

LA CONSERVAZIONE DELL'ORSO BRUNO
(*URSUS ARCTOS*) IN APPENNINO: IL SUPPORTO
DELLA GENETICA NON INVASIVA

RITA LORENZINI¹, MARIO POSILLICO², LEONARDO GENTILE³,
ROSARIO FICO¹, LUCIANO SAMMARONE²

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Campo Boario, 64100 Teramo, Italy

² Corpo Forestale dello Stato, Ufficio Foreste Demaniali di Castel di Sangro, Via Sangro 45, 67031 Castel di Sangro, AQ, Italy

³ Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise, Via S. Lucia, 67032 Pescasseroli, AQ, Italy
Corrispondenza: Rita Lorenzini, Tel: ++39 08613321; Fax: ++39 0861332251
E-mail: r.lorenzini@izs.it

ABSTRACT – Conservation of the brown bear *Ursus arctos* in the Apennines: a non-invasive genetic approach. Molecular techniques were used to assess individual identification for 24 brown bears (*Ursus arctos*) from the Apennine population through noninvasive sampling. Shed hairs were collected and used as a source of DNA to derive single genotype profiling at 12 microsatellite loci. Genotypes of 11 bears were obtained from tissues or blood of dead or caught animals. Average expected heterozygosity ($H_E = 0.432$) and mean number of alleles per locus ($n_A = 2.1$) showed that the level of genetic diversity was one of the lowest recorded for brown bear populations across their European and North American ranges. A large portion of the original genetic variation may have gone lost through random genetic drift during the recent period of isolation. However, the level of genetic variability proved sufficient to identify the bears individually using 9 microsatellite loci. The probability that two animals shared by chance the same multilocus genotype was estimated to be 1 in 100. Lack of genetic diversity, as well as the maintenance of an adequate effective number are alarming and may seriously jeopardize the long-term survival of this population. Furthermore, high mortality rates, poaching and encroachment with human activities represent immediate, urgent concerns. In a conservation perspective, we suggest to implement protection and enforce habitat restoration for a natural increase of the population. Presently, restocking with bears from other source populations should be discouraged to avoid genetic extinction of the resident bears. Noninvasive sampling provided reliable population and individual genetic data without disturbing the animals, and microsatellite genotyping proved a valuable genetic tagging method and a feasible alternative to conventional field counts.

Key words: *Ursus arctos*, hairs, microsatellite loci, DNA fingerprinting

RIASSUNTO - Ventiquattro individui di orso bruno (*Ursus arctos*) appenninico sono stati identificati singolarmente attraverso metodi molecolari, a partire da campioni raccolti con tecniche non invasive. Il DNA è stato estratto dalle radici di peli recuperati sul campo e il genotipo composito di ogni orso è stato ottenuto analizzando 12 loci microsatelliti. I genotipi di 11 individui sono stati determinati isolando il DNA da tessuti e sangue di animali

morti o catturati. I risultati hanno evidenziato che la variabilità genetica di questa popolazione (eterozigosi attesa $H_E = 0,432$, numero medio di alleli per locus $n_A = 2,1$) è tra le più basse mai rilevate per l'orso bruno europeo e nord americano. Gran parte della variabilità originale è stata probabilmente perduta per effetto della deriva a causa dell'isolamento e dei colli di bottiglia subiti in passato. Tuttavia, la variabilità genetica residua della popolazione si è rivelata sufficiente per poter identificare individualmente gli orsi, tramite l'analisi di un minimo di 9 loci microsatelliti. Da questa analisi è risultato che la probabilità di trovare due animali diversi che abbiano casualmente lo stesso genotipo è di 1 su 100. Il basso livello di variabilità genetica, così come la ridotta dimensione effettiva sono aspetti assai preoccupanti che potrebbero minacciare la sopravvivenza a lungo termine della popolazione di orsi nell'Appennino. A questo proposito, non sono inoltre da sottovalutare l'alta mortalità, il bracconaggio e il conflitto con le attività umane, che rappresentano attualmente seri e urgenti problemi da risolvere. In un'ottica di conservazione, si suggerisce di favorire l'aumento della popolazione esistente attraverso l'implementazione di misure di conservazione più efficaci e attraverso la corretta gestione dell'habitat. Allo stato attuale, si sconsiglia vivamente di effettuare immissioni di orsi da altre popolazioni, per evitare l'estinzione genetica della popolazione autoctona. Il campionamento non invasivo ha permesso di raccogliere dati genetici a livello di singolo individuo e di popolazione senza arrecare alcun disturbo agli animali, e l'analisi dei loci microsatelliti in particolare si è dimostrata un valido metodo per "marcare" gli orsi in alternativa ai metodi tradizionali di conteggio.

Parole chiave: *Ursus arctos*, peli, microsatelliti, DNA fingerprinting.

INTRODUZIONE

Nell'Appennino centrale l'orso vive in completo isolamento da almeno 400 anni (Febbo e Pellegrini, 1990). La popolazione attuale è ormai ridotta a poche decine di individui (Randi *et al.*, 2004) in conseguenza del *trend* demografico fortemente negativo subito a partire dagli anni '80 (Posillico, 1996). L'elevato tasso di mortalità, spesso imputabile all'uomo è una delle cause più preoccupanti di rarefazione per questa popolazione ed è perciò necessario mettere in atto immediatamente degli efficaci piani per la sua conservazione (Calvario e Sarrocco, 1997; Potena *et al.* 2004). I moderni metodi della genetica hanno ormai un ruolo di primissimo piano nell'acquisizione di dati e informazioni indispensabili per la programmazione e l'implementazione di strate-

gie di conservazione a lungo termine delle popolazioni di orso sia in Europa che in Nord America (Taberlet *et al.*, 1993 e 1997; Paetkau e Strobeck, 1994; Paetkau *et al.*, 1995; Paetkau *et al.*, 1998b; Mowat e Strobeck, 2000; Waits *et al.*, 2000; Lorenzini *et al.* 2004). Recentemente, le tecniche di genetica molecolare sono state impiegate con successo per rispondere a importanti quesiti sulla biologia e sull'ecologia comportamentale di questa specie (Paetkau *et al.*, 1998a; Cronin *et al.*, 1999; Woods *et al.*, 1999). Inoltre, la conoscenza di alcune caratteristiche genetiche della popolazione, quali il livello di variabilità e differenziamento, il grado di parentela tra gli individui, il tasso di consanguineità e le ricostruzioni genealogiche, permette di sviluppare delle strategie di conservazione più efficaci. La dimensione della popolazione

è un parametro demografico indispensabile da conoscere. L'orso è un animale attivo per lo più al crepuscolo e durante le ore notturne, può avere *home range* anche molto ampi, è elusivo, vive generalmente a basse densità in habitat di montagna, che spesso sono di difficile accesso per l'uomo. Per questi motivi, il censimento di questa specie attraverso i tradizionali metodi di campo può risultare impraticabile, oppure estremamente dispendioso o poco attendibile (Mace *et al.*, 1994), tant'è vero che per l'orso appenninico a tutt'oggi non sono disponibili stime affidabili della popolazione (cf. Potena *et al.*, 2004). Tuttavia, Boscagli (1990), tramite il conteggio delle orme su neve in un'area di 600 km², ha suggerito un numero minimo certo di 38-39 individui nel 1985, mentre Randi *et al.* (2004) hanno indicato in circa 30 il numero di individui presenti in un'area ampia circa 1500 km² sovrapposta alla quasi totalità del *core range* della popolazione. Questi dati sono estremamente allarmanti.

