

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Facoltà di Medicina Veterinaria

DOTTORATO DI RICERCA IN PRODUZIONI ANIMALI, BIOTECNOLOGIE
VETERINARIE, QUALITÀ E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI

INDAGINI GENETICHE SULLE POPOLAZIONI DI CAPRIOLO
(*Capreolus capreolus*) DELLA PROVINCIA DI PARMA

Coordinatore del Dottorato:

Chiar.mo Prof. *Primo Mariani*

Docenti guida:

Chiar.mo Prof. *Alberto Sabbioni*

Chiar.mo Prof. *James Tagliavini*

Dottorando:

Chiara Serena Soffiantini

XX CICLO

*Alla mamma.
Grazie per dimostrarmi ogni giorno che,
nonostante tutto, non ha senso vivere
senza sorridere.
Grazie per averlo insegnato a tutti.
Persino al cane.*

PREMESSA.....	1
INTRODUZIONE.....	3
1. Biologia della specie.....	3
<i>Tassonomia</i>	3
<i>Origine e domesticazione</i>	4
<i>Distribuzione</i>	5
<i>Caratteristiche e fisiologia</i>	6
<i>Comportamento alimentare</i>	10
<i>Classi di età ed identificazione</i>	11
<i>Ciclo biologico annuale</i>	18
<i>Gravidanza e diapausa</i>	20
<i>Curve di crescita</i>	22
2. Gestione della specie.....	23
<i>Biodiversità, conservazione e gestione</i>	23
<i>Status</i>	26
<i>Gestione faunistico-venatoria del capriolo</i>	26
<i>Gestione faunistico-venatoria in provincia di Parma</i>	29
3. Struttura genetica e distribuzione delle popolazioni.....	35
<i>Struttura genetica delle popolazioni</i>	35
<i>Marcatori molecolari</i>	36
<i>Marcatori mitocondriali per indagini biogeografiche</i>	37
<i>Marcatori nucleari per indagini di struttura di popolazione</i>	40
<i>Origini e struttura genetica delle popolazioni italiane ed europee ottenute da studi dei polimorfismi mitocondriali</i>	43
SCOPO.....	45
MATERIALI E METODI.....	46
Materiale raccolto.....	46
<i>Misure biometriche</i>	46

<i>Materiale biologico</i>	47
<i>Siero</i>	48
Estrazione del DNA.....	50
Analisi dei polimorfismi della regione D-loop.....	50
<i>Amplificazione della regione D-loop</i>	50
<i>Analisi con enzimi di restrizione</i>	52
<i>Sequenziamento</i>	52
<i>Analisi dei dati di sequenza</i>	53
<i>Analisi SSCP su una porzione della regione D-loop</i> <i>per la determinazione di aplotipi diversi</i>	56
Analisi dei marcatori RAPD.....	57
<i>Condizione di amplificazione e visualizzazione dei risultati</i>	57
Analisi dei marcatori microsatellite.....	59
<i>Condizione di amplificazione di locus STR</i>	59
<i>Caratterizzazione allelica tramite clonaggio dei prodotti di amplificazione</i>	60
<i>Amplificazione, separazione e visualizzazione degli alleli</i>	61
Analisi statistica.....	61
<i>Modelli applicati alle misure biometriche</i>	61
<i>Analisi statistiche applicate ai tracciati RAPD</i>	68
RISULTATI	71
A. Schede biometriche	71
<i>Analisi dei parametri</i>	72
<i>Effetto del periodo degli accoppiamenti sul peso pieno dei soggetti</i> <i>maschi di classe 1, 2 e 3</i>	87
<i>Confronto fra animali abbattuti in aree diverse</i>	88
<i>Effetto del fattore tempo sulle caratteristiche morfologiche degli animali</i> ...	91
B. Craniometria	97
<i>Gruppo misure D, E, F, G, H, I, M, N e O</i>	101
<i>Gruppo misure A, B, C, J, K, L e P</i>	103
C. Genetica	104

<i>Analisi della D-loop</i>	104
<i>Analisi dei marcatori RAPD</i>	112
<i>Analisi dei marcatori microsatellite (STR)</i>	122
D. Genetica e morfologia.....	126
DISCUSSIONE.....	128
CONSIDERAZIONI FINALI.....	135
RIASSUNTO.....	136
ABSTRACT.....	140
BIBLIOGRAFIA.....	143
RINGRAZIAMENTI.....	150

Nota

Le foto contenute nel lavoro sono state scattate dall'autore se non diversamente specificato.

Il capriolo è un cervide del continente Eurasiatico. Ne sono state individuate due specie: *Capreolus capreolus*, o capriolo europeo, presente in Europa occidentale, e il *C. pygargus*, o capriolo siberiano, presente nel sud-est europeo e nella parte dell'Asia che si estende fino alla Corea (Randi et al., 1998).

Gli studi di alcuni caratteri morfologici condotti da Festa (1925) sulla popolazione di caprioli presenti nella Tenuta Presidenziale di Castelporziano (Roma) e da Lehmann (1973) sui caprioli presenti nell'Orsomarso (nord della Calabria), hanno ipotizzato la presenza nel sud Italia di una sottospecie, definita *C. c. italicus*. L'analisi della sequenza della regione di controllo del genoma mitocondriale (D-Loop mtDNA) ha sostanzialmente confermato che le popolazioni di capriolo del sud Italia (Castelporziano, Orsomarso, Gargano) si distinguono da altre popolazioni italiane e centro europee (Randi et al., 1998; Vernesi et al., 2002).

Lorenzini *et al.* (2002) hanno caratterizzato caprioli provenienti da 20 diverse zone geografiche italiane analizzando sia la variabilità mitocondriale (D-Loop) che quella derivante da loci nucleari (microsatelliti). I risultati molecolari mitocondriali e nucleari, sostanzialmente concordanti, hanno evidenziato l'esistenza di due gruppi geneticamente diversi, ascrivibili rispettivamente al tipo "italicus" ed al tipo "centro-europeo". L'analisi di loci microsatellite, inoltre, ha consentito di valutare il livello di "contaminazione" di popolazioni di *C. c. italicus* da parte di soggetti geneticamente "centro-europei"; contaminazione riconducibile, secondo gli stessi autori, a pratiche di reintroduzione/introduzione/traslocamento di animali alloctoni per ragioni di natura faunistico-venatoria.

Secondo fonti aneddotiche la popolazione di caprioli presente nel territorio parmense dovrebbe essere costituita da soggetti non autoctoni introdotti per scopi venatori nella prima metà dell'Ottocento, nella zona corrispondente all'attuale Parco Regionale dei "Boschi di Carrega", sito tra i comuni di Sala Baganza, Collecchio, Fornovo Taro e Felino. Secondo queste fonti gli animali provenivano dal Centro Europa e dalla Slovenia. Nel corso degli anni la popolazione è aumentata considerevolmente, tanto che la Provincia di Parma ne ha autorizzato il controllo numerico dal 1997 attraverso un piano di abbattimento selettivo in funzione del numero di animali censiti.

Randi *et al.* (2004) hanno osservato la presenza dell'aplotipo mitocondriale italico anche in alcuni caprioli presenti sull'Appennino tosco-emiliano, nella provincie di Modena e Massa Carrara. Tuttavia gli stessi autori non escludono come ipotesi la presenza di nuclei autoctoni nell'Appennino settentrionale.

Studi specifici riferiti alle popolazioni di capriolo della provincia di Parma, sono stati condotti da Sabbioni *et al.* (2002) e Soffiantini *et al.* (2003) e hanno evidenziato curve di crescita ed coefficienti allometrici significativamente differenti per soggetti provenienti da zone diverse. Mancano però al momento informazioni di natura genetico-molecolare sulle popolazioni stesse.

In linea generale, l'intento del presente lavoro è quello di costituire un osservatorio in grado di acquisire e registrare informazioni genetiche, sanitarie e demografiche della popolazione di capriolo nel territorio parmense, per poterla caratterizzare. Tenendo aggiornata questa banca dati, ci sarà inoltre la possibilità di valutare, attraverso variazioni annuali, l'impatto di attività antropiche (caccia, costituzione di aree protette e zone non più destinate ad attività agricole intensive, *etc.*) e naturali (comparsa o l'incremento numerico di predatori come il lupo, condizioni climatiche particolari, patologie, *etc.*).

Nell'introduzione del lavoro verranno toccati separatamente tre argomenti apparentemente piuttosto lontani fra loro, con lo scopo di fornire alcune nozioni utili per la comprensione organica del significato del lavoro svolto e dei risultati ottenuti.

In primo luogo verranno descritte la biologia del capriolo, con particolare riguardo per alcune caratteristiche fisiologiche ed etologiche, indispensabili per l'interpretazione dei dati.

In secondo luogo verranno toccati i concetti di biodiversità, conservazione e gestione, per delineare il contesto entro il quale si inserisce il presente studio.

Infine verranno forniti alcuni concetti relativi alla biologia molecolare e alla genetica di popolazione per chiarire le scelte metodologiche intraprese.

1. BIOLOGIA DELLA SPECIE

Tassonomia

Phylum: *Cordata*

Classe: *Mammalia*

Ordine: *Artiodactyla*

Sottordine: *Ruminantia*

Famiglia: *Cervidae*

Sottofamiglia: *Odocoileinae*

Genere: *Capreolus*

Specie: *Capreolus capreolus* (Linnaeus, 1758)

Sottospecie italiane: *C.c.capreolus* (Linnaeus, 1758) e *C.c.italicus* (Festa, 1925)



Secondo Whitehead (1972), la famiglia dei cervidi comprende diciassette generi, quaranta specie e più di 190 diverse sottospecie. Ciò che accomuna le specie appartenenti a questa famiglia é in generale la presenza di appendici frontali che vengono rigenerate annualmente, definite palchi. Ad eccezione della renna o caribù

(*Rangifer tarandus*), e in rari casi nel capriolo, i palchi sono portati solo dai maschi di ogni specie.

