

Francesca Davoli, Marta De Barba, Ettore Randi*

MONITORAGGIO GENETICO NON INVASIVO DELL'ORSO BRUNO (*URSUS ARCTOS*) IN VENETO

Abstract - Non-invasive genetic monitoring is one of the primary ways to get information about brown bears in the Central-Eastern Alps. Monitoring is defined as "genetic" because based on molecular markers analysis and "non invasive" because the DNA is from biological samples collected on the field, minimizing any potential harm to the animals. The collected samples analysis, over large areas and over time, allows to identify individuals and their sex. The data processing generates valuable information on demographics (population size, reproduction, mortality), ecology (distribution, habitat use) and genetic variability. For wild populations, the growing development and application of molecular markers provide new possibilities for establishing kinship and reconstructing pedigrees in species where such information cannot be obtained from field observations alone. These skills are crucial to follow the trend of the population over time and to ensure the appropriate management measures for the conservation of the species. The application of non-invasive genetic monitoring in Veneto allowed to determine the presence and to follow major movements of six different bears, from 2007 to 2012.

Keywords: Non-invasive genetic monitoring, microsatellites, molecular sexing, *Ursus arctos*, Veneto region.

Riassunto - Il monitoraggio genetico non invasivo rappresenta oggi uno dei metodi principali per ottenere informazioni sull'orso bruno nelle Alpi centro-orientali. Il monitoraggio è definito "genetico" perché basato sull'analisi di marcatori molecolari presenti nel DNA e "non invasivo" perché il DNA analizzato è ricavato da campioni biologici raccolti sul territorio senza la necessità di manipolare direttamente gli animali. L'analisi dei campioni, raccolti su una vasta area e nel tempo, consente di identificare gli individui presenti e il loro sesso. Dall'elaborazione di questi dati di base si ottengono preziose informazioni sulla demografia (dimensioni della popolazione, riproduzione, mortalità), ecologia (distribuzione, uso dell'habitat) e variabilità genetica e si possono ricostruire le relazioni di parentela tra gli individui. Queste conoscenze sono di fondamentale importanza per seguire l'andamento della popolazione nel tempo e garantire le adeguate misure gestionali per la conservazione della specie. L'applicazione del monitoraggio genetico non-invasivo in Veneto ha consentito di determinare la presenza e di seguire gli spostamenti principali di sei orsi diversi, dal 2007 al 2012.

Parole chiave: monitoraggio genetico non-invasivo, microsatelliti, sessaggio molecolare, *Ursus arctos*, Regione Veneto.

*Francesca Davoli- e-mail: francesca.davoli@isprambiente.it; Marta De Barba - Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA) CNRS UMR 5553, Univ. Joseph Fourier, BP 53 - 38041 Grenoble Cedex 9, France e-mail: marta.debarba@gmail.com; Ettore Randi - e-mail: etttore.randi@isprambiente.it - Laboratorio di Genetica - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) - Via Ca' Fornacetta, 9 - 40064 Ozzano Emilia (BO)

Introduzione

Le convenzioni internazionali e le direttive comunitarie (Convenzione sulla Diversità Biologica - CBD, Convenzione di Washington - CITES, Direttiva Habitat) prevedono l'attuazione di programmi di rilevamento e monitoraggio dello status e della dinamica delle popolazioni indispensabili per ottenere le informazioni necessarie alla realizzazione di adeguati piani di conservazione e gestione delle specie di carnivori minacciate e soggette a tutela e fra queste l'orso bruno. Tuttavia, lo studio dei carnivori presenta notevoli difficoltà operative poiché lupo, orso, lontra, gatto selvatico e lince vivono a basse densità ed in ambienti spesso difficilmente accessibili e sono animali elusivi e spesso notturni che possono compiere notevoli spostamenti. Le tecniche di biologia molecolare permettono l'identificazione ed il monitoraggio su larga scala di queste specie, grazie all'analisi dei campioni biologici raccolti sul campo in maniera non invasiva, cioè senza la cattura e la manipolazione diretta degli animali. I campioni non invasivi sono costituiti in genere da escrementi, peli, tracce di sangue e urina e l'analisi del DNA da essi ricavato permette di ottenere informazioni sulla presenza e la distribuzione della specie, sul numero di individui presenti nella popolazione, sull'identificazione dei gruppi familiari, sulla ricostruzione delle dispersioni giovanili ed individuali e della diversità genetica presente, anche in caso di popolazioni criptiche.

La genetica non invasiva, quindi, permette di identificare il genotipo individuale, il sesso, il gruppo familiare e la popolazione di appartenenza, realizzando, su ampia scala geografica e a costi contenuti, programmi di monitoraggio della presenza e abbondanza della specie. Questi programmi, coordinati da ISPRA e MATTM, sono realizzati in collaborazione con numerose Amministrazioni locali e Parchi nazionali, regionali e provinciali e grazie alla partecipazione attiva di centinaia di persone (CFS, CTA, guardie provinciali, guardie ecologiche, cacciatori, studenti, volontari, ...) che, formate tramite specifici corsi, contribuiscono alla raccolta dei campioni ed alla valutazione dei risultati. I data-base informatizzati, contenenti, fra gli altri dati, i genotipi geore-

ferenziati, sono utilizzati dalle amministrazioni e dagli enti parco per la definizione degli specifici interventi istituzionali di monitoraggio e conservazione.