Una delle applicazioni più affascinanti delle tecniche molecolari è la possibilità di stimare il numero minimo d'individui di una popolazione in natura avvalendosi di metodi di campionamento non invasivo (Schwartz *et al.*, 1998; Kohn *et al.*, 1999). La raccolta di escrementi depositati lungo i sentieri e di peli persi naturalmente dagli orsi o rimasti impigliati in apposite trappole (Woods *et al.*, 1999) permette di identificare singolarmente gli individui dal DNA (DNA *fingerprinting*), caratterizzandone i genotipi attraverso l'analisi di loci microsatelliti (Taberlet *et al.*, 1997; Woods *et al.*, 1999; Mowat e

Strobeck, 2000). Questa "marcatura molecolare" permette di non catturare gli animali per marcarli, ed elimina qualsiasi necessità di contatto fisico o visivo che potrebbe arrecare danno o disturbo agli orsi. Inoltre, in tal modo, vengono minimizzate le fonti di errore che sono intrinseche ai metodi di marcatura e ricattura tradizionali (Woods *et al.*, 1999).

L'analisi dei microsatelliti ormai fa parte dei "ferri del mestiere" del genetista che si occupa di conservazione. È una tecnica che viene usata ormai di frequente su campioni raccolti in modo non invasivo, in particolare per determinare il livello di variabilità genetica nelle popolazioni a dimensioni ridotte, che sono quelle maggiormente esposte ai rischi di estinzione. I microsatelliti sono loci altamente variabili. L'alto tasso di mutazione li rende particolarmente adatti a studiare popolazioni di orso geneticamente depauperate, per il cui studio altri *marker*, quali gli alloenzimi o il DNA mitocondriale, si sono rivelati poco o per nulla informativi (Allendorf *et al.*, 1979; Larsen *et al.*, 1983; Cronin *et al.*, 1991; Randi *et al.*, 1994). Essendo costituiti da corte sequenze nucleotidiche, i loci microsatelliti possono essere amplificati anche da DNA degradato, che spesso è l'unico materiale ricavabile da campioni di escrementi o peli.

In questo studio pilota vengono riportati i primi dati sulla variabilità genetica nucleare nella popolazione di orsi dell'Appennino centrale, la maggior parte dei quali campionati attraverso tecniche non invasive. Il livello di diversità genetica viene messo a confronto con quello di altre popolazioni

europee di orso bruno per cui sono disponibili dati comparabili, e i risultati sono discussi in un contesto di conservazione. Viene suggerito il numero minimo di loci microsatelliti da analizzare, necessari per identificare in modo univoco gli individui e risalire alle relazioni di parentela. Inoltre, viene presa in considerazione l'applicabilità delle tecniche di raccolta non invasiva, associate all'analisi molecolare, come alternativa ai tradizionali metodi di censimento sul campo dell'orso bruno. Infine, viene effettuata la determinazio-

ne del sesso a partire da campioni di pelo appartenenti ad individui sconosciuti.

MATERIALI E METODI

1. Analisi di laboratorio

Durante gli anni 1991-2003 sono stati raccolti 100 campioni di orso provenienti da un'area di circa 500 km² localizzata principalmente nell'Abruzzo meridionale (coordinate: 41°51' N, 14°02' E) (Fig. 1). Di questi campioni, 11 erano costituiti da sangue o tessuto muscolare di individui cattu-

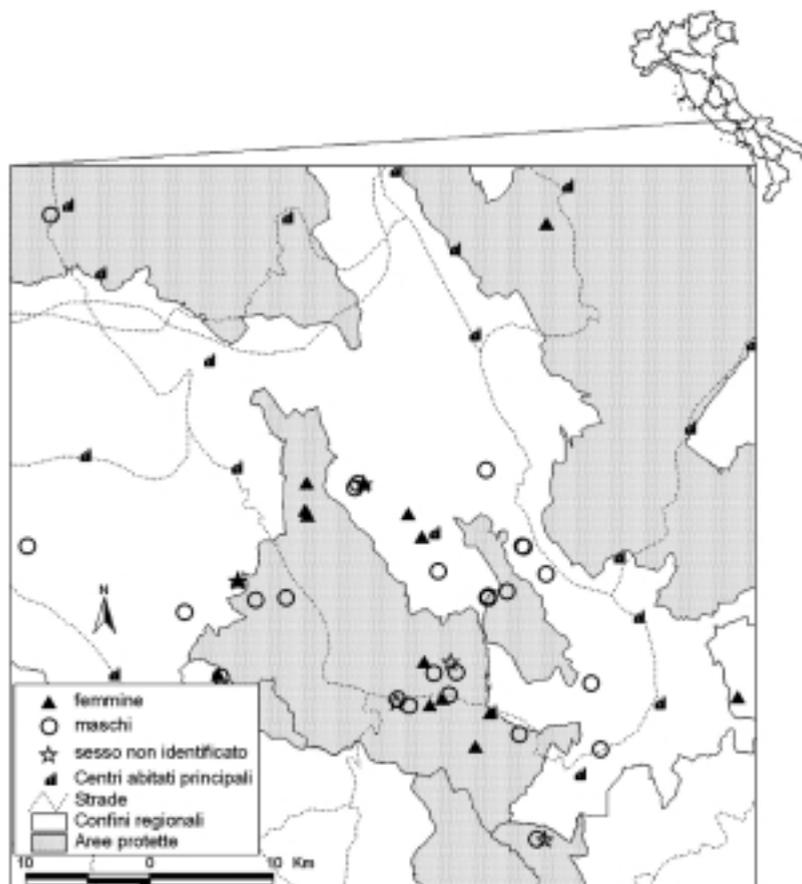


Figura 1 - Distribuzione dei campioni di orso analizzati. Ad uno stesso sito possono corrispondere diversi campioni. Nella figura è evidenziato il sesso attribuito ai diversi campioni.