Origine e domesticazione

I cervidi fecero la loro comparsa 25-30 milioni di anni fa: si trattava di animali di circa 10 kg, privi di trofeo, con maschi dotati di lunghi canini superiori. I primi cervidi dotati di appendici frontali risalgono a 18 milioni di anni fa: le appendici erano costituite da tessuto osseo vitale, prive di rosa, permanenti e a crescita continua, ricoperte di tessuto cutaneo simile al velluto. Tali strutture erano simili agli steli ossei dei cervidi dei nostri giorni. I primi animali dotati di palchi, cioè di appendici ossee rinnovate annualmente, risalgono a 10 milioni di anni fa. Le stanghe erano però di modesta lunghezza e poggiavano su lunghi steli ossei, come accade ancora oggi nel muntjac (*Muntiacus* spp.). Gli steli ossei andarono via via accorciandosi e le stanghe assunsero forme e dimensioni diversificate.



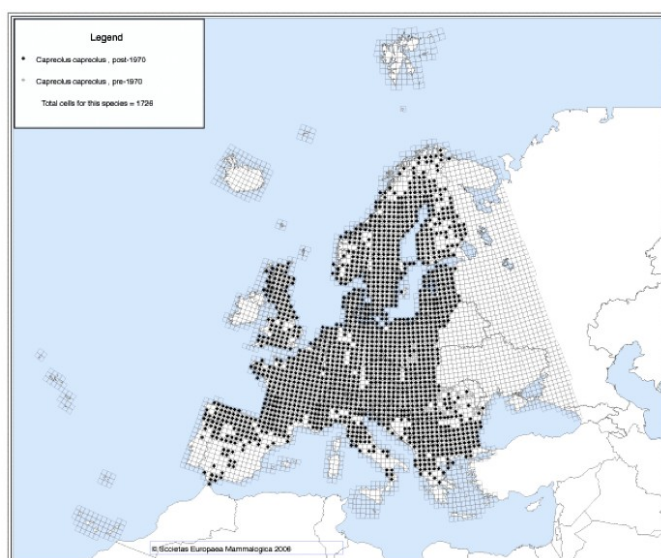
La specie *C. capreolus* é comparsa in Europa circa 3 milioni di anni fa (Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, 2006). Modificazioni climatiche avvenute nel corso del Pleistocene, che hanno causato l'abbassamento delle temperature in Europa, hanno portato alla contrazione dell'areale di questa specie e l'hanno spinta a rifugiarsi nelle aree mediterranee. Da qui, il capriolo ha poi ricolonizzato l'intero continente. Le due specie presenti in Europa sono il *C. capreolus* (Europa occidentale) ed il *C. pygargus* (Europa orientale), che ha dimensioni maggiori rispetto al primo (Pedrotti *et al.*, 2001). In Italia é presente il *C. capreolus* in due sottospecie: *C. c. capreolus* e *C. c. italicus*.

La domesticazione di questo cervide non é stata efficace quanto quella subita dalla renna. La spiegazione di questa difficoltà sembra risiedere nella estrema territorialità del capriolo e nella scarsa tendenza a compiere lunghe migrazioni o spostamenti. Inoltre, la sua indole, seppur gregaria, lo spinge a vivere in branchi non molto numerosi. Questo ha fatto sì che per i popoli primitivi nomadi dell'Europa non fosse semplice tenere in grandi branchi questi animali ed eventualmente modificarne gli

spostamenti migratori a proprio vantaggio, come invece è successo per la renna (Clutton-Brock, 2001).

Distribuzione

Il capriolo, ampiamente diffuso in tutta Europa, ha subito una progressiva contrazione dal XVI secolo, quando l'uomo ha iniziato a strappare alla natura territori da destinare all'agricoltura ed all'allevamento. Parallelamente vi è stato anche un aumento della pressione diretta su questa specie. In Italia il minimo storico è stato



toccato in corrispondenza della Seconda Guerra Mondiale. Dagli anni '50, questo *trend* si è poi invertito e l'attuale distribuzione del capriolo è frutto sia dell'espansione da popolazioni relitte che delle reimmissioni praticate dall'uomo. Nella nostra penisola attualmente possono essere individuati tre grandi areali: uno corrispondente

all'Arco Alpino, uno all'Appennino centro-settentrionale ed uno comprendente tutto il sud Italia, caratterizzato da una distribuzione molto frammentaria (Pedrotti *et al.*, 2001). Secondo le più recenti stime i capi in tutto presenti sarebbero circa 420000 (INFS, 2006). Il capriolo è assente sulle isole.



In Italia, come già anticipato, esiste anche la sottospecie *C.c. italicus*, che pare essere presente solo nella tenuta presidenziale di Castelporziano, nella Foresta Umbra, nell'Orsomarso e in Maremma, ma sono in corso ricerche per verificarne la presenza anche in altre aree.

Caratteristiche e fisiologia

Aspetto - L'anatomia di superficie del capriolo ci mostra una groppa più alta del garrese. Inoltre gli angoli compresi fra l'asse maggiore del bacino e quello del femore e fra l'asse maggiore del femore e quello della tibia sono acuti, conferendo alla cintura e agli arti pelvici l'aspetto di una molla raccolta pronta a scattare. Anche gli angoli della cintura e degli arti toracici sono molto chiusi. Esso viene infatti definito come animale saltatore. Sempre considerando l'animale nel suo insieme, si ricorda che esso possiede una coda assai breve, lunga 2-4 cm, difficilmente visibile osservando l'animale.

Dimensioni - In generale, le dimensioni sono piuttosto variabili. Questo può essere dovuto a fattori genetici, ma soprattutto alla presenza di un ambiente più o meno favorevole, tanto che le popolazioni peninsulari sono mediamente più grandi di quelle alpine. Comunque in Italia le misure oscillano fra: altezza al garrese di 65-90 cm; lunghezza totale (naso-coccigea) di 100-140 cm; peso vivo di 18-32 kg (Ladini, 1989; Ferloni, 1998).

Mantello - Come tutti gli animali selvatici, anche il capriolo ha cicli biologici intimamente legati alla stagionalità dovendo adattarsi alla ciclicità della natura per la riproduzione, per l'alimentazione, per la tipologia e l'aspetto del mantello. Quest'ultimo subisce due mute ogni anno, una primaverile (aprile-maggio) ed una autunnale (ottobre-novembre), regolate essenzialmente dal fotoperiodo (Spagnesi e Toso, 1991; Mattioli e Nicoloso, 2001; Mustoni, 2002).

Il mantello invernale è formato da peli più lunghi e fitti, il colore tende al marrone-grigiastro e solitamente le tonalità più scure si rinvengono nella parte più dorsale del tronco. E' talvolta possibile riscontrare macchie di colore bianco nella porzione ventrale del collo. In questa fase, lo specchio anale è bianco candido ed è ben visibile perché molto in contrasto con la colorazione del resto del corpo. Si nota inoltre molto bene la falsa coda della femmina, costituita dai peli vulvari, ovviamente assente nel maschio.



Il manto estivo è rossiccio, con tonalità più chiare nella parte ventrale dell'addome. In questo periodo la macchia anale si fa meno evidente poiché il suo colore varia dal bianco al giallognolo-beige.



I cuccioli appena nati hanno il mantello tipico dei piccoli cervidi, bruno con macchie bianche, che viene definito pomellato. La pomellatura, però, verrà gradualmente meno per scomparire definitivamente con la muta autunnale, quando l'animale ha circa 4-5 mesi, e verrà sostituita dal manto invernale (Ladini, 1989).

Palco - Nel capriolo solo il maschio porta il palco. Questa struttura, a differenza di quanto succede nei bovidi, è di natura ossea e non cornea. Il corno dei bovidi è un

annesso cutaneo e, analogamente all'organo digitale, è composto da una base



scheletrica, costituita dalla cavicchia ossea (processo corneale dell'osso frontale) e da un rivestimento cutaneo privo di peli, con un'epidermide molto cheratinizzata. Questa struttura è normalmente presente in entrambi i sessi e permane per tutta la vita, accrescendosi con il passare degli

anni. In qualche specie ed in particolar modo nei bovidi selvatici (muflone, camoscio, ma soprattutto stambecco) sono ben visibili le bande di accrescimento annuali, molto utili per la valutazione dell'età degli animali. Quelle che vengono impropriamente chiamate "corna" nei cervidi sono in realtà organi molto diversi e si dicono appunto "palchi". In generale il palco si compone di diverse parti. Il supporto è costituito dallo stelo osseo (o peduncolo): una propaggine dell'osso frontale che per tutta la vita è coperto da cute con peli (Pelagalli, 1989). Dall'apice dello stelo si sviluppa il palco caduco vero e proprio la cui base è una struttura tondeggiante ed allargata, chiamata rosa. Dalla rosa parte la stanga, struttura principale del palco, dalla quale si ramificano una cima frontale definita "oculare", una caudale chiamata "stocco" ed una cima superiore, il "vertice". Le ridotte dimensioni del trofeo rispetto agli altri cervidi, lo scarso numero di ramificazioni ed il fatto che esso sia normalmente rivolto caudalmente, suggeriscono che esso sia nato per percorrere la macchia e i fitti sottoboschi, ambienti che il capriolo frequenta normalmente (Ferloni, 1998). La struttura del palco a sviluppo ultimato è costituita da tessuto osseo con "solchi" e piccoli rilievi, chiamati "perle," poste principalmente sulla superficie mediale della stanga. Durante la fase di accrescimento il palco è rivestito da un sottile strato di tessuto connettivo (tela sottocutanea e derma) a sua volta ricoperto da epidermide sprovvista di ghiandole e dotata di fitti peli, corti e molto morbidi, che le conferiscono il nome di "velluto". Al termine dello sviluppo, il velluto si atrofizza per obliterazione dei vasi nutritizi e viene eliminato. Questo succede in primavera e si dice che gli