Metodi di campionamento, raccolta e conservazione dei campioni

Il monitoraggio genetico dell'orso sulle Alpi si basa principalmente sul campionamento non-invasivo di peli ed escrementi raccolti sul territorio senza disturbo per gli animali e, occasionalmente, sul prelievo di campioni di sangue, tessuto, ossa da orsi rinvenuti morti o manipolati in occasione di eventuali operazioni di cattura. Esistono vari metodi per campionare peli e feci di orso in modo non invasivo e la scelta del disegno e della tecnica di campionamento più adatti dipende sia dal contesto ambientale che dagli obiettivi del monitoraggio. Il disegno di campionamento può essere, infatti, o di tipo sistematico, se la raccolta dei campioni è effettuata a intervalli regolari, per un periodo limitato di tempo e su un areale predefinito, oppure opportunistico, se invece la raccolta non risponde a precise regole temporali e spaziali.

Una tecnica efficace per il campionamento sistematico di peli di orso è quella delle "trappole per peli", che utilizzano un'esca odorosa per attrarre l'orso all'interno di un'area delimitata da filo spinato sul quale rimangono impigliati i peli al



Fig. 1. DG2 ripreso dalla fotocamera fissa il 28 aprile 2012.

passaggio dell'orso. Altre tecniche applicabili in modo sistematico sono: la raccolta di peli da grattatoi naturali, come per esempio gli alberi su cui gli orsi, soprattutto maschi, hanno l'abitudine di sfregarsi per marcare il territorio lasciando il loro odore e dei peli (Fig. 1), e la ricerca di peli e feci lungo una rete di sentieri (transetti).

Alternativamente, i campioni possono essere raccolti in modo opportunistico, ossia in seguito al rinvenimento del tutto casuale di peli o escrementi durante le regolari attività del personale operante sul territorio, o in seguito a segnalazioni da parte di terzi. A questa categoria appartengono anche i campioni raccolti presso i siti di danno alle proprietà e alle attività agro-silvo-pastorali. Il DNA è una molecola delicata, che si degrada facilmente a causa dell'umidità, di sbalzi di temperatura, luce (radiazione UV) e interazione con diversi prodotti chimici. Peli ed escrementi campionati in modo non invasivo sul territorio contengono, quindi, DNA degradato, presente in scarsa quantità e spesso contaminato da muffe e batteri. Anche la contaminazione del campione da altre fonti di DNA, infatti, può compromettere i risultati delle analisi, ma l'appropriata raccolta e conservazione dei campioni possono minimizzare questi problemi. Nel caso dei peli, il DNA è ottenuto da cellule del follicolo pilifero, mentre nel caso delle feci, da cellule di sfaldamento del tratto intestinale dell'orso che le ha deposte, che rimangono sulla superficie esterna dell'escremento. Come già sottolineato, peli ed escrementi, una volta deposti, sono esposti all'azione di umidità, raggi UV della luce solare, batteri e muffe che possono fortemente degradare il DNA quanto più è prolungata la sua esposizione all'ambiente. È perciò molto importante che i campioni biologici siano raccolti il prima possibile dal momento della loro deposizione e conservati adottando precauzioni volte a minimizzare la degradazione del DNA presente ed evitare contaminazioni endogene (tra un campione e l'altro) ed esogene (da DNA umano e DNA estraneo alla specie orso), massimizzando così la resa di genotipizzazione.

Metodi di analisi del DNA

I campioni biologici raccolti costituiscono, come abbiamo detto, la fonte di DNA per le analisi

genetiche. La prima fase delle analisi è, infatti, l'estrazione del DNA dai campioni, per liberarlo dalle cellule che lo contengono, isolarlo, e renderlo utilizzabile per le successive procedure. Per questa operazione sono sufficienti alcuni follicoli piliferi (in genere più di 5) e una piccola porzione del campione di fece raccolto (basta una quantità pari ad un'unghia). Il DNA estratto, in particolare il poco e degradato DNA dei campioni non invasivi di peli e feci, non è però sufficiente per svolgere le successive analisi genetiche e deve prima essere amplificato attraverso la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR). La PCR è una reazione enzimatica che permette di realizzare in vitro, e molto più velocemente di quanto avvenga in natura, il normale processo che porta alla divisione e alla duplicazione cellulare, ottenendo, nell'arco di un paio d'ore, milioni di copie della sequenza di DNA che si vuole studiare (marcatore molecolare), producendone così una quantità sufficiente per poterla analizzare. L'amplificazione di diversi marcatori molecolari è alla base delle analisi che portano all'identificazione della specie, dell'individuo e del sesso. Vediamone i dettagli. L'identificazione della specie ha lo scopo di distinguere i campioni di orso bruno da quelli di altre specie, soprattutto altri carnivori che occupano lo stesso areale. Il marcatore molecolare generalmente usato per queste analisi è una regione del DNA mitocondriale (il DNA contenuto nei mitocondri delle cellule) che presenta variabilità interspecifiche, come, per esempio, differenze nella lunghezza oppure nella composizione della sequenza (SHIELDS F.G. & KOCHER T.D., 1991). Dopo l'amplificazione con PCR, questa variabilità può essere visualizzata con tecniche di analisi quali il sequenziamento del DNA e la successiva corsa elettroforetica su sequenziatore automatico (Fig. 2). Una volta stabilito che si tratta di orso si può passare all'identificazione individuale, cioè a determinare l'orso cui appartengono i peli o gli escrementi raccolti. Questa analisi si basa sulla definizione del profilo genetico (genotipo multilocus) dell'individuo ed è svolta tramite la tipizzazione di un numero di marcatori molecolari, chiamati loci microsatelliti, necessario e sufficiente per distinguere un orso da un altro, come se fosse un'impronta digitale genetica (DNA *fingerprinting*). I microsatelliti (o

