



Progetto Life Natura 99 NAT/IT/006244  
"Conservazione dell'orso bruno nell'Appennino centrale"



Corpo Forestale dello Stato



## Prodotto identificabile D1

### Azione D1:

Relazione finale sul conteggio della popolazione, sullo status genetico e demografia/dinamica della popolazione.

A cura di:

Randi E. e Pierpaoli M. - *Istituto Nazionale della Fauna Selvatica* - Ozzano dell'Emilia (BO).

Potena G. e Sammarone L. - *Corpo Forestale dello Stato* - Foreste Demaniali di Castel di Sangro - Castel di Sangro (AQ).

Filippone I. e Petrella A. - *Ufficio Foreste Demaniali di Castel di Sangro* - Castel di Sangro (AQ)

Posillico M. - *Università degli Studi di Siena* - Dipartimento di Scienze Ambientali "G.Sarfatti", Sezione di Ecologia Comportamentale, Etologia e Gestione della Fauna - Siena.

## **Sommario**

Introduzione.....	3
Area di campionamento .....	3
Metodi di campionamento .....	5
Trappole per la cattura dei peli .....	6
Rilievi in centri di aggregazione stagionale.....	8
Percorsi campione .....	11
Campioni casuali.....	11
Analisi dei dati .....	11
Attività svolte nel 2003 .....	12
Risultati del campionamento .....	12
Calcolo degli home range .....	20
Metodi di analisi genetica .....	23
Stoccaggio dei campioni .....	23
Analisi del DNA mitocondriale (mtDNA).....	23
DNA fingerprinting.....	23
Determinazione del sesso.....	24
Risultati delle analisi genetiche .....	25
DNA fingerprinting.....	25
Determinazione del sesso.....	29
Variabilità genetica.....	31
Relazioni di parentela tra genotipi.....	32
Stima della dimensione della popolazione .....	32
Discussione .....	35
Conclusioni .....	41
Bibliografia.....	44

## **AZIONE D1: CONTEGGIO TRAMITE DNA FINGERPRINTING, STUDIO DELLA VARIABILITA' GENETICA, ANALISI DEL RAPPORTO SESSI E MONITORAGGIO DELLA DISTRIBUZIONE E DENSITA' RELATIVA**

### **Introduzione**

Le misure di gestione e conservazione di un *taxon* minacciato di estinzione sono necessariamente subordinate, alla conoscenza della consistenza numerica della popolazione (Wilson *et al.*, 1996) e dei parametri demografici (tasso di riproduzione, tasso e cause di mortalità, rapporto sessi), nonché ad un'analisi dei fattori limitanti (Peyton *et al.*, 1999). Gli interventi di conservazione da attuare nel breve e nel lungo periodo variano sensibilmente a seconda della dimensione della popolazione, anche per le conseguenti implicazioni sociali ed economiche: conflitti con le attività antropiche tradizionali, danni al patrimonio agro-pastorale, bracconaggio, etc.

Per definire la consistenza della popolazione in una specie elusiva come l'orso bruno è stato messo a punto un metodo non invasivo basato sull'analisi del DNA contenuto nella radice dei peli e nelle cellule di sfaldamento della mucosa intestinale presenti negli escrementi (Hoss *et al.*, 1992; Kohn *et al.*, 1995; Petkau *et al.* 1995; Kohn e Wayne, 1997; Woods *et al.*, 1999). Tale tecnica consente di studiare anche altri parametri come la variabilità genetica ed il rapporto sessi la cui conoscenza può essere utile a individuare strategie di conservazione a lungo termine più opportune (Harris e Allendorf, 1987; Kohn e Wayne, 1997).

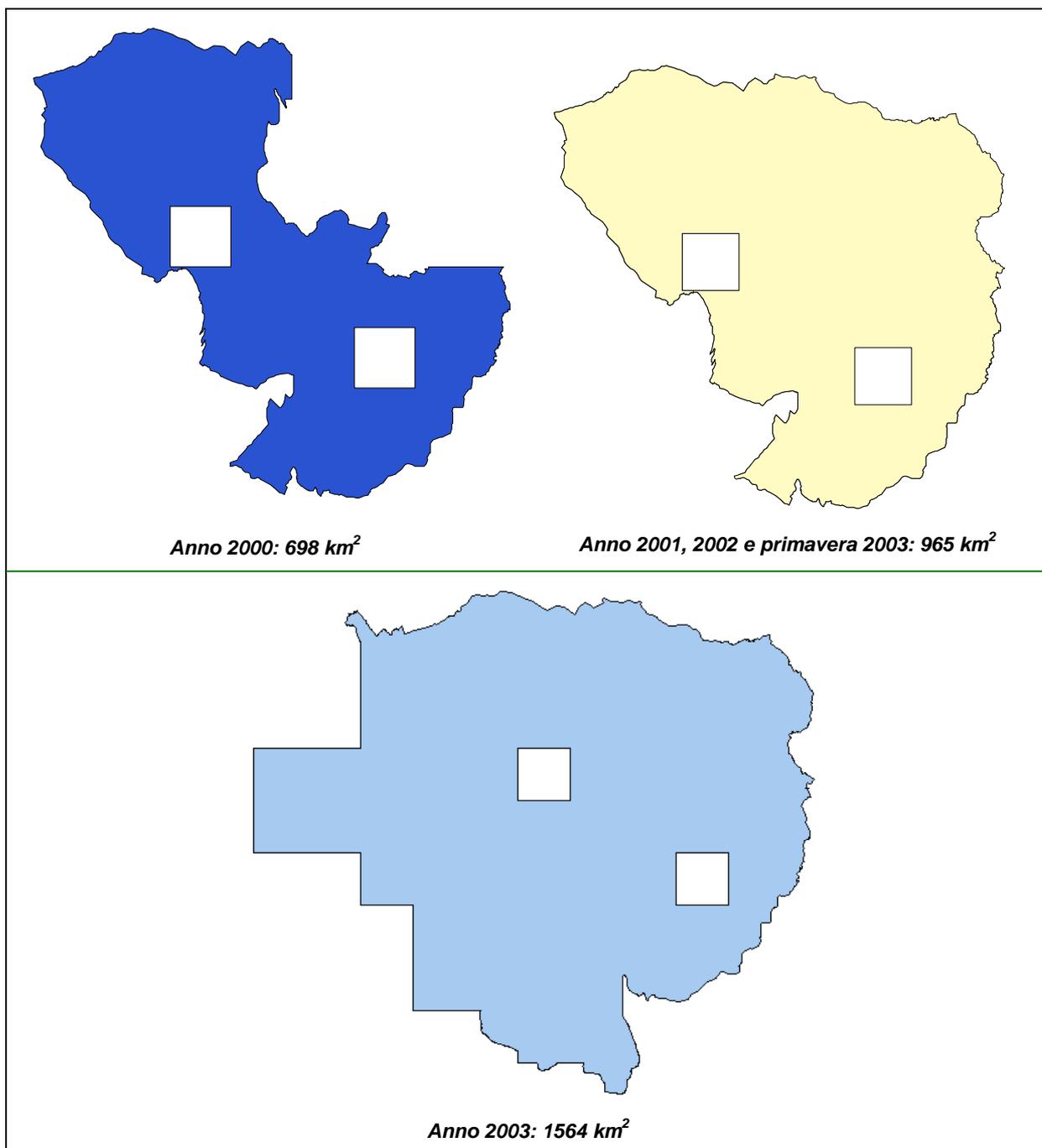
Uno dei principali vantaggi dell'utilizzo di metodi non invasivi è che il reperimento dei campioni biologici non richiede la cattura e la manipolazione dei soggetti, può essere calibrato su territori più o meno vasti; è ripetibile nel tempo e quindi permette, con una buona percentuale di approssimazione, di confrontare dati relativi a periodi diversi, per aree uniformi. La metodologia di conteggio è stata sperimentata nell'area del progetto LIFE Natura '99 del Corpo Forestale dello Stato, e poi estesa all'area del Parco Regionale dei Monti Simbruini, alla Riserva Naturale Parziale Montagne della Duchessa, al Parco Regionale del Sirente Velino a parte del Parco Nazionale Gran Sasso Monti della Laga (Foresta Demaniale del Chiarino e Valle Caterina) e, dal settembre 2003, al Parco Nazionale d'Abruzzo Lazio e Molise: il tutto grazie a specifici protocolli di intesa, che hanno consentito di allargare l'area iniziale che comprendeva tra l'altro anche la parte meridionale del Parco Nazionale della Majella.

Il coinvolgimento nel conteggio genetico dell'area del Parco d'Abruzzo ha permesso di dare una svolta importante alle ricerche perché per la prima volta è stato effettuato un campionamento su base scientifica in tutta l'area abitata stabilmente dalla specie, con la stessa metodologia di ricerca. Con la ripetizione e l'affinamento dell'iniziativa sarà possibile derivare una stima più accurata della consistenza numerica della popolazione di orso bruno. Questo importante risultato sarà la premessa per la definizione di interventi di conservazione di questa specie su un ampio territorio che comprende l'area di presenza reale e potenziale (Meriggi *et al.*, 2001; Posillico *et al.*, in stampa).

### **Area di campionamento**

L'area di campionamento ha subito durante il periodo di svolgimento del progetto (1999-2003) delle variazioni annuali, soprattutto grazie all'avvio delle diverse collaborazioni con altri Enti.

Nel primo anno di campionamento l'area era estesa 698 km<sup>2</sup>; si è passati nel 2001 e 2002 a 965 km<sup>2</sup>, per arrivare nell'autunno del 2003 a 1564 km<sup>2</sup> (Figura D1.1).



**Figura D1.1. Evoluzione dell'area di campionamento dal 2000 al 2003.**

Per la raccolta dei campioni l'area del progetto è stata suddivisa mediante una ripartizione a griglia il cui punto di inizio è stato selezionato casualmente partendo dal reticolato chilometrico UTM (1×1 km). Sono stati identificati in questo modo 37 quadranti (lato = 5 km), riportati sulla carta topografica regionale in scala 1:25.000. Otto quadranti interessano il Parco Nazionale della Majella con cui è stata avviata la collaborazione per l'allestimento delle "trappole" a partire dal 2000.

Una cella non è stata campionata perché vi ricadeva il sito di cattura (Relazione finale Azione F1) e quindi era probabile che i dati del conteggio venissero falsati dalla presenza del sito di alimentazione. Un'altra cella non è stata ritenuta idonea per la forte antropizzazione, per la mancanza di superfici boscate necessarie per allestire la trappola e per la presenza di una linea ferroviaria e di

numerose arterie viarie che rappresentano una fonte di pericolo per gli animali. Il campionamento ha quindi interessato 35 celle.

Dovendo definire la dimensione minima della cella di campionamento si è ritenuto opportuno fare riferimento all'estensione media degli *home range* delle femmine adulte, pari a 25 km<sup>2</sup>, calcolati considerando le dimensioni degli *home range* di orsi bruni in Trentino e Croazia (Huber e Roth, 1993; Roth, 1983; Roth *et al.*, 1994) in quanto non disponibili per la popolazione appenninica. Tali dimensioni sembrano coerenti con i dati che recentemente sono stati rilevati per l'orso bruno appenninico (Gentile e Latini, *ex verbis*; Eusepi e Latini, 2003).

### **Metodi di campionamento**

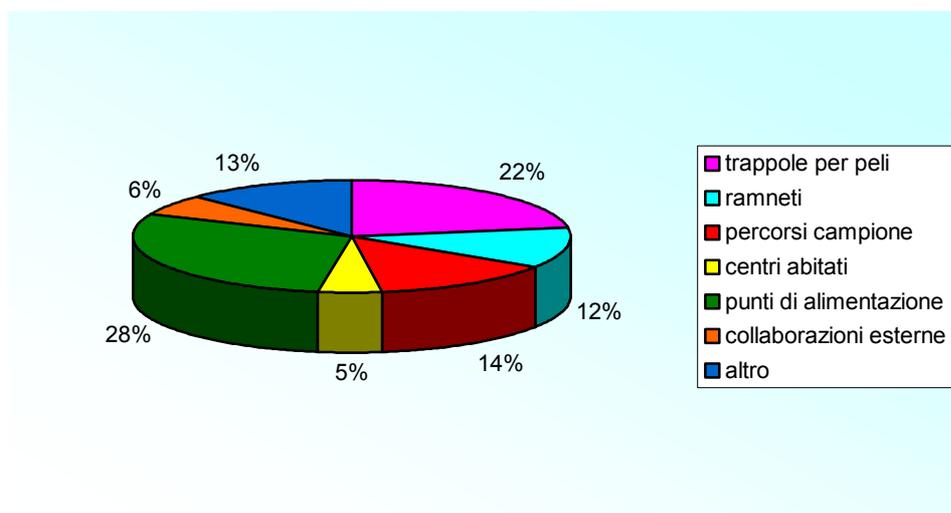
Le analisi genetiche sono state effettuate su campioni biologici reperiti sia tramite metodi di campionamento standardizzati (Roth, 1980; Mowat e Strobeck, 2000; Wilson e Delahay, 2001) sia opportunisticamente.

I metodi standardizzati comprendono:

- a- trappole per la cattura del pelo, in cui gli orsi vengono attirati periodicamente con esche olfattive (Woods *et al.*, 1999; Mowat e Strobeck, 2000; Romain – Bondi *et al.*, 2004);
- b- campionamenti in centri di aggregazione stagionale (ramneti);
- c- rilievi lungo un sistema di percorsi campione.

Tutti gli altri campioni sono stati reperiti in maniera opportunistica, cioè casuali, in allevamenti, alveari e centri abitati, grazie alla collaborazione dei Comandi Stazione del Corpo Forestale dello Stato, di collaboratori volontari e della popolazione locale (Figura D1.2).

L'ubicazione di ogni campione di orso rinvenuto è stata registrata tramite navigatore satellitare GARMIN mod. 12CX, XL e 3 *Plus*. Il campione è stato raccolto con guanti monouso e posto in provette contenenti alcool etilico a 95%. Sono stati inviati all'INFS solo quei campioni ritenuti, dopo analisi macroscopica, potenzialmente idonei per le analisi genetiche cioè campioni fecali freschi e campioni piliferi con bulbo. Per gli escrementi sono state preparate anche aliquote da destinare all'analisi parassitologica/batterologica utile per avere informazioni sulla presenza di patologie nella popolazione (Relazione finale Azione D2).



**Figura D1.2. Ripartizione dei campioni acquisiti per metodo di raccolta.**

### Trappole per la cattura dei peli

Ogni anno sono state effettuate due sessioni di campionamento: la prima generalmente tra maggio – giugno e la seconda tra settembre ed ottobre. Ogni ciclo è caratterizzato dalla localizzazione dei siti in cui posizionare fisicamente la trappola, costruita recintando un'area di circa 20 m<sup>2</sup> con un filo spinato teso intorno a 4 o più alberi ad un'altezza di circa 50 cm dal terreno (Figura D1.3) e dalla installazione della stazione di cattura con la contemporanea attivazione con esca olfattiva. All'interno di ogni cella sono state individuate 3 stazioni di "trappolaggio", in cui veniva spostata a scadenza prefissata di 10 giorni l'esca olfattiva. In ognuna delle sessioni di cattura si sono quindi svolti 3 cicli di trappolaggio (cioè di attivazione delle esche olfattive): ogni ciclo si chiude (a distanza di 10 giorni dall'attivazione), con il controllo della presenza dei campioni, la disattivazione dell'esca olfattiva (che viene allontanata) e la contemporanea attivazione di un altro sito all'interno della stessa cella di campionamento. In pratica ogni sessione dura circa 30 giorni, durante i quali i vari siti attivi vengono comunque ispezionati, sia per verificare la presenza di eventuali segni, sia per verificarne la funzionalità che può risultare alterata da fattori imprevedibili (danneggiamento della recinzione, danni al contenitore dell'esca, etc.).

La metodologia descritta è stata introdotta per la prima volta in Italia riprendendo un sistema già sperimentato con successo in Nord America, adattandolo ovviamente alle esperienze del territorio e della popolazione di orso bruno marsicano. In ciò occorre sottolineare come l'opportunità di spostare periodicamente, all'interno della stessa cella, il sito attivo è stato derivato dalla semplice analisi costi-benefici: infatti attivare contemporaneamente due o più siti di trappolaggio comporta uno sforzo eccessivo, difficilmente sostenibile; per contro, non dovrebbero aumentare, in proporzione, le probabilità di cattura di campioni proprio in relazione alle dimensioni degli *home range* utilizzati per le singole celle di campionamento. Le trappole sono state dislocate sul territorio prevedendo che tutti gli eventuali animali presenti avessero la stessa probabilità di essere "catturati" durante ogni sessione di cattura dalle trappole. Inoltre spostando le trappole tra un ciclo e l'altro all'interno della stessa cella, si riduce la probabilità di catturare sempre lo stesso animale, si aumenta la probabilità di catturare animali che hanno un *home range* più piccolo di quello stimato per calcolare l'ampiezza della cella e si aumenta l'eterogeneità dei campioni.

In media sono state costruite 2,95 trappole nella sessione primaverile e 2,93 trappole nella sessione autunnale per ogni cella (Figura D1.4). Il posizionamento delle trappole è stato deciso in base all'ecologia della specie, alla disponibilità di situazioni idonee alla realizzazione del sito di cattura ed alla raggiungibilità del sito con mezzi fuoristrada. Nei quattro anni di campionamento sono state attivate in media 100 trappole in 33,75 celle nella prima sessione e 118,5 trappole in 40 celle nella seconda sessione (Tabella D1.1).

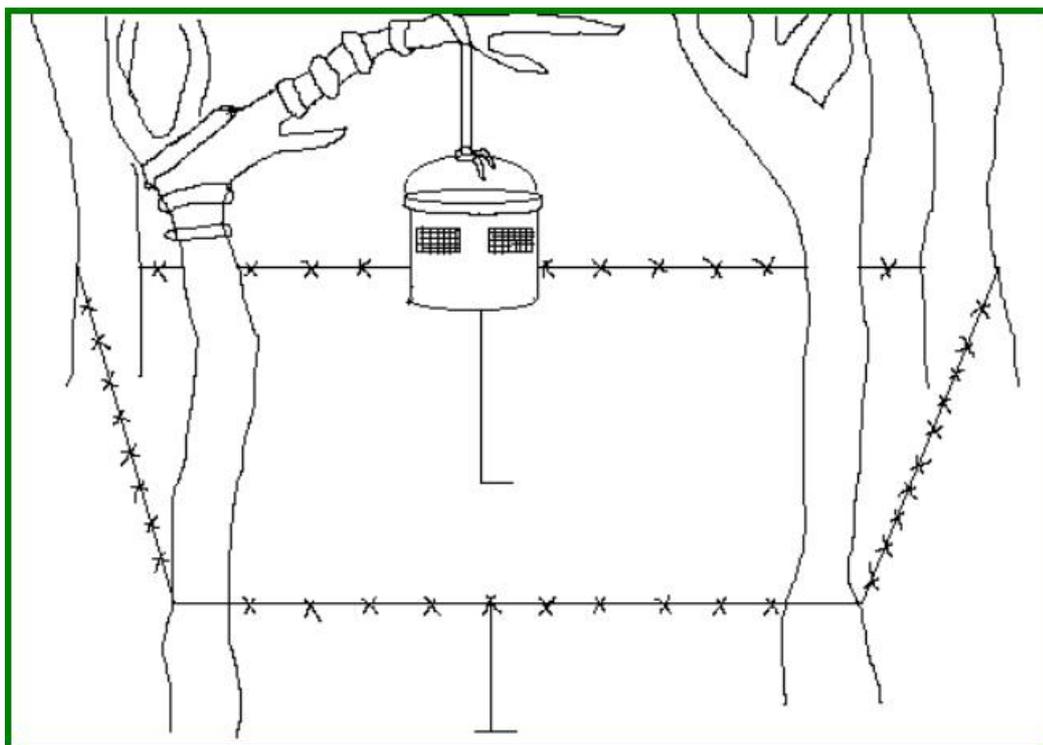


Figura D1.3. Schema di una trappola per la cattura dei peli

Tabella D1.1. Numero di celle e di trappole attivate nei quattro anni di campionamento

Anno	N. celle		N. trappole			
	1 <sup>a</sup> sessione	2 <sup>a</sup> sessione	1 <sup>a</sup> sessione	Trappole/cella	2 <sup>a</sup> sessione	Trappole/cella
2000	30	30	86	2,86	86	2,86
2001	35	35	97	2,77	97	2,77
2002	35	35	107	3,05	107	3,05
2003	35	60	110	3,14	183	3,06
<b>N. Medio</b>	<b>33,75</b>	<b>40</b>	<b>100</b>	<b>2,95</b>	<b>118,5</b>	<b>2,93</b>

L'esca olfattiva è stata preparata con scarti di pescheria diluiti in acqua e lasciati a macerare per almeno 10 giorni.