animali “puliscono”. Il meccanismo che porta alla necrosi e all’eliminazione del velluto è il seguente: la progressiva ossificazione della rosa determina una riduzione della rete venosa e quindi della circolazione sanguigna dell’intero palco. Anche le arterie della rosa si contraggono e infine si occludono. Questa chiusura fisiologica dei vasi della rosa causa l’atrofia e l’essiccamento del velluto. Lo stimolo a liberarsi di questa membrana sfregando il palco contro tronchi e cespugli sembra sia dovuto sia agli ormoni testicolari che ad impulsi locali di natura meccanica e fisica. Tale sfregamento, porta anche ad un secondo risultato: i tannini presenti in grande quantità nella giovane vegetazione primaverile, conferiscono la caratteristica colorazione al trofeo, che risulterà quindi più o meno scuro. Con il distacco del velluto si ha il palco definitivo. Dopo la perdita dei tessuti molli i vasi più superficiali delle stanghe si obliterano e restano evidenti solo i canalicoli all’interno dei quali essi scorrevano. Questi canalicoli non sono altro che i solchi. Nella parte centrale delle stanghe, invece, persiste un tessuto spongioso che rimarrà irrorato ancora a lungo. Questa struttura, infatti, sarà vitale fino all’autunno successivo, quando subirà il distacco dallo stelo osseo, sempre regolato degli androgeni. Anche i vasi più interni della stanga verranno infatti obliterati a livello della giunzione fra stelo osseo e rosa e così l’intero palco verrà secondato. Solitamente, anche se il distacco della stanga di destra e quella di sinistra non è esattamente contemporaneo, avviene a distanza di brevissimo tempo. Questa sorta di “lesione” è del tutto fisiologica ed indolore per l’animale. La superficie di distacco viene rapidamente ricoperta da cute, cioè dal velluto; al di sotto si forma una struttura cartilaginea, che si accresce rapidamente spingendo avanti a sé la cute e presentando già le gemme per la ramificazioni. Quando la struttura cartilaginea è ultimata, subisce l’ossificazione ed in circa tre mesi si giunge al suo completo sviluppo, al termine del quale verrà perso il velluto e un nuovo ciclo avrà inizio.

Negli animali al di sotto dell’anno di età, questo ciclo è particolare. Infatti, verso il 2°-3° mese di vita, i maschi hanno dei piccoli abbozzi di trofeo. Fra ottobre e novembre spunta il palco vero e proprio, in velluto, che solidificherà e sarà pulito a dicembre. Questo primo palco supera raramente i 4 cm. A fine gennaio esso cadrà per lasciare posto al secondo trofeo che sarà pronto in 3 o 4 mesi. E’ quindi possibile concludere che l’animale ad un anno di età presenta già il secondo trofeo.

Comportamento alimentare

Il capriolo, come tutti i selvatici, mostra caratteristiche comportamentali che spesso dipendono dalle sue abitudini alimentari, le quali, a loro volta, sono dettate da vere e proprie esigenze fisiologiche.

Nel capriolo la capacità del complesso rumine-reticolo, tenendo conto della ridotta mole dell'animale, è molto inferiore rispetto agli altri cervidi e raggiunge solo il 6-8,5% del peso corporeo (Ferloni, 1998). Le conseguenze di questa peculiarità sono almeno due. La prima è che il suo sistema digerente non è adatto a ricevere alimenti



troppo ricchi di fibra grezza. Per aumentare la velocità di assimilazione e diminuire la velocità di transito, l'animale si vede costretto a puntare più sulla qualità dell'alimento che sulla quantità. Esso, infatti, viene definito "brucatore selettivo" e si contrappone ai "pascolatori" come

il cervo, il daino e il muflone (Perco, 1987). Un brucatore ha la necessità di selezionare l'alimento, in modo che sia il più energetico possibile e di alto valore proteico. Infatti, il capriolo predilige gemme, germogli, polloni e frutti di diverso tipo (mele, ciliege...), nei quali sono concentrate le sostanze di origine vegetale più nobili. In un prato di erba medica, ad esempio, esso seleziona gli apici novelli e mai lo si vedrà strappare a testa bassa interi ciuffi di erba, come fanno invece cervo e daino. Questa esigenza fa sì che l'habitat ideale per il capriolo sia caratterizzato dalla presenza di colture e gruppi vegetazionali variegati e disetanei, ad alta diversificazione ambientale su superfici anche ristrette. Sono indispensabili boschi alternati a radure e prati, ma anche aree coltivate e di sottobosco ricco di essenze arbustive. Fondamentale, quindi, è l'eterogeneità.

Un'altra conseguenza delle ridotte dimensioni del rumine del capriolo è la necessità di alimentarsi un considerevole numero di volte nell'arco della giornata. I pasti

arrivano alla decina, distribuiti nelle 24 ore, anche se l'ingestione subisce due picchi, uno all'alba ed uno al tramonto.

In generale, si può dire che la sua dieta si compone mediamente per un 24,5% di essenze arboree e arbustive, per un 15,8% di graminacee e per un 55,25% di altre essenze erbacee e foraggiere (Ladini, 1989). Ma queste proporzioni variano notevolmente durante l'anno.

Va ricordato infatti che la stagionalità, come per altri aspetti della fisiologia, è da considerare una componente essenziale della strategia alimentare del capriolo. Infatti, in funzione delle stagioni e delle disponibilità trofiche, si alternano fasi di catabolismo e perdita di peso con altre di recupero di massa corporea, come per molti altri animali selvatici. L'andamento ciclico di perdita e recupero di peso viene mantenuto anche in animali che vivono in cattività, ai quali viene fornito cibo in abbondanza e di alta qualità in modo costante. Questa osservazione fa ritenere che l'andamento altalenante del metabolismo sia il risultato delle interazioni biochimiche-fisiologiche che intercorrono fra gli animali selvatici e l'ambiente nel quale si sono evoluti (Robbins, 1993). I periodi in cui il consumo è massimo sembrano essere l'autunno e la primavera (Perco, 1987). La capacità di ingestione risulta direttamente proporzionale al contenuto di proteina dell'alimento, alla capacità di assimilazione da parte dell'animale ed è inversamente proporzionale al contenuto di fibra grezza, in particolar modo della frazione di lignina (Perco, 1987). Data l'estrema selettività nella scelta del cibo, tutti gli altri ungulati, selvatici e non, rappresentano per il capriolo dei competitori alimentari. Quindi questo piccolo cervide è colui che risente maggiormente della coabitazione con altri ruminanti, soprattutto in cattività.

Classi di età ed identificazione

Come per gli altri ungulati selvatici, per definire l'età del capriolo vengono utilizzate le classi di età, anziché gli anni. Le classi di età sono categorie che prendono in considerazione contemporaneamente gli anni e la posizione sociale degli animali (Ferloni, 1998). Le classi comunemente in uso ed utilizzate nel presente lavoro sono le seguenti:

Classe di età	Categoria	Età
0	Piccoli	0-11 mesi
1	Subadulti	12-23 mesi
2	Adulti	2-7 anni
3	Vecchi	>7 anni

Le ultime indicazioni fornite dall'INFS (2006) prevedono che la classe 2 e 3 vengano accorpate e che vengano individuate solo tre classi, sia nei maschi che nelle femmine:

0 - I "piccoli" sono gli animali nati durante l'ultima stagione di parto.

I - In questa classe troviamo gli animali nati durante la penultima stagione di parto, quindi animali nel secondo anno di vita, all'incirca fra i 12 ed i 24 mesi di età. I maschi vengono definiti "puntuti" e le femmine "sottili". I puntuti sono caratterizzati da un trofeo costituito da due stanghe semplici, con una unica punta. Essi vengono anche definiti "subadulti": animali fisiologicamente maturi per la riproduzione ma che non hanno ancora raggiunto una posizione sociale che permetta loro di accoppiarsi (socialmente immaturi). Le sottili, o subadulte, sono femmine che non hanno ancora partorito ma che partoriranno al compimento dei 24 mesi e questo evento sancirà il passaggio all'età adulta.

II - I maschi vengono definiti palcuti e le femmine semplicemente adulte. E' stata eliminata la distinzione fra adulti e vecchi poiché, comunque, si tratta di animali che all'interno della popolazione rivestono lo stesso ruolo: sono i riproduttori.

Ci sono due diversi momenti della gestione faunistica durante i quali è indispensabile stabilire la classe di età degli animali e gli strumenti che abbiamo a disposizione sono nei due casi molto diversi. Il primo di questi momenti consiste nell'osservazione dell'animale in vita, o durante i censimenti o durante la caccia nel momento che precede l'abbattimento. E' d'obbligo, in queste circostanze, l'uso di binocoli (7x42, 8x30, 8x50, 10x40, etc.) e di cannocchiali che abbiano almeno 20 ingrandimenti (20x). Gli elementi che ci aiutano sono: le dimensioni e la stima del peso, in minima parte il colore del mantello, le proporzioni fra le parti anatomiche, (quella che si definisce anatomia di superficie), il comportamento sociale e, per il

maschio, solo nel periodo in cui ne è provvisto, il palco. Nessuno di questi elementi preso singolarmente è sufficiente per la stima della classe: serve invece integrare mentalmente tutte queste informazioni e giungere così ad una valutazione di sintesi. In secondo luogo, la classe di età va valutata successivamente all'abbattimento, a controllo dell'abbattimento stesso, utilizzando la tavola dentaria e la sua usura.

Di seguito verranno considerati singolarmente gli elementi utili per la stima della classe di età (Perco, 1955; Perco e Perco, 1979; Ponti, 1992).

Dimensioni e peso – Queste grandezze cambiano molto in relazione all'età dell'animale, ma l'informazione che possiamo trarne è talvolta fuorviante. Inoltre, stimando il peso a distanza, è piuttosto facile fare errori dell'ordine di 5-10 kg.