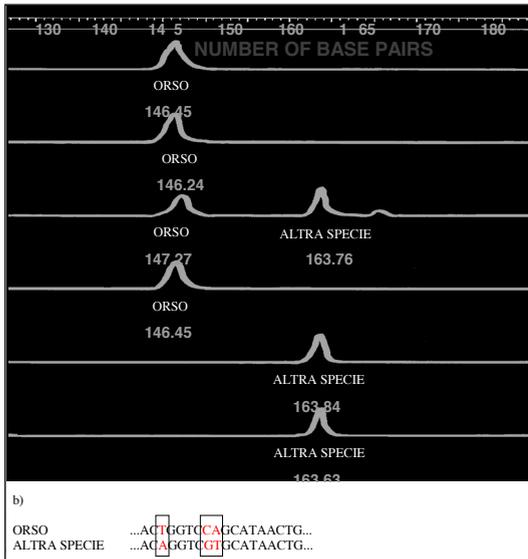
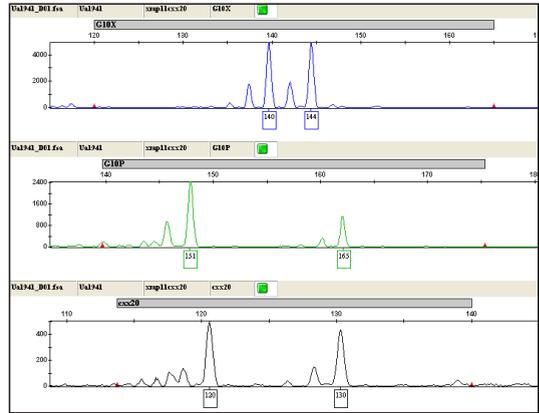


Fig. 2. a) Elettroferogramma illustrante l'identificazione dei campioni di orso da quelli di altre specie tramite corsa elettroforetica di un frammento amplificato di DNA mitocondriale che presenta lunghezze diverse nell'orso rispetto ad altre specie. b) Confronto di due sequenze di DNA, ottenute tramite amplificazione e successivo sequenziamento di una regione del DNA mitocondriale, che permette di identificare i campioni di orso da quelli di altre specie in base a differenze nella composizione della sequenza.

short tandem repeats - STR) sono regioni di DNA ripetitivo non codificante costituite da unità di ripetizione molto corte (da 1 a 5 paia di basi) disposte in tandem, cioè senza interruzioni, e sparse in tutto il DNA nucleare (DNA contenuto nel nucleo delle cellule). I microsatelliti, per loro natura, presentano un alto livello di polimorfismo, dovuto alla differente lunghezza della sequenza fra gli individui di una popolazione (diverso numero di unità di ripetizione - *repeat* - che la costituiscono) e sono quindi marcatori molto informativi negli studi di genetica di popolazione. Il confronto genetico potrà, infatti, essere effettuato paragonando la diversa lunghezza dei microsatelliti presenti in individui differenti. Queste differenze nelle dimensioni della sequenza di un locus microsatellite danno luogo a varianti, dette alleli, che possono essere visualizzate, analogamente a quanto visto per il DNA mitocondriale, tramite una corsa elettroforetica su sequenziatore automatico, in seguito ad amplificazione con PCR. L'analisi e la determinazione degli alleli in più loci microsatelliti (per l'orso sulle Alpi sono

ORSO 1



ORSO 2

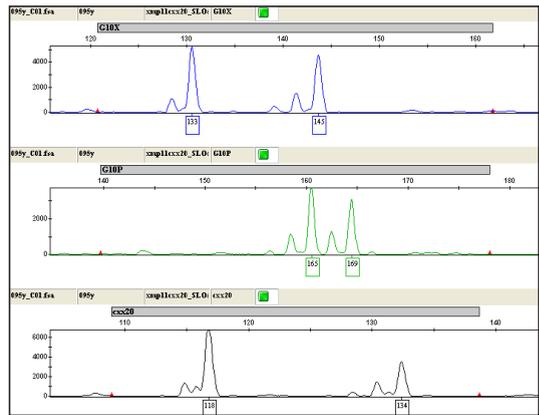


Fig. 3. Profilo genetico di due orsi a tre loci microsatelliti come si presenta all'elettroferogramma a seguito di corsa elettroforetica su un sequenziatore automatico. I picchi rappresentano gli alleli (varianti nella lunghezza del locus microsatellite) le cui dimensioni sono espresse in paia di basi. Per ogni locus microsatellite un individuo eredita un allele dalla madre e un allele dal padre. La determinazione degli alleli presenti a più loci fornisce il profilo genetico (genotipo multilocus) di un individuo e consente di distinguerlo da quello di altri individui. Nell'esempio, l'ORSO 1 e l'ORSO 2 si distinguono per diverse combinazioni alleliche ai tre loci esaminati. L'analisi di un numero sufficiente di loci è necessaria per identificare correttamente gli individui.

attualmente sufficienti 10 loci) forniscono, come detto, il genotipo multilocus di un individuo e consentono di distinguerlo da quello di altri orsi (Fig. 3). Per quello che riguarda le analisi genetiche svolte sull'orso bruno sulle Alpi, i genotipi individuali sono identificati tipizzando i seguenti 10 loci microsatelliti: G10X, G10M, G10P, G1D, MU11, MU15, MU23, MU50, MU59 e cxx20 (TABERLET ET AL., 1997, PAETKAU ET AL., 1998, BELLEMAIN