DNA fingerprinting nell'orso appenninico

rati o ritrovati morti, mentre 89 erano ciuffi di pelo raccolto in giacigli, su tronchi di alberi da frutto, nelle vicinanze di arnie o su recinzioni metalliche a protezione del bestiame domestico o di piccole aree coltivate. Inoltre, sono stati raccolti campioni di pelo da 5 animali vivi e da carcasse per permettere la validazione del metodo, ovvero per controllare la corrispondenza del genotipo ottenuto dall'analisi del DNA estratto dai peli e da quello estratto dai tessuti dello stesso animale. Nelle radici dei peli il DNA si trova in scarsa quantità ed è spesso molto degradato, per cui la possibilità di ottenere degli artefatti durante l'amplificazione (ad esempio la contaminazione, la generazione di falsi alleli o la mancata amplificazione di uno dei due alleli di un eterozigote - "allelic drop out", dovuta all'eccessiva diluizione del DNA; Taberlet *et al.*, 1996; Gagneux *et al.*, 1997) deve essere attentamente valutata per evitare risultati falsati. La caratterizzazione dei genotipi dai campioni di orso è stata effettuata amplificando tramite PCR 12 loci microsatelliti (Taberlet *et al.*, 1997; Paetkau *et al.*, 1998a; Cronin *et al.*, 1999; Waits *et al.*, 2000; Tab.1). Per ogni campione di pelo e per ogni locus l'amplificazione è stata effettuata in doppio sia per gli omo-

zigoti sia per gli eterozigoti. In caso di risultati non coincidenti, sono state eseguite due amplificazioni ulteriori e il genotipo è stato registrato solo se coincidevano almeno 3 genotipi su 4. La determinazione del sesso degli individui identificati come diversi a posteriori con il DNA *fingerprinting* è stata effettuata amplificando i geni per l'Amelogenina (AMG, Ennis e Gallagher, 1994) e il segmento Sry (Sex Determining Region) presente sul cromosoma Y utilizzando i *primer* esterni 121R e 29F, pubblicati in Taberlet *et al.* (1993) e il locus microsatellite G1A come controllo interno. Le modalità di raccolta dei campioni sul campo e i metodi di laboratorio sono riportate in dettaglio in Lorenzini *et al.* 2004.

2. Analisi dei dati

Dalle frequenze alleliche sono stati stimati il numero medio di alleli per locus (n_A), le eterozigosi osservata e attesa (H_O , H_E), il PIC-polymorphism information content. Il test esatto di Fisher è stato utilizzato per verificare che non ci fosse associazione tra coppie di loci, ovvero che ogni locus venisse ereditato indipendentemente dagli altri,

Tabella 1 - Loci microsatelliti analizzati in questo studio

Locus	Specie di origine	Letteratura
CXX20	Cane	Ostrander <i>et al.</i> , 1993
G10P	Orso nero	Paetkau <i>et al.</i> , 1995
G1D	Orso nero	Paetkau e Strobeck, 1994
G1A	Orso nero	Paetkau e Strobeck, 1994
G10C	Orso nero	Paetkau e Strobeck, 1994
G10X	Orso nero	Paetkau e Strobeck, 1994
G10B	Orso nero	Paetkau e Strobeck, 1994
G10L	Orso nero	Paetkau e Strobeck, 1994
MU59	Orso bruno	Taberlet <i>et al.</i> , 1997
MU05	Orso bruno	Taberlet <i>et al.</i> , 1997
MU50	Orso bruno	Taberlet <i>et al.</i> , 1997
G10H	Orso nero	Paetkau <i>et al.</i> , 1998a

mentre gli scostamenti dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) sono stati valutati applicando le statistiche F_{is} secondo Weir e Cockerham (1984) e secondo Robertson e Hill (1984), che valutano la significatività del deficit di eterozigoti ai singoli loci (Guo e Thompson, 1992). Una popolazione che ha subito una recente diminuzione del numero effettivo perde variabilità allelica più velocemente di quanto non ne venga ridotta l'eterozigosi media (Luikart *et al.*, 1998). Per verificare se la popolazione di orsi in Appennino sia stata recentemente soggetta a un collo di bottiglia, è stato applicato ai dati il test per ranghi di Wilcoxon (cf. BOTTLENECK versione 1.2.02; Cornuet e Luikart, 1996). Il test valuta se la stima dell'eterozigosi attesa in base all'equilibrio di HW (H_E) è significativamente più alta rispetto alla stima dell'eterozigosi attesa in base al numero di alleli presenti nella popolazione attuale, assumendo l'equilibrio tra mutazione e deriva (H_{EQ}). Se questa differenza non è dovuta al caso, è statisticamente molto probabile che si sia verificato un collo di bottiglia. Poiché il modello mutazionale dei microsatelliti è molto complesso (Goldstein e Schlotterer, 2000, per una disamina) e nel genere *Ursus* è sconosciuto, i calcoli sono stati effettuati seguendo tre possibili modelli: il modello IAM (Infinite Allele Model) (Kimura e Crow, 1964), il modello SMM (Stepwise Mutation Model) (Kimura e Ohta, 1978) e infine il modello TPM (Two Phase Model, adottando il 5% di mutazioni multi-step) (Valdès *et al.*, 1993; Di Rienzo *et al.*, 1994). Quest'ultimo, un derivato del modello SMM, prevede la possibilità di addizioni o delezioni di più di una unità ripetuta nella sequenza del microsatellite.

Questo lavoro è uno studio di fattibilità, svolto per verificare se i metodi della genetica non invasiva possono essere applicati per stimare la consistenza della popolazione. In quest'ottica, i dati sono stati utilizzati per stimare la probabilità di identità (P_{ID}),

ovvero la probabilità che due orsi diversi abbiano lo stesso genotipo per il solo effetto del caso e siano quindi scambiati per lo stesso individuo. Tali calcoli permettono di selezionare il numero minimo di loci da analizzare per ottenere valori accettabili di P_{ID} per questa popolazione di orso bruno. È stata applicata sia la formula standard per il calcolo di P_{ID} per loci codominanti (Paetkau *et al.*, 1994), sia quella relativa a fratelli, suggerita da Waits *et al.* (2001) come limite conservativo per l'identificazione individuale, dato un certo set di loci microsatelliti analizzati. Infatti, nelle popolazioni di orsi piccole e isolate, è concreta la possibilità che esse non siano in HWE, come conseguenza dei trascorsi demografici, e che gli individui condividano un certo grado di parentela. Di conseguenza, la stima teorica di P_{ID} può essere sensibilmente più bassa di quella reale, anche di tre ordini grandezza, come è stato dimostrato per la popolazione di orsi della Scandinavia (Waits *et al.*, 2001).

RISULTATI

I dodici loci microsatelliti sono stati analizzati inizialmente in un gruppo di 11 orsi di cui era disponibile la carcassa o campioni di sangue. Per cinque animali è stato verificato che il genotipo ottenuto dall'analisi del DNA estratto dai peli corrispondeva a quello ottenuto analizzando il DNA estratto dai tessuti. Non sono stati evidenziati problemi di contaminazione o di amplificazione di falsi alleli, e i genotipi ottenuti dai peli e dai tessuti dello stesso animale hanno sempre dato risultati coincidenti. Il DNA è stato isolato con successo in 70 (79%) degli 89 campioni di pelo raccolti sul campo o prelevati da animali vivi. Da 62 campioni è stato possibile estrarre un quantitativo di

DNA fingerprinting nell'orso appenninico

DNA sufficiente per ottenere dei genotipi completi (12 loci). Ciò ha permesso di identificare 24 orsi diversi (38 ricature). I campioni che non hanno fornito alcun prodotto amplificato erano probabilmente campioni in cui il DNA era troppo scarso, forse altamente degradato, oppure perché appartenenti ad altre specie.