In generale un capriolo alla nascita pesa 1-1,5 kg e arriva all'età adulta ad un peso di circa 25-30 kg. A fianco di una variabilità individuale piuttosto ampia, vi sono notevoli modificazioni in rapporto al momento biologico e climatologico. Ad esempio, i maschi durante gli amori perdono una buona percentuale del loro peso; ancora, il peso varia molto in rapporto alle disponibilità alimentari che a loro volta dipendono dalle condizioni atmosferiche. Per tutti questi motivi, peso e dimensioni saranno utili più che altro per distinguere gli animali di pochi mesi (classe zero) dagli adulti (classi 2 e 3).

Colore del mantello - Anche in questo caso ci sarà utile per la distinzione dei piccoli (classe 0). Gli animali nascono a maggio con il mantello pomellato e nei mesi successivi, questa caratteristica si fa sempre meno evidente, fino a scomparire definitivamente fra settembre e ottobre durante la muta autunnale. Quindi la presenza della pomellatura identifica gli animali al di sotto dei 4 mesi di vita.

In generale, gli animali più giovani effettuano la muta prima degli altri ed in base a ciò, la valutazione che è possibile effettuare è solo di tipo relativo all'interno di un gruppo, senza alcun valore assoluto.

Anatomia di superficie - Le proporzioni relative fra le varie parti del corpo dell'animale sono un prezioso strumento di stima. La sagoma dell'animale subisce grandi cambiamenti nel corso della sua vita. Come in tutte le specie, e forse più che in altre, il capriolo nasce con spiccatissimi tratti infantili: arti anteriori e soprattutto posteriori lunghi ed esili, tronco snello, collo sottile e testa leggera ma con occhi, naso

e orecchie proporzionalmente molto sviluppati. L'effetto finale che ne riceve l'osservatore è quello di un animale tutt'altro che agile, elegante ed armonico. Per analogia si pensi alla sensazione che procura l'osservazione un puledrino: grande testa e lunghe zampe.

Tutte queste caratteristiche tendono ad attenuarsi gradualmente con il passare dei mesi e degli anni.

L'animale subadulto conserva comunque un aspetto snello. In esso la lunghezza degli arti anteriori (misurata dal punto d'appoggio all'olecrano), è maggiore della profondità del torace (misurata dal garrese al manubrio dello sterno). Inoltre il margine dorsale del collo e la linea dorsale formano un angolo di circa 90° o poco più: l'animale tiene il collo quasi eretto. Infine la circonferenza del collo è esigua.

Nei giovani adulti l'angolo fra linea dorsale e margine dorsale del collo aumenta. Nell'adulto la lunghezza degli arti anteriori ha quasi uguagliato la profondità del torace e la testa viene portata sempre più vicina al suolo.

Nei vecchi gli arti anteriori acquistano sempre più vigore ed anche il collo si fa sempre più massiccio. Anche il portamento della testa è ormai molto diverso rispetto all'animale giovane: nell'incedere il collo viene tenuto quasi parallelo al suolo. Il torace si fa sempre più profondo e la sua misura eguaglia o addirittura supera quella degli arti anteriori. L'effetto globale è quello di un animale con un anteriore ben sviluppato e massiccio.

Anche la testa perde angolosità e da lunga e sottile, con l'età, si fa più ampia e le orecchie spiccano sempre meno per le loro dimensioni rispetto alle altre parti (Ponti 1992).

Trofeo - Esso può darci informazioni molto utili anche se molte volte il loro valore viene sopravvalutato. Intorno ai 4 mesi di età si ha la comparsa dei primi fusi, alti 3-4 cm, che solidificano intorno ai 6-7 mesi. A 8 mesi il primo trofeo cade ed in tre mesi, cioè quando l'animale ha circa un anno, è già presente la "seconda testa". Questa sarà di circa 20 cm ed arriverà circa all'apice delle orecchie e la forma potrà essere ad una, due o addirittura tre cime (animale puntuto, forcuto, o palcuto). Nell'adulto, il trofeo ha normalmente tre cime e supera abbondantemente l'altezza delle orecchie. In conclusione, più che il numero delle cime, a fornire informazioni utili sono la forza del

trofeo e la sua altezza rispetto alle orecchie. Con forza intendiamo il calibro della stanga e delle rose, che sono le strutture per mezzo delle quali il palco si innesta sugli steli ossei del frontale. Queste misure sono infatti direttamente proporzionali all'età degli animali. Anche nella classe dei vecchi, dove il trofeo inizia a perdere una o più cime, sono sempre riscontrabili rose e stanghe di buone dimensioni (Ponti, 1992).

Atteggiamento - Come in tutte le specie animali, anche nel capriolo il comportamento si modifica con l'età.

I piccoli sono sempre accompagnati dalla madre ed il loro fare è vivace, giocoso ed irresponsabile. Sono molto attenti a tutto ciò che succede loro intorno e sono estremamente curiosi ma non sono ancora in grado di giudicare un evento o una presenza come pericolosi. Anche i movimenti tradiscono una giovanissima età in quanto è più frequente vederli saltare e saltellare piuttosto che camminare. Hanno scatti improvvisi, fanno corse repentine e bruschi arresti. Insomma, giocano come tutti i cuccioli.

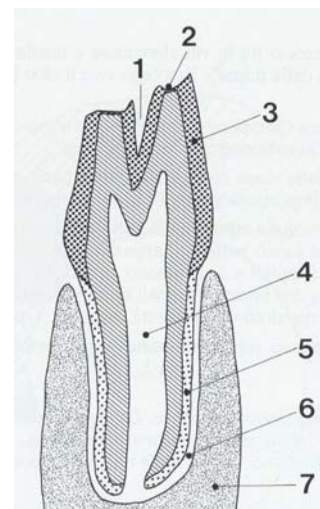
Con l'età questa spensieratezza viene gradualmente meno. I subadulti ed i giovani adulti sono comunque poco sospettosi, escono presto al pascolo serale e a quello mattutino si trattengono fino a tardi. Le movenze leggere ed il rispetto che hanno nei confronti degli animali più anziani sono indice di un livello sociale ancora precario.

L'animale adulto, soprattutto il maschio, si fa più guardingo e diventa prepotente nei confronti di piccoli e delle femmine.

I vecchi, infine, sono oltremodo diffidenti. Se vivono in zone disturbate, spesso escono solo di notte o in qualche caso, che dimostra l'estrema astuzia di questi animali, solo da mezzogiorno alle due, poiché hanno imparato che l'uomo difficilmente costituirà un pericolo a quell'ora (Perco, 1955).

Tavola dentaria - Questa osservazione fornisce un aiuto prezioso per la stima della classe, ma ha il difetto intrinseco di poter essere effettuata solo dopo l'abbattimento.

Gli incisivi del capriolo, come in tutti i ruminanti erbivori, visti in sezione, presentano la cavità del dente colma di polpa dentaria (4) delimitata da dentina (2), dallo smalto (3) e dal cemento (5). Sulla faccia masticatoria è presente una invaginazione a calice dello smalto che va a formare il cornetto dentario, comunemente chiamato "fessura" (1).



Wagenknech, 1981

I premolari ed i molari presentano il cosiddetto smalto a

pieghe. Esso ha infatti numerose invaginazioni sulla faccia masticatoria che gli conferiscono questo aspetto "ad onde". Dalla superficie masticatoria, inoltre, sporgono delle creste date dalla confluenza dei tubercoli dello smalto (dentatura lofodonte). All'esterno si stratifica il cemento, che va a riempire anche i calici dello smalto. Gli spazi interni sono invece riempiti da dentina. Questi denti continuano a crescere anche dopo la loro eruzione. Il corpo del dente diventa quindi molto alto e solo a sviluppo completo si formano delle radici relativamente brevi. In corrispondenza della faccia masticatoria, per sfregamento, le creste diventano sottili, mentre la dentina, che ha una consistenza minore, ed il cemento si approfondano a guisa di solchi. Di conseguenza la faccia masticatoria arriva ad avere quella superficie ruvida indispensabile per la triturazione degli alimenti di origine vegetale.

Come tutti gli altri ruminanti il capriolo è un difiodonte, cioè presenta una doppia dentizione. I piccoli possiedono alla nascita 20 denti caduchi da latte e la formula dentaria è:

p1 p2 p3

i1 i2 i3 c1 p1 p2 p3

Il capriolo adulto, invece, possiede 32 denti e la formula dentaria permanente è:

0I 0C 3P 3M

3I 1C 3P 3M

Per la stima dell'età, normalmente si considerano soltanto i denti dell'arcata inferiore. Le valutazioni vengono effettuate sia sull'eruzione dei denti che sull'usura della superficie masticatoria.

Si riporta di seguito uno schema che descrive la tavola dentaria in funzione dei mesi di età. È importante notare che i premolari permanenti erompono tutti fra il 12° ed il 13° mese e che il secondo premolare definitivo (P2) è bicuspidato, mentre quello da latte (p2) è tricuspido. Questa osservazione è molto utile per stabilire se un animale ha superato l'anno di età, cioè se fa ancora parte della classe 0 o se appartiene già alla classe 1.

DENTIZIONE DEL CAPRIOLO - TABELLA RIASSUNTIVA

Con lettera minuscola sono indicati i denti da latte o decidui, con lettera maiuscola i denti definitivi.
 i,I = incisivo; c,C = canino; p,P = premolare; m,M = molare.
 Formula dentaria completa per lato: al numeratore i denti mascellari, al denominatore i denti mandibolari.