E. & TABERLET P., 2004). Per avere la certezza di distinguere due orsi strettamente imparentati, come nel caso di due fratelli, si deve calcolare la stima della probabilità di identità tra i genotipi (PID). La PID è la probabilità che due individui diversi abbiano per caso lo stesso genotipo ai loci analizzati. Il calcolo della PID è fondamentale nella pianificazione e nell'analisi dei dati ricavati da un campionamento non invasivo, perché, basandosi sulle frequenze alleliche di un campione di riferimento, permette di stabilire il numero di loci necessario per ottenere un determinato livello di probabilità, abbastanza basso da poter distinguere fra loro, appunto, individui strettamente imparentati. Nel caso della popolazione di orso bruno sulle Alpi, stimata in un numero di esemplari inferiore ai 50 individui, si ritiene che, per essere certi di non assegnare lo stesso genotipo a due o più individui diversi, la probabilità di identità possa aggirarsi attorno ad un valore PID 0.01. Nel calcolo della PID si deve tener conto del fatto che alcuni degli individui in esame sono legati da relazioni di parentela e, quindi, presentano genotipi molto più simili rispetto ad individui non imparentati. La PID tra genotipi legati da relazioni di parentela di primo grado (PID_{sib}) è quindi molto più elevata della PID tra campioni non imparentati. Poiché la variabilità genetica osservata nella popolazione di orso bruno presente sulle Alpi centro-orientali è ridotta in confronto alla variabilità osservata in altre popolazioni (ad esempio quella slovena di origine), si può presumere che la popolazione effettiva sia pure ridotta e che esista un certo grado di inbreeding. Tuttavia, non è certamente realistico assumere che il livello medio di parentela nella popolazione corrisponda all'inbreeding atteso fra fratelli (PID_{sib}). I valori "reali" di probabilità di identità, quindi, saranno compresi fra quelli delle stime di PID e PID_{sib} . La necessità di dover identificare i genotipi di individui strettamente imparentati tra loro rende necessario l'utilizzo di un numero di loci sensibilmente più elevato, rispetto a quello utile per individuare i genotipi di campioni non imparentati. La PID_{sib} e la PID_{unb} (unbiased = corretta per le dimensioni del campione) sono calcolate utilizzando il software Gimlet (VALIERE N., 2002). La determinazione del sesso degli orsi identificati si basa sull'analisi di marcatori molecolari

collocati sui cromosomi sessuali. Nell'orso e gli altri mammiferi, il sesso femminile è determinato dalla presenza di due copie del cromosoma X (XX), mentre il sesso maschile da una copia del cromosoma X e una del cromosoma Y (XY). Uno dei sistemi più usati per la determinazione molecolare del sesso nell'orso sfrutta il fatto che il marcatore impiegato è presente con sequenze di lunghezza diversa sul cromosoma X e Y. È così possibile, grazie all'amplificazione con PCR del marcatore e successiva corsa al sequenziatore automatico del frammento di DNA amplificato, determinare la presenza di due (XY) o di un solo (XX) frammento e quindi stabilire il sesso dell'animale. Una volta ricostruito il genotipo individuale, quindi, ogni campione è sessualmente identificato amplificando tramite PCR il gene dell'amelogenina (AMG; ENNIS S. & GALLAGHER T.F., 1994). Come detto, è possibile identificare il sesso dell'individuo in quanto il gene è fiancheggiato da sequenze leggermente diverse nei due sessi e, determinandole, si può risalire al sesso. Il gene dell'amelogenina si trova sulla regione omologa dei cromosomi sessuali X e Y, ma non presenta frammenti di uguale lunghezza su entrambi i cromosomi: sul cromosoma Y, infatti, nell'orso bruno presenta una delezione di circa 54 basi. Ad un'elettroforesi capillare, quindi, la presenza di due picchi indica un maschio, mentre un solo picco corrisponde ad una femmina (Fig. 4).

L'utilizzo del gene AMG fornisce un vantaggio immediato ed intrinseco rispetto agli altri marcatori: l'amplificazione del frammento originato dal cromosoma X rappresenta un ottimale controllo interno di amplificazione, dal momento che viene effettuata contestualmente all'amplificazione del frammento diagnostico vero e proprio (il frammento Y) ed utilizzando esattamente gli stessi primers. Nel sistema AMG le differenze in efficienza di amplificazione tra la banda diagnostica (originata dal frammento presente sul cromosoma Y) e quella di controllo (originata dal frammento presente sul cromosoma X) sono, quindi, annullate. La determinazione dei genotipi dei singoli orsi, in ultima analisi, permette di eseguire l'analisi delle parentele, l'identificazione dei genitori dei nuovi cuccioli e la ricostruzione delle relazioni genealogiche di un gruppo di orsi

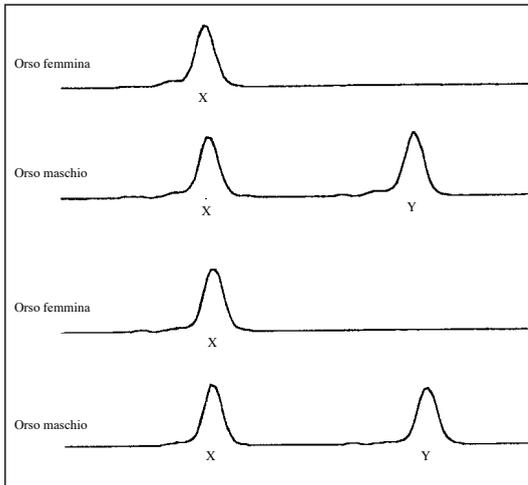


Fig. 4. Elettroferogramma illustrante il sistema di sessaggio molecolare basato sull'amplificazione e corsa elettroforetica al sequenziatore automatico di un frammento di DNA presente su entrambi i cromosomi sessuali, ma con lunghezze diverse sui cromosomi X e Y. Come illustrato nell'esempio in figura, nelle femmine viene amplificato solo il frammento sul cromosoma X perché hanno due copie di questo cromosoma, mentre nei maschi viene amplificato il frammento su entrambi i cromosomi perché hanno una copia del cromosoma X e una del cromosoma Y.