Nell'analisi dell'indipendenza dei loci, una coppia di microsatelliti è risultata associata (test di associazione, $P < 0,05$). Tuttavia, è stato dimostrato che la presenza di una o due coppie di *marker* associati sostanzialmente non influisce sui risultati dei calcoli di carattere probabilistico impiegati nelle analisi successive (Meagher, 1986), per cui è stato assunto che ogni locus microsatellite fornisca informazioni genetiche indi-

pendenti.

Le stime dei parametri di variabilità genetica sono state calcolate separatamente per il gruppo di 11 orsi sicuramente diversi e per quello dei 24 identificati come orsi diversi *a posteriori* dall'analisi dei microsatelliti. La differenza nelle distribuzioni delle frequenze alleliche nei due campioni non è risultata significativa (test di Wilcoxon, $P = 0,809$). Di conseguenza, le analisi successive sono state effettuate su un campione totale di 35 orsi (Tab. 2). Il livello di variabilità allelica è risultato molto basso (numero medio di alleli per locus $n_A = 2,1 \pm 0,1$), mentre valori medio-bassi sono stati ottenuti per l'eterozigosi attesa H_E : da 0,205 per il locus G1A a 0,509 per il locus MU59. I valori di PIC variavano fra 0,182 per

Tabella 2 - Statistica descrittiva relativa a 12 loci microsatelliti analizzati in un campione di 35 orsi dell'Appennino centrale.

	H_O^a	H_E	n_A^b	alleli ^c	PIC ^d
CXX20	0,571	0,508	2	130-132	0,370
MU05	0,370	0,453	2	135-137	0,346
G10X	0,441	0,507	2	130-136	0,375
G10B	0,500	0,496	2	137-155	0,370
G1D	0,486	0,506	2	170-184	0,374
MU59	0,448	0,509	2	105-111	0,375
G10C	0,400	0,467	3	96-104	0,367
MU50	0,423	0,449	2	211-215	0,343
G10P	0,294	0,365	2	161-173	0,295
G10H	0,364	0,359	2	246-248	0,290
G10L	0,294	0,365	2	157-163	0,295
G1A	0,229	0,205	2	180-192	0,182
Media (SE)	0,402 (0,028)	0,432 (0,027)	2,1 (0,17)		0,332 (0,058)

^a H_O (H_E) = eterozigosi osservata (attesa)

^b n_A = numero di alleli

^c dimensione degli alleli espressa in paia di basi (bp)

^d PIC = *polymorphism informative content* (Hearne *et al.*, 1992)

G1A e 0,375 per MU59 e G10X. Le eterozigosi medie attesa e osservata hanno registrato valori pari rispettivamente a 0,432 ($\pm 0,027$) e 0,402 ($\pm 0,028$). Non è stata rilevata alcuna deviazione dall'equilibrio di HW per i loci analizzati. Il test di Wilcoxon (a una coda), utilizzato per verificare la significatività della differenza fra H_E e H_{EQ} , ha dato risultati significativi per tutti e tre i modelli mutazionali considerati (IAM, SMM e TPM, $P < 0,001$; 10000 repliche), confermando che l'orso bruno in Appennino ha effettivamente subito un collo di bottiglia recente-

standard $P_{(ID)}$ che quella per i fratelli $P_{(ID) sib}$ vengono riportate in Tab. 3. Sono stati calcolati prima i valori di probabilità per ogni locus singolarmente, poi è stata ottenuta una probabilità media moltiplicando i singoli valori. Le probabilità derivate dall'analisi di un numero di loci inferiore a 12 sono state ottenute scartando a turno i loci meno informativi, ovvero quelli con i più bassi valori di PIC. In un'ottica di costi-benefici, è verosimile ipotizzare che, nella scelta del numero minimo di loci da analizzare in uno studio estensivo di riconoscimento dei singoli individui, si

Tabella 3 - Probabilità d'identità nella popolazione di orso bruno appenninico.

N. of loci	$P_{(ID)}^a$	$P_{(ID)}/100^b$	$P_{(ID)sib}^c$	$P_{(ID)sib}/100$
12	$2,8 \times 10^{-5}$	0,003	$5,0 \times 10^{-3}$	0,498
11	$5,4 \times 10^{-5}$	0,005	$5,6 \times 10^{-3}$	0,564
10	$1,1 \times 10^{-4}$	0,011	$8,8 \times 10^{-3}$	0,881
9	$2,3 \times 10^{-4}$	0,023	$1,3 \times 10^{-2}$	1,279
8	$4,9 \times 10^{-4}$	0,049	$1,8 \times 10^{-2}$	1,856
7	$1,2 \times 10^{-3}$	0,120	$2,9 \times 10^{-2}$	2,935
6	$2,9 \times 10^{-3}$	0,294	$4,7 \times 10^{-2}$	4,661
5	$7,6 \times 10^{-3}$	0,765	$7,6 \times 10^{-2}$	7,562
4	$2,0 \times 10^{-2}$	2,021	$1,2 \times 10^{-1}$	12,589
3	$5,3 \times 10^{-2}$	5,288	$2,1 \times 10^{-1}$	20,979
2	$1,4 \times 10^{-1}$	14,071	$3,5 \times 10^{-1}$	35,270
1	$3,7 \times 10^{-1}$	35,500	$5,9 \times 10^{-1}$	59,375

^a $P_{(ID)}$ = equazione standard

^b $P_{(ID)}/100$ = numero di orsi su 100 che potrebbero avere lo stesso genotipo per il solo effetto del caso

^c $P_{(ID)sib}$ = equazione per i fratelli

mente, così come viene evidenziato dalla struttura genetica della popolazione attuale. Le probabilità di identità, calcolate seguendo sia l'equazione

opti per i loci più variabili e si scartano quelli meno polimorfi. I valori di $P_{(ID)}$ e $P_{(ID)sib}$ differiscono di due ordini di grandezza quando il numero di loci

considerato varia tra 7 e 12 (Tab. 3). Nel caso di un numero di loci inferiore a 7 le differenze si riducono di un ordine di grandezza. Secondo i nostri dati, dall'analisi di 11-12 loci microsatelliti si ottiene una probabilità di trovare per caso due orsi diversi con lo stesso genotipo di circa 1 su 200: $P_{(ID)_{sib}} = 5,0 \times 10^{-3}$ e $P_{(ID)_{sib}} = 5,6 \times 10^{-3}$, rispettivamente per 12 e 11 loci; invece l'analisi di 9-10 loci fa salire la probabilità a circa 1 su 100: $P_{(ID)_{sib}} = 1,3 \times 10^{-2}$ e $P_{(ID)_{sib}} = 8,8 \times 10^{-3}$, rispettivamente per 9 e 10 loci.