Nella sessione autunnale del 2002 è stata condotta una sperimentazione per verificare la funzionalità di una nuova esca: un attrante olfattivo sintetico composto da una parte altamente odorosa (1 ml), una base ormonale (2 ml) e olio di paraffina (5 ml), utilizzato in Canada come attrante per l'orso bruno e l'orso nero americano per i programmi di cattura. Questa esca, rispetto alla precedente, aveva il vantaggio di essere più facilmente trasportabile e più durevole nel tempo. Tuttavia per la difficoltà di reperimento della sostanza e per il successo di cattura non superiore a quello calcolato con l'esca tradizionale, si è preferito sospendere la sperimentazione proseguendo con il metodo "tradizionale".

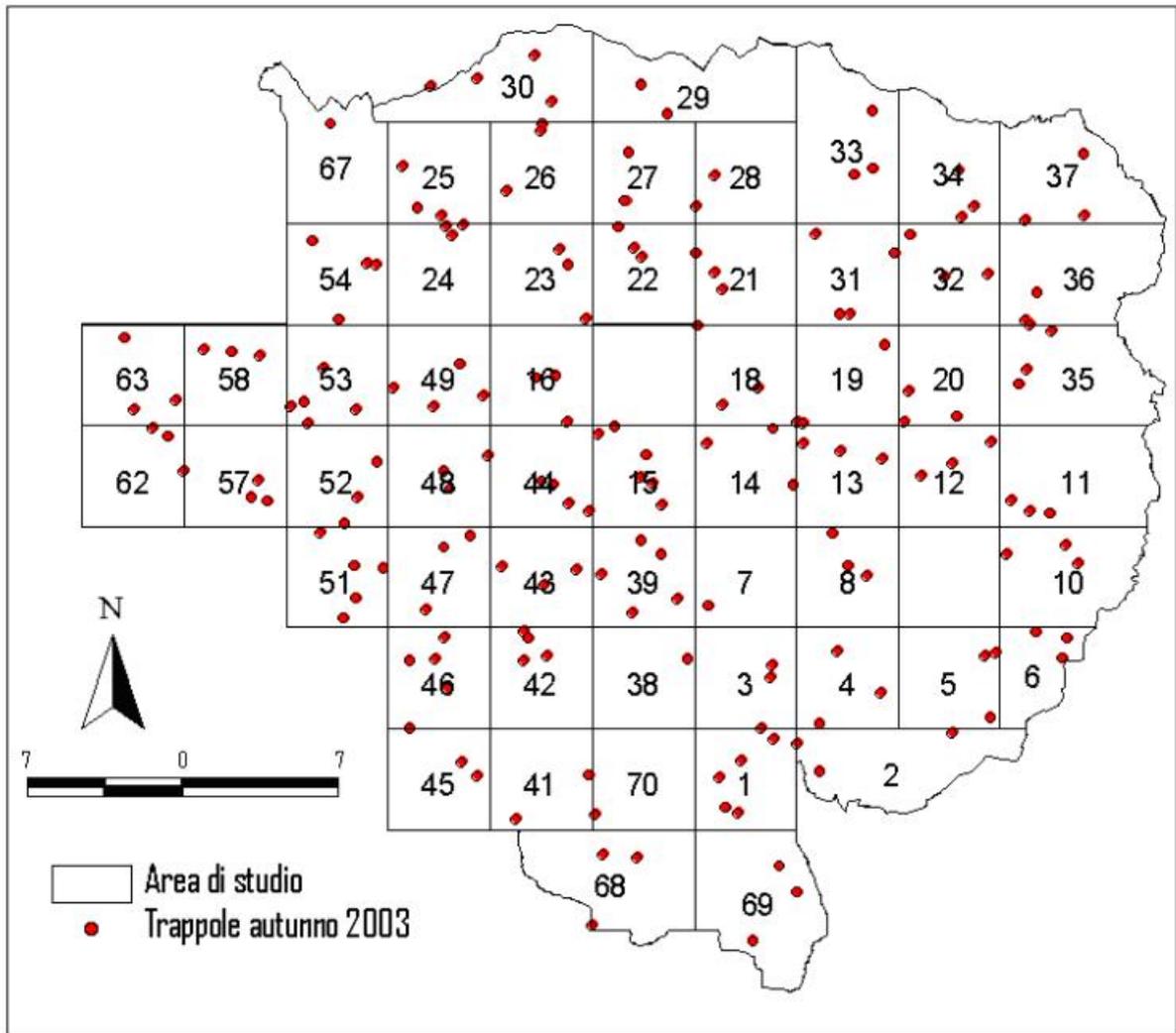


Figura D1.4. Localizzazione delle trappole per peli nelle celle di campionamento.

#### Rilievi in centri di aggregazione stagionale

Gli arbusteti a ramno (*Rhamnus alpinus*) (Figura D1.5) sono frequentati stagionalmente dall'orso bruno che nella tarda estate si nutre in prevalenza delle loro bacche, così come dimostra l'analisi macroscopica dei campioni fecali (Varriale *et al.*, 1996) (Figura D1.6). Pertanto peli ed escrementi sono in genere facilmente rinvenibili in queste aree, generalmente presenti in gran parte delle aree montane frequentate dalla specie, per lo più oltre il limite superiore della vegetazione arborea o nelle aree marginali dei pascoli e dei boschi di faggio.

Per aumentare le probabilità di successo di cattura dei campioni piliferi di orso, alcune aree, estese in media 25 m<sup>2</sup> comprendenti alcune piante scelte in base alla produzione di frutti, sono state recintate con filo spinato, fissato a 4 paletti di ferro, secondo le stesse modalità dei siti di trappolaggio. Ovviamente la termine della stagione produttiva, le strutture sono state completamente rimosse.



**Figura D1.5. Arbusteto di ramno alpino nella Foresta Demaniale di Valle Cupa**

Per la loro ubicazione, i ramneti offrono anche condizioni visive ottimali per l'avvistamento dei soggetti e quindi permettono valutazioni aggiuntive rispetto al semplice monitoraggio genetico, con una stima anche solo approssimativa di alcuni parametri demografici: infatti in più circostanze proprio sui ramneti è stato possibile osservare a breve distanza più soggetti adulti ed anche femmine con piccoli.

Nel periodo compreso tra la metà di agosto e la fine di settembre ognuno dei 25 ramneti individuati per il campionamento è stato visitato 4 volte (Tabella D1.2). Il monitoraggio è consistito in un appostamento prima dell'alba e del tramonto effettuato da siti sopraelevati, impiegando cannocchiali e binocoli (in funzione della distanza) e in un rilievo della produzione trofica e della fenologia delle singole piante.

Questo lavoro ha costituito la parte preponderante di una tesi sperimentale effettuata in collaborazione con l'Università degli Studi di Napoli (Colamarco, 2004) i cui risultati sono riportati nel prodotto identificabile Azione E.

Tabella D1.2. Dati dei campionamenti effettuati ai ramneti.

Id ramneto	N° campionamenti	N° medio metri percorsi	Deviazione standard dei metri percorsi
1	3	376,3	200,849
2	3	1147,1	135,839
3	4	483,6	226,77
4	3	1872,0	450,567
5	3	580,6	228,114
6	2	335,7	57,827
7	3	1774,1	237,722
8	4	2145,0	1004,56
9	5	927,8	366,575
10	4	992,8	201,488
11	3	5327,6	2247,51
12	4	508,4	205,763
13	4	2275,6	946,454
14	2	1584,7	1415,17
15	1	1469,5	
16	3	253,7	
17	3	469,7	
18	3	241,8	202,042
19	3	1730,1	
20	3	946,3	
21	3	531,9	
22	3	1132,1	1157,89
23	3	3533,6	
24	3	313,1	309,444
25	1	2472,4	



Figura D1.6. Escremento di orso con bacche di ramno

### Percorsi campione

Il reticolo di percorsi campione che periodicamente (in genere due volte all'anno) vengono effettuati per il monitoraggio della presenza e distribuzione dell'orso bruno ed anche di altre specie della fauna selvatica, è stato utilizzato anche per il reperimento standardizzato di campioni biologici. I 30 percorsi individuati, di lunghezza complessiva pari a 500 km, sono distribuiti in tutta l'area del progetto e sono rappresentativi dei diversi ambienti presenti. Tutti gli indici di presenza di orso rilevati lungo il percorso sono annotati su un'apposita scheda e georeferenziati tramite un navigatore satellitare al pari di tutti gli altri campioni reperiti.

### Campioni casuali

Il 51% dei campioni sono stati raccolti casualmente durante le normali attività di monitoraggio o di sorveglianza del territorio oppure in seguito alle segnalazioni di avvistamenti di orso soprattutto in vicinanza di allevamenti, alveari e centri abitati frequentati occasionalmente dalla specie. Molti campioni sono pervenuti da sopralluoghi ai punti di alimentazione supplementare allestiti nell'ambito dell'azione di cattura di orsi in natura. Lungo il perimetro del recinto di cattura è stato sistemato un filo spinato controllato sistematicamente 2-3 volte alla settimana o anche quotidianamente in occasione di presenza continua di animali. Tutti i campioni rinvenuti sono stati raccolti e catalogati al pari degli altri, per l'invio all'analisi genetica.

Il reperimento dei campioni biologici tramite metodologie non standardizzate è stato possibile grazie alla collaborazione del personale dei diversi Comandi Stazione del Corpo Forestale dello Stato nonché di collaboratori esterni e semplici cittadini.

### Analisi dei dati

I dati relativi a tutto il periodo di ricerca sono stati analizzati, di volta in volta, per singola sessione di campionamento anche per verificare se il numero di campioni raccolti variava in rapporto alla stagione. Per analizzare la significatività statistica dei risultati è stato utilizzato il test del  $\chi^2$  con la correzione di Yates per un grado di libertà. Lo stesso test è stato utilizzato per mettere in evidenza le differenze nel numero di campioni ritrovati quando la trappola è attiva o non attiva (senza l'esca olfattiva).

Per misurare il successo di cattura delle trappole ad ogni ciclo di controllo, sono stati annotati oltre ai campioni di orso ed a quelli considerati dubbi, anche i campioni piliferi appartenenti ad altre specie: canide e cinghiale. Il successo di cattura è stato calcolato dividendo il numero di campioni per il numero di celle o il numero di trappole:

N° campioni raccolti

N° celle di campionamento

N°campioni raccolti

N° trappole

### **Attività svolte nel 2003**

Nell'anno 2003 sono stati raccolti 289 campioni biologici di cui 125 escrementi e 164 campioni piliferi. Il 59% di questi ultimi (N = 97) derivano dalle trappole per la cattura dei peli. La sessione primaverile del conteggio genetico si è svolta nell'area del progetto (965 km<sup>2</sup>) dove sono state attivate 110 trappole in 35 celle; in 98 trappole (89%) sono stati catturati campioni piliferi delle diverse specie considerate. Nella sessione autunnale invece, grazie alla collaborazione avviata con il Parco Nazionale d'Abruzzo Lazio e Molise, formalizzata poi con un protocollo di intesa tra l'Ente Parco ed il Corpo Forestale dello Stato – Ufficio Foreste Demaniali di Castel di Sangro, la stessa metodologia è stata estesa anche all'area del Parco e a parte della sua Zona di Protezione Esterna non compresa nell'area del progetto. Sono state attivate, su un totale di circa 1.564 km<sup>2</sup>, 184 trappole in 60 celle (Figura D1.4). 85 trappole (46%) hanno dato esito positivo.

Nella prima sessione è stato raccolto 1 campione appartenente ad orso e 3 classificati come sospetti; nella sessione autunnale invece il numero di campioni di orso è stato 84 e quello dei campioni sospetti 46 (Tabella D1.3). I campioni classificati come sospetti sono quelli che non è stato possibile, ad un'analisi macroscopica, attribuire a nessuna delle categorie elencate. Pertanto tali campioni sono stati inviati comunque all'Istituto Nazionale Fauna Selvatica di Bologna per una conferma della loro appartenenza ad orso tramite l'analisi del DNA mitocondriale.

**Tabella D1.3. Risultati del trappolaggio peli nell'anno 2003**

<b>Sessione</b>	<b>N. campioni orso</b>	<b>N. campioni canide</b>	<b>N. campioni cinghiale</b>	<b>N. campioni sospetti</b>	<b>Totale</b>
Primavera	1	157	96	3	257
Autunno	84	555	158	46	843
<b>TOTALI</b>	<b>85</b>	<b>712</b>	<b>254</b>	<b>49</b>	<b>1100</b>

### **Risultati del campionamento**

In totale sono stati raccolti 643 campioni biologici mentre l'analisi genetica è stata effettuata su 605 campioni biologici: 288 escrementi e 317 campioni piliferi. Dei 605 campioni analizzati, 523 sono risultati appartenere ad orso (86,5%) (Figura D1.7), 32 a canide ed il resto non sono stati attribuiti. I risultati dei 38 campioni restanti, raccolti alla fine del progetto, non sono ancora disponibili in quanto il laboratorio dell'INFS non ha ancora concluso le procedure tecniche per poter attribuire il campione con una affidabilità superiore al 95%.

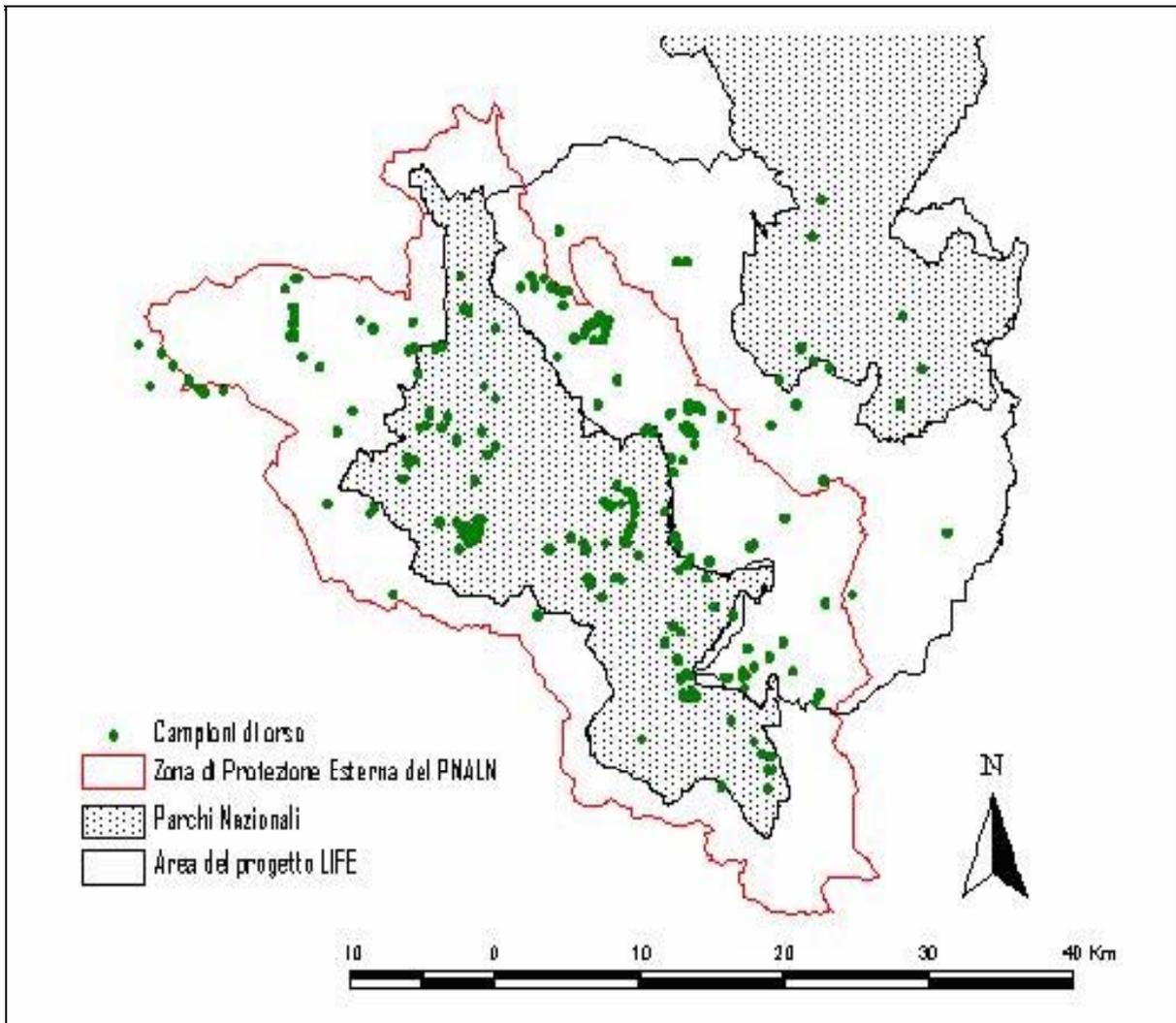


Figura D1.7. Campioni biologici attribuiti ad orso.

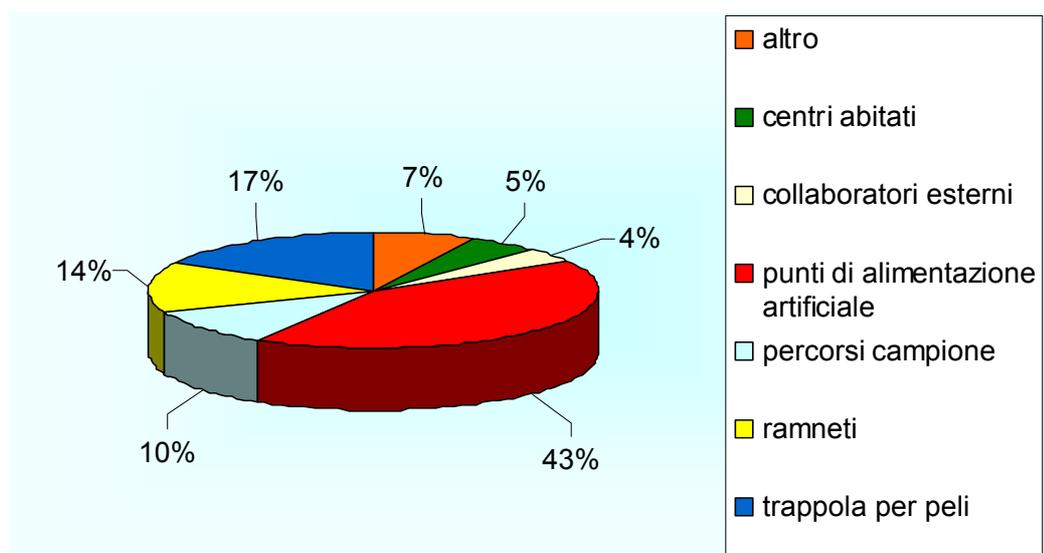


Figura D1.8. Numero di campioni ritenuti idonei per l'analisi genetica per metodologia di campionamento.