o all'interno dell'intera popolazione. Un individuo, infatti, eredita metà del proprio patrimonio genetico dalla madre e metà dal padre, per cui, confrontando il profilo genetico di un orso con quello dei presunti genitori, è possibile escludere oppure attribuire con ragionevole certezza la paternità e la maternità presunte (Fig. 5). Nel caso in cui si verifichi la presenza di femmine e/o di cuccioli fra gli animali campionati, possiamo quindi calcolare le relazioni di parentela esistenti fra gli individui. Conoscere il numero dei nuovi nati e i rapporti di parentela tra gli individui è un presupposto fondamentale per controllare l'evoluzione nel tempo della popolazione e di conseguenza prendere le decisioni gestionali più idonee. Per ricostruire le genealogie dei cuccioli identificati geneticamente si confrontano i dati ottenuti utilizzando due diverse metodologie, una sviluppata dal software PARENTE (CERCUEIL A. ET AL., 2002) e l'altra dal software COLONY, Version 2.0.0.1 (Z.S.L., Zoological Society of London © Copyright by JINLIANG WANG, 2008), due pacchetti statistici che permettono di ricostruire le relazioni di parentela partendo da dati molecolari pro-

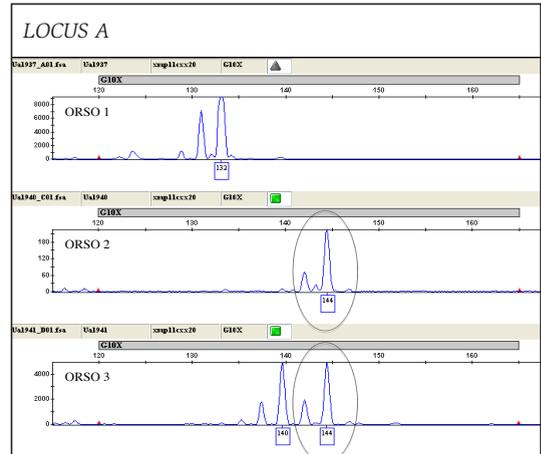


Fig. 5. Confronto del profilo genetico di tre orsi ad un locus microsatellite per la determinazione degli individui parentali. I picchi rappresentano gli alleli come appaiono all'elettroferogramma dopo la corsa elettroforetica al sequenziatore automatico. Le dimensioni degli alleli sono espresse in paia di basi. Per ogni locus microsatellite, un individuo eredita un allele dalla madre e un allele dal padre. L'ORSO 3, di cui si vogliono determinare i genitori, non ha nessun allele in comune con l'ORSO 1, ma ha un allele in comune con l'ORSO 2. In base a questo principio, l'ORSO 1 può essere escluso come genitore dell'ORSO 3, mentre l'ORSO 2 non può essere escluso. Dal confronto dei profili genetici ottenuti analizzando un numero sufficiente di loci microsatelliti è possibile stabilire se l'ORSO 2 sia o no un genitore dell'ORSO 3.

venienti da marcatori diploidi codominanti come i microsatelliti. PARENTE si basa sul principio di compatibilità allelica (eredità genetica mendeliana) fra i cuccioli identificati e i potenziali genitori, assegnando un valore di probabilità a ciascun probabile genitore, mentre COLONY si basa sul concetto di maximum likelihood, o della probabilità più verosimile, come descritto dal metodo di WANG J. & SANTURE A.W. DEL 2009.

Le varie tipologie di campioni biologici di orso (tessuto, sangue, ossa, peli e feci) sono analizzate con le stesse tecniche di analisi genetica, ma, poiché peli ed escrementi trovati sul territorio contengono DNA degradato e presente in scarsa quantità, il DNA di questi campioni presenta maggiori difficoltà di analisi rispetto al DNA di campioni di tessuto o di sangue. Perciò è necessario che, in tutte le fasi delle analisi genetiche di campioni non invasivi, siano adottate delle procedure addizionali per evitare il rischio di contaminazione da DNA esogeno e per il controllo di qualità, utilizzando protocolli standardizzati.

Questi protocolli includono l'utilizzo di stanze apposite per l'estrazione del DNA e la preparazione della PCR (queste stanze sono separate da quelle in cui viene analizzato il DNA amplificato), l'uso di controlli negativi e positivi, il controllo delle strumentazioni e dei reagenti, la replica dei risultati e l'impiego di procedure statistiche per il controllo degli errori di genotipizzazione e per garantire l'affidabilità dei risultati. L'elevata probabilità di errore associata alla tipizzazione di campioni ottenuti mediante procedure di campionamento non-invasive (bassa resa di PCR, amplificazione di falsi alleli o drop-out di un allele in alcuni genotipi eterozigoti), quindi, impone l'ottimizzazione di procedure di laboratorio idonee alla minimizzazione degli errori.

A tale scopo è stato adottato l'approccio delle amplificazioni multiple (TABERLET P. ET AL., 1996) che consiste nella ripetizione in serie delle amplificazioni fino ad ottenere un genotipo giudicato affidabile.