All'interno del gruppo di 24 orsi individuati tramite DNA *fingerprinting*, l'identificazione del sesso ha evidenziato 12 maschi e 7 femmine. Il metodo è stato validato analizzando sia i tessuti che i peli di cinque orsi e verificando che due amplificazioni indipendenti producessero risultati identici.

Contrariamente a quanto suggerito da Randi *et al.* 2004, l'amplificazione del segmento Sry si è rivelato più efficiente rispetto all'impiego dei *primer* per l'Amelogenina: dei 19 animali di cui è stato possibile identificare il sesso con il sistema Sry/G1A, 6 (32%) sono rimasti invece indeterminati utilizzando i geni AMG, la cui amplificazione è totalmente fallita oppure ha prodotto risultati ambigui. Inoltre, la validazione effettuata su cinque orsi ha dato esito negativo in due casi. Viceversa, il sistema Sry/G1A nella validazione ha dato sempre esito positivo e non ha mai evidenziato la presenza di bande aspecifiche nelle femmine o la mancanza di bande specifiche nei maschi. Non è stato possibile determinare il sesso dei restanti cinque campioni con nessuno

dei due sistemi, a causa dei risultati non ripetibili o per esaurimento del DNA estratto. Considerando il numero totale di orsi identificati come maschi o femmine, si è ottenuto un rapporto sessi pari a 0,6.

DISCUSSIONE

I risultati esposti evidenziano che la raccolta di campioni non invasivi, come i peli persi naturalmente dagli orsi, può fornire dati altamente affidabili sulla variabilità genetica individuale e di popolazione nell'orso bruno in Appennino, senza la necessità di catturare gli animali o arrecare loro alcun tipo di disturbo. L'analisi del DNA estratto dai bulbi piliferi si è rivelata relativamente semplice da eseguire, e la procedura di effettuare almeno due amplificazioni per campione per ogni locus, sia omozigote sia eterozigote, ha dimostrato che è possibile minimizzare gli errori nell'assegnazione del genotipo. Le comparazioni tra il genotipo ottenuto dall'analisi dei tessuti e quello ottenuto dai peli dello stesso individuo hanno sempre dato risultati coincidenti. Tuttavia, qualora i campioni di pelo vengano analizzati dopo molto tempo dalla raccolta, si può anche pensare di aumentare le ripetizioni, se lo scopo è quello di determinare con sicurezza la consistenza minima della popolazione. I problemi che possono insorgere quando si analizzano campioni non invasivi in cui il DNA è molto diluito e/o altamente degradato sono stati ampiamente discussi (Gossens *et al.*, 1998; Taberlet *et al.*, 1996 e 1999) e l'affidabilità di analisi quali il DNA *fingerprinting* è stata a volte messa in discussione

(Pemberton *et al.*, 1995). In questo studio è stata adottata la strategia di utilizzare almeno cinque radici per campione e di amplificare per almeno due volte tutti i *marker* per lo stesso campione. In questo modo, il rischio di assegnare genotipi non corretti, che spesso si accompagna all'estrazione di un basso quantitativo di DNA o alla possibilità di contaminazione tra due campioni diversi, viene sensibilmente ridotto. L'analisi dei campioni di pelo e tessuti raccolti nell'arco di circa dieci anni ha permesso di identificare i genotipi di 35 orsi, un numero d'individui sicuramente rappresentativo dell'intera popolazione presente attualmente in Appennino, costituita, ottimisticamente, da non più di 60 animali (Swenson *et al.*, 2000). L'analisi di 12 loci microsatelliti, normalmente molto variabili in altre popolazioni di orso bruno, ha evidenziato la presenza di 2,1 varianti alleliche per locus e una H_E media pari a 0,432, che sono tra i valori più bassi mai ottenuti per l'orso bruno in nord America e nord Europa (Paetkau *et al.*, 1998a; b; Waits *et al.*, 2000). In particolare in Europa, solo l'orso dei Pirenei, che conta appena cinque individui, ha un livello ugualmente basso di variabilità genetica ($H_E = 0,40$, $n_A = 1,5$; Taberlet *et al.*, 1997). Il depauperamento si riflette non tanto sulla variabilità genetica media, quanto sulla variabilità allelica. Per l'orso appenninico il massimo di variabilità allelica (3 varianti) è stato trovato in 1 locus su 12, mentre in media, gli stessi loci in popolazioni diverse di orso bruno hanno in genere da 5 a 9 alleli (Paetkau *et al.*, 1998b; Cronin *et al.*, 1999; Waits *et al.*, 2000). Un valore di eterozigosi attesa media di 0,71 e un

numero medio di alleli pari 6,8 sono stati trovati nell'orso in Scandinavia, una popolazione che ha subito di recente un marcato collo di bottiglia (Waits *et al.*, 2000). Rispetto a questi dati, è evidente che l'orso in Appennino ha subito una severissima riduzione della variabilità genetica, soprattutto in relazione al numero d'alleli persi. Ad esempio, i loci G10B e G1D hanno due alleli ciascuno, nei range 137-155 bp e 170-184 bp, che differiscono di 18 e 14 paia di basi, rispettivamente. Ciò indica chiaramente che gran parte della variabilità allelica originale, evidentemente ancora presente nella popolazione scandinava, è invece stata persa nell'orso appenninico, per effetto della forte contrazione numerica e del protratto isolamento. In Nord America, solo nella popolazione di orso bruno dell'arcipelago di Kodiak è stata evidenziata una diversità genetica ($H_E = 0,265$) inferiore a quella ottenuta per l'orso Appenninico, sebbene le cause di ciò rimangano oscure, visto che né colli di bottiglia, né effetti fondatore sembrano essere spiegazioni plausibili (Paetkau *et al.*, 1998b). Al contrario, proprio la forte riduzione numerica sembra essere la causa del depauperamento genetico nell'orso appenninico, così com'è stato evidenziato dall'analisi "*bottleneck*", i cui risultati sono stati gli stessi, indipendentemente dal modello mutazionale ipotizzato per l'evoluzione dei microsatelliti. L'attuale struttura genetica della popolazione è dunque la naturale conseguenza dei suoi trascorsi demografici. Assumendo che il collo di bottiglia risalga alle ultime $2N_e - 4N_e$ generazioni (dove N_e è la dimensione effettiva della popolazione), che il

tempo generazionale nell'orso sia pari a 10 anni, che N_e /dimensione totale della popolazione sia pari a 0,20 – 0,30 (Harris e Allendorf, 1989) e assumendo che 12-18 orsi si riproducano effettivamente (data una popolazione totale di 40-60 orsi, Swenson *et al.*, 2000), un collo di bottiglia potrebbe risalire a 240-720 anni fa. Questa recente riduzione numerica è verosimilmente dovuta alla frammentazione e all'alterazione dell'habitat, nonché alla persecuzione diretta, in ogni caso imputabili alle attività umane. Tuttavia, al momento, non si possono escludere cause di carattere sanitario e problemi che interessano la sfera riproduttiva. Positività alla brucellosi, patologia che influisce negativamente sul tasso riproduttivo, sono state, infatti, evidenziate in orsi sia in cattività sia in natura (Colli, 1996). Inoltre, la presenza della malattia di Aujeszky e della clostridiosi, ambedue letali per l'orso, sono state riportate nel cinghiale (*Sus scrofa*) e nel cervo (*Cervus elaphus*) nell'area di distribuzione dell'orso (Capua *et al.*, 1997). In particolare, la clostridiosi, la parvovirosi, e il cimurro sono state riscontrate anche nella popolazione di orso e talvolta con effetti letali.