Alla nascita	— — — —	p1 p2 p3
	i1 i2 i3 c	p1 p2 p3
A 3-4 mesi	— — — —	p1 p2 p3 M1 (M2)
	i1 i2 i3 c	p1 p2 p3 M1 (M2)
A 5-6 mesi	— — — —	p1 p2 p3 M1 M2
	I1 i2 i3 c	p1 p2 p3 M1 M2
A 7-8 mesi	— — — —	p1 p2 p3 M1 M2
	I1 I2 i3 c	p1 p2 p3 M1 M2
A 9 mesi circa	— — — —	p1 p2 p3 M1 M2
	I1 I2 I3 c(C)	p1 p2 p3 M1 M2
A 10 mesi circa	— — — —	p1 p2 p3 M1 M2 (M3)
	I1 I2 I3 C	p1 p2 p3 M1 M2 (M3)
A 12-13 mesi	— — — —	P1 P2 P3 M1 M2 M3
	I1 I2 I3 C	P1 P2 (P3) M1 M2 M3
A 14 mesi circa	— — — —	P1 P2 P3 M1 M2 M3
	I1 I2 I3 C	P1 P2 P3 M1 M2 M3

(da von Raesfeld, 1985)

Superati i 12 mesi, cioè quando la bocca è ormai “fatta”, nella stima dell'età è d'aiuto solo l'usura della tavola.

I tre elementi da considerare per stabilire il livello di usura sono: la spigolosità delle cuspidi, l'evidenza della dentina e la profondità della fessura. Con la masticazione, infatti, le cuspidi si usurano ed affiora sempre di più la dentina, distinguibile per la colorazione brunastra che si interpone ai due strati di smalto che formano una cuspidi. Giunti all'usura completa delle cuspidi, anche la fessura scomparirà e rimarrà evidente

solo la dentina. Questo logorio si presenta solitamente a carico di secondo, terzo premolare e primo molare (P2, P3 e M1). Da qui, si estenderà in senso centrifugo andando ad interessare anche le altre corone.

Per una buona stima, bisogna infine tenere conto di almeno altri due fattori: eventuali differenze individuali e l'alimentazione. Infatti, pare che il colore più scuro della dentina sia associato ad una sua maggiore resistenza all'usura (Ladini, 1989). Inoltre, più tenero è l'alimento e maggiore è l'usura; più lignina esso contiene e minore è il logorio. Questo si spiega per il fatto che è lo sfregamento fra le due arcate sovrapposte a causare il consumo. Quindi se l'alimento ha una certa consistenza e spessore, le superfici masticatorie sono in qualche modo protette dallo sfregamento reciproco. In ultima analisi, per una corretta stima, bisogna valutare anche il comprensorio omogeneo (pianura, collina, montagna) all'interno del quale un animale vive (Pelagalli, 1989; Ladini, 1989; Perco, 1987).

Si ricorda che l'osservazione della tavola dentaria permette solo di effettuare una stima sull'età degli animali con lo scopo di attribuire la classe di età. Per valutare con maggiore precisione gli anni sarebbe necessario effettuare un'indagine molto più complessa, che prevede che un dente (solitamente M1 o I1) venga decalcificato con apposite soluzioni e che, con il microtomo, ne venga tagliata una sezione poco sopra la/le radici. Il preparato viene opportunamente colorato e microscopicamente vengono valutati gli anelli di interruzione di crescita del cemento. Quest'ultimo, infatti, viene deposto in modo non costante durante l'anno, con un rallentamento in inverno (Mitchell, 1967; White, 1974; McCollough, 1986; Azorit *et al.*, 2004).

Ciclo biologico annuale

Nel corso dell'anno, per i cervidi si susseguono ciclicamente le diverse fasi fisiologiche, scandite sia dal fotoperiodo che da altri "input" che gli animali ricevono dall'ambiente che li circonda. Cercheremo di considerare parallelamente fisiologia e comportamento sociale per dare un'idea organica della vita di questi animali.

Per semplicità, iniziamo a considerare il ciclo biologico dal periodo delle nascite, che si concentrano in maggio (aprile-giugno) (Ladini, 1989). Dal parto fino a metà luglio si svolge la fase definita parentale e l'attività principale della femmina è quella

di allattare e prendersi cura dei piccoli nati. I parti gemellari sono la normalità. Il capriolo ha quattro mammelle che vengono tutte utilizzate dalla prole. Entro 60 minuti dalla nascita il cucciolo é in grado di reggersi più o meno stabilmente sulle zampe e di muoversi con una discreta disinvoltura. Essi vengono definiti con il termine inglese *hiders*: durante le prime 2-3 settimane di vita i piccoli vengono nascosti dalla madre fra l'erba, favoriti dal riflesso all'immobilità, dalla mancanza quasi totale di emanazioni olfattive e dal mimetismo offerto dal mantello pomellato. I piccoli rimangono quindi accovacciati intanto che la madre si allontana per alimentarsi (Ladini, 1989), per evitare che la sua presenza richiami i predatori.

Mentre le madri sono occupate nelle cure parentali, i maschi di capriolo vivono la cosiddetta fase territoriale: ognuno di essi occupa un territorio di qualità ed estensione proporzionale al proprio rango sociale, difendendolo dai conspecifici. Per questo é molto frequente l'attività di demarcazione con raspate sul terreno e fregoni sui cespugli (scortecciatura di tronchi e rami), che lasciano segnali visivi ma anche olfattivi, per la presenza di ghiandole interdigitali e frontali. Si intensificano inoltre i segnali sonori: l'abbaiato, un suono gutturale utilizzato da entrambi i sessi nel momento del pericolo, viene spesso usato dai maschi per intimidire i rivali.

Da metà luglio a metà agosto gli animali sono tutti impegnati nella fase degli amori (Ferloni, 1998). Poiché le femmine di capriolo sono monoestrali, il maschio cerca una femmina che transita sul suo territorio corteggiandola fino all'estro, che dura 36-48 ore. Si parla infatti di "temporanea monogamia". In questo momento le femmine allontanano temporaneamente i piccoli nati, che sono comunque già in grado di alimentarsi anche autonomamente.

Subito dopo il calore, i maschi godono di un periodo di tranquillità finalizzato al recupero della forma fisica migliore, definito fase indifferente (fine agosto-fine ottobre). Successivamente gli animali entrano nella fase di raggruppamento che durerà fino a marzo: si formano i gruppi invernali composti dalla femmina, dai piccoli dell'anno, eventualmente dalla figlia dell'anno precedente e talvolta da uno o più maschi. Il palco viene perso in autunno, quindi durante tutta questa fase i maschi hanno il trofeo ricoperto dal velluto.

In primavera, i gruppi invernali si sciolgono. I maschi, dopo la pulitura del trofeo (marzo), iniziano la fase gerarchica: si formano gruppi unisessuali con progressivo aumento dell'aggressività che si manifesta in parate e confronti finalizzati all'autoaffermazione. Lo scopo è quello di raggiungere una buona posizione sociale che permetterà di scegliere i territori migliori nella fase successiva e quindi per il periodo degli accoppiamenti. Le femmine rompono il rapporto parentale con i piccoli, preparandosi per i parti imminenti (concentrati a maggio), quando un nuovo ciclo avrà inizio.

Gravidanza e diapausa

La femmina di capriolo è definibile come monoestrale stagionale e per la maggior parte dell'anno essa si trova quindi in anestro stagionale. Negli ultimi decenni sono stati condotti diversi studi dosando progesterone e gonadotropine nel sangue periferico delle femmine di capriolo nel periodo compreso fra l'inizio di luglio e fine ottobre, con lo scopo di chiarire l'andamento endocrino nel periodo degli amori (Schams *et al.*, 1980; Lambert *et al.*; 2001, Lambert *et al.*, 1998, Tixier *et al.*1997). Ecco i risultati.

Il livello di progesterone rimane basso con piccole fluttuazioni fino alla metà o alla fine di luglio, quando si osserva un aumento che dura circa 5 giorni, e tocca i 0,9 ng/mL.

La successiva diminuzione è seguita da un nuovo aumento ancora più consistente con alte concentrazioni plasmatiche per tutto il periodo esaminato, fino a 3-4 ng/mL, anche se con grandi fluttuazioni. L'ormone luteotropo (LH) fa registrare almeno 2 distinti picchi prima del piccolo aumento di progesterone (da 0,9 a 3-4 ma anche 41 ng/mL).

Dopo questo primo piccolo aumento di progesterone e prima del suo nuovo aumento postovulatorio, si è osservato un evidente picco preovulatorio di LH che perdura per qualche giorno.

Per quanto riguarda l'ormone follicolo-stimolante (FSH), l'andamento è simile a quello dell' LH. I suoi primi due picchi vanno dai 20 ai 40-60 ng/mL mentre quello preovulatorio dai 20 ai 30-65 ng/mL.

Sia LH che FSH rimangono a livelli basali quando il progesterone è molto concentrato, successivamente all'ovulazione (LH 1 ng/mL e FSH 15-30 ng/mL).

In conclusione, le fluttuazioni di gonadotropine all'inizio del periodo in esame dimostrano come l'asse ipotalamico-ipofisario sia già attivo anche prima della stagione degli amori: anche nelle specie domestiche, come nella pecora , al termine dell'anestro stagionale si hanno fluttuazioni di LH e progesterone che suggeriscono la ripresa dell'attività sessuale.