I campioni analizzati derivano per il 43% (N= 260 campioni) da siti di alimentazione; per il 17% (N=103 campioni) derivano dalle trappole per peli; per il 14% (N=85 campioni) da centri di aggregazione stagionale, per il 10% (N=60 campioni) da percorsi campione, ed il restante 16% (N=97) deriva da rilievi casuali (Figura D1.8). Complessivamente nel corso di tutto il lavoro sono stati individuati 40 genotipi diversi di cui 19 femmine e 14 maschi; per i restanti 7 genotipi non è stato possibile attribuire il sesso (Figura D1.9). Inoltre 17 genotipi sono stati tipizzati da peli, 12 da escrementi e 11 da entrambe le matrici. Del totale dei genotipi individuati, il 24% deriva da campioni provenienti da trappole per peli; il 23% da percorsi campione; il 18% da centri di aggregazione stagionale, il 15% da punti di alimentazione ed il restante 20% da campionamenti casuali (Figura D1.10).

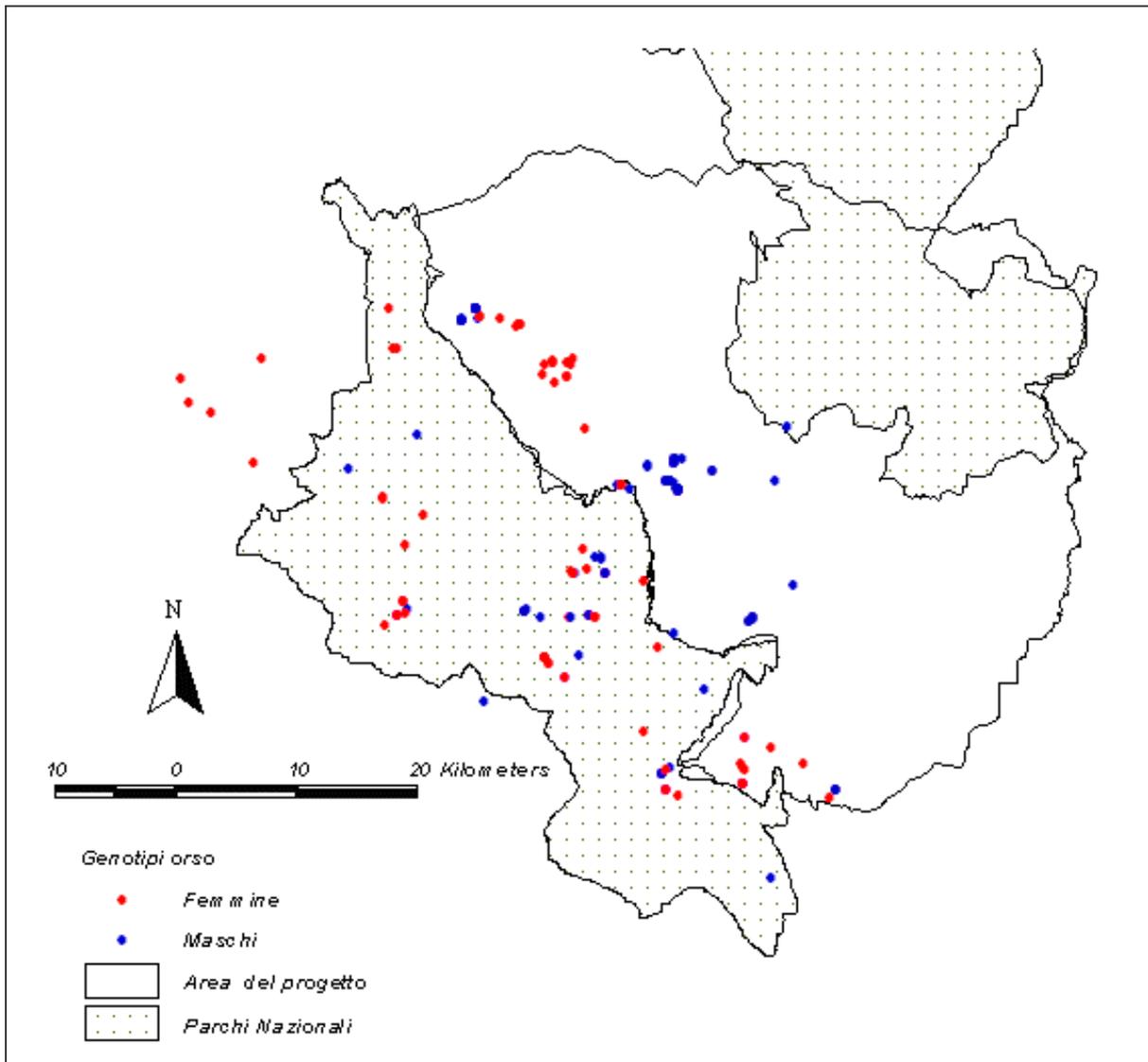


Figura D1.9. Distribuzione dei genotipi nell'area di studio.

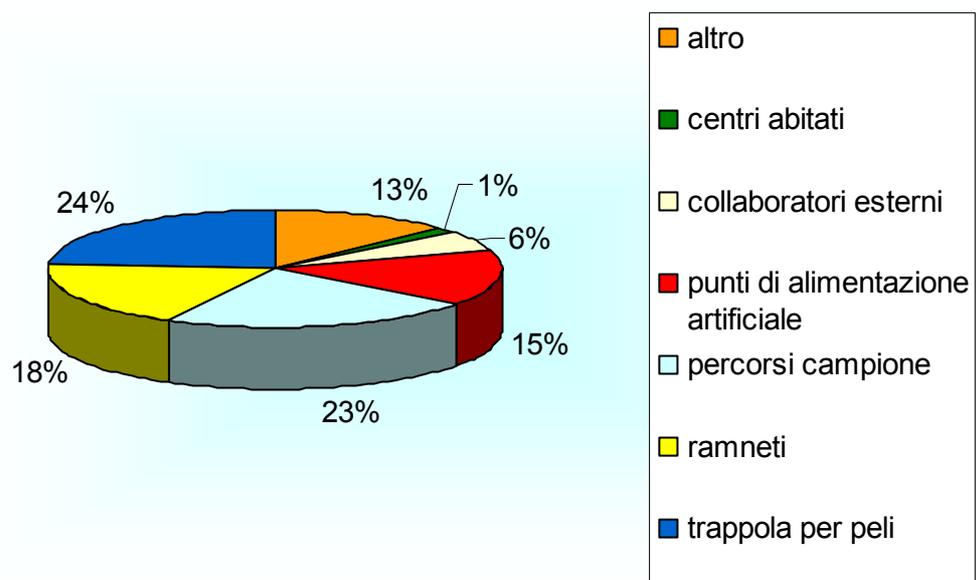
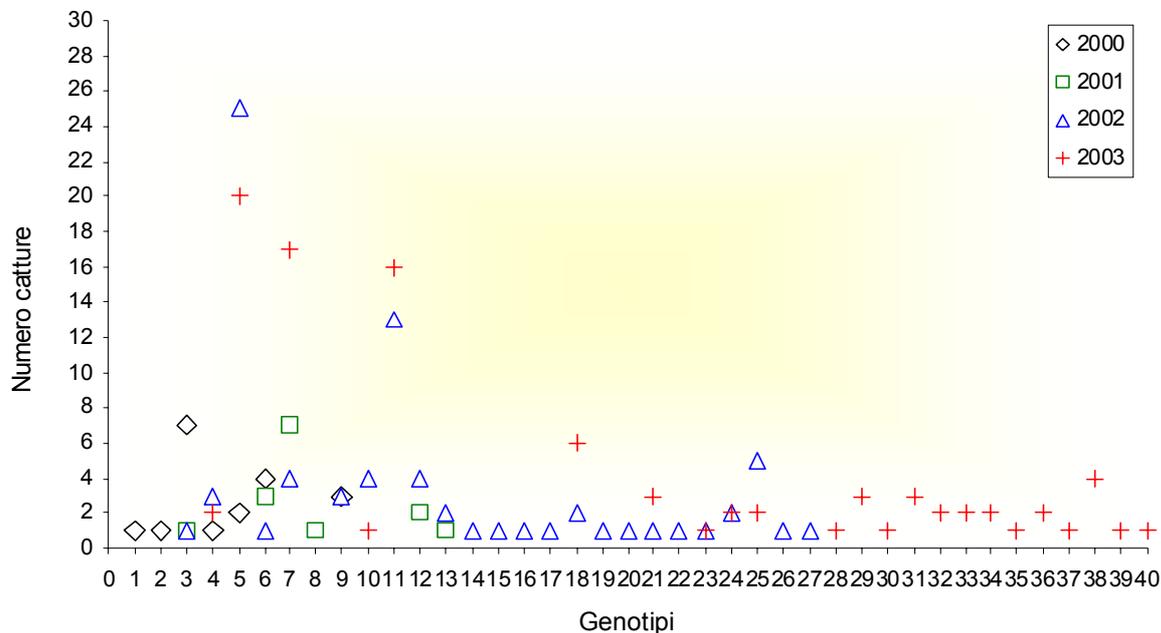


Figura D1.10. Numero di genotipi rilevati per metodologia di campionamento

Dall'analisi della distribuzione dei genotipi nel corso dei vari anni emerge che, dai campioni raccolti nel 2000, sono stati individuati 7 genotipi, da quelli del 2001 6 genotipi, 24 genotipi da quelli del 2002 e 23 da quelli del 2003. La somma delle cifre riportate è ovviamente superiore ai 40 individui citati poiché 15 genotipi sono risultati presenti in due o più anni di campionamento (Figura D1.11).



**Figura D1.11. Numero di catture dei genotipi nei quattro anni di ricerca.**

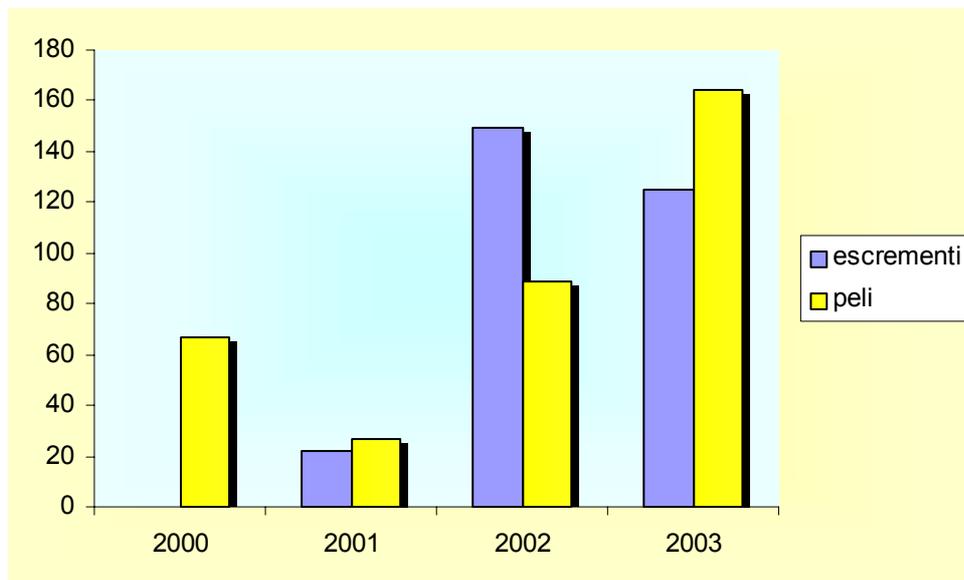
Si ritiene assolutamente doveroso, per evitare equivoci ed interpretazioni non corrette dei dati esposti, sottolineare come dai citati risultati non è possibile al momento derivare indicazioni chiare ed univoche sulla effettiva consistenza numerica della popolazione in quanto i dati si riferiscono a periodi ed aree di campionamento diversi nel corso dell'intero lavoro. È stata comunque effettuata una stima della consistenza, utilizzando però solo i dati raccolti nell'autunno 2003 in quanto è stato il momento in cui il conteggio ha interessato gran parte dell'area frequentata dalla specie.

Per quanto riguarda i risultati relativi alla metodologia di campionamento, l'analisi ha interessato, tutti i 643 campioni rinvenuti tra marzo 2000 e dicembre 2003; di cui 296 escrementi e 347 campioni piliferi (Figura D1.12).



**Figura D1.12. Peli di orso in un filo spinato**

Nel primo anno di campionamento sono stati prelevati esclusivamente campioni di pelo in quanto non era ancora stato messo a punto il protocollo di laboratorio per la tipizzazione del DNA da campioni fecali (Figura D1.13).



**Figura D1.13. Numero di escrementi e di campioni piliferi rinvenuti nel periodo 2000-2003**

Il 22% (N =144) dei campioni piliferi sono stati raccolti in trappole per la cattura dei peli, il 12% (N=76) in centri di aggregazione stagionale, il 29% (N=186) in punti di alimentazione, il 14% (N=88) su percorsi campione ed il restante 23% (N=149) tramite campionamenti casuali.

Uno degli principali obiettivi del lavoro svolto nell'ambito dell'azione D1 era quello di mettere a punto una metodologia di campionamento su base scientifica, ripetibile nel tempo ed in grado di

consentire il confronto dei dati relativi ad aree diverse. Da ciò la metodologia di campionamento descritta in precedenza, che ha dato i seguenti risultati.

Nelle sessioni primaverili sono stati raccolti 10 campioni di orso, 426 di canide, 193 di cinghiale e 4 campioni sospetti; nelle sessioni autunnali sono stati invece rilevati 91 campioni di orso, 778 di canide, 258 di cinghiale e 55 campioni sospetti (Tabelle D1.4 e D1.5).

Nel complesso quindi, il numero di campioni di orso non è risultato elevatissimo, ma la funzionalità delle trappole è comunque evidenziata dall'altissimo numero di segni di presenza di altre specie, presumibilmente attratte dall'esca, considerate le rispettive abitudini alimentari.

**Tabella D1.4. Risultati del trappolaggio peli delle quattro sessioni primaverili**

Anno	N. campioni orso	N. campioni canide	N. campioni cinghiale	N. campioni sospetti	Totale
2000	5	67	11	0	83
2001	1	27	16	0	44
2002	3	175	70	1	249
2003	1	157	96	3	257
<b>TOTALI</b>	<b>10</b>	<b>426</b>	<b>193</b>	<b>4</b>	<b>633</b>

**Tabella D1.5. Risultati del trappolaggio peli delle quattro sessioni autunnali**

Anno	N. campioni orso	N. campioni canide	N. campioni cinghiale	N. campioni sospetti	totale
2000	2	43	24	0	69
2001	0	26	26	1	53
2002	5	154	50	8	217
2003*	84	555	158	46	843
<b>TOTALI</b>	<b>91</b>	<b>778</b>	<b>258</b>	<b>55</b>	<b>1182</b>

\*Il campionamento è stato effettuato anche nel Parco Nazionale d'Abruzzo Lazio e Molise

Per poter meglio valutare l'efficacia del metodo utilizzato, e cioè il successo di cattura delle trappole, l'analisi dei dati relativi ai campioni ottenuti nelle singole sessioni è stata eseguita valutando solo quelli relativi all'area LIFE, ed escludendo invece i risultati ottenuti nella sessione autunnale 2003 dall'area del PNALM in modo da tenere costante l'area di campionamento. Considerando solo l'area del progetto LIFE, sono risultate differenze statisticamente significative nella sessione primaverile ed autunnale per il numero di campioni di orso (N=10 vs. N=33;  $\chi^2 = 5,628$ ;  $p < 0,05$ ) e per i campioni sospetti (N=4 vs. N=20;  $\chi^2 = 4,687$ ;  $p < 0,05$ ). Anche per il numero di campioni di cinghiale sono risultate differenze significative tra le due stagioni ( $\chi^2 = 27,169$ ;  $p < 0,01$ ), mentre il numero di campioni di canide non ha mostrato differenze stagionali significative ( $\chi^2 = 2,602$ ;  $p > 0,05$ ).

Nelle due sessioni di campionamento svolte nel corso dei vari anni, il controllo delle trappole è stato effettuato sia con trappole attive, cioè con l'esca olfattiva presente, che in assenza di esca. Ne sono derivati risultati interessanti poiché il numero di campioni di orso in primavera è risultato maggiore nelle trappole attive (N=4 vs. N=0) (Tabella D1.6), mentre nel periodo autunnale il risultato si inverte (N=27 vs. N=11) (Tabella D1.7).

**Tabella D1.6. Numero di campioni raccolti nelle trappole attive e non attive nella prima sessione**

	N. campioni orso	N. campioni canide	N. campioni cinghiale	N. campioni sospetti	Totali
Trappola attiva	4	113	76	1	194
Trappola non attiva	0	219	90	3	312
<b>TOTALI</b>	<b>4</b>	<b>332</b>	<b>166</b>	<b>4</b>	<b>506</b>

**Tabella D1.7. Numero di campioni raccolti nelle trappole attive e non attive nella seconda sessione**

	N. campioni orso	N. campioni canide	N. campioni cinghiale	N. campioni sospetti	Totali
Trappola attiva	11	122	44	9	186
Trappola non attiva	27	393	78	19	517
<b>TOTALI</b>	<b>38</b>	<b>515</b>	<b>122</b>	<b>28</b>	<b>703</b>

Nella sessione primaverile sono risultate differenze significative tra trappole attive e non attive relativamente al numero di campioni di canide ( $\chi^2=16,604$ ;  $p<0,01$ ) e non significative per i campioni di orso (N=4 vs. N=0;  $\chi^2=1,125$ ;  $p<0,05$ ), di cinghiale ( $\chi^2=0,509$ ;  $p<0,05$ ) ed i sospetti (N=1 vs. N=3;  $\chi^2=0,125$ ;  $p<0,05$ ).

Nella sessione autunnale invece sono state evidenziate differenze significative tra trappole attive e non attive per i campioni di canide ( $\chi^2=70,776$ ;  $p<0,01$ ), significative per i campioni di cinghiale ( $\chi^2=4,463$ ;  $p<0,05$ ) e non significative per i campioni di orso (N=11 vs. N=27;  $\chi^2=2,960$ ;  $p>0,05$ ) e per quelli sospetti (N=9 vs. N=19;  $\chi^2=1,446$ ; g.l.1).

I valori del successo di cattura per trappola e per cella calcolati per i campioni attribuiti ad orso all'analisi macroscopica sono risultati maggiori nell'autunno 2003 (rispettivamente 0,456 e 1,4; Tabella D1.8); lo stesso risultato è scaturito calcolando il successo di cattura per trappola e per cella per i campioni totali (orso, cinghiale, canide e sospetti) (4,581 e 14,05; Tabella D1.9).

**Tabella D1.8. Successo di cattura per trappole e per celle relativo ai campioni di orso**

Anno	Sessione	N. campioni orso/N. trappole	N. campioni orso/N. celle
2000	Primavera	0,058	0,166
2000	Autunno	0,023	0,066
2001	Primavera	0,010	0,028
2001	Autunno	0	0
2002	Primavera	0,028	0,085
2002	Autunno	0,046	0,143
2003	Primavera	0,009	0,028
2003	Autunno	0,456	1,4

**Tabella D1.9. Successo di cattura per trappole e per celle relativo ai campioni totali**

Anno	Sessione	N. campioni totali/N. trappole	N. campioni totali/N. celle
2000	Primavera	0,965	2,766
2000	Autunno	0,802	2,3
2001	Primavera	0,453	1,257
2001	Autunno	0,546	1,514
2002	Primavera	2,327	7,114
2002	Autunno	2,028	6,2
2003	Primavera	2,336	7,343
2003	Autunno	4,581	14,05

Comparando il successo di cattura dei quattro anni di campionamento non sono risultate differenze significative per il numero di campioni di orso e per il numero di campioni totali sia rispetto alle trappole che alle celle (Tabella D1.10).