In uno studio precedente è stato analizzato un segmento del DNA mitocondriale lungo 695 paia di basi ed è risultato che 10 individui provenienti dal Parco Nazionale d'Abruzzo avevano tutti la stessa sequenza, poco diversa da quella degli orsi delle Alpi e della Croazia (Randi *et al.*, 1994). Allo stesso modo, Taberlet e Bouvet (1994) non hanno evidenziato alcuna variabilità nella sequenza di un segmento lungo 272 paia di basi nella regione di con-

trollo mitocondriale di quattro individui. Secondo una prospettiva filogenetica, gli autori hanno incluso l'orso appenninico nella linea genetica occidentale, assieme agli orsi alpini, sloveni, croati, bosniaci, greci e bulgari, che rappresentano il gruppo di popolazioni che probabilmente si sono isolate nella zona rifugio balcanica durante i periodi glaciali del Pleistocene.

In conclusione, i dati sul DNA mitocondriale e nucleare (Randi *et al.*, 1994; Taberlet e Bouvet, 1994; Taberlet *et al.*, 1997; Waits *et al.*, 2000; questo studio) convergono nel mettere in evidenza una ridotta quanto preoccupante variabilità genetica nell'orso appenninico. Tuttavia, il grado di variabilità attuale, sebbene assai limitato, permette comunque di individuare singolarmente gli animali usando un numero relativamente basso di loci microsatelliti. Difatti, dall'analisi di 9-10 *marker* risulta una probabilità di identità pari a 1 su 100, vale a dire che nella nostra popolazione ci aspettiamo di trovare per il solo effetto del caso 1 orso su 100 che ha lo stesso genotipo di un altro. Tale probabilità scende poi a 1 su 200 se si usano 11-12 loci. Tenendo conto che si tratta di stime conservative, perché ottenute assumendo che tutti gli individui siano parenti di primo grado, allora l'analisi di 9 loci è sufficientemente affidabile per individuare gli orsi appenninici singolarmente, anche se condividono un certo grado di parentela. Il potere distintivo e l'affidabilità di un sistema di *marker* dipendono ovviamente dalla dimensione della popolazione, ovvero dal numero massimo d'individui che ci si aspetta di dover distinguere mediante il loro genotipo

(Paetkau, 2003). Ecco perché il valore di $P_{ID} = 0,01$ è accettabile per stimare la dimensione di una popolazione che si presume non superi i 60 individui, come avviene per l'orso appenninico. Nell'ambito delle strategie di conservazione, la disponibilità di *marker* genetici per effettuare dei test di paternità e per stabilire il grado di parentela tra gli individui permette di raccogliere dati importanti sugli aspetti biologici e demografici delle popolazioni in pericolo. Gli interventi gestionali più urgenti potrebbero essere puntuali e focalizzati qualora si sapesse, per esempio, se il successo riproduttivo è distribuito ugualmente fra i maschi adulti, o se nella popolazione esistono sottogruppi con potenziale riproduttivo differenziato. Lorenzini *et al.* (2004) hanno evidenziato che la popolazione di orso in Appennino ha una variabilità nucleare sufficiente per poter effettuare questi test con alta affidabilità, sebbene il numero di loci microsatelliti da analizzare sia superiore a quello necessario per distinguere gli individui. Allo stesso modo, gli autori hanno evidenziato che, nonostante il ridotto numero di orsi della popolazione attuale, il tasso di *inbreeding* non è significativamente elevato e che la maggior parte degli individui non condividono relazioni di parentela di primo grado, non sono, cioè, fratelli o genitore-figlio. Questi risultati, sebbene inaspettati, trovano una probabile spiegazione nel fatto che il campionamento degli animali copre un lasso di tempo superiore a dieci anni, e che alcuni degli orsi analizzati vivevano in cattività e non si erano mai riprodotti. La consanguineità non sembra dunque costituire un problema

urgente per l'orso appenninico. Tuttavia, gli aspetti genetici non sono da sottovalutare ai fini della conservazione a lungo termine. Basti pensare al livello di variabilità genetica della popolazione attuale, che è indiscutibilmente basso, al numero effettivo, che si aggira intorno a 12-18 individui, e all'eterozigosi, che continuerà a diminuire alla velocità di $1/2N_e$ ogni generazione. Purtroppo, l'aspetto genetico non è né l'unica, né probabilmente la più pressante minaccia alla sopravvivenza di questa popolazione. Infatti, dal 1980 al 1985 è stato registrato un elevatissimo tasso di mortalità che ha ridotto la popolazione del 32-64% (Posillico *et al.*, 2002) e ne ha minacciato seriamente le capacità di ripresa demografica nel breve periodo. Tra il 1991 e il 2002 la mortalità minima è stata pari a 2,5 orsi/anno (R. Fico e L. Gentile, dati non pubblicati). Queste sono comunque delle sottostime del tasso di mortalità reale, in quanto una parte delle carcasse di orso non viene ritrovata. Inoltre, non è da sottovalutare il fatto che la metà degli orsi trovati morti erano femmine, cosa che ha verosimilmente influito sul potenziale riproduttivo della popolazione. In aggiunta, i problemi sanitari e la costante presenza del bracconaggio (responsabile del 30% circa della mortalità) possono aver rallentato la ripresa della popolazione. Nel caso dell'orso appenninico, i modelli predittivi non sono di grande aiuto per prevedere la dinamica della popolazione nel tempo, in quanto molti dei parametri necessari per la loro formulazione non sono stati rilevati (Peyton *et al.*, 1999). Non sono noti, ad esempio, la proporzione di femmine

con piccoli, né il numero di nuovi nati per anno, né tanto meno il tasso di sopravvivenza.

Sebbene l'orso bruno sia una specie "particolarmente protetta" in Italia (Legge N. 157/92), in pratica è ancora molto perseguitata e, per questo, si auspica una maggiore attenzione da parte delle autorità competenti nello sviluppo e nella messa in atto d'efficaci misure di conservazione con particolare riferimento alla prevenzione e alla repressione del fenomeno del braccaggio per minimizzare le perdite "non naturali" e alla conservazione dell'habitat dell'orso in quantità e qualità sufficiente (Posillico *et al.*, 2004). Inoltre, non è da sottovalutare il generale conflitto tra agricoltura-allevamento e fauna selvatica, che è all'origine di alcuni abbattimenti illegali di orsi, benché i danni siano da attribuirsi nella quasi totalità dei casi a cani, lupi o cinghiali ed esistano metodi di prevenzione efficaci nei confronti della predazione da orso (Cozza *et al.*, 1996). Tra gli obiettivi prioritari di una strategia di conservazione dell'orso bruno nell'Appennino, considerata la dimensione della popolazione e il tasso di mortalità, figurano quindi tutti gli interventi in grado di aumentare il tasso di sopravvivenza e diminuire la mortalità. In questo modo sarebbe ipotizzabile in un futuro non remoto una graduale ripresa demografica, visto che l'habitat appenninico è idoneo per l'orso e sembrerebbe offrirgli reali possibilità di sussistenza (Posillico *et al.*, 2004).