La peculiarità, sta nell'andamento dei livelli di progesterone nel periodo postovulatorio: essi risultano alti per tutto il periodo preso in esame, dimostrando la persistenza dei corpi lutei sia che vi sia stata fecondazione che nel caso contrario. Questo andamento viene giustificato dalla particolare gravidanza del capriolo, che inizia solitamente in agosto e termina con il parto intorno ad maggio-giugno, per una durata complessiva di circa 10 mesi. Ma per i primi 4,5-5 mesi, i frutti del concepimento rimangono flottanti nell'utero ed hanno uno sviluppo lentissimo. Questo periodo prende il nome di "diapausa embrionale". L'impianto vero e proprio avviene solo verso dicembre. Nella maggior parte dei mammiferi, è proprio l'impianto a segnalare all'organismo materno l'avvenuto concepimento, stimolando quindi la persistenza del corpo luteo, che continuerà a secernere progesterone per tutta la gravidanza. Nel caso del capriolo, visto il periodo di diapausa, l'impianto è posticipato e non può di conseguenza svolgere questa funzione, perché sarebbe ormai troppo tardi. Gli alti livelli di progesterone persistenti sino a febbraio sono una sorta di "sistema di sicurezza": prima dell'impianto il prodotto del concepimento è un cattivo regolatore della gravidanza. Per rimediare l'evoluzione ha messo in atto questo sistema: vi è comunque persistenza del corpo luteo fino a febbraio. Se c'è effettivamente gravidanza la persistenza continua grazie ai segnali conseguenti all'impianto tardivo a dicembre. Se non c'è gravidanza, questo segnale manca e si ha una normale luteolisi a febbraio. Nelle femmine non gravide il progesterone resta dosabile fino ad aprile anche se la concentrazione inizia a diminuire da febbraio.

E' infine interessante ricordare che neppure con recentissimi studi si è riusciti ad individuare il meccanismo in grado di riattivare la gravidanza e lo sviluppo della blastocisti, dopo la diapausa. Lo studio degli animali in natura ha mostrato come

questa riattivazione coincida con il solstizio d'inverno. Ma studi effettuati su animali esposti a fotoperiodo artificiale, ha al contrario avvalorato l'ipotesi che la diapausa sia regolata da un ritmo materno endogeno, dipendente sia da fattori genetici che dalle condizioni corporee materne. Al contempo è stata individuata una PAG (Pregnancy Associate Glycoprotein) specie-specifica prodotta dalla blastocisti in grado di colpire specifici recettori sull'endometrio. Conseguentemente a questo segnale, vi è un picco della concentrazione sierica materna di estradiolo, il quale stimolerà le modificazioni endocrine che porteranno all'impianto del *conceptus* (Lambert, 2005, Lambert *et al.*, www.roedeer.com). Ciò che ancora non si conosce è il fattore che sta a monte di tutte queste modificazioni materno-fetali, in grado di innescare il termine della diapausa.

Dal punto di vista del significato biologico, la diapausa è da considerare come una strategia evolutiva che permette al capriolo di concentrare tutti gli sforzi riproduttivi (sia l'accoppiamento che i parti e l'allattamento) nei mesi estivi, che sono più favorevoli dal punto di vista climatico ed alimentare. Questa particolarità non è unica in natura, anzi è molto frequente ad esempio nei piccoli carnivori, come il tasso, il furetto, la martora e la faina.

Curve di crescita

Soffiantini (2002) considerando i caprioli della provincia di Parma, ha definito gli incrementi ponderali giornalieri massimi e l'età corrispondente. Per i maschi vengono raggiunti i 56 g/giorno a 70 giorni di vita e per le femmine i 43 g/giorno a 43 giorni di vita.

Alla nascita un cucciolo pesa 800-1500 g. A 7 mesi pesa circa il 60% del suo peso adulto e a 12 mesi ha raggiunto circa l'85%. A circa 24 mesi ha ormai conseguito le sue dimensioni definitive.

2. GESTIONE DELLA SPECIE

Biodiversità, conservazione e gestione

La biodiversità indica una misura della varietà delle specie animali e vegetali nella biosfera ed è il risultato del processo di evoluzione. Quest'ultima è il meccanismo che permette ad ogni forma di vita di adattarsi al variare delle condizioni ambientali, climatiche, sociali, etc. L'attualità dell'argomento sta nel fatto che in quest'ottica la biodiversità non è intesa solo come risultato dell'evoluzione, ma anche come serbatoio da cui attinge l'evoluzione stessa.

La biodiversità può essere considerata a diversi livelli: a livello di geni all'interno di una specie o di una popolazione (come faremo nel presente studio) , a livello di specie diverse, a livello di ecosistemi diversi.

La conservazione ha come finalità quella di garantire, a medio e lungo termine, il mantenimento della massima biodiversità negli ecosistemi e di preservare le condizioni naturali in grado di mantenere attivi tutti i processi ecologici ed i meccanismi evolutivi che stanno alla base dei sistemi naturali. Un'adeguata conoscenza dello status e dell'evoluzione numerica delle popolazioni è il primo e fondamentale passo per la conservazione e l'eventuale gestione faunistica di tutte le specie selvatiche.

La gestione faunistica è la parte attiva della conservazione. Si occupa dello studio e della realizzazione di interventi, nel caso in cui ne sia stata individuata l'opportunità (INFS, 2006).

Alcune tappe fondamentali della gestione degli ungulati selvatici sono:

1. Valutazione del territorio che ospita la popolazione, relativamente ad altitudine, flora, suolo, presenza di acqua, predatori e insediamenti umani, allo scopo di stabilirne la capacità faunistica.
2. Censimento delle specie e delle popolazioni, effettuato con diversi metodi che prevedono l'osservazione diretta degli animali e dei segni di presenza, con la raccolta di dati qualitativi e quantitativi sugli animali (sesso e classe di età).
3. Controllo sanitario degli animali, attraverso l'osservazione diretta per le alterazioni più evidenti come micosi o parassitosi cutanee molto estese, o attraverso le indagini effettuate sui capi trovati morti sul territorio.

4. Attuazione di miglioramenti ambientali (colture a perdere, piantumazioni disetanee, creazione di nicchie ambientali,...) che rendano il territorio più adatto ad accogliere specie selvatiche.
5. Attuazione di eventuali ripopolamenti, introduzioni, reintroduzioni, dopo aver condotto appropriati studi di fattibilità.
6. Controllo antibraconaggio, svolto in modo costante durante l'anno dagli agenti di Polizia Provinciale con la collaborazione di tutti i soggetti coinvolti nel piano di gestione, tra cui i selecontrollori, e il monitoraggio della presenza di cani vaganti/randagi/rinselvaticiti, che costituiscono un grave pericolo per le popolazioni di ungulati selvatici.

Talvolta la gestione faunistica coincide con la gestione faunistico-venatoria, poiché spesso il mondo venatorio è l'unica componente sociale ad occuparsi attivamente della gestione della fauna, nei territori non ricadenti all'interno di aree protette (oasi, parchi,...). In questo caso il mondo venatorio effettua materialmente o sostiene economicamente i sei punti elencati poco sopra, ai quali si aggiunge eventualmente il prelievo selettivo, quando vi siano i presupposti per poterlo attuare.

Il prelievo venatorio, infatti, dal punto di vista tecnico-razionale non è in contraddizione con il concetto di conservazione, a patto che venga programmato in modo da non danneggiare le capacità produttive della popolazione. Quando viene raggiunto l'equilibrio fra densità e risorse ambientali, il prelievo è sostenibile nella misura in cui non supera l'incremento utile annuo, cioè il numero di animali dei quali si accresce la popolazione ogni anno (nascite, al netto delle stime di perdite per mortalità naturale, bracconaggio, incidenti stradali, ...). Per prudenza, la percentuale di prelievo non supera mai il 12-14% della popolazione stimata, quando l'incremento utile annuo teorico si aggira solitamente intorno al 30-38% (INFS, 2006).

In contrapposizione al concetto di gestione (soprattutto gestione faunistico-venatoria), vi è quello di "protezione passiva" che consiste nel non attuare nessun tipo di intervento sulla popolazione in esame. Alcuni esempi, soprattutto in aree protette, hanno mostrato come questo tipo di approccio non dia i risultati sperati né sulla salute della popolazione animale in esame né tanto meno su quella del suo ecosistema.

Attualmente esistono due normative nazionali che regolano la conservazione e la gestione della fauna selvatica:

La legge 6 dicembre 1991, n. 394 “Legge quadro sulle aree protette”, definisce le finalità e individua gli elementi fondamentali di programmazione delle diverse tipologie di area protetta.

La legge 11 febbraio 1992, n. 157 “Norme per la protezione della fauna selvatica omeoterma e per l’esercizio dell’attività venatoria”, definisce le principali linee di indirizzo e programmazione per la protezione di mammiferi e uccelli e per la gestione venatoria delle specie cacciabili, e disciplina modi e tempi in cui è possibile esercitare l’attività venatoria.

L’art. 10 prevede che tutto il territorio agro-silvo-pastorale sia sottoposto a pianificazione faunistico-venatoria finalizzata, per quel che riguarda le specie di ungulati, al raggiungimento delle densità ottimali e alla loro conservazione.

A questo scopo il territorio è suddiviso in Ambiti Territoriali di Caccia (ATC), di dimensioni subprovinciali e con caratteristiche ambientali omogenee, destinati alla gestione venatoria e alle attività di caccia in forma programmata.

L’art. 18 prevede la possibilità di cacciare gli ungulati sia nella forma ordinaria della caccia programmata, sia sulla base di piani di abbattimento selettivi approvati dalle Regioni.

L’Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica (INFS) ha il compito di “valutare e studiare lo status e l’evoluzione dei popolamenti degli Ungulati selvatici, e dei rapporti che essi contraggono con le altre componenti ambientali, nonché di fornire strumenti utili per l’elaborazione di progetti volti al miglioramento o alla ricostituzione delle comunità animali, e per una corretta organizzazione della pianificazione faunistico-venatoria.”

Status

Dati relativi al 2000 (Pedrotti *et al.*, 2001) indicavano il capriolo come presente in 67 province su 103 (65%); in 36 (59%) di esse la sua presenza era consistente e ben distribuita, in 16 (26%) occupava il territorio in modo ancora discontinuo e con nuclei tra loro isolati ed in 9 (15%) la sua presenza era ancora sporadica come conseguenza delle prime fasi di un fenomeno di colonizzazione naturale, per una stima complessiva di circa 336000 capi. Una stima del 2005 indica una popolazione nazionale complessiva di circa 420000 capi (INFS, 2006), confermando in linea generale che la popolazione italiana non è in pericolo, sebbene vi sia spazio per un ulteriore aumento. Si calcola che l'attuale consistenza costituisca circa il 18% di quella potenziale e che l'areale attualmente occupato copra solo il 45 % di quello potenziale (INFS, 2006).