**Tabella D1.10. Successo di cattura per trappole e per celle relativo ai campioni totali**

Anno	Sessione	N. campioni totali/N. trappole	N. campioni totali/N. celle
2000	Primavera	0,965	2,766
2000	Autunno	0,802	2,3
2001	Primavera	0,453	1,257
2001	Autunno	0,546	1,514
2002	Primavera	2,327	7,114
2002	Autunno	2,028	6,2
2003	Primavera	2,336	7,343
2003	Autunno	4,581	14,05

Oltre all'area citata il conteggio genetico è stato effettuato a partire dal 2002 con le stesse metodologie già descritte per l'area del progetto anche nel Parco Nazionale del Gran Sasso Monti della Laga (Allegati D1.1 e D1.2), nella Riserva Naturale Parziale Montagne della Duchessa (Allegato D1.3) e nel Parco Regionale dei Monti Simbruini (Allegato D1.4). Il personale del Coordinamento Territoriale per l'Ambiente per il Parco Nazionale del Gran Sasso Monti della Laga in collaborazione con il personale dell'Ente Parco e dell'Ufficio Foreste Demaniali di Castel di Sangro ha selezionato due aree, la Valle del Chiarino e la Valle Caterina nelle quali sono state posizionate 10 trappole per peli. In totale sono stati ritrovati nelle quattro sessioni di campionamento 4 campioni sospetti, 10 campioni di canide e 18 campioni di cinghiale. Esito negativo ha avuto anche il trappolaggio peli effettuato dal personale addetto in collaborazione con quello del Corpo Forestale dello Stato nella Riserva Naturale della Duchessa dove sono state posizionate in totale 5 trappole e sono stati rinvenuti solo peli di cinghiale e di cervo. L'area del Parco Regionale dei Monti Simbruini è stata suddivisa in 33 celle di campionamento, di cui solo 17 utilizzate perché ritenute idonee, sono state attivate da 1 a 4 trappole per peli. Il 40% dei controlli (N=75) ha evidenziato la presenza di campioni di canide e cinghiale per un totale di 30 catture complessive, mentre non è mai stata riscontrata la presenza di campioni di pelo attribuiti a orso.

Anche nel Parco Regionale del Sirente Velino è stato condotto in collaborazione il conteggio genetico, ma con una metodologia diversa soprattutto per quanto riguarda l'esca olfattiva costituita da telaini di miele. Dei 10 siti attivati, solo in un caso sono stati rinvenuti peli di orso (Allegati D1.5).

#### Calcolo degli *home range*

Ventidue dei 40 genotipi sono stati catturati più volte nel corso del campionamento (da 2 a 47 volte). Per 12 di questi sono state calcolate le dimensioni delle aree delimitate dalle localizzazioni più esterne definite come *home range* genetico (Tabella D1.11; Figura D1.14; Allegato D1.6) (Kohn e Wayne, 1997). Gli altri 10 genotipi, sono stati ricatturati più volte, ma sempre nello stesso punto o in due siti diversi, e pertanto non è stato possibile calcolare gli *home range* perché ovviamente per chiudere il poligono sono necessari almeno tre localizzazioni diverse.

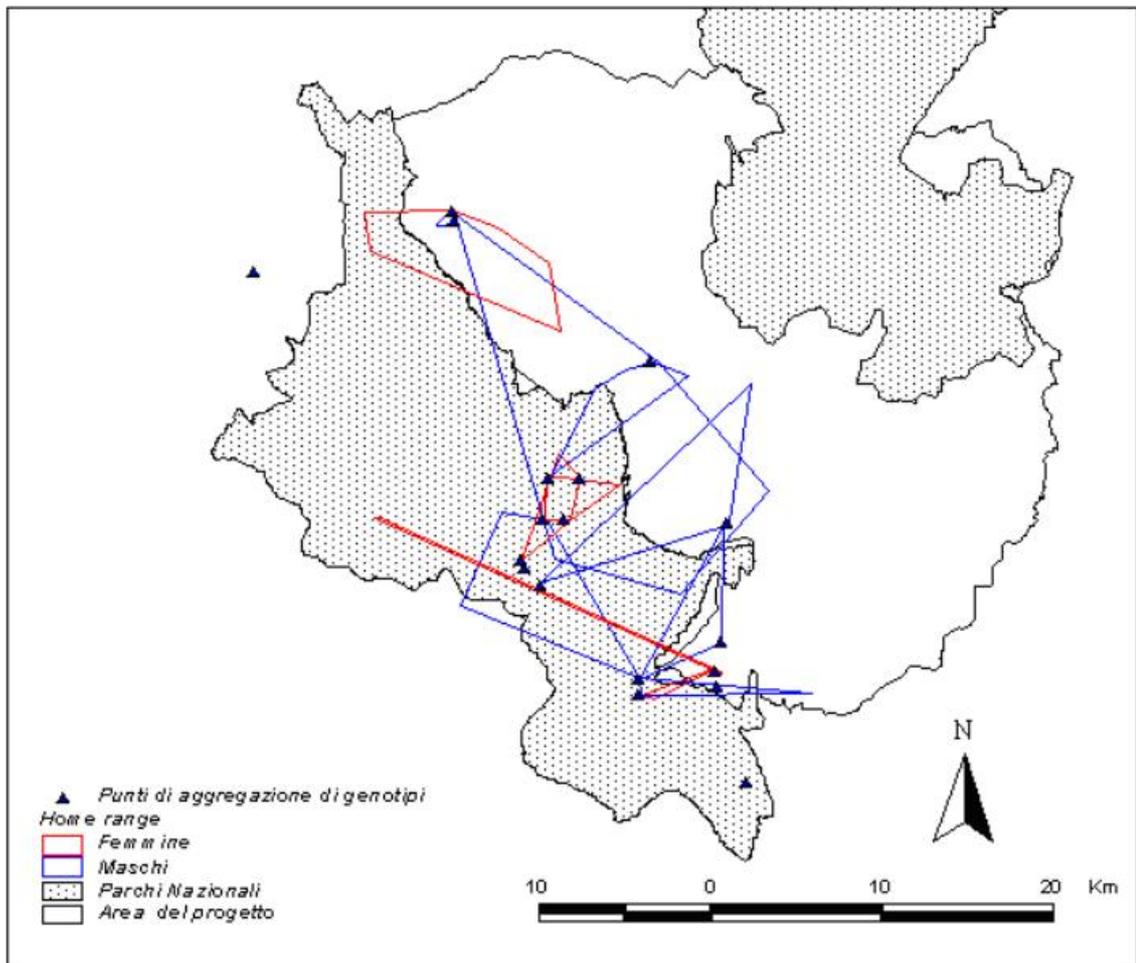


Figura D1.14. Punti di aggregazione di diversi genotipi.

Tabella D1.11. Area e perimetro degli *home range* genetici.

Genotipi	Periodo cattura	Area (km <sup>2</sup> )	Perimetro (km)	Sesso	Diagonale maggiore
3	05/2000-02/2002	54,73	31,91	M	12,61
5	08/2000-10/2003	182,95	61,39	M	25,94
21	09/2002-09/2003	16,57	22,57	M	10,35
13	09/2001-09/2002	1,22	9,52	F	4,65
18	08/2002-10/2003	8,36	14,87	F	6,66
4	07/2000-10/2003	7,27	12,01	F	4,83
6	08/2000-03/2002	66,15	36,90	M	10,01
7	06/2001-10/2003	42,10	30,13	F	13,42
9	07/2000-09/2002	4,66	20,96	M	10,11
12	08/2001-09/2002	3,08	44,45	F	22,18
11	08/2002-10/2003	0,39	2,83	M	1,10
10	07/2002-10/2003	42,63	36,59	M	16,87

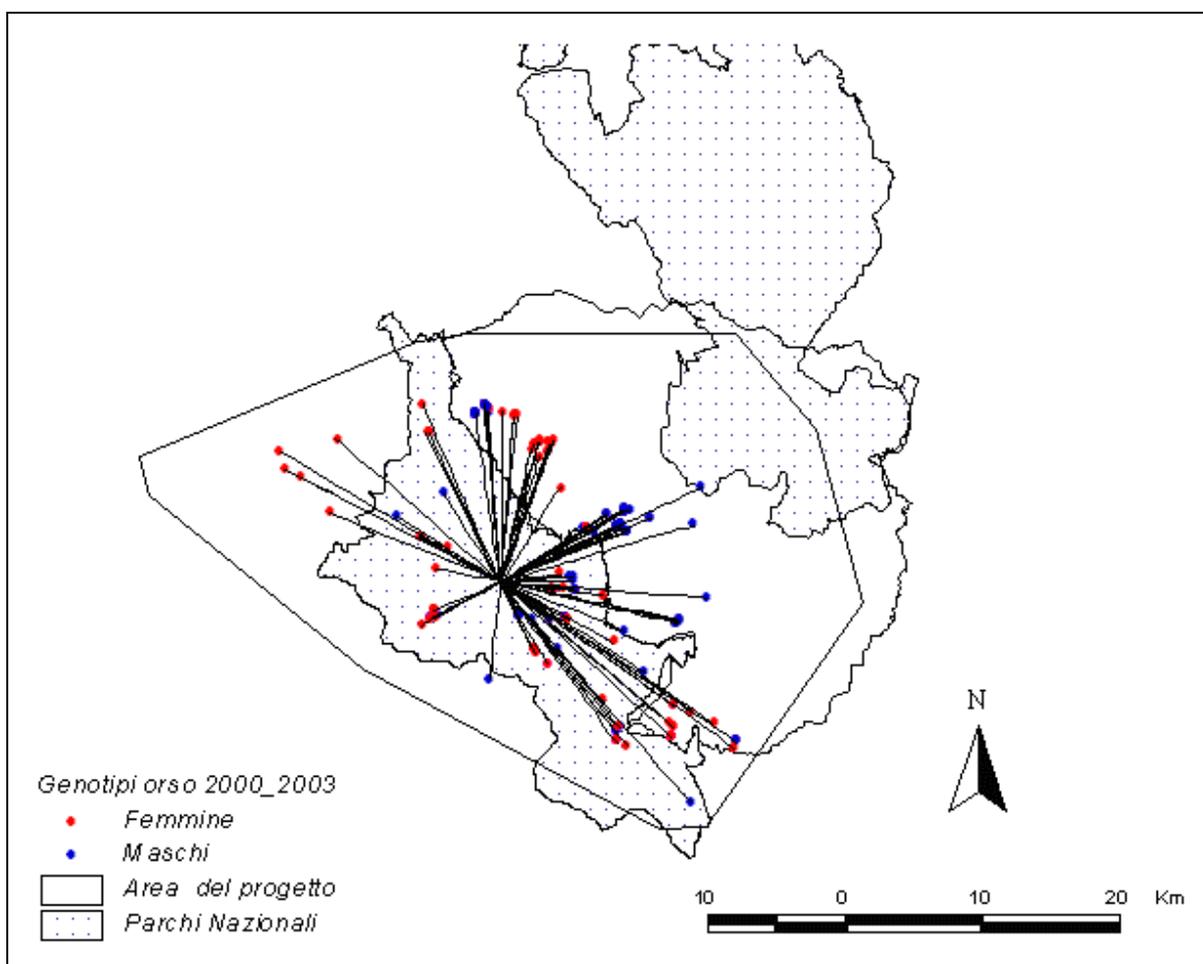
Per poter analizzare i dati relativi agli *home range* genetici, sono stati presi in esame solo quelli con estensione superiore a 40 km<sup>2</sup>, in quanto tale limite è la soglia minima degli *home range* derivati dalla radiotelemetria. Il valore medio dell'ampiezza degli *home range* è risultato di 86,61 km<sup>2</sup> per i maschi e di 43,24 km<sup>2</sup> per le femmine. Per queste ultime il valore medio è stato calcolato confrontando lo *home range* della femmina con genotipo 7 (42,10 km<sup>2</sup>) con quello dell'orsa "Serena" (44,37 km<sup>2</sup>) seguita per un lungo periodo da personale addetto del Parco Nazionale d'Abruzzo Lazio e Molise e calcolato in base a dati radiotelemetrici (Eusepi e Latini, 2003).

I valori medi dei perimetri degli *home range* sono risultati di 41,70 km per i maschi e 32,14 km per le femmine.

In alcuni punti è stata notata una sovrapposizione tra le localizzazioni di più genotipi (da 2 a 4 genotipi) e di diversi *home range* (Figura D1.14). Alcuni genotipi sono situati in vicinanza di trappole per peli (N=4), altri di punti di alimentazione artificiale (N=3), altri ancora di percorsi campione (N=4) o di ramneti (N=4). Un punto di aggregazione di genotipi diversi non sembra associato con nessuno dei siti identificati, mentre due punti ricadono in vicinanza sia di un punto di alimentazione che di una trappola.

La localizzazione dei campioni per i quali è stato possibile identificare il sesso (N=213 di cui 127 maschi e 86 femmine) evidenzia una preponderanza di maschi nella parte centro-orientale dell'area di campionamento, mentre le femmine risultano distribuite in modo più uniforme in tutta l'area di studio.

Considerando le localizzazioni più esterne dei segni di presenza di orso, è stato tracciato un poligono che comprendesse tutti i campioni rilevati nei 4 anni. La distanza media dei genotipi dei maschi e delle femmine rispetto al centroide del poligono è risultata paragonabile: rispettivamente 12,51 km vs. 11,84 km (Figura D1.15).



**Figura D1.15. Distanza dal centroide del poligono che racchiude le localizzazioni estreme di orso.**

## Metodi di analisi genetica

### Stoccaggio dei campioni

Tutti i campioni sono stati conservati in etanolo 95%, in congelatore, alla temperatura di - 20°C dal momento del loro arrivo presso il Laboratorio di genetica dell'Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica.

### Analisi del DNA mitocondriale (mtDNA)

L'analisi del mtDNA serve per identificare la specie di origine del campione, e viene effettuata preliminarmente per accertare che le successive analisi genetiche proseguano solo su campioni di orso. Inoltre, il mtDNA è un genoma presente in copie multiple nelle cellule e quindi ha maggiori probabilità di amplificazione (tramite la PCR, cioè un metodo di amplificazione del DNA mediante tecniche di laboratorio) rispetto alle altre sequenze di DNA nucleare utilizzate in queste analisi (presenti in copia singola). Il mtDNA viene quindi utilizzato anche come indicatore della quantità e qualità del DNA presente in ogni campione. I *primer* utilizzati in questa ricerca (Höss *et al.*, 1992) amplificano un frammento di mtDNA lungo circa 100 paia di basi, frammento che mappa nella parte ipervariabile della regione di controllo. La sequenza nucleotidica di questo frammento è ben caratterizzata, e può essere utilizzata per identificare con certezza la specie di appartenenza del campione. Dopo l'amplificazione, il successivo sequenziamento del frammento amplificato permette l'esatta identificazione della specie sulla base della sequenza nucleotidica.

### DNA fingerprinting

L'analisi dei microsatelliti sui campioni fecali si è rivelata particolarmente difficoltosa, e ciò ha reso necessaria l'analisi preliminare di un numero di loci maggiore rispetto a quello poi effettivamente utilizzato allo scopo di identificare quei loci la cui amplificazione fosse particolarmente efficiente. Nel corso dello svolgimento del progetto sono stati quindi sperimentati per l'amplificazione del DNA estratto dagli escrementi i seguenti loci microsatellite: G10B, G10C, G10H, G10L, G1D, G10X, MU05, MU09, MU10, MU11, MU15, MU50, MU51, MU59, MU61, MU64 (Taberlet *et al.*, 1997). In una prima fase delle analisi, effettuate lavorando esclusivamente sui campioni di pelo raccolti nel 2000, sono stati utilizzati i loci G1D, G10X, MU05, G10L, G10H, G10C, MU59, G10B, ottenendo buoni risultati. Tuttavia una parte dei suddetti loci ha evidenziato una scarsa efficienza di amplificazione nelle analisi effettuate sui campioni di escrementi raccolti a partire dall'agosto 2001. Questi risultati hanno indotto ad effettuare una serie ulteriore di sperimentazioni su un set di loci allargato. Sono inoltre stati ridisegnati i *primer* utilizzati in PCR, così da ottenere frammenti più corti e quindi più facilmente amplificabili. Tutto ciò è stato effettuato allo scopo di individuare i marcatori più efficienti nell'amplificazione del DNA da escrementi. Dopo una serie di sperimentazioni effettuate su un gruppo di escrementi, per il protocollo di analisi sono stati infine selezionati i seguenti nove loci: MU05, MU50, G10L, MU59, MU15, G10C, G10B, MU11, MU51 (Allegato D1.7).

Allo scopo di incrementare ulteriormente l'efficacia dei marcatori utilizzati si è sperimentato l'approccio *nested*, che consiste nell'effettuare una prima reazione di PCR (preamplificazione) attraverso la quale si amplifica un frammento leggermente più lungo utilizzando *primer* esterni (Taberlet *et al.*, 1997). Si ottiene così una soluzione di DNA contenente un numero di molecole "bersaglio" più elevato rispetto a quelle presenti nell'estratto grezzo di DNA. La seconda

amplificazione viene effettuata utilizzando la miscela così arricchita ed un *primer* interno, marcato in modo da permettere la visualizzazione del frammento sul sequenziatore automatico di DNA. Tale approccio viene utilizzato per tutti quei campioni che abbiano dato risultati negativi all'amplificazione diretta dei microsatelliti.

L'elevata probabilità di errore (dovuta ad amplificazioni nulle, all'amplificazione di falsi alleli o al *drop-out* di un allele in alcuni genotipi eterozigoti) associata alla tipizzazione di campioni ottenuti mediante procedure di campionamento non-invasive, impone l'ottimizzazione di procedure di laboratorio idonee alla minimizzazione degli errori. A tale scopo è stato adottato l'approccio delle amplificazioni multiple (Taberlet *et al.*, 1996). Tale approccio 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 utilizzando il programma RELIOTYPE (Miller *et al.*, 2002), il quale, 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%, allora il genotipo viene accettato. In caso contrario il programma propone una serie ulteriore di repliche da effettuare in particolare sui loci la cui affidabilità è al di sotto della soglia di significatività. Pertanto, sulla base dei risultati delle analisi di affidabilità, il numero di PCR per ogni campione e per ogni locus microsatellite è stato ripetuto da un minimo di 4 ad un massimo di 8 volte, fino a raggiungere un "risultato" finale. Se l'affidabilità del genotipo raggiunge o supera il 95% il genotipo viene accettato ed assegnato definitivamente. Il campione viene così identificato ed aggiunto al database. Se l'affidabilità del genotipo non raggiunge comunque la soglia del 95%, il genotipo non viene accettato ed il campione viene definitivamente escluso dal database.

Per la valutazione della dimensione della popolazione è necessario stimare la probabilità che due individui diversi abbiano lo stesso genotipo ai loci analizzati ( $P_{id}$ ). Il calcolo della  $P_{id}$  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. Nel caso della popolazione di orso bruno marsicano, stimata in un numero di esemplari inferiore ai 100 individui, si ritiene che la probabilità di identità possa aggirarsi attorno ad un valore  $P_{id} \approx 0,01$ . Nel calcolo della  $P_{id}$  si deve tener conto del fatto che, quasi certamente, alcuni degli individui in esame sono legati da relazioni di parentela e, quindi, i loro genotipi sono molto più simili rispetto ad individui non imparentati. La  $P_{id}$  tra genotipi legati da relazioni di parentela ( $P_{id_{sib}}$ ) è quindi molto più elevata della  $P_{id_{tot}}$  tra campioni casuali. 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 necessario ad individuare i genotipi di campioni non imparentati. La  $P_{id_{sib}}$  è stata calcolata utilizzando il programma PID (Waits *et al.*, 2001).

#### Determinazione del sesso

Sono stati sperimentati tre differenti sistemi genetici (legati ai cromosomi sessuali) che possono consentire il sessaggio molecolare dei campioni non-invasivi. Sono stati messi a punto protocolli di amplificazione per ottenere sequenze specifiche dei geni dell'Amelogenina (AMG; Ennis and Gallagher, 1994), del locus Zink-Finger (ZFX/Y; Woods *et al.*, 1999), e del locus Sex-Determining-

Region (*SRY*; Taberlet *et al.*, 1996). Le sperimentazioni hanno mostrato che utilizzando il sistema *AMG* si ottengono due frammenti diagnostici nei maschi ed uno nelle femmine, mentre con il sistema *SRY* si ottiene un frammento nei maschi e nessuno nelle femmine, infine il sistema *ZFX/Y* amplifica un frammento di uguale lunghezza nei maschi e nelle femmine, e può essere utilizzato come controllo positivo di amplificazione.