L'affidabilità delle tipizzazioni è stabilita attraverso una procedura di valutazione statistica, effettuata dal software Reliotype (MILLER C.R. ET AL., 2002), che, basandosi sulle frequenze alleliche osservate nella popolazione di riferimento e sul numero di repliche di PCR che hanno fornito risultati concordanti, calcola la probabilità che un determinato genotipo osservato possa effettivamente appartenere alla popolazione in analisi. Se la probabilità osservata supera la soglia di significatività del 95%, il genotipo è considerato sicuro. In caso contrario, il programma propone di effettuare una serie di ulteriori repliche sui loci la cui affidabilità è al di sotto della soglia di significatività.

Pertanto, sulla base dei risultati di Reliotype, il numero di PCR per ogni campione per ogni locus microsatellite varia da un minimo di 4 ad un massimo di 8, fino a raggiungere il risultato definitivo. Se, concluse le ulteriori analisi, l'affidabilità del genotipo continua ad essere inferiore al 95%, il campione viene scartato o assegnato come

genotipo dubbio, mentre in caso contrario viene accettato, identificato ed aggiunto al database.

Risultati delle tipizzazioni nella Regione Veneto

Dal 2007 al 2012 sono stati raccolti in Veneto 156 campioni presumibilmente appartenenti ad orso bruno sul territorio delle tre province confinanti con il Trentino Alto Adige: 121 campioni in provincia di Belluno, 31 in provincia di Verona e 4 in provincia di Vicenza di cui 59 feci, 96 peli e 1 campione di urina (40 feci e 81 peli in provincia di Belluno e 17 feci, 13 peli e 1 campione di urina in provincia di Verona, 2 feci e 2 peli in provincia di Vicenza).

A causa delle problematiche legate al DNA estratto da campioni non invasivi, è stato possibile determinare il genotipo solo di 85 campioni su 156, ottenendo una resa di genotipizzazione del 54,5% e individuando un totale di 6 orsi maschi (5 in provincia di Belluno di cui uno in comune con Verona e Vicenza, 2 in provincia di Verona e 1 in provincia di Vicenza) (v. Fig. 6).

I sei orsi identificati sono MJ4, KJ2G2, DG2, M4, M5 e Gen15. MJ4, KJ2G2 e DG2 sono tre orsi che gravitano da anni a cavallo fra Trentino Alto Adige, Veneto e Friuli Venezia Giulia; M4, invece, è stabile nel veronese ed è un individuo che già nel corso del 2010 era stato campionato a Verona nel territorio del Comune di Ferrara Monte Baldo (in

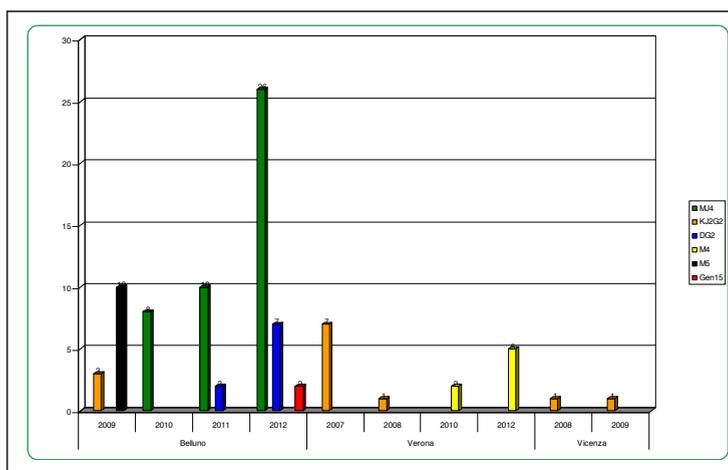


Fig. 6. Orsi identificati fra il 2007 e il 2012 in Veneto. In ordinate il numero di campioni raccolti per singolo orso.

cui è stato campionato anche nel corso del 2012), mentre nel 2011 è stato campionato una sola volta nel territorio del comune di Avio (Trentino). Gli ultimi due orsi individuati, invece, meritano un discorso a parte.

Nel corso del 2012, infatti, per la seconda volta dall'inizio del monitoraggio genetico nelle Alpi centro-orientali, un orso di origine slovena (Gen15), già identificato in Friuli Venezia Giulia nel corso del 2010 e del 2011, si è spinto fino al bellunese (Comune di Tambre), facendo ben sperare in un avvicinamento e futuro ricongiungimento delle popolazioni alpina e dinarico-balcanica, obiettivo a lungo termine del progetto Life Ursus. La prima volta che le analisi genetiche hanno permesso di individuare un orso geneticamente sconosciuto in Trentino, proveniente quindi dalla popolazione balcanica in migrazione da est, fu nel 2009, in occasione dell'identificazione di M5, il famoso orso "Dino" responsabile di numerosi danni alle attività agro-pastorali (in particolare pollai e recinti di pecore e asini). In Fig. 7, infine, sono riportati i dati ottenuti in base alla tipologia del campione. Come si vede, fatta eccezione per M5, dotato di radiocollare, i due animali più frequentemente campionati (KJ2G2 E MJ4) hanno dato risultati apprezzabili anche all'analisi genetica delle feci, probabilmente perché gli escrementi sono più disponibili sul territorio ed è più probabile raccogliergli di freschi, mentre i tre individui campionati solo occasionalmente (DG2,

M4 e Gen15) sono stati identificati più spesso a partire dal DNA di buona qualità che è presente nel bulbo dei peli.