La popolazione di orsi dell'Appennino è dunque ben al di sotto della dimensione minima considerata necessaria per la sopravvivenza nel lungo periodo

(Franklin, 1980; Soulé, 1987; Peyton *et al.*, 1999). Tuttavia è da sottolineare come spesso le stime della popolazione minima vitale risultino irrealistiche (Caughley, 1994). Mills *et al.* (1996) hanno evidenziato come piccole differenze nella stima del tasso di crescita della popolazione e negli algoritmi di calcolo tra diversi programmi utilizzati possano produrre risultati molto diversi. Un modello conservativo elaborato per popolazione di orso bruno nella Columbia Britannica suggerisce una consistenza minima di 200-250 individui (Wielgus, 2002). Una stima più incoraggiante (nell'ipotesi che il tasso di crescita sia positivo) è quella del modello elaborato da Sæther *et al.*, 1998) per l'orso bruno in Svezia e Norvegia. Una popolazione iniziale con almeno 6-8 femmine (età > 1 anno) avrebbe una probabilità di sopravvivenza >90% in 100 anni. Questi valori sono però stimati partendo da una popolazione pari a circa 1000 individui (con una produttività elevata, non postulabile per la popolazione appenninica). Inoltre, una diminuzione del tasso di crescita della popolazione (*i.e.* l'elevata mortalità dei primi anni '80, Posillico *et al.*, 2002) ha effetti negativi non trascurabili sul numero minimo d'individui. Infatti, dalle simulazioni di Sæther *et al.* (1998) si evince che ad un aumento di 10 punti percentuali della mortalità delle femmine adulte, corrisponde un innalzamento del numero minimo di femmine da 6-8 a 25 per conservare una probabilità di sopravvivenza della popolazione pari al 90% entro 100 anni. Pertanto, si propone di incrementare sensibilmente la protezione della popolazione esistente. Un

eventuale ripopolamento sarebbe dunque accettabile, se considerato da un punto di vista filogenetico, ma non lo sarebbe sicuramente se si volesse evitare l'estinzione genetica dell'orso appenninico. L'immissione d'individui alloctoni aumenterebbe il potenziale riproduttivo della popolazione, ma inquinerebbe irrimediabilmente il *pool* genico di una popolazione dai caratteri unici, da lungo tempo adattata, anche nell'ecologia comportamentale, all'ecosistema appenninico. Il ripopolamento deve essere considerato come l'estremo tentativo di mantenere una popolazione di orso in Italia centrale, nel momento in cui il numero d'individui dovesse ridursi in maniera tale da non essere più in grado di auto-sostenersi, e ferme restando l'individuazione e la rimozione delle cause del declino.

RINGRAZIAMENTI

Ringraziamo G. Potena per aver incoraggiato questo lavoro. A. Petrella e L. Finamore hanno fornito alcuni campioni. D. Paetkau, S. Stearns e S. Wasser hanno fornito un importante contributo con gli utili commenti sulla prima stesura del manoscritto.

OPERE CITATE

- Allendorf F. W., Christiansen F. B., Dobson T., Earnes W. F. e Frydenberg O., 1979. Electrophoretic variation in large mammals. I. The polar bear, *Thalarctos maritimus*. *Hereditas*, 91: 19-22.
- Boscagli G. 1990. Marsican brown bear population in Central Italy: status report 1985. *Aquilo Ser. Zool.* Oulu, Finland, 27: 81-83.
- Calvario E. e Sarrocco S. 1997. Lista rossa dei Vertebrati italiani. Roma: Worldwide Fund for Nature, Ital. Appeal. 156 pp.
- Capua I., Fico R., Banks M., Tamba M. e Calzetta G. 1997. Isolation and characterisation of an Aujeszky's disease virus naturally infecting a wild boar (*Sus scrofa*). *Veter. Microb.*, 55: 141-146.
- Caughley G. 1994. Directions in conservation biology. *J. Anim. Ecol.*, 63: 215-244.
- Colli B. 1996. L'orso bruno marsicano del Parco Nazionale d'Abruzzo: indagine sulle principali patologie infettive. Tesi, Università di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Istituto di Malattie infettive degli animali. 89 pp.
- Cornuet J. M. e Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144: 2001-2014.
- Cozza K., Fico R., Battistini L. e Rogers E. 1996. The damage-conservation interface illustrated by predation on domestic livestock in Central Italy. *Biol. Cons.*, 78: 329-336.
- Cronin M.A., Amstrup S. C., Garner G. W. e Vyse E.R. 1991. Interspecific and intraspecific mitochondrial DNA variation in North American bears (*Ursus*). *Can. J. Zool.*, 69: 2985-2992.
- Cronin M., Shideler R., Hechtel J., Strobeck C. e Paetkau D. 1999. Genetic relationships of grizzly bears (*Ursus arctos*) in the Prudhoe Bay Region of Alaska: inference from microsatellite DNA, mitochondrial DNA, and field observations. *J. Hered.*, 90: 622-628.
- Di Rienzo A., Peterson A. C., Garza J. C., Valdes A. M., Slatkin M. e Freimer N. B. 1994. Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 3166-3170.
- Ennis S. e Gallagher T. F. 1994. A PCR-based sex-determination assay in cattle