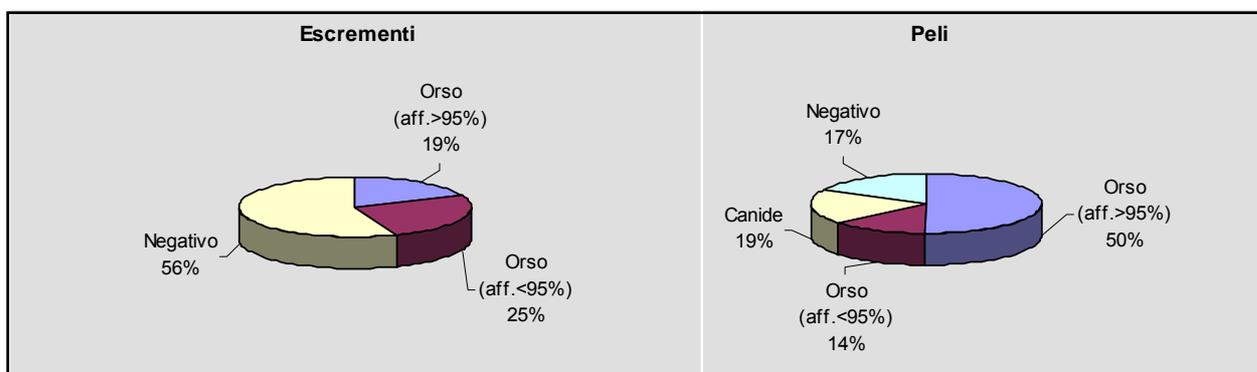
### Risultati delle analisi genetiche

#### DNA fingerprinting

Poiché nel corso dello svolgimento del progetto, alcuni loci microsatellite sono stati sostituiti con altri più efficaci nell'amplificazione, in particolare degli escrementi, si precisa che i genotipi identificati con il primo set di marcatori sono stati tutti analizzati anche con il secondo set (fatta eccezione per i campioni 49, 51 e 56 di cui si è esaurito il materiale genetico), rendendo perciò perfettamente omogenei e confrontabili i risultati ottenuti.

La prima considerazione da fare riguarda la grande differenza riscontrata, per quanto riguarda l'efficienza di amplificazione, tra peli ed escrementi.

La Figura D1.16, infatti, mostra come solo il 17% dei peli non contenga DNA amplificabile, mentre tra gli escrementi tale percentuale sale al 56%. In Tabella D1.12 sono riportati in maniera maggiormente dettagliata i risultati delle tipizzazioni ottenute sui campioni che hanno prodotto DNA analizzabile di orso.



**Figura D1.16. Percentuale di campioni amplificabili.**

**Tabella D1.12. Valori del test di affidabilità.**

	Affidabilità	mtDNA	Sessaggio	Microsatelliti
Peli	> 95%	155	147	155
Escrementi	> 95%	53	47	53
Peli	< 95%	197	2	42
Escrementi	< 95%	69	19	72
Totale		474	215	322

Dopo aver effettuato una serie di 4-5 repliche per ogni locus e per ogni campione, i campioni con genotipo completo sono stati sottoposti al test di affidabilità usando il programma RELIOTYPE

(Miller *et al.*, 2002). I risultati hanno indicato che un totale di 208 campioni (155 peli e 53 escrementi) ha superato la soglia del 95% di affidabilità (corretta per test multipli) (Tabella D1.12).

Complessivamente il 19% degli escrementi ed il 62% dei peli, escludendo i campioni con mtDNA di canide, ha fornito genotipi la cui affidabilità supera il 95%.

Infine, 114 campioni (42 peli e 72 escrementi) hanno prodotto amplificazioni positive per almeno un locus microsatellite, con una piccola percentuale (pari al 10%) di campioni positivi sui nove loci, ma con affidabilità comunque inferiore al 95%.

Il programma GIMLET (Valiere, 2002), è stato infine utilizzato per raggruppare i genotipi identici con affidabilità > 95% e determinare così il numero di genotipi unici che è stato individuato dalle analisi. Questa analisi ha così permesso di identificare 40 genotipi distinti, corrispondenti a 40 orsi, che sono stati campionati nel periodo compreso tra giugno 2000 e dicembre 2003. Dall'analisi delle frequenze di ricampionamento (Figura D1.17), è immediatamente individuabile come tre soli genotipi (il n. 5, n. 7 e n. 11) rappresentino il 50% della totalità dei campioni. Questi genotipi sono ascrivibili a tre orsi che sono stati ricampionati molte volte poiché frequentavano regolarmente siti di alimentazione artificiale allestiti per il programma di cattura. Escludendo i suddetti tre genotipi, rimangono 37 genotipi campionati 104 volte, per una media di 2,8 campionamenti/genotipo. Va tuttavia notato come ben 18 genotipi siano stati campionati soltanto una volta.

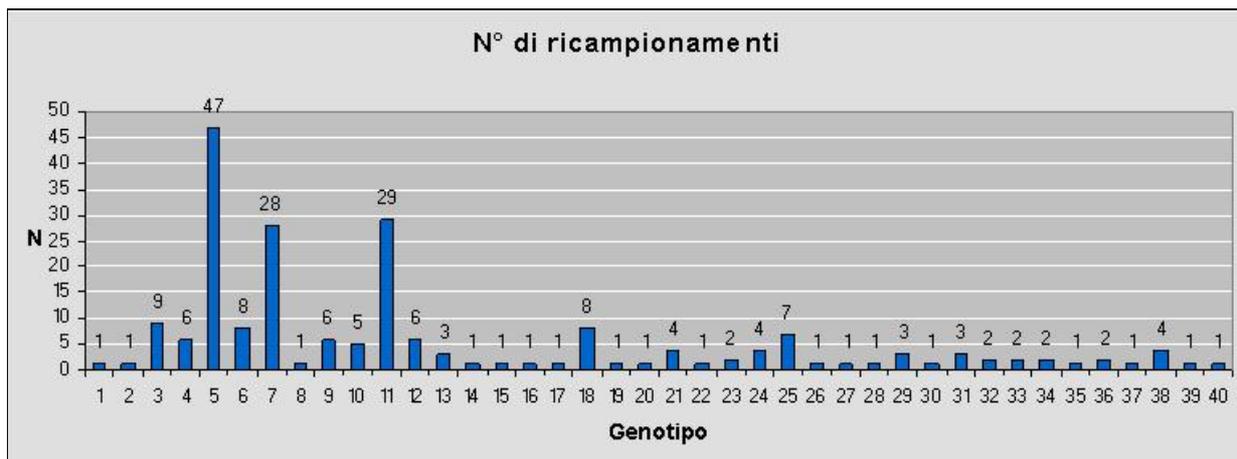
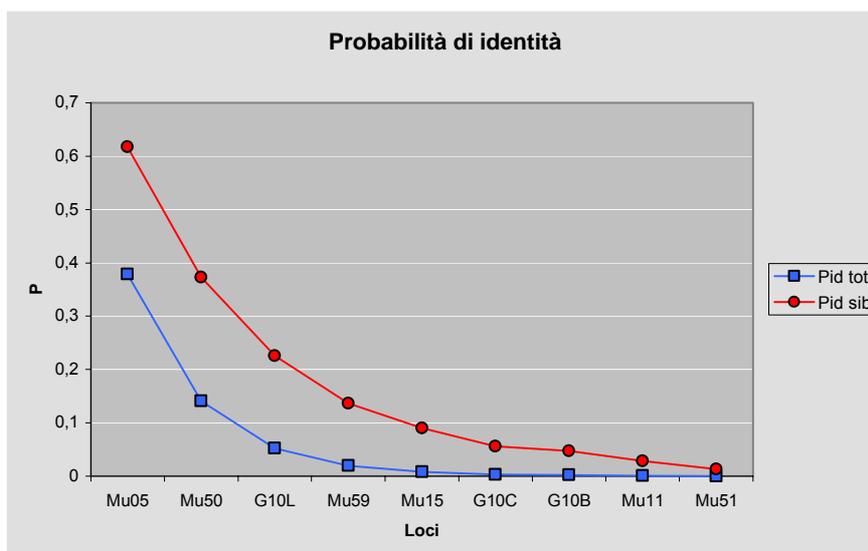


Figura D1.17. Valori di probabilità di identità nell'orso bruno marsicano



**Figura D1.18. Valori di probabilità di identità nell'orso bruno marsicano.**

La Pid relativa ai 9 loci utilizzati in questo progetto è riportata nella Tabella D1.13 e nel grafico in Figura D1.18, dove la probabilità di identità cumulativa per un numero di loci da 1 a 9 è riportata sull'asse y. Si osserva chiaramente la differenza tra le curve  $Pid_{sib}$  e  $Pid_{tot}$ .

Per quanto riguarda i dati sulla popolazione di orso bruno marsicano, la Pid è stata calcolata su un campione di 11 individui, costituito da sangue o tessuti raccolti negli ultimi anni. Si rileva come tale numero sia probabilmente troppo basso per fornire una stima completamente affidabile della Pid, ma rappresenta comunque una utile guida nella scelta del numero di loci da utilizzare per le analisi. Si sottolinea anche la necessità di raccogliere, conservare ed inviare al laboratorio di genetica dell'INFS aliquote di tessuto (conservate in etanolo 95%) prelevate da tutti gli esemplari di orso eventualmente rinvenuti morti giacchè rappresentano un materiale indispensabile per la costituzione di una più affidabile banca dati di genetica basata su materiali raccolti con metodi non-invasivi.

I risultati di queste analisi indicano che il pannello di 9 loci prescelti consente di identificare i singoli individui con una Pid totale di 1/10.000, ed una  $Pid_{sib}$  di circa 1/100. Poiché è molto improbabile che gli orsi della popolazione appenninica presentino un grado medio di parentela corrispondente alla parentela fra fratelli, si ritiene che il pannello di 9 marcatori prescelti sia perfettamente funzionale.

**Tabella D1.13. Valori di probabilità di identità nell'orso bruno marsicano**

locus	Pid <sub>tot</sub>	Pid <sub>sib</sub>
Mu05	0,3786	0,6175
Mu50	0,1404	0,3731
G10L	0,0521	0,2254
Mu59	0,0193	0,1362
Mu15	0,0081	0,0902
G10C	0,0031	0,0557
G10B	0,0021	0,0471
Mu11	0,0008	0,0284
Mu51	0,0001	0,0133

Si riportano in Tabella D1.14 i risultati relativi alla stima della frequenza dei *drop-out* (cioè la mancata amplificazione di un allele in un locus polimorfo) e delle amplificazioni positive per campione, in media. Data l'eterogeneità riscontrata tra peli ed escrementi i risultati sono riportati separatamente. Si precisa, inoltre, che i valori riportati nelle Tabelle D.13 e D1.14 sono riferiti ai soli campioni tipizzati con affidabilità superiore al 95%.

**Tabella D1.14. Valori della stima della frequenza dei drop-out.**

	% PCR positive	% drop-out
Peli (N = 155)	0.86	0.03
Escrementi (N = 53)	0.8	0.21

Da questi è possibile notare che, per i campioni affidabili al 95%, la maggior differenza tra peli ed escrementi sia a carico del numero dei *drop-out*, piuttosto che a carico del numero di amplificazioni positive. La scarsa concentrazione del DNA di orso, la maggior degradazione e la presenza di inibitori della polimerasi nell'estratto di DNA dalle feci, sono probabilmente i fattori che determinano la minore qualità di questo tipo di campione.

In Tabella D1.15 si riportano le percentuali di amplificazioni positive per ogni locus.

**Tabella D1.15. Valori percentuali delle amplificazioni positive per locus.**

Locus	% PCR positive
MU05	80
MU50	79
G10L	76
MU59	82
MU15	78
G10C	85
G10B	85
MU11	84
MU51	93
AMG	95

#### Determinazione del sesso

La determinazione del sesso si è rivelata particolarmente difficoltosa ed ha richiesto uno sforzo particolare per l'identificazione e la messa a punto dei marcatori più efficaci. In un primo tempo sono stati utilizzati i geni *SRY* (Taberlet *et al.*, 1993), e *ZFX/Y* (Woods *et al.*, 1999), con risultati ambigui. Infatti, dopo una prima serie di analisi, la banda generata dal gene *SRY*, prevista solo sul cromosoma Y, è risultata in realtà presente in tutti i campioni, indicando perciò che tutti gli individui erano di sesso maschile. Si sottolinea come la tipizzazione effettuata su 50 campioni (campioni 2-121, vedi relazione intermedia agosto 2002) utilizzando il gene *SRY* abbia sempre portato all'identificazione di soli individui maschi. I risultati di queste analisi sono sembrati dubbi. Perciò, allo scopo di confermare o di smentire tale risultato è stato utilizzato il gene *AMG* (Ennis e Gallagher, 1994). La procedura di analisi di laboratorio consiste nella co-amplificazione di frammenti originati da entrambi i cromosomi sessuali, X (femminile e maschile) ed Y (esclusivamente maschile). Tuttavia il frammento originato dal cromosoma Y è, nell'orso, più corto di circa 50 nucleotidi rispetto all'analogo prodotto che mappa sul cromosoma X. Analizzando i prodotti di PCR tramite elettroforesi, risulta pertanto che i maschi sono caratterizzati dalla presenza di due distinti prodotti di amplificazione (X e Y), mentre le femmine presentano un solo frammento (XX).

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 *primer* (Figura D1.19). Nel sistema AMG le differenze in efficienza di amplificazione tra banda diagnostica e banda di controllo sono, quindi, intrinsecamente annullate. I sistemi di sessaggio basati sull'amplificazione del gene *SRY*, invece, impongono l'amplificazione di un marcatore esterno, come controllo positivo di PCR, dal momento che il sesso femminile è determinato dalla semplice "assenza di prodotto di amplificazione". La necessità di ottimizzare una reazione di PCR multiplex utilizzando loci diversi e *primer* diversi impone uno sforzo di messa a punto e di validazione supplementari, che comunque non garantisce un'affidabilità maggiore, rispetto al sistema AMG.

Le repliche di PCR effettuate utilizzando gli stessi campioni, hanno indicato un elevato livello di affidabilità e riproducibilità delle tipizzazioni realizzate usando il gene *AMG*. Il tasso di *drop-out* (calcolato sui maschi, in quanto "eterozigoti") è infatti risultato del 9%, mentre la percentuale di PCR positive è risultato del 95%. Pertanto anche la tipizzazione dell'*AMG* richiede un approccio *multitube*, ma il numero di ripetizione richieste per ottenere un'affidabilità del 95% è limitato (massimo 4 ripetizioni per campione). Va infine notato come i campioni n. 23, 35, 70, 76, 80, 81, 83, 96 e 102, risultati maschi dopo la tipizzazione al gene *SRY*, siano invece risultati essere femmine dopo le analisi, replicate e concordanti, del gene *AMG*.

I risultati della determinazione del sesso, indicano la presenza di almeno 14 maschi e 19 femmine (rapporto 1:1,3), mentre la tipizzazione è risultata negativa in 7 genotipi (Tabella D1.16). Le differenze tra numero di maschi e numero di femmine non sono risultate statisticamente significative (test del  $\chi^2$ ).

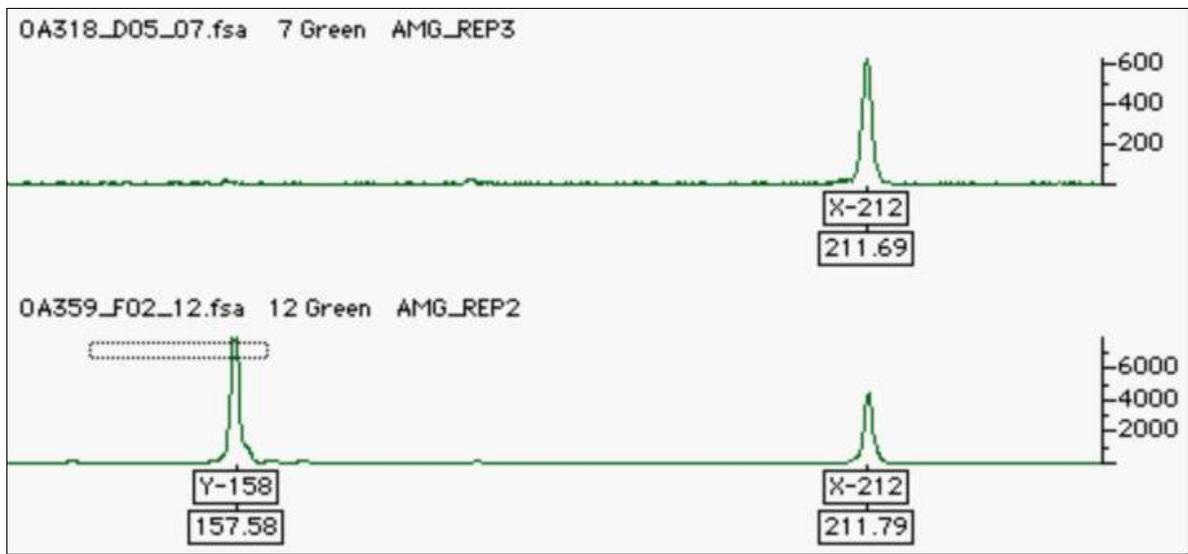


Figura D1.19. Tipizzazione di alcuni campioni utilizzando il gene *AMG*.

**Tabella D1.16. Risultati del sessaggio.**

Genotipo	Sesso	Genotipo	Sesso	Genotipo	Sesso	Genotipo	Sesso
1	M	11	M	21	M	31	F
2	F	12	F	22	F	32	F
3	M	13	F	23	F	33	F
4	F	14	Neg	24	M	34	F
5	M	15	Neg	25	F	35	M
6	M	16	Neg	26	F	36	F
7	F	17	Neg	27	F	37	F
8	F	18	F	28	Neg	38	F
9	M	19	Neg	29	M	39	M
10	M	20	M	30	Neg	40	M

### Variabilità genetica

Non sono state osservate differenze significative tra i valori di eterozigosi attesa ( $H_e = 0,460$ ) ed osservata ( $H_o = 0,471$ ) per i 40 genotipi individuati (Tabella D1.17). L'eterozigosi attesa ( $H_e$ ) varia complessivamente da 0,222 (locus MU15) a 0,550 (locus MU51). Questi valori sono comparabili con quanto riportato da Lorenzini *et al.*, (in stampa) dove è stata osservata (per 12 loci polimorfi di 30 orsi) una eterozigosi attesa pari a 0,438 (da 0,189 – locus G1A – a 0,522 – locus CXX20). Il numero medio di alleli per locus (2,3) è piuttosto basso ed è confrontabile con quanto riportato per la stessa popolazione di orso bruno da Lorenzini *et al.* (in stampa), dove il numero medio di alleli per locus è 2,2 ( $\pm 0,1$ ). Rispetto ad altre popolazioni di orso bruno in Nord America e in Scandinavia sia l'eterozigosi attesa che il numero medio di alleli per locus è basso. L'eterozigosi attesa ( $H_e$ ) per 10 popolazioni di orso bruno in America Settentrionale va da 0,605 a 0,761 (Paetkau *et al* 1998; Paetkau, 2003). Nelle popolazioni scandinave l'eterozigosi attesa è pari in media a 0,710 (Waits *et al.*, 2000). Il numero medio di alleli per locus di queste popolazioni è pari a 6,8, mentre in Nord America va da 4,38 a 7,63 (Paetkau *et al*, 1998). L'unica eccezione è rappresentata dalla popolazione di orso bruno dell'isola di Kodiak, in cui sia l'eterozigosi attesa media ( $H_e = 0,265$ ) che il numero medio di alleli per locus (2,13) (Paetkau *et al* 1998) sono inferiori o comparabili con quanto riscontrato per l'orso bruno nell'Appennino.

L'eterozigosi della popolazione orientale di orso bruno dei Monti Cantabrici in Spagna è pari a 0,438 e il numero medio di alleli per locus a 3,4 (Rey e Doadrio, 1999). Il valore di  $F_{is}$  non è statisticamente diverso da zero suggerendo che non c'è differenza statisticamente significativa nel tasso di accoppiamento tra consanguinei (*inbreeding*) rispetto a quanto ci si aspetterebbe in una popolazione a riproduzione casuale. Nel complesso questi risultati indicano, almeno dal punto di vista statistico, una bassa incidenza della consanguineità.