Discussione dei risultati

I genotipi campionati in Veneto dal 2007 al 2012 sono quindi sei, tutti maschi. Seguono alcune considerazioni sui singoli individui.

Genotipo M5. Rilevato per la prima volta nel mese di aprile del 2009 nel bellunese, questo esemplare maschio con ogni probabilità appartiene alla popolazione slovena, e nel mese di ottobre di quell'anno, in occasione della cattura effettuata dal personale del Corpo Forestale Trentino ai fini di controllo e monitoraggio, si stimava un'età compresa tra i 3 e i 5 anni. Nel 2009 è stato rilevato geneticamente in provincia di Belluno, nei comuni di Pieve di Cadore, Longarone, Cortina d'Ampezzo, Lozzo di Cadore, Seren del Grappa, Cencenighe, Danta di Cadore, Gosaldo, Cesiomaggiore, Sovramonte e nel Primiero, mentre nel 2010, con i rilevamenti effettuati tramite radio collare satellitare, è stato possibile ricostruire il lungo tragitto che lo ha portato dall'altopiano di Asiago alla porte di Verona.

Genotipo KJ2G2. Si tratta di un orso maschio nato in Trentino nel 2006. In Veneto, è stato campionato per la prima volta in provincia di Verona nei comuni di Brenzone e Malcesine; nel 2008 questo esemplare dapprima frequenta ancora il territorio Veronese (comune di Brenzone, Malcesine e Ferrara Monte Baldi) e successivamente intraprende una migrazione verso est stabilendosi sull'altopiano di Asiago (Vicenza). Nel 2009 viene monitorato ancora in Asiago per poi spostarsi verso nord, nel mese di maggio in Provincia di Belluno dove viene campionato due volte (comuni di Longarone e Auronzo di Cadore). È sempre del 2009 la sua prima segnalazione in Austria (giugno) e in Friuli-Venezia Giulia (settembre, in Carnia, in località Varmost, in occasione di una predazione). Stiamo

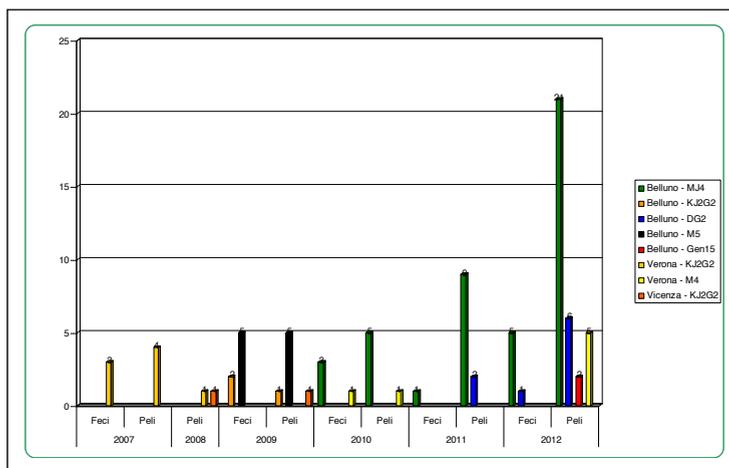


Fig. 7. Orsi identificati in Veneto fra il 2007 e il 2012 in base al tipo di campione biologico raccolto. In ordinate il numero di campioni raccolti per singolo orso.



Fig. 8. Distribuzione dei campionamenti dell'orso MJ4 in Veneto nel corso del 2012. La dimensione dei punti è proporzionale al numero di campioni trovati in quella località, mentre il colore si riferisce alla data di raccolta dei campioni: rosso per i campioni più vecchi (aprile 2012), fino ad arrivare all'azzurro per i più recenti (novembre 2012).

parlando, quindi, di un orso di origine trentina che dal 2009 al 2012 ha compiuto enormi spostamenti, attraversando il Veneto e il Friuli fino ad arrivare in Lombardia: l'08/05/2010 in provincia di Brescia (comune di Collio, località Pezzeda Mattina) e il 15/05/2010 in Provincia di Sondrio (comune di Buglio, località Erbolo), spingendosi fino in Austria

Genotipo MJ4. Si tratta di un orso maschio nato nel 2005 dalla coppia Maya e Joze e campionato tutti gli anni dal 2006 ad oggi. Nel corso del 2012 è stato campionato 43 volte: 17 volte in Provincia di Trento (Comuni di Bleggio, Covelò, Prada, San Lorenzo in Banale, Stenico, Terlago e Vezzano) fra il 10 maggio e l'11 luglio e 26 volte in Provincia di Belluno (Comuni di: Castellavazzo, Forno di Zoldo, Longarone, Ospitale di Cadore, Sedico e Zoppè di Cadore) il 18 aprile e fra il primo luglio e il 20 novembre.

Sembra quindi che, dopo aver passato l'inverno nel bellunese, l'animale si sia spostato in Trentino e, dopo una decina di giorni di luglio di andirivieni fra la Provincia di Trento e quella di Belluno, si sia nuovamente trasferito in Veneto, forse per prepararsi a passare l'inverno ancora in Provincia di Belluno. Si conferma, comunque, anche nel corso del 2012, la tendenza dell'animale a non stabilirsi per periodi prolungati in una particolare zona, ma a compiere ampi spostamenti attraversando più volte nel corso dell'anno il confine fra

le Regioni (Veneto e Trentino). Si precisa che per il 2012 il campionamento svolto in Regione Friuli Venezia Giulia non ha fornito risultati nella zona di confine con il Veneto e quindi mancano i dati di spostamento di MJ4 sul confine orientale. La Fig. 8 mostra la distribuzione geografica dei campionamenti di MJ4 in provincia di Belluno, tra la valle del Piave e la valle di Zoldo.