Sulle Alpi centro-occidentali e sull'Appennino centro-settentrionale il capriolo mostra uno stato di conservazione soddisfacente ed in progressivo miglioramento, con una percentuale di crescita dal 2000 al 2005 pari rispettivamente al 60% ed al 38%. Non mancano tuttavia situazioni locali nelle quali una cattiva gestione tende a mantenere densità di popolazione inferiori a quelle potenziali o ad impedire la naturale ricolonizzazione dei territori.

Mediamente meno buono appare lo status delle popolazioni in numerose aree delle Alpi centro-occidentali, dove molto spesso la pianificazione dell'entità dei prelievi concessi non è finalizzata al raggiungimento di densità ottimali di popolazione, ma al soddisfacimento delle richieste del mondo venatorio. Fino al raggiungimento delle consistenze ottimali di gestione, i tassi di prelievo dovrebbero essere direttamente proporzionati alle densità, in modo da garantire l'ulteriore crescita delle popolazioni. La popolazione, in questa parte dell'arco alpino, dal 2000 al 2005 ha subito una flessione dell'11%.

Nell'Italia centro-meridionale il capriolo si trova in uno stato di conservazione precario: risulta prioritaria la messa in atto di azioni tese a salvaguardare i nuclei autoctoni residui, con eventuali programmi di reintroduzione.

Per la conservazione della specie in Italia e per favorire una sua presenza effettiva che si avvicini maggiormente a quella potenziale, l'Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica ha fornito le seguenti linee guida: mantenimento della caccia di selezione

come metodo di prelievo (il prelievo è commisurato ai censimenti), ulteriore miglioramento dei criteri e delle tecniche di gestione con particolare riferimento ai metodi di stima di popolazione, tempi di caccia rispettosi delle necessità tecniche e biologiche, riduzione del bracconaggio e del randagismo canino, efficace strategia di reintroduzione nell'Italia meridionale.

Gestione faunistico-venatoria del capriolo

La gestione venatoria che si attua per questa speci viene definita “adattativa”. Ciò significa che le attività e l'eventuale piano di prelievo vengono valutati al termine di ogni annata venatoria tramite i censimenti, il calcolo dello sforzo di caccia (numero di ore medio che ogni cacciatore impiega a compiere l'abbattimento che gli è stato assegnato), le osservazioni in campo effettuate dai selecontrollori, le informazioni ottenute dallo studio delle schede biometriche, ecc... In funzione dei risultati, vengono modulate le scelte dell'annata successiva. Ad esempio si può concludere che sia preferibile ridurre il piano di prelievo per l'eccessiva diminuzione della densità emersa dal censimento o dall'eccessivo sforzo di caccia.

Tecnicamente, la gestione del capriolo in un ATC inizia con la redazione del cosiddetto “catasto ambientale”, grazie al quale è possibile stabilire la capacità faunistica del territorio, cioè la capacità che esso ha di accogliere questa specie, in base alla presenza di insediamenti e attività umane, vie di comunicazione, estensione e tipologia di colture e tipologie ambientali, etc.

Viene quindi effettuato un censimento per stimare la consistenza della popolazione presente, che verrà ripetuto ogni primavera.

Se i risultati ottenuti raggiungono una certa densità-soglia (che è funzione della capacità ambientale), l'ATC propone un piano di prelievo in cui sono indicati il numero di capi da abbattere, il sesso, la classe di età ed i tempi del prelievo. Esso viene quindi valutato ed eventualmente respinto o accettato (con possibili correzioni) dalla Provincia e dall'Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica.

In generale, le linee guida da rispettare per la stesura del piano sono:

- adeguare la densità della popolazione alle risorse dell'ambiente,
- adeguare il prelievo all'incremento utile annuo, quando la popolazione ha raggiunto

una densità in equilibrio con l'ambiente,

- effettuare un prelievo equilibrato tra i sessi (1:1),
- effettuare un prelievo ben ripartito nelle classi di età per rispettare la struttura della popolazione: i giovani dovrebbero rappresentare il 55-65% del totale del prelievo, gli adulti e i vecchi un 35-45%, sia maschi che femmine.

Al piano di prelievo accedono solo i selecontrollori. Essi sono cacciatori che, oltre al normale esame per l'abilitazione all'attività venatoria, hanno seguito appositi corsi sulla biologia e la gestione degli ungulati selvatici e superato l'esame finale.

Ad ogni selecontrollore viene assegnata una parcella di competenza ed uno o più capi di una precisa classe di età, con un numero identificativo corrispondente. Questo numero è riportato su una fascetta con chiusura inammovibile che il selecontrollore deve apporre al capo subito dopo l'abbattimento. Entro 12 ore, il capo deve essere consegnato al centro di raccolta presente in ogni ATC. Qui vengono compiuti i rilievi obbligatori, che comprendono un prelievo di sangue e di tessuti, e la compilazione della scheda biometrica.

La redazione di quest'ultima è considerata un punto fondamentale dell'attività di gestione, tanto che da qualche anno, la normativa regionale dell'Emilia-Romagna individua una nuova figura appositamente addestrata per questo compito, quella del misuratore biometrico. Ogni ATC deve disporre di un numero sufficiente di questi operatori, affinché i rilievi siano corretti e uniformi. I dati ottenuti hanno infatti grande importanza nello studio di una popolazione e nella valutazione della sua evoluzione morfologica nel tempo, sempre nell'ottica di una gestione "adattativa", come ricordavamo pocanzi.

Attualmente il capriolo è cacciato in tutte le province dell'arco alpino, dell'Emilia Romagna e della Toscana, ad eccezione di Varese, Asti, Imperia e Lucca. Complessivamente la specie è cacciata in 42 province sulle 67 in cui è presente. Il capriolo è cacciato nella maggior parte delle province solo mediante sistemi selettivi, che permettono una migliore gestione della specie.

Gestione faunistico-venatoria in provincia di Parma

Ambiti Territoriali di Caccia - La provincia di Parma è divisa in 9 Ambiti Territoriali di Caccia (gli ATC) e a fianco di questi troviamo circa una quarantina fra Aziende Faunistico-Venatorie (AFV) e Aziende Agriturismo-Venatorie (AATV). In questi territori, dove si è sempre praticata la caccia tradizionale alla selvaggina stanziale e di passo, da circa 25 anni si caccia il cinghiale in squadre organizzate e, parallelamente, in alcuni ATC dal 1995 ha avuto inizio la caccia di selezione al capriolo.

Il primo distretto ad attuare un piano di prelievo fu il distretto 1 dell'ATC PR 8, quello che si colloca nelle vicinanze del Parco Regionale dei Boschi di Carrega (Comuni di Felino, Fornovo, Collecchio e Sala Baganza) nell'annata 1996-1997, per un esiguo numero di capi. Fu però solo dalla stagione 1999-2000 che vennero effettuati abbattimenti selettivi in tutti gli areali che sono tuttora oggetto di prelievo. Attualmente gli ATC coinvolti sono l'ATC PR 4, l'ATC PR 5, l'ATC PR 8, ai quali dal 2005 si è aggiunto l'ATC PR 9:

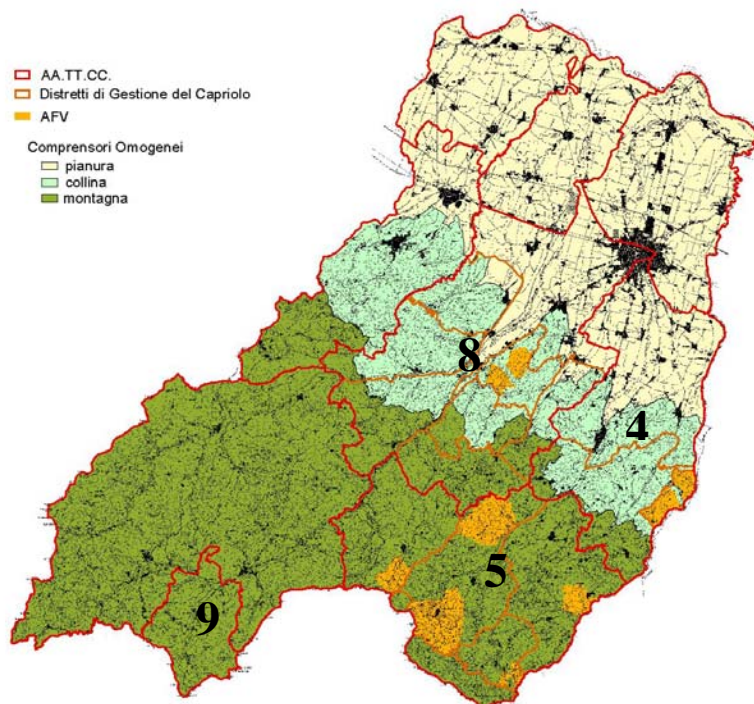
- l'ATC PR4 (superficie: 38.579 ha): comprende i comuni di Parma (parte), Montechiarugolo, Traversetolo, Lesignano de' Bagni, Langhirano, Neviano degli Arduini.
- l'ATC PR 5 (superficie: 49.544 ha): comprende i comuni di Berceto, Corniglio, Tizzano Val Parma, Palanzano, Monchio delle Corti.
- l'ATC PR 8 (superficie: 60.597): comprende i comuni di Noceto, Parma (parte), Collecchio, Medesano, Sala Baganza, Felino, Varano Melegari, Fornovo Taro, Terenzo, Calestano, Solignano.
- l'ATC PR 9 (superficie:10.170 Ha): comprende il comune di Albareto.

Gli ATC sono suddivisi in aree e le aree sono a loro volta suddivise in parcelle.