Considerando i valori di eterozigosi attesa e soprattutto il numero medio di alleli per locus, è evidente nella popolazione Appenninica di orso bruno una perdita rilevante di variabilità genetica.

**Tabella D1.17. Indici di variabilità genetica dei 40 genotipi tipizzati.**

Locus	n° alleli	dimensioni	Ho	He	Fis	significatività
MU05	2	135-137	0.400	0.470	0.159	n.s.
MU50	2	100-104	0.450	0.470	0.053	n.s.
G10L	2	148-154	0.550	0.440	-0.242	n.s.
MU59	2	101-107	0.520	0.500	-0.043	n.s.
MU15	2	117-121	0.250	0.220	-0.130	n.s.
G10C	3	95-101-105	0.570	0.500	-0.131	n.s.
G10B	3	112-126-128	0.520	0.510	-0.014	n.s.
MU11	2	88-92	0.430	0.480	0.103	n.s.
MU51	3	114-120-122	0.550	0.550	0.012	n.s.
media	2.33		0.471	0.460	-0.026	n.s.

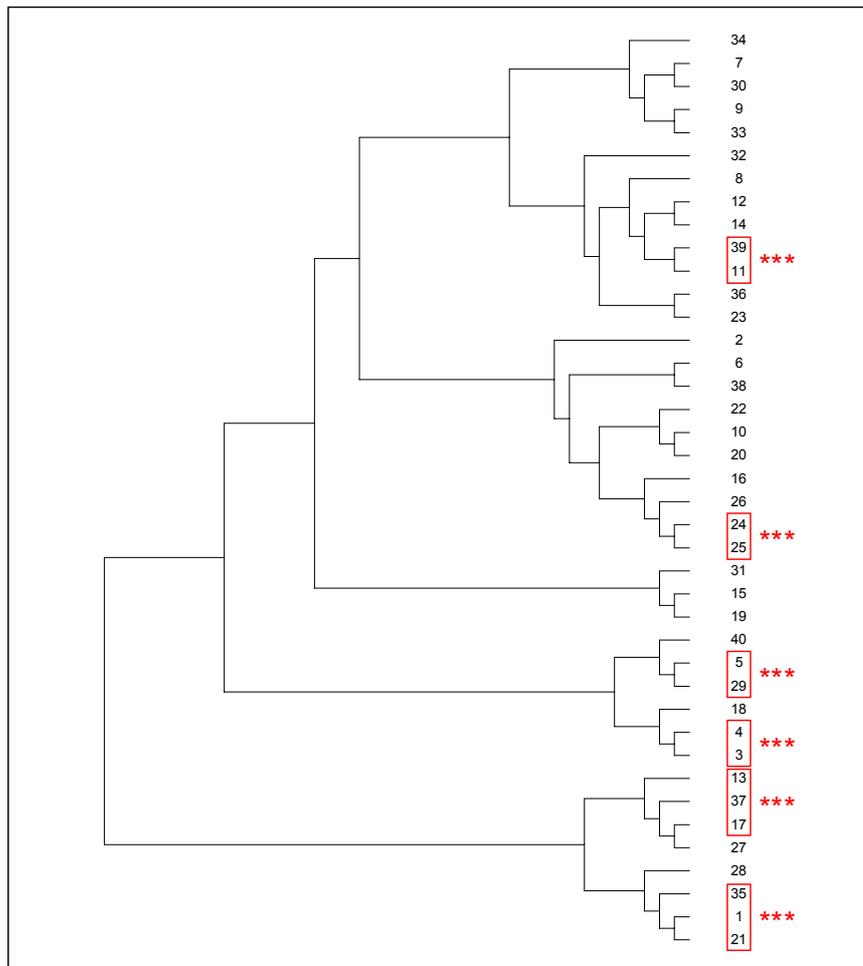
### Relazioni di parentela tra genotipi

Le relazioni di parentela tra i genotipi sono state analizzate utilizzando il programma KINSHIP (Queller e Goodnight, 1989). In allegato vengono riportati i livelli di significatività delle potenziali relazioni fratello/fratello (indipendenti dal sesso degli individui). In Figura D1.20 vengono illustrate in forma grafica, attraverso un dendrogramma UPGMA, le stesse relazioni di parentela prodotte dall'analisi di KINSHIP (Queller e Goodnight, 1989). In Figura D1.20 sono inoltre riportate le relazioni di parentela risultate significative con una probabilità  $p < 0.001$ . E' importante sottolineare che, utilizzando 9 loci microsatellite, ciascuno rappresentato da 2-3 alleli, le stime di parentela siano affette da un tasso di errore molto elevato. Questo suggerisce cautela nell'interpretazione delle significatività che sono state riscontrate.

### Stima della dimensione della popolazione

I genotipi ottenuti dalle analisi genetiche dei campioni biologici permettono di stimare la dimensione della popolazione. La dimensione della popolazione è stata calcolata con l'analisi di rarefazione (Krebs, 1989) che stima il numero di individui in base al rapporto tra il numero dei campioni biologici analizzati ed il numero dei genotipi rilevati [Kohn *et al.*, 1999 per il coyote (*Canis latrans*), Wilson *et al.*, 2003 per il tasso (*Meles meles*)]. Assumendo che ogni genotipo nuovo rappresenti un esemplare diverso, il numero di individui corrisponde all'asintoto della funzione  $y = (ax)/(b+x)$ , dove  $a$  è l'asintoto della curva;  $y$  è il numero cumulativo di genotipi unici;  $x$  è il numero dei campioni biologici raccolti;  $b$  è il tasso di declino della curva.

Dato che l'ordine con cui i campioni sono immessi nel data base influenza la stima dell'asintoto la stima della popolazione è stata effettuata considerando il valore medio (o mediano) dell'asintoto derivato da 1000 ripetizioni casuali, ognuna con un ordine diverso di ingresso dei dati. L'analisi di rarefazione è stata effettuata utilizzando il software GIMLET (Valiere, 2002) che permette la compilazione di uno *script file* che viene eseguito nel software R. Questo programma esegue l'analisi di rarefazione, stimando il valore dell'asintoto con differenti equazioni. Per questo lavoro sono state utilizzate 3 equazioni: l'equazione di Kohn, l'equazione di Chessel  $\{y = a - a[1 - (1/a)]^x\}$  e l'equazione di Eggert  $\{y = a[1 - e^{-(bx)}]\}$ . Interpolando i dati ricavati dalle 3 equazioni utilizzate è stato ricavato il valore dell'asintoto  $e$ , quindi, il numero di orsi che hanno frequentato l'area campionata.



**Figura D1.20. Relazioni di parentela.**

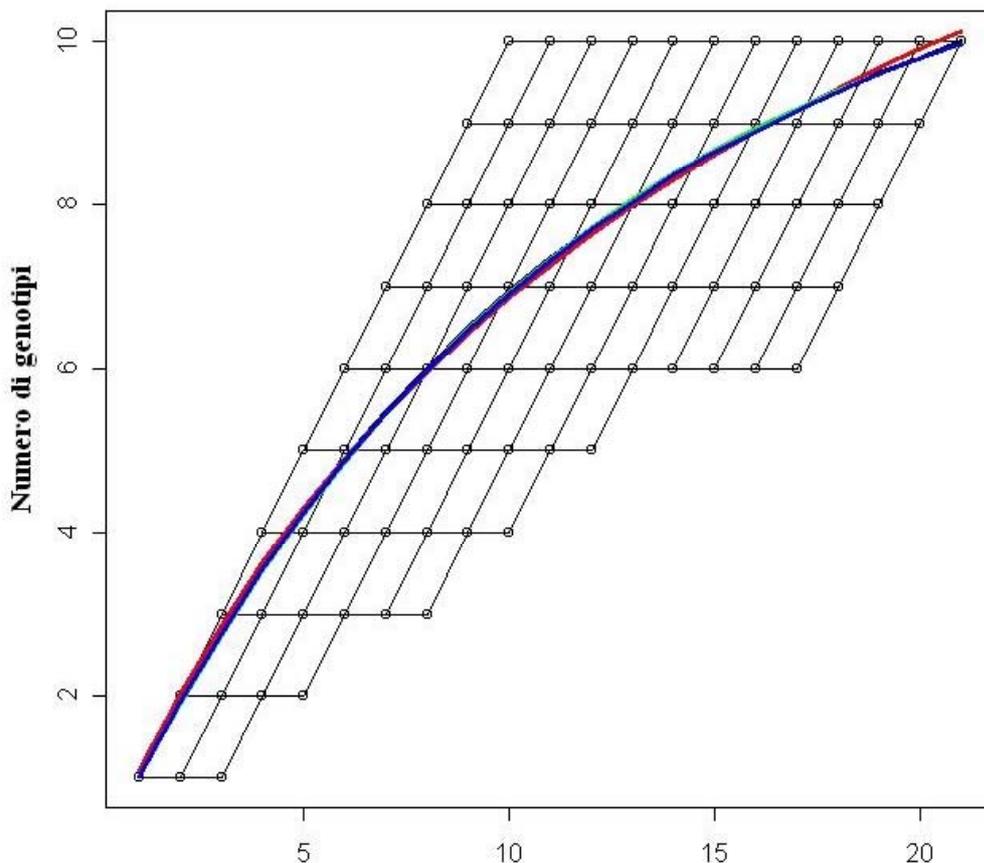
Per le ragioni citate, in questa relazione sono riportate due stime di popolazione: la prima si riferisce al numero di orsi che hanno frequentato una parte dei ramneti presenti nel *core* della popolazione di orso bruno marsicano nell'anno 2002 (Colamarco, 2004); la seconda invece è stata calcolata in base al numero di genotipi che sono stati campionati nei ramneti, tramite percorsi campione e trappole per peli nel periodo agosto-novembre 2003 nell'area del progetto, nel Parco Nazionale d'Abruzzo Lazio e Molise ed in parte della Zona di Protezione Esterna.

L'analisi di rarefazione ha stimato la presenza di 19,34 orsi (asintoto medio) (intervallo di confidenza al 99%: da 18,62 a 20,05) nei ramneti campionati tra agosto e settembre 2002 (Figura D1.21). I risultati delle simulazioni hanno evidenziato che l'asintoto stimato può variare da 15,54 a 20,61. Il valore dell'asintoto pari a 19,34 è stato riscontrato in 997 delle 1000 simulazioni effettuate. Nello 0,3% delle simulazioni sono stati riscontrati valori superiori a 20,61 individui e assolutamente irrealistici (da 757 a 2840). Siccome la distribuzione dei valori degli asintoti derivati dalle simulazioni si discosta significativamente da una distribuzione normale, viene riportato anche il valore dell'asintoto mediano che è pari a 17,48.

Una seconda curva di rarefazione è stata calcolata per stimare la dimensione della popolazione considerando i campioni biologici (N=32) raccolti nell'autunno del 2003 ai quali è stato possibile attribuire un genotipo. Per il calcolo della stima della popolazione sono stati considerati solo i campioni ritrovati lungo percorsi campione, nelle trappole per peli e nei ramneti poiché questi sono gli unici metodi di campionamento standardizzati. Questa stima è stata effettuata solo per l'autunno 2003 in

quanto, considerata l'estensione e l'ubicazione dell'area di studio ed il ristretto intervallo temporale, si può ragionevolmente assumere una chiusura geografica e demografica dell'area di studio e della popolazione. Ciò implica che sia stata campionata quasi tutta l'area frequentata da quasi tutti gli orsi e che la somma dei nati e degli immigrati sia uguale alla somma dei morti e degli emigrati. Il numero di individui stimato (asintoto mediano) è pari a 26,16 con un livello di confidenza del 95% pari a 0,56 (Tabella D1.18; Figura D1.22).

Figura D1.21. Curva che esprime il numero dei genotipi tipizzati in funzione del

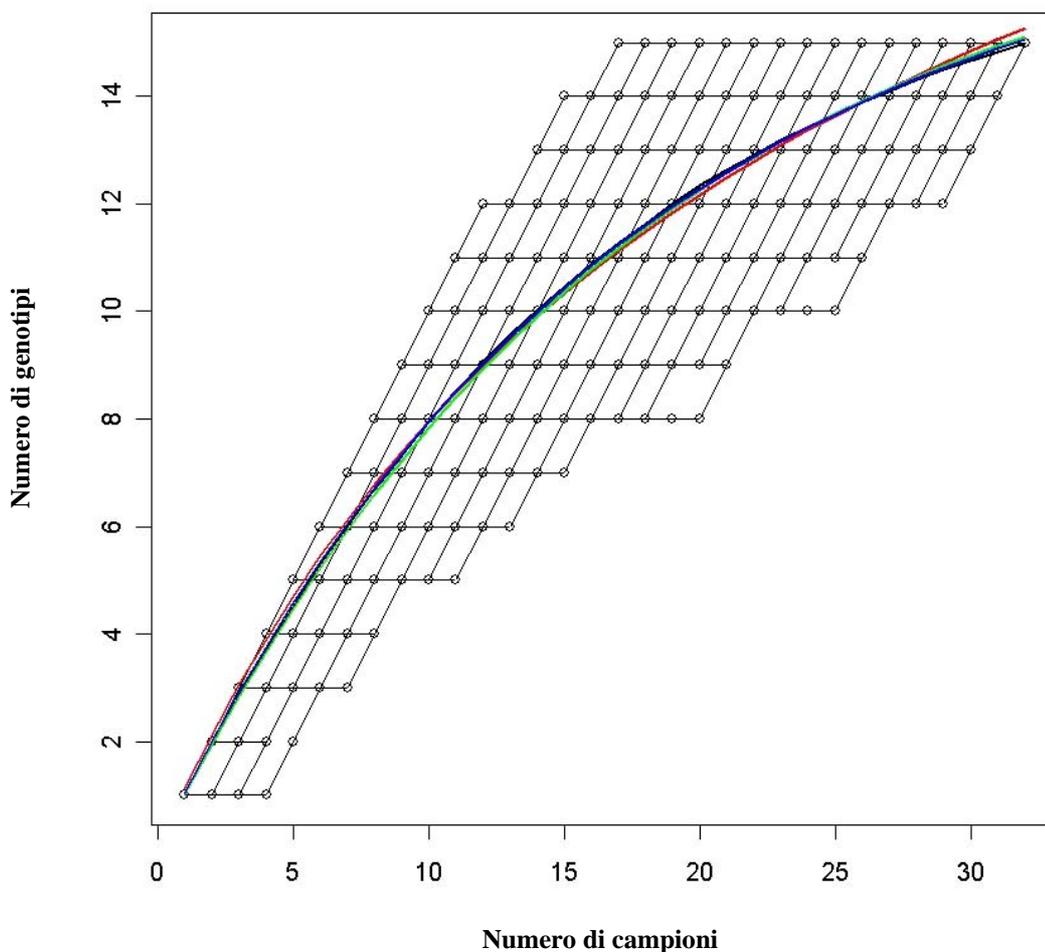


numero di campioni biologici raccolti. L'equazione di Kohn è espressa in rosso, in verde quella di Chessel e in blu l'equazione di Eggert.

Tabella D1.18. Statistiche descrittive relative alla stima della popolazione (autunno 2003).

Statistiche	Kohn	Chessel	Eggert
<b>Mediana</b>	26.16	17.98	17.79
<b>Livello di confidenza 95%</b>	0.56	0.10	0.27
<b>I Quartile</b>	23.87	16.90	16.69
<b>III Quartile</b>	30.24	19.08	19.68

La densità della popolazione è quindi pari a 1,7 orsi/100 km<sup>2</sup>. Questo valore è paragonabile a quanto ipotizzato da Posillico e Lorenzini (2000), in riferimento a 15 genotipi rilevati in un'area di circa 700 km<sup>2</sup> dal 1991 al 1999.

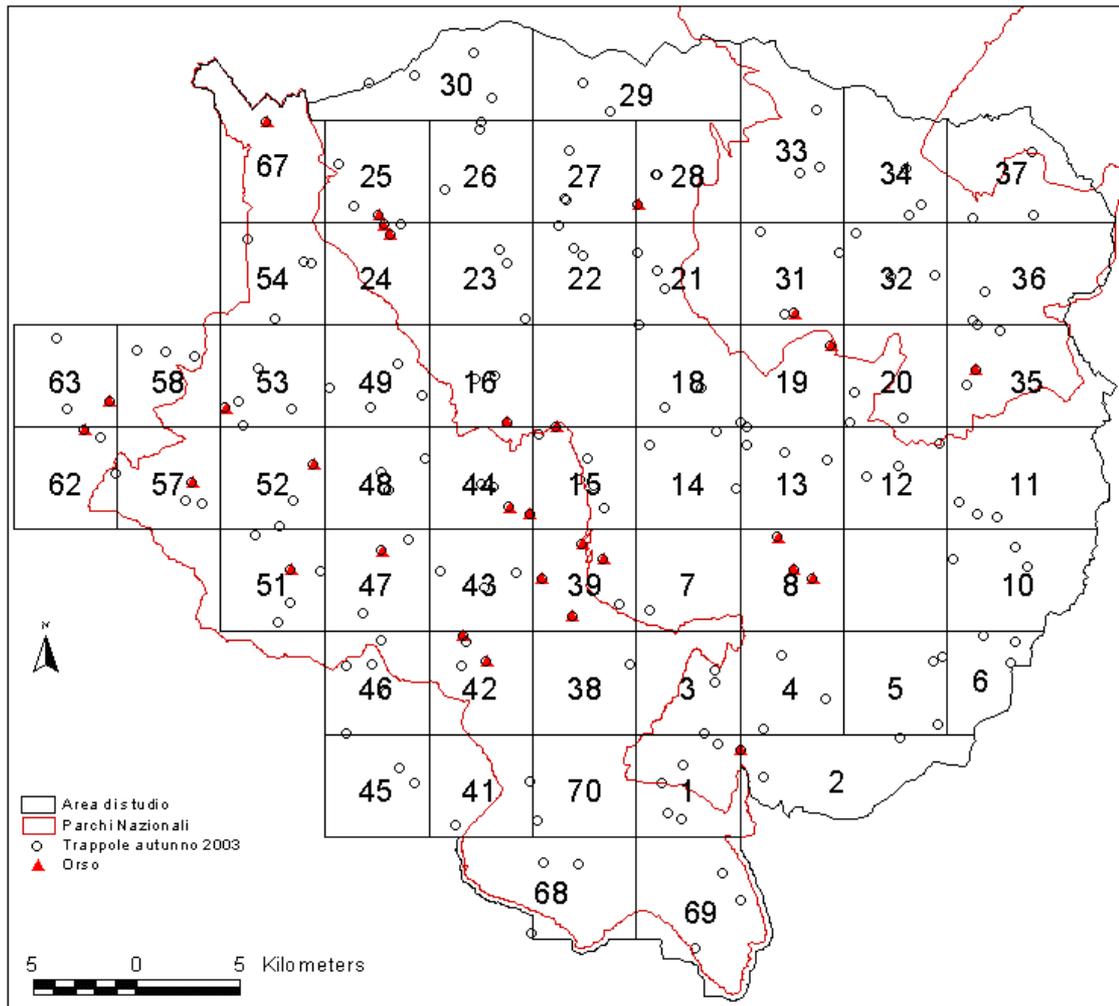


**Figura D1.22. Curva che esprime il numero dei genotipi tipizzati in funzione del numero di campioni biologici raccolti. L'equazione di Kohn è espressa in rosso, in verde quella di Chessel e in blu l'equazione di Eggert.**

### Discussione

Il prelievo di campioni piliferi tramite trappole è risultato un metodo efficiente (perché si ottengono risultati con costi contenuti) ed efficace (perché i risultati sono di alto livello qualitativo rispetto alle attese) per reperire campioni biologici per le analisi genetiche, infatti il 36% dei campioni piliferi idonei è stato raccolto proprio tramite le trappole per peli. Tale metodo consente inoltre di poter standardizzare il campionamento e quindi di ripeterlo nel tempo per aree omogenee, risultato di assoluto rilievo per una specie elusiva come l'orso. Altri vantaggi sono legati alla possibilità di creare una banca dati "oggettiva", cosa che fino ad ora è praticamente mancata per la popolazione di orso bruno marsicano, e di poter seguire nel tempo gli eventuali spostamenti dello stesso esemplare.