DNA fingerprinting nell'orso appenninico

- based on the bovine amelogenin locus. *Animal Genetics*, 25: 425-427.
- Febbo D. e Pellegrini M. 1990. The historical presence of the brown bear in the Apennines. *Aquilo Ser. Zool. Oulu*, Finland, 27: 85-88.
- Franklin J. R. 1980. Evolutionary change in small populations. In: Soulé M. E. e Wilcox B. A. (eds.), *Conservation Biology. An evolutionary-ecological perspective*. Sunderland, Sinauer Associates Inc. Massachusetts, 135-149.
- Gagneux P., Boesch C. e Woodruff D. S. 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Mol. Ecol.*, 6: 861-868.
- Goldstein D. B. e Schlötterer C. 2000. *Microsatellites. Evolution and applications*. Oxford, Oxford University Press, 268 pp.
- Gossens B., Waits L. P. e Taberlet P. 1998. Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. *Mol. Ecol.*, 7: 1237-1241.
- Guo S. e Thompson E. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.
- Harris R. B. e Allendorf F. W. 1986. Genetic effective population size of large mammals: an assessment of estimators. *Conserv. Biol.*, 3: 181-191.
- Hearne C. M., Ghosh S. e Todd J. A. 1992. Microsatellite for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet.*, 8: 288-294.
- Kimura M. e Crow J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 143: 549-555.
- Kimura M. e Ohta T. 1978. Stepwise mutation model and the distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 2868-2872.
- Kohn M. H., York E. C., Kamradt D. A., Haught G., Sauvajot R. M. e Wayne R. K. 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proc. R. Soc. Lond.*, B 266: 657-663.
- Larsen T., Telengström H., Kumar J., Juneja R., Taylor M. K. 1983. Low protein variability and genetic similarity between populations of the polar bear (*Ursus maritimus*). *Polar Research*, 1: 97-105.
- Lorenzini R., Posillico M., Lovari S., Petrella A. 2004. Noninvasive genotyping of the endangered Apennine brown bears: a case study not to let one's hair down. *Anim. Conserv.*, 7: 199-209.
- Luikart G., Sherwin W. B., Steele B. M. e Allendorf F. W. 1998. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Mol. Ecol.*, 7: 963-974.
- Mace R. D., Minta S. C., Manley T. L. e Aune K. E., 1994. Estimating grizzly bear population size using camera sightings. *Wild. Soc. Bull.*, 22: 74-83.
- Meagher T. R., 1986. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. I. Identification of most-likely male parents. *Amer. Nat.*, 128: 199-215.
- Mills L. S., Hayes S. G., Baldwin C., Wisdom M. J., Citta J., Mattson D. J. e Murphy K. 1996. Factors leading to different viability predictions for a grizzly bear data set. *Cons. Biol.*, 10: 863-873.
- Mowat G. e Strobeck C. 2000. Estimating population size of grizzly bears using hair capture, DNA profiling, and mark-recapture analysis. *J. Wildl. Manage.*, 64: 183-193.
- Ostrander E. A., Sprague G. F. e Rine J., 1993. Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic-mapping in dog. *Genomics*, 16: 207-213.
- Paetkau D. 2003. An empirical exploration of data quality in DNA-based popula-

- tion inventories. *Mol. Ecol.*, 12: 1375-1387.
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I. e Strobeck C., 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.*, 4: 347-354.
- Paetkau D., Shields G. F. e Strobeck C. 1998a. Gene flow between insular, coastal and interior populations of brown bears in Alaska. *Mol. Ecol.*, 7: 1283-1292.
- Paetkau D. e Strobeck C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Mol. Ecol.*, 3: 489-495.
- Paetkau D., Waits L. P., Clarkson P. L., Craighead L., Vyse E., Ward R. e Strobeck C. 1998b. Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. *Conserv. Biol.*, 12: 418-429.
- Pemberton J. M., Slate J., Bancroft D. R. e Barret J. A., 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.*, 4: 249-252.
- Peyton B., Servheen C. e Herrero S., 1999. An overview of bear conservation planning and implementation. In: Servheen C., Herrero S. e Peyton B. (eds), *Bears. Status survey and conservation action plan*, Gland, Switzerland, IUCN/SSC Bear and Polar Bear Specialist Group. IUCN., 8-24.
- Posillico M. 1996. Brown bear presence in State Forests and neighbour areas in central Italy. *J. Wildl. Res.*, 1: 250-252.
- Posillico M., Meriggi A., Pagnin E., Lovari S. e Russo L., 2004. A habitat model for brown bear conservation and land use planning in the central Apennines. *Biol. Conserv.*, 118: 149-150.
- Posillico M., Petrella A. e Sammarone L. 2002. Piano preliminare di conservazione dell'orso bruno. Project LIFE-NAT99/IT/006244, Ministero delle Politiche Agricole e Forestali – European Commission, 48 pp.
- Randi E., Pierpaoli M., Potena G., Sammarone L., Filippone I., Petrella A., e Posillico M. 2004. Azione D1, relazione finale: conteggio tramite DNA fingerprinting, studio della variabilità genetica, analisi del rapporto sessi e monitoraggio della distribuzione e densità relativa. Prodotto identificabile, Progetto LIFE-NAT99/IT/006244. Ministero delle Politiche Agricole e Forestali – Commissione Europea, 48 pp.
- Potena G., Sammarone L., Posillico M., Petrella A. e Filippone I., 2004. Piano finale di conservazione dell'orso bruno. Prodotto Identificabile, Progetto LIFE-NAT99/IT/006244, Ministero delle Politiche Agricole e Forestali – Commissione europea, 48 pp.
- Randi E., Roth H. e Boscagli G., 1994. Mitochondrial DNA sequence divergence among some West European brown bear (*Ursus arctos*) populations. Lessons for conservation. *Heredity*, 73: 480-489.
- Robertson A. e Hill W. G. 1984. Deviation from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics*, 107: 713-718.
- Sæther B. E., Engen S., Swenson J. E., Bakke O e Sandegren F. 1998. Assessing the viability of Scandinavian brown bear populations: effect of uncertain parameter estimates. *Oikos*, 83: 403-416.
- Schwartz M. K., Tallmon D. A. e Luikart G. 1998. Review of DNA-based census and effective population size estimators. *Anim. Conserv.*, 1: 293-299.
- Soulé M. E. 1987. Viable populations for conservation. Cambridge, Cambridge University Press, 264 pp.
- Swenson J. E., Gerstl N., Dahle B. e Zedrosser A., 2000. Action Plan for the conservation of the Brown Bear (*Ursus*

DNA fingerprinting nell'orso appenninico

- arctos*) in Europe. Nature and environment, N. 114. Strasbourg, Council of Europe Publishing.
- Taberlet P., Mattock H., Dubois-Paganon C. e Bouvet J. 1993. Sexing free-ranging brown bears *Ursus arctos* using hairs found in the field. *Mol. Ecol.*, 2: 399-403.
- Taberlet P. e Bouvet J. 1994. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear (*Ursus arctos*) in Europe. *Proc. Royal Soc. Lond. Series B*, 255: 195-200.
- Taberlet P., Griffin S., Gossens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L. P. e Bouvet J. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucl. Acid Res.*, 24: 3189-3194.
- Taberlet P., Camarra J. J., Griffin S., Uhrès E., Hanotte O., Waits L. P., Dubois-Paganon C., Burke T. e Bouvet J. 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Mol. Ecol.*, 6: 869-876.
- Taberlet P., Waits L. P. e Luikart G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.*, 14: 323-327.
- Valdès A. M., Slatkin M. e Freimer N. B. 1993. Allelic frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics*, 133: 737-749.
- Waits L. P., Luikart G. e Taberlet P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Mol. Ecol.*, 10: 249-256.
- Waits L. P., Taberlet P., Swenson J. E., Sandegren F. e Franzén R. 2000. Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (*Ursus arctos*). *Mol. Ecol.*, 9: 421-431.
- Weir B. S. e Cockerham C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Wielgus R. B. 2002. Minimum viable population and reserve sizes for naturally regulated grizzly bears in British Columbia. *Biol. Conserv.*, 106: 381-388.
- Woods J. G., Paetkau D., Lewis D., McLellan B. N., Proctor M. e Strobeck C. 1999. Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. *Wildl. Soc. Bull.*, 27: 616-627.