Genotipo DG2. Si tratta di un orso maschio nato nel 2006 dalla coppia Daniza e Gasper e praticamente stabile in Friuli Venezia Giulia, ma probabilmente svernante in Provincia di Belluno nel 2011. Gli ultimi campionamenti del 2011, infatti, risalgono al 3 settembre (Ospitale di Cadore, località Tartana – Tovanelle) e al 24 dicembre (Castellavazzo, località Diane). Durante il 2012, ma anche in questo caso si sottolinea la mancanza di risultati sui campioni provenienti dalla Regione Friuli Venezia Giulia, che avrebbero permesso di ricostruire meglio il quadro degli spostamenti, è stato campionato 7 volte, tutte in Provincia di Belluno (Comuni di Longarone e Ospitale di Cadore) fra il 28 aprile e il 24 agosto, date che confermano il probabile svernamento in zona (Fig. 9; Fig. 1).

Genotipo M4. Si tratta di un orso chiaro ("biondo", da ciò che si evince dai peli che sono giunti in laboratorio), fratello di M3 (l'orso bianco stabile in Trentino-Alto Adige) e figlio di KJ2 e Joze,



Fig. 9. Distribuzione dei campionamenti dell'orso DG2 in Veneto nel corso del 2012, rinvenuti solo in provincia di Belluno. La dimensione dei punti è proporzionale al numero di campioni trovati in quella località, mentre il colore si riferisce alla data di raccolta dei campioni: rosso indica i campioni più vecchi (aprile 2012), mentre il colore verde quelli più recenti (agosto 2012).

nato nel 2008. Questo orso è stato campionato 13 volte in tutto dal 2010 ad oggi e cinque volte nel corso del 2012, in Provincia di Verona (Comuni di Ferrara di Monte Baldo e Malcesine). In aprile del 2010 si trovava in Trentino (Comune di Villa Lagarina), ma in settembre-ottobre dello stesso anno veniva già campionato nel Comune di Ferrara di Monte Baldo (VR).

Per il 2011 possiamo contare su un solo ritrovamento, in territorio trentino, ma sempre in zona (Comune di Avio), per arrivare, infine ai ritrovamenti del 2012, ancora una volta nel Comune di Ferrara di Monte Baldo (VR) e in più anche nel comune di Malcesine.

L'orso M4 sembra stabile nella zona del Monte Baldo, sarebbe perciò interessante intensificare il campionamento nel veronese per ricostruire meglio gli spostamenti dell'animale.

Purtroppo, la totale assenza di georeferenziazioni per i campioni inviatici dalla Provincia di Ve-

rona, non ci permette di mappare i ritrovamenti.

Genotipo Gen15. Il Gen15 è un orso autonomamente entrato in Italia dalla Slovenia e identificato per la prima volta in Friuli Venezia Giulia nel corso del 2010 (Foresta di Tarvisio). Nel corso del 2011 l'orso sembra stabile in Carnia e il 6 luglio 2012 è stato campionato anche in Provincia di Belluno nel Comune di Tambre – Località Nigonnella (si sottolinea sempre l'assenza del dato che riguarda il Friuli per quest'anno).

L'animale sembra quindi spostarsi progressivamente verso Ovest, alimentando le speranze che riesca a raggiungere le femmine presenti in Trentino per poi riprodursi, contribuendo a dare nuova vitalità genetica alla popolazione delle Alpi Centro-Orientali.

Il Gen15, infatti, presenta due alleli completamente assenti nella popolazione reintrodotta nelle Alpi centro-orientali: l'allele 177 al locus G10P e l'allele 135 al locus G10X.

Bibliografia

- BELLEMAIN E., TABERLET P. (2004). *Improved non invasive genotyping method: application to brown bear (Ursus arctos)*. Mol. Ecol. Notes, 4, 519-522.
- CERCUEIL A., BELLEMAIN E., MANEL S. (2002). *Parente: Computer program for parentage analysis*. J Hered, 93(6),458-459.
- ENNIS, S. & GALLAGHER, T. F. (1994). *A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus*. Animal Genetics, 25, 425-427.
- MILLER C. R., JOYCE P., WAITS L. P. (2002). *Assessing allelic dropout and genotyping reliability using maximum likelihood*. Genetics, 160, 357-249.
- PAETKAU D., SHIELDS G. F., STROBECK C. (1998). *Gene flow between insular, coastal and interior populations of brown bears in Alaska*. Mol. Ecol., 7(10), 1283-1292.
- SHIELDS F. G. & KOCHER T. D. (1991). *Phylogenetic relationships of North American ursids based on analysis of mitochondrial DNA*. Evolution, 45:218-221.
- TABERLET S., GRIFFIN B., GOOSSENS S. ET AL. (1996). *Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR*. Nucleic Acids Research, 26, 3189-3194.
- TABERLET P., CAMARRA J.-J., GRIFFIN S., UHRÈS E., HANOTTE O., WAITS L. P., DUBOIS-PAGANON C., BURKE T., BOUVET J. (1997). *Non-invasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population*. Mol. Ecol., 6, 869-876.
- VALIERE N. (2002). *GIMLET: a computer program for analyzing genetic individual identification data*. Mol. Ecol. Notes, 2, 377-379.
- WANG J. & SANTURE A.W. (2009). *Parentage and sibship inference from multi-locus genotype data under polygamy*. Genetics, 181, 1579-1594.