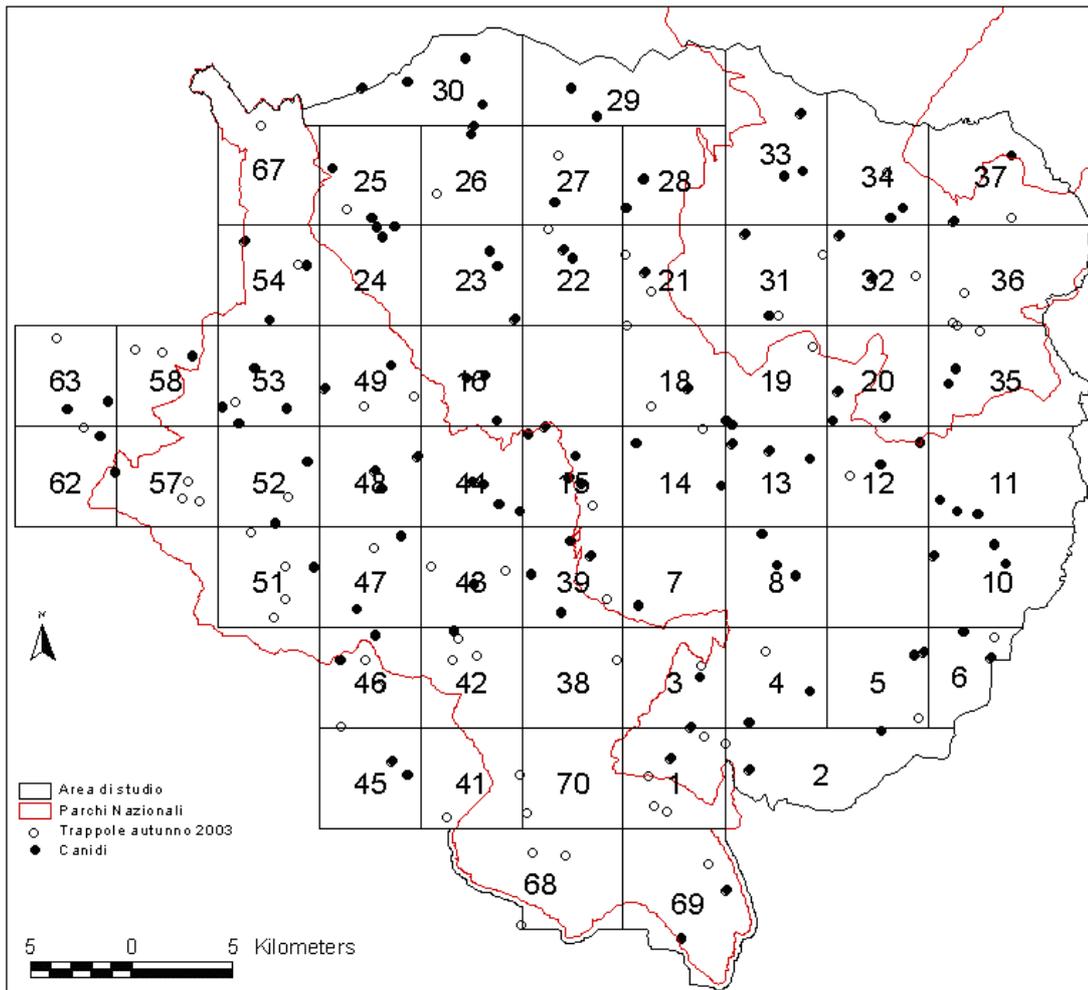
I valori apparentemente bassi dei successi di cattura riferiti ai campioni di orso per singole trappole e per celle di campionamento sono un dato oggettivo da attribuire però più alla bassa densità dell'orso nell'area del progetto che non alla ridotta funzionalità delle trappole. Infatti analizzando i dati relativi al solo periodo dell'autunno 2003 ( $N^{\circ}$  campioni di orso/ $N^{\circ}$  trappole =0,456;  $N^{\circ}$  campioni di orso/ $N^{\circ}$  celle =1,4), quando il conteggio con le trappole ha interessato anche l'area del Parco Nazionale d'Abruzzo Lazio e Molise, cioè l'area più densamente e costantemente frequentata dall'orso bruno, il successo di cattura è molto maggiore rispetto al resto del periodo. Questo sembrerebbe confermare che ad una densità di popolazione maggiore, corrisponde un maggior numero di campioni e genotipi rilevati nelle trappole per peli (Figura D1.23).



**Figura D1.23. Localizzazione dei campioni di orso nelle trappole per peli**

L'efficacia del sistema di cattura, con esca olfattiva che attira animali necrofagi, è inoltre confermata dalla cattura nelle trappole di campioni piliferi di altre specie: 1.204 campioni di canide e 451 campioni di cinghiale. Tali numeri mostrano anche la non specie-specificità delle trappole, aspetto questo, apparentemente negativo che però si è rilevato utile per stimare la distribuzione dei canidi (Figura D1.24) e dei cinghiali (Figura D1.25) nell'area interessata dal campionamento. Il ritrovamento di campioni piliferi nelle trappole non attive dimostra inoltre la capacità della trappola di "attirare" anche alcuni giorni dopo la disattivazione dell'esca olfattiva.

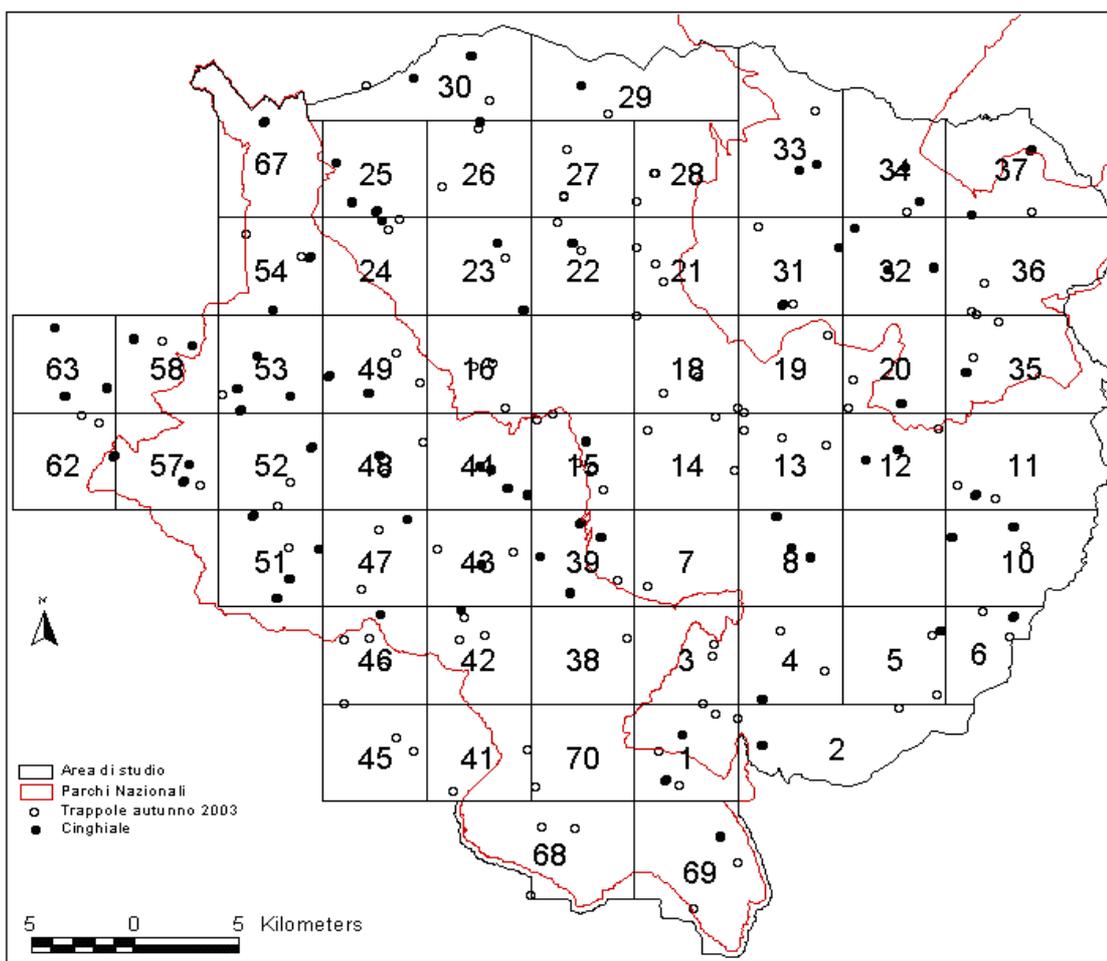
Ovviamente, il successo del metodo dipende dalla possibilità di ripetere nel tempo le sessioni di campionamento in tutta l'area di distribuzione della specie, fino alla "ricattura" di buona parte degli esemplari presenti, permettendo di stimare con una confidenza maggiore la dimensione della popolazione.



**Figura D1.24. Localizzazione dei campioni di canide nelle trappole per peli.**

A conferma di tutto ciò vi sono i dati ottenuti dal conteggio nell'area del progetto LIFE ed in parte della Zona di Protezione Esterna del Parco Nazionale d'Abruzzo Lazio e Molise: in quattro anni di campionamento 11 genotipi (3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 18, 25) sono stati catturati più di 10 volte e 8 genotipi (13, 23, 29, 31, 32, 33, 34, 36) più di 2 volte, proprio perchè il conteggio è stato ripetuto più volte nel tempo.

I risultati delle analisi del DNA mostrano che sia i maschi che le femmine possono essere catturati con questo metodo (Mowat e Strobeck, 2000), ma i maschi sono stati ricatturati più volte (127/213; 59,7%) rispetto alle femmine (87/213; 40,3%).

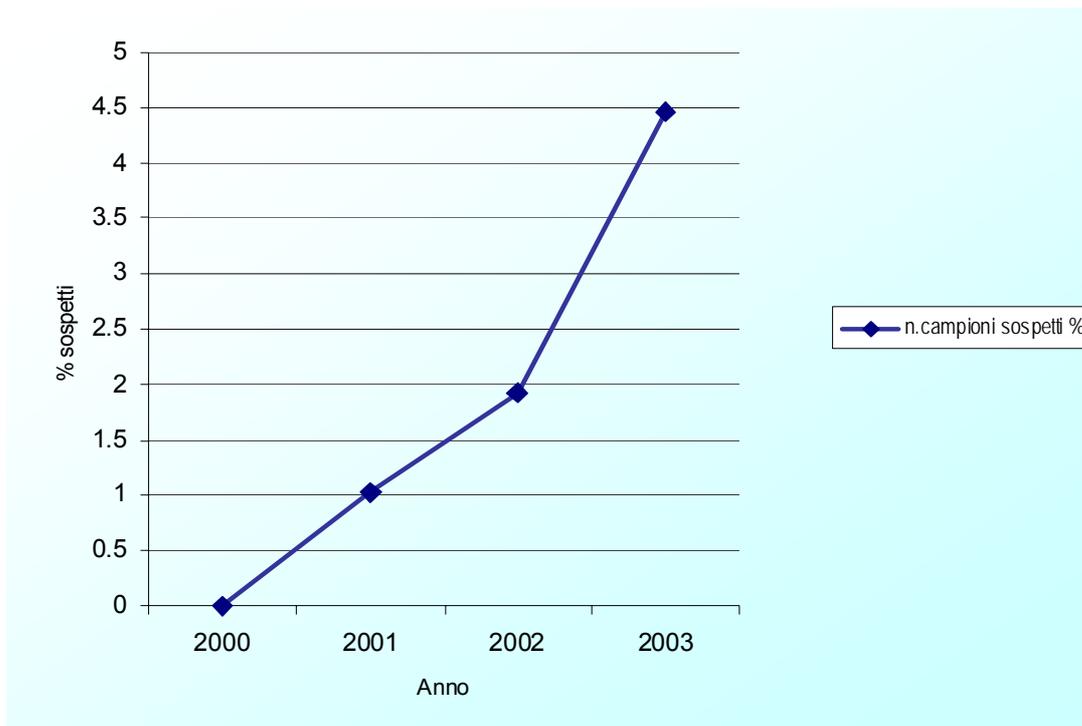


**Figura D1.25. Localizzazione dei campioni di cinghiale nelle trappole per peli.**

Per quanto riguarda i campioni sospetti, il loro numero percentuale è cresciuto proporzionalmente al numero di campioni totali (Figura D1.26). Su 9 campioni sospetti trovati nel 2002 4 sono stati analizzati e sono risultati di canide (100%) e nessuno di orso. Nel 2003 sono stati rinvenuti 59 campioni sospetti e dei 7 analizzati finora 5 sono risultati di orso (71,43%). Questo dato è un indice dell'accresciuta esperienza degli operatori nel riconoscimento degli segni di presenza dell'orso.

Il calcolo degli *home range* a partire dai dati genetici è risultato un metodo affidabile e poco dispendioso per avere una stima minima dell'ampiezza degli spostamenti effettuati da alcuni orsi nell'arco dei quattro anni di ricerca. Il valore medio degli *home range* dei maschi è risultato doppio rispetto a quello delle femmine (86,61 km<sup>2</sup> vs 43,24 km<sup>2</sup>) che, come riportato in bibliografia (Servheen, 1983; Dahle e Swenson, 2003), compiono in genere spostamenti di entità minore. Altro risultato interessante è che l'ampiezza dello *home range* della femmina "Serena" calcolato su dati radiotelemetrici è perfettamente comparabile allo *home range* genetico della femmina con genotipo 7 (44,37 km<sup>2</sup> vs 42,10 km<sup>2</sup>) (Eusepi e Latini, 2003).

Ovviamente questi dati non hanno nessuna pretesa di sostituire quelli derivati dalla radiotelemetria che, infatti, consente la raccolta di dati continuativi e programmati sull'ecologia e sull'etologia di una specie. I dati ottenuti dalla genetica possono comunque, come nel caso di questa ricerca, sostituire egregiamente quelli non disponibili della radiotelemetria, e/o integrarli nel caso in cui vengano avviati progetti specifici per la cattura di animali e la successiva ricerca radiotelemetrica.



**Figura D1.26. Percentuale dei campioni sospetti sul totale dei campioni raccolti.**

Indipendentemente dall'estensione dei singoli *home range* è comunque ben visibile, nella cartina D1.14, la concentrazione dei poligoni degli *home range genetici* in un'area relativamente ristretta posta tra il Parco Nazionale d'Abruzzo Lazio e Molise, la Valle del Sagittario ed gli Altipiani Maggiori. Questo a conferma del fatto che gli stessi esemplari frequentano abitualmente anche aree poste all'esterno delle aree protette e soprattutto dell'importanza ecologica del territorio posto tra il Parco d'Abruzzo e quello della Majella. Pertanto, la gestione delle aree immediatamente confinanti con quelle protette è altrettanto importante di queste ultime e soprattutto deve essere coerente con le misure di tutela e di conservazione della fauna selvatica.

La confluenza degli *home range* in alcuni punti potrebbe essere interpretata come un'ulteriore prova della funzionalità di alcuni metodi per la cattura dei campioni biologici; infatti, escludendo i punti di alimentazione artificiale, ben 5 punti sono in corrispondenza delle trappole per peli, 4 dei ramneti e 4 di percorsi campione.

I risultati ottenuti in questo studio, ed in accordo con altri recentemente pubblicati (Lorenzini *et al.*, in stampa), indicano come i livelli di variabilità genetica nell'orso bruno marsicano, espressi in termini di numero medio di alleli per locus ( $N=2,3$ ), ed eterozigosi attesa ( $H_e=0,46$ ), siano tra i più bassi osservati tra le popolazioni di orso bruno (Tabella D1.18) (Waits *et al.*, 2000). La popolazione dell'isola di Kodiak è la meno variabile tra le popolazioni nord-americane di orso bruno analizzate fino ad ora (Paetkau *et al.*, 1998).

Dal confronto con questa popolazione è evidente come livelli di variabilità genetica confrontabili, o addirittura inferiori a quelli osservati nell'orso bruno marsicano, siano compatibili in linea di principio con elevate densità di individui ed elevata produttività (Paetkau *et al.*, 1998). La bassa variabilità genetica nell'ordine di quanto rilevato per l'orso in Appennino (probabilmente imputabile alla progressiva diminuzione e isolamento di questa popolazione) non sembra essere di per sé una

minaccia. Tuttavia alla ridotta variabilità genetica si sommano gli effetti di una dimensione piuttosto bassa della popolazione (circa 30 individui stimati con il metodo descritto, rispetto ai circa 3000 dell'isola di Kodiak, Barnes *et al.*, 1995) e di una mortalità minima accertata di 2,5 orsi all'anno (Fico e Gentile, *ex verbis*) pari all'8,3-10,5% della popolazione stimata. È del tutto evidente quindi che, anche ipotizzando una popolazione doppia rispetto alla stima approssimativa riportata, l'interazione tra questi fattori non può al momento non destare preoccupazione per la conservazione dell'orso nell'Appennino.

**Tabella D1.19. Valori di eterozigoti e numero di alleli di tre popolazioni di orso bruno.**

	Abruzzo	Svezia	Kodiak
Ho	0.471	0.660	0.298
He	0.460	0.710	0.265
n° alleli / locus	2.3	6.8	2.13

Gli effetti della perdita di variabilità genetica, in termini di risposte adattative degli individui a un ambiente in evoluzione, e la mortalità agiscono su due scale di tempo diverse, rispettivamente lunga e breve. Non esiste una soglia, determinabile a priori, al di sotto della quale la bassa diversità genetica diventa un fattore critico per la sopravvivenza di una popolazione. Il caso del decremento numerico del camoscio d'Abruzzo (una popolazione con una ridottissima variabilità genetica, Lorenzini *ex verbis*) nel secondo dopoguerra con un successivo aumento sostanziale della popolazione è emblematico. Ma è noto che i tassi riproduttivi dell'orso sono stimati essere molto bassi rispetto al camoscio e quindi una eventuale ripresa della popolazione non potrebbe essere così rapida come nel caso del camoscio.

Analogamente, non esiste alcuna correlazione diretta fra ridotta diversità genetica ed effetti negativi dell'*inbreeding*. Tuttavia, in popolazioni isolate riproduttivamente da secoli, gli effetti di bassa variabilità genetica, della dimensione ridotta della popolazione, della mortalità elevata e spesso di origine antropica si possono integrare negativamente, ad un tasso riproduttivo basso (come per l'orso in genere), anche se non è noto quanto basso sia per la popolazione Appenninica. L'evoluzione demografica di altre popolazioni di orso bruno isolate, di piccole dimensioni, con una ridotta variabilità genetica e soggette a una mortalità non trascurabile e soprattutto di origine antropica, è esemplificata dal caso degli orsi nelle Alpi e nei Pirenei.

In ogni caso, i dati emersi sconsigliano ogni ipotesi di rilascio di orsi in Abruzzo ed aree limitrofe allo scopo di ristabilire un patrimonio genetico depauperato, considerata anche l'unicità del patrimonio genetico dell'orso appenninico (Randi *et al.*, 1994; Randi *ex verbis*, Lorenzini, dati non pubblicati).

È però necessario un monitoraggio costante nel tempo e standardizzato dei parametri demografici (numero di individui, tasso di natalità, tasso di mortalità e cause), per analizzare l'evoluzione della popolazione. Tutti gli interventi necessari per controbilanciare una eventuale basso tasso di sopravvivenza e una elevata mortalità vanno accuratamente studiati e intrapresi. Così come è necessaria una strategia di consuntivo periodico delle informazioni per prevedere e verificare nel lungo periodo le possibilità di autosostentamento della stessa popolazione.

Come già detto nei paragrafi precedenti, il numero di loci analizzato non permette stime accurate delle relazioni di parentela. Dalla Figura 10 è tuttavia possibile individuare piccoli gruppi di individui apparentemente più imparentati rispetto ad altri. La significatività riportata è riferita all'ipotesi

dell'esistenza di un rapporto di parentela tipo fratello/fratello (indipendente dal sesso), rispetto all'ipotesi nulla di non parentela.

La stima di qualsiasi popolazione per essere attendibile deve necessariamente avere una dimensione spazio-temporale definita. Tale assunzione vale ovviamente anche per il conteggio genetico così come dimostrano il numero di catture dei genotipi nei quattro anni di ricerca: infatti mentre alcuni individui sono stati catturati in più anni tra il 2000 ed il 2003, altri (per esempio il genotipo 1 e 2) sono stati catturati solo nel 2000 e non sono stati più trovati negli anni successivi. Questo dato può ovviamente essere interpretato in vari modi: gli orsi potrebbero essersi allontanati dall'area indagata oppure semplicemente i loro campioni biologici potrebbero non essere stati ritrovati.

In ogni caso si ritiene comunque improbabile che il genotipo sia "scomparso".

L'individuazione di un'area di campionamento che garantisca una sufficiente chiusura demografica e geografica della popolazione studiata è quindi un parametro imprescindibile: solo proseguendo, ed implementando, le attività svolte in modo coordinato e condiviso, sarà perciò possibile migliorare le conoscenze sulla specie, definire i parametri non ancora noti (tra tutti i principali sono sicuramente la consistenza numerica, ed i tassi di mortalità e natalità) necessari per attuare le misure di conservazione a lungo termine.

Per i motivi esposti, e quindi per avere una stima di popolazione più realistica, la curva di rarefazione è stata calcolata prendendo in considerazione solo i genotipi trovati in un intervallo temporale ben definito: 10 nel periodo agosto-settembre 2002 e 15 nel periodo agosto-novembre 2003. Qualunque altro tipo di analisi statistica risulta in questa fase assolutamente improponibile perché poco realistica.

Dai risultati ottenuti dall'analisi di rarefazione si evince che il numero di orsi che hanno frequentato i ramneti campionati nel 2002 è stato pari a  $19,34 \pm 0,72$  (livello di confidenza del 99%); quelli che hanno frequentato i ramneti, i percorsi campione e le trappole per peli nell'autunno del 2003 sono invece 26,16 con un livello di confidenza del 95%. Si tratta ovviamente di una stima, basata in entrambi i casi su dati relativi a periodi limitati e non ripetuti nel tempo, e pertanto i risultati devono essere valutati con la giusta prudenza, considerando anche che il dato della sola consistenza numerica della popolazione, quale che sia, non fornisce alcuna indicazione sulla struttura della popolazione rapporto sessi, sui tassi di natalità e mortalità, etc.

Si ritiene quindi che una valutazione della dimensione della popolazione nell'area di studio nell'autunno 2003 (1564 km<sup>2</sup>) ripetuta per due o tre sessioni nell'arco di 12-18 mesi consentirà comunque di incrementare la banca dati esistente, ma di giungere ad una stima con maggiore confidenza il numero di esemplari presenti.

## **Conclusioni**

La consistenza numerica di specie difficilmente contattabili, può essere stimata tramite metodi di conteggio indiretti basati su tecniche biomolecolari e gli indici di presenza. Rispetto ad estrapolazioni dell'abbondanza relativa basate sul numero di segni di presenza, la cui quantificazione può essere fortemente influenzata da errori associati con i fattori ambientali (Wilson e Delahay, 2001), l'analisi genetica di campioni biologici consente una stima dell'abbondanza assoluta.

Il risultato delle analisi genetiche è condizionato dalla qualità iniziale del campione e dal suo stato di conservazione che garantiscono la ripetibilità e l'accuratezza della tipizzazione a livello individuale, rendendo necessario un numero più basso di ripetizioni di ogni analisi. Uno studio

condotto su 50 campioni fecali di orso bruno ha dimostrato che la conservazione in etanolo al 90% è più efficace di altri metodi (Murphy *et al.*, 2002). La necessità di avere una quantità di DNA sufficientemente elevata, e quindi alcune decine di peli, è una diretta conseguenza della necessità di effettuare ripetizioni multiple, queste, infatti, richiedono un quantitativo di DNA molto superiore rispetto a quello richiesto in progetti dove lo stato di conservazione dei campioni non rappresenta un problema.

I dati esposti potrebbero indicare che il numero di orsi nell'Appennino centrale sia inferiore alla soglia minima necessaria per assicurare la sopravvivenza a lungo termine della popolazione (Franklin, 1980; Peyton *et al.*, 1999), anche se le stime della popolazione minima vitale risultano spesso in predizioni irrealistiche (Caughley, 1994). Questo problema è stato estesamente disaminato da Mills *et al.* (1996) che hanno illustrato come piccole differenze nella stima del tasso di crescita della popolazione e negli algoritmi di calcolo tra diversi programmi possano produrre risultati molto diversi anche partendo dagli stessi dati. Austin (*British Columbia Ministry of Environment*) ha proposto una Minima Popolazione Vitale (MVP) per l'orso bruno in nord America di 100 individui, basandosi però solo su fattori demografici deterministici (dipendenti da relazioni causa-effetto) ed escludendo quelli casuali e che dovrebbero comunque essere presi in considerazione (Boyce, 1995; Mills *et al.*, 1996). Un modello conservativo elaborato per popolazione di orso bruno nella Columbia Britannica suggerisce invece una consistenza minima di 200-250 individui (Wielgus, 2002). Una stima più incoraggiante per l'orso bruno marsicano (sempre nell'ipotesi necessaria ma non verificata che il tasso di crescita sia positivo) viene invece dal riferimento al modello elaborato da Saether *et al.* (1998) per gli orsi in Svezia e Norvegia. Le stime di minima popolazione vitale hanno suggerito che è sufficiente una popolazione iniziale di almeno 6-8 femmine (età > 1 anno) affinché la stessa abbia una probabilità di sopravvivenza maggiore del 90% entro 100 anni. Questi valori sono stati stimati però da dati relativi a una popolazione pari a circa 1000 individui, con una produttività elevata rispetto alla media dell'orso bruno. Inoltre, una diminuzione del tasso di crescita della popolazione (p. es. l'elevata mortalità dei primi anni '80, Posillico *et al.*, 2002) ha effetti negativi non trascurabili sul numero minimo di individui. Infatti, dalle simulazioni di Saether *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 poter prevedere il 90% delle probabilità che la popolazione sopravviva entro 100 anni. Non disponendo dei parametri di popolazione adeguati è impossibile al momento, viste le limitazioni del metodo, prevedere quale potrebbe essere la Minima Popolazione Vitale per l'orso bruno marsicano. Tuttavia, a titolo di esempio, considerando come valori di riferimento quelli della popolazione scandinava e i risultati del conteggio della popolazione effettuato in questo progetto, emerge che a fronte di circa 30 individui e ipotizzando un rapporto sessi di 1:1, siano presenti nella popolazione circa 15 femmine.

Nell'ipotesi di un tasso di crescita positivo, questo valore potrebbe essere incoraggiante, anche se andrebbe diminuito del numero di individui di età <1 anno, e andrebbe supposto un effetto trascurabile della mortalità sulla sopravvivenza delle femmine, cosa peraltro non realistica in base ai dati di mortalità minima noti. Inoltre il tasso di fecondità particolarmente elevato delle popolazioni scandinave non è automaticamente ipotizzabile per l'orso bruno in Appennino. Variazioni anche minime del tasso di fecondità possono generare stime di MVP anche decisamente diverse (Saether *et al.*, 1998).

Appare quindi chiaro, al momento, che per l'orso bruno marsicano è necessario conoscere almeno gli aspetti basilari della dinamica e struttura di popolazione: tasso di natalità, di mortalità e di sopravvivenza, ed effettuare ulteriori stime della consistenza numerica applicando i metodi di conteggio in tutta l'area di distribuzione in maniera coordinata, oltre a porre in atto tutte le azioni necessarie per diminuire l'impatto della mortalità di origine antropica.

Questo aspetto è particolarmente importante da indagare anche perché la dimensione delle popolazioni in natura influenza la variabilità genetica (Frankham, 1996) che, insieme all'aumento dell'*inbreeding*, può rappresentare un fattore di minaccia per la sopravvivenza della popolazione (Wright, 1977). Inoltre i risultati relativi alla variabilità genetica sono indispensabili da un lato per definire le azioni per la conservazione della specie e dall'altro per pianificare eventuali misure di gestione degli individui in cattività (Montgomery *et al.*, 2000).

I risultati delle analisi genetiche attualmente disponibili confermano l'unicità genetica dell'orso dell'Appennino sia a livello mitocondriale (Randi *et al.*, 1994) che nucleare (Lorenzini *et al.*, dati non pubblicati). Pertanto l'immissione di individui alloctoni provenienti da altre popolazioni di orso bruno in Europa determinerebbe l'estinzione del *pool* genico della popolazione appenninica. Inoltre, l'immissione di individui alloctoni comporta numerosi e rilevanti problemi di accettazione da parte delle popolazioni locali. Nel caso di popolazioni di orso in cui la mortalità di origine antropica non è trascurabile – come per l'Appennino – questo elemento non è da sottovalutare; come non è da sottovalutare l'adattamento in termini soprattutto comportamentali a un ambiente unico come l'Appennino, profondamente diverso da quello di origine di qualsiasi altro orso bruno europeo: questo fattore avrebbe una enorme influenza sulle capacità di sopravvivenza a breve termine per gli individui immessi.

I risultati emersi dal lavoro svolto hanno fornito quindi importanti risposte agli obiettivi iniziali del progetto che non mirava, né poteva farlo vista l'area iniziale di studio, a definire la consistenza numerica della popolazione di orso bruno marsicano in maniera completamente esaustiva, ma a definire una metodologia efficiente ed efficace per la popolazione appenninica, ed a porre le basi per una banca dati condivisa da tutti gli Enti preposti alla conservazione della specie e del territorio di cui la stessa necessita per avere buone probabilità di sopravvivenza.

## **Bibliografia**

- Barnes V. G., Smith R. B., Udevitz M. S., e Bellinger J. R., 1995. Kodiak brown bears. Pag. 349-350 in E. T. LaRoe, G. S. Farris, C. E. Puckett, P. D., Doran e M. J. Mae, editors. Our living resources: a report to the nation on the distribution, abundance, and health of U.S. plants, animals, and ecosystems. National Biological Service, Washington, D.C.
- Boyce M. S., 1995. Population viability for grizzly bears (*Ursus arctos horribilis*): a critical review. Report to the Interagency Grizzly Bear Committee. US Fish and Wildlife Service.
- Caughley G., 1994. Directions in conservation biology. *Journal Animal Ecology*. 63: 215-244.
- Colamarco A., 2004. Monitoraggio non invasivo dell'orso bruno nell'Appennino centrale: implicazioni gestionali. Tesi di Laurea Corso di Laurea in Scienze Naturali, Università degli Studi di Napoli "Federico II".
- Dahle B. e Swenson J. E., 2003. Home ranges in adult Scandinavian brown bears (*Ursus arctos*): effect of mass, sex, reproductive category, population density and habitat type. *J. Zool., Lond.*, 260: 329-335.
- Ennis S., T. F. Gallagher., 1994. A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Animal Genetics*, 25, 425-427.
- Eusepi L. e Latini R., 2003. Attività e uso dello spazio di un esemplare di orso bruno marsicano (*Ursus arctos marsicanus*) nel Parco Nazionale d'Abruzzo Lazio e Molise. IV Convegno Italiano di Teriologia. Riccione, 6-8 novembre 2003.
- Frankham R., 1996. Relationship of genetic variation to populations size in wildlife. *Conservation Biology*, 10: 1500-1508.
- Franklin, J. R., 1980. Evolutionary change in small populations. In *Conservation Biology. An evolutionary-ecological perspective*: 135-149. Soulè M. E. & Wilcox B.A. (Eds.). Sunderland: Sinauer Associates Inc. Massachusetts.
- Harris R. B. e Allendorf F. W., 1987. Genetically effective population size of large mammals: an assessment of estimators. *Conservation Biology*, 3: 181-191.
- Höss M., M. Kohn e S. Pääbo, 1992. Excrement analysis by PCR. *Nature*, 359.
- Huber D. e H.U. Roth, 1993. Movements of European brown bear in Croatia. *Acta Theriol.* 38: 151-159.

- Kohn M., Knauer F., Stoffella A., Schroder W e Paabo S., 1995. Conservation genetics of the European brown bear – a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. *Mol. Ecol.*, 4: 95-103.
- Kohn M. H. e Wayne R. K., 1997. Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 12, no. 6.
- 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. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*. 266: 657-663.
- Lorenzini R., Posillico M., Lovari S., Petrella A., in stampa. Noninvasive genotyping of the endangered Apennine brown bears: a case study not to let one's hair down. *Animal Conservation*, 2004.
- Meriggi A., Sacchi O., Ziliani U. e M. Posillico, 2001. Definizione dell'areale potenziale di cervo sardo, muflone e orso bruno. In S. Lovari e Sforzi A. (a cura di) Progetto di monitoraggio dello stato di conservazione di alcuni mammiferi particolarmente a rischio della fauna italiana. Ministero dell'Ambiente, Servizio Conservazione della Natura.
- Miller C. R., P Joyce, L. P. Waits., 2002. Assessing allele dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics*, 160, 357-366.
- 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. *Conservation Biology*, 10: 863-873.
- Montgomery M. E., Woodworth L. M., Nurthen R. K., Gilligan D. M., Briscoe D. A. e Frankham R., 2000. Relationship between population size and loss of genetic diversity: comparisons of experimental results with theoretical predictions. *Conservation Genetics*, 1: 33-43.
- Mowat G. e C. Strobeck, 2000. Estimating population size of grizzly bears using hair capture, dna profiling, and mark-recapture analysis. *Journal of Wildlife Management* 64: 183-193.
- Murphy M. A., Waits L. P., Kendall K. C., Wasser S. K., Higbee J. A. e Bodgen R., 2002. An evaluation of long term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples. *Conservation Genetics*, 3: 435-440.
- Peatkau D., 2003. An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. *Molecular Ecology*, 12: 1375-1387.
- Peatkau D., Calvert W., Stirling I. e Strobeck C. *et al.*, 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4: 347-354.

- Peatkau D., Waits L., Clarkson P. L., Craighead L., Vyse E., Ward R., Strobeck C., 1998. Variation in genetic diversity across the range of north american brown bears. *Conservation Biology*, 12, 418-429.
- Peyton B., Servheen C. e Herrero S., 1999. An overview of bear conservation planning and implementation. In *Bears. Status survey and conservation action plan: 8-24*. Servheen C., Herrero S. & Peyton B. (Eds.). Gland Switzerland, IUCN/SSC Bear and Polar Bear Specialist Group. IUCN.
- Posillico M. e Lorenzini R., 2000. Abruzzo brown bear DNA *fingerprinting*. *International Bear News*. 9: 20.
- Posillico M., Petrella A., Sammarone L. e Potena G., 2002. Piano preliminare di conservazione dell'orso bruno (*Ursus arctos* L. 1758). Prodotto identificabile del Progetto LIFE NAT99/IT/006244. Ministero delle Politiche Agricole e Forestali – Commissione Europea. Pp.48.
- Posillico M., Meriggi A., Pagnin E. e Lovari S. e Russo L., in stampa. A habitat model for brown bear conservation and land use planning in the central Apennines. *Biological Conservation* 2004.
- Queller D. C. e Goodnight K. F., 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43, 258-275.
- Romain-Bondi K. A., Wielgus R. B., Waits L., Kasworm W. F., Austin M., Wakkinen W., 2004. Density and population size estimates for North Cascade grizzly bears using DNA hair-sampling techniques. In stampa.
- Randi E., Gentile L., Boscagli G., Huber D e Roth H. U., 1994. Mitochondrial DNA sequence divergence among some West European brown bear (*Ursus arctos* L.) populations. Lessons for conservation. *Heredity* 73: 480-489.
- Rey I. e Doadrio I., 1999. Aplicación de la genética al seguimiento y conservación de las especies. Individualización, determinación del sexo y variabilidad genética de la población oriental. Trabajo realizado dentro del convenio de colaboración entre Ministerio de Medio Ambiente y el Museo Nacional de Ciencias Naturales, denominado: "Estudio genético de las poblaciones españolas del oso pardo".
- Roth H. U., 1980. Il metodo dei percorsi campione e la sua applicazione per lo studio dell'orso nel Trentino. *Natura alpina*, 31: 19-25.
- Roth H.U. 1983. Home ranges and movement patterns of European brown bears as revealed by radiotracking. *Acta zool. Fennica* 174: 143-144.

- Roth H.U., Boscagli G., Gentile L. Klahre J. e G. Putaturo. 1994. L'orso bruno marsicano nel Parco Nazionale d'Abruzzo, risultati preliminari di una ricerca a lungo termine. Volume degli Abstract del I Congr. Italiano di Teriologia. Pisa 27-29 ottobre 1994.
- Saether B. E., Engen S., Swenson J. E., Bakke Ø. e Sandegren F., 1998. Assessing the viability of Scandinavian brown bear, *Ursus arctos*, populations: the effects of uncertain parameter estimates.
- Servheen C., 1983. Grizzly bear food habits, movements and habitat selection in the Mission Mountains, Montana. *J. Wildl. Manage.* 47 (4): 1026-1035.
- Swenson J. E., Gerstl N., Dahle B., Zedrosser A., (2000). Action Plan for the Conservation of the Brown Bear in Europe (*Ursus arctos*). Oslo 22-24 giugno.
- Taberlet P., Griffin S., Goosens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L., Bouvet J., 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acid Research*, 24, 3189-3194.
- Taberlet P., J.-J. Camarra, S. Griffin *et al.*, 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology*, 6, 869-876.
- Valiere N., 2002. GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*.
- Varriale M., Posillico M., Burrini L. e S. Lovari, 1996. Alimentazione dell'orso bruno in un'area dell'Italia centrale. *Il Conv. Ass. Teriologica Italiana*, 3° Conv. Naz. Sui Carnivori. Perugia, ottobre 1996.
- Waits L. P., G. Luikart, P. Taberlet., 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10, 249-256.
- Waits L., Taberlet P., Swenson J. E., Sandegren F., Franzen R., 2000. Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (*Ursus arctos*). *Molecular Ecology*, 9, 421-431.
- Wielgus R. B., 2002. Minimum viable population and reserve sizes for naturally regulated grizzly bears in British Columbia. *Biological Conservation*, 106: 381-388.
- Wilson D. E., Nicols J. D., Rasanayagam R e Southwell C., 1996. Introduction. pp. 1-7 In *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for mammals* (ed. D. E. Wilson, F. R. Cole, J. D. Nicols, R. Rasanayagam & M. S. Foster),. Washington – London: Smithsonian Institution Press.

Wilson G. J. e Delahay R. J., 2001. A review of methods to estimate the abundance of terrestrial carnivores using field signs and observation. *Wildlife Research*, 28: 151-164.

Wilson G. J., Frantz A. C., Pope L. C., Roper T. J., Burke T. A., Cheeseman C. L. e Delahay R. J., 2003. Estimation of badger abundance using faecal DNA typing. *Journal of Applied Ecology*. 40: 658-666.

Woods J., Petkau D., Lewis D., McLellan B.N., Proctor M, e C. Strobeck, 1999. Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. *Wildlife Society Bulletin*, 27(3): 616-627.

Wright S., 1977. *Evolution and the Genetics of Populations*. Chicago Press, Chicago.



Ufficio Foreste Demaniali, Via Sangro, 45 - 67031 Castel di Sangro (AQ)

Tel. 0864/845938 - Fax 0864/840706

E-mail: [ex\\_asfd.c\\_sangro@corpoforestale.it](mailto:ex_asfd.c_sangro@corpoforestale.it)

[www.corpoforestale.it/wai/servziattivita/progetti\\_ricerca/progetti/orsolife/index.html](http://www.corpoforestale.it/wai/servziattivita/progetti_ricerca/progetti/orsolife/index.html)