Il numero di animali oggetto di prelievo è molto diverso nelle diverse ATC perché molto diverse sono la tipologia e l'estensione del distretto interessato e di conseguenza anche la capacità faunistica e la densità degli animali.

Il calendario venatorio ha subito delle modifiche nel corso degli anni, poiché è stato plasmato a seconda dei risultati e delle esperienze raccolte negli anni precedenti.

Attualmente il calendario Regionale e quello Provinciale prevedono due diversi periodi di caccia. Il primo si colloca in estate ed interessa i soli maschi subadulti, adulti e vecchi, mentre il secondo si colloca fra gennaio e l'inizio di marzo ed interessa le femmine di tutte le età e i piccoli maschi.

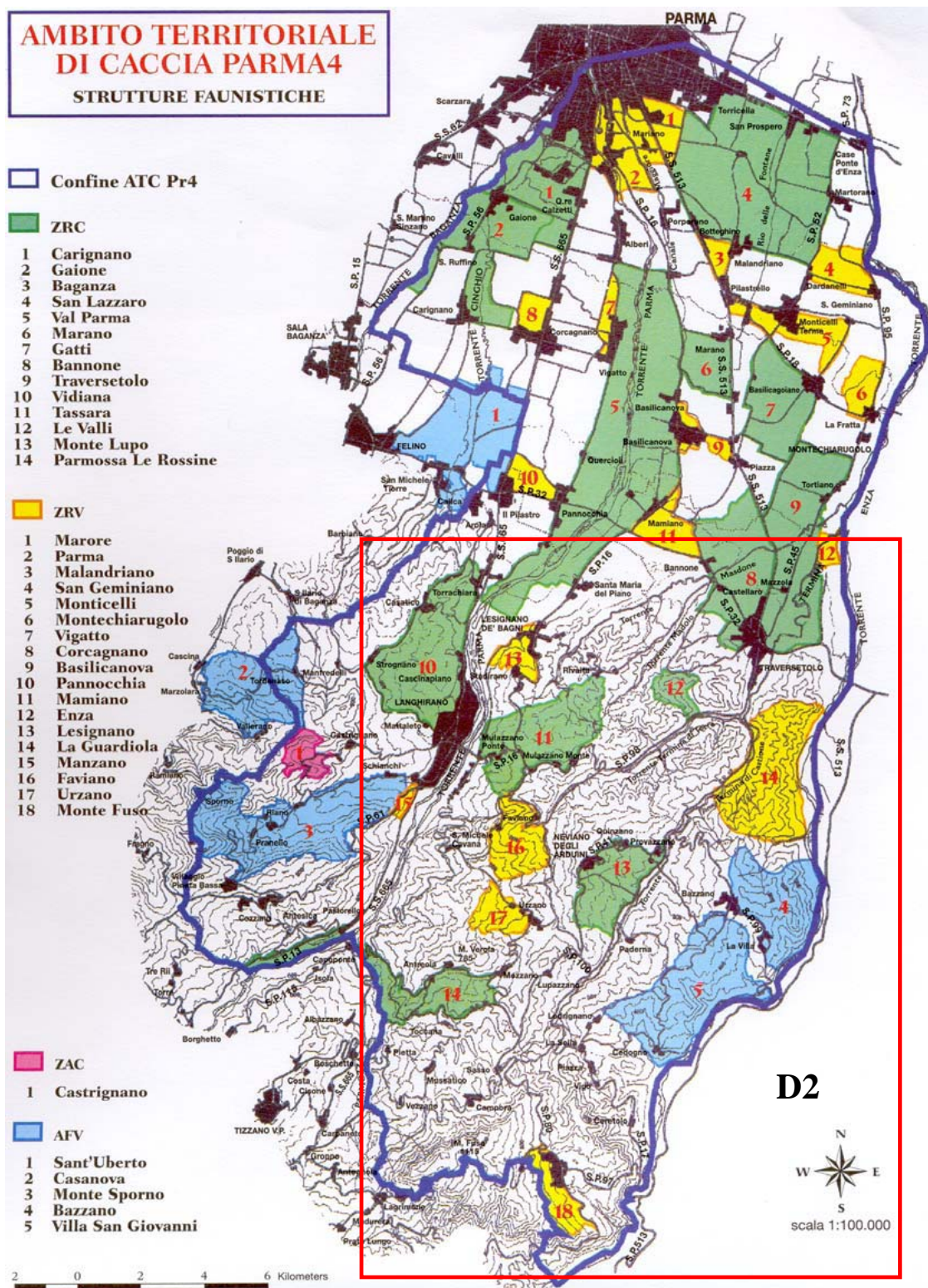


Ripartizione della provincia di Parma in ATC.

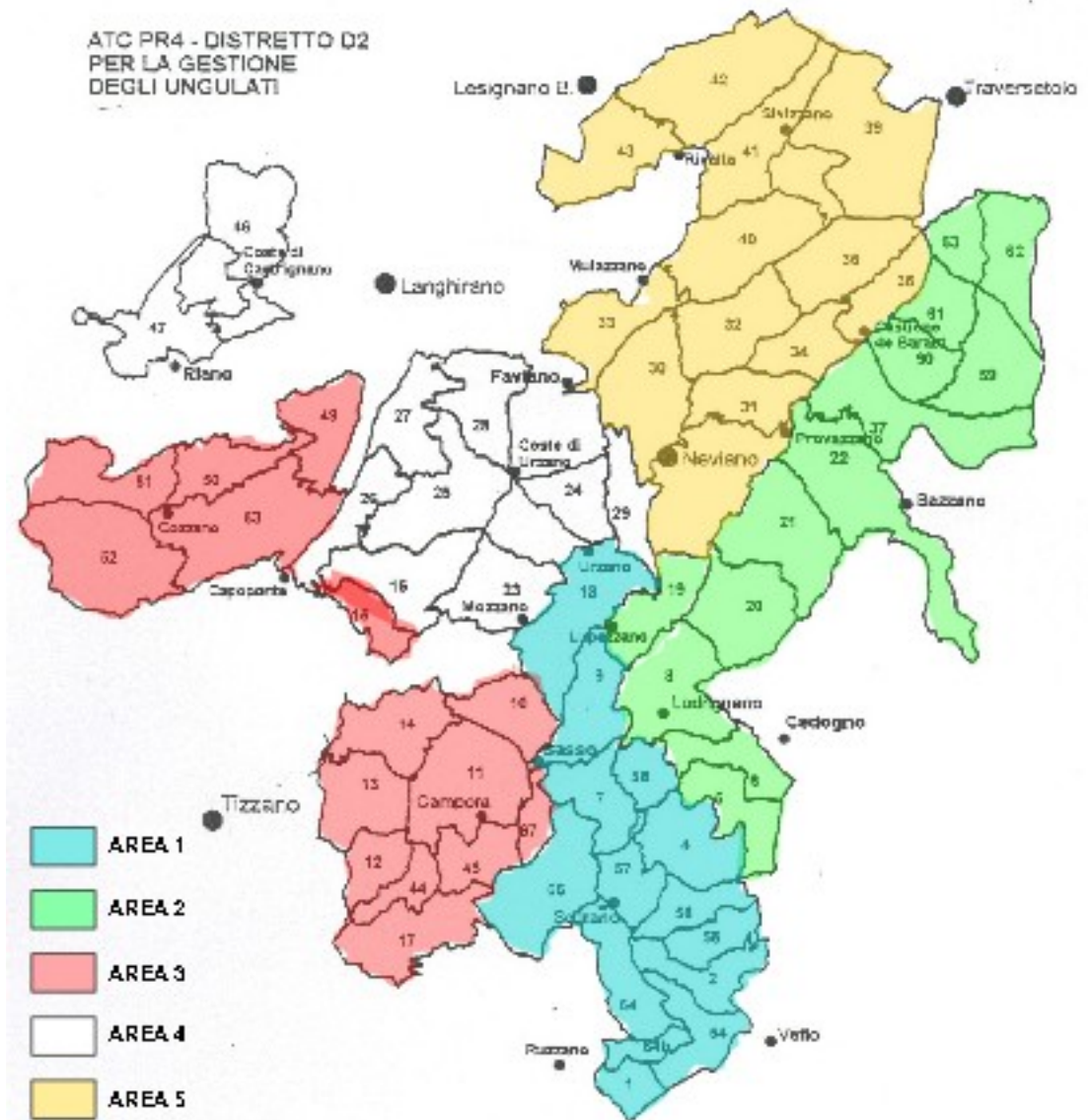
ATC PR 4 - L'Ambito Territoriale di Caccia PR 4 (ATC PR4) è compreso tra i comuni di Parma, Montechiarugolo, Traversetolo, Lesignano de' Bagni, Langhirano e Neviano degli Arduini. All'interno dell'ATC, la gestione del capriolo attraverso interventi di caccia di selezione è attuata nel Distretto 2 (D2), che si estende su una superficie di 14.983 ettari compresi nella fascia collinare. Il Distretto 2 è suddiviso in 5 Aree, a loro volta suddivise in parcelle (64 in totale). Il piano di prelievo viene proposto annualmente dall'ATC in base ai risultati ottenuti dalle stime di consistenza della popolazione. La metodologia adottata per ottenere i valori di densità della popolazione è quella del censimento attraverso punti fissi di osservazione (altane o appostamenti a terra) distribuiti uniformemente sul territorio. Il censimento viene effettuato nel periodo tra fine marzo e inizio aprile, nelle prime ore seguenti l'alba e in quelle precedenti il tramonto. Diversi operatori, durante le uscite effettuate in

contemporanea, registrano il numero di individui osservati, la zona di avvistamento, l'area di osservazione, il sesso e l'età, nonché l'ora di avvistamento e la direzione di movimento, utili per evitare doppi conteggi. I dati ottenuti sono elaborati considerando la percentuale di superficie aperta che viene coperta dal censimento rispetto alla superficie aperta totale. Una volta stimata la consistenza della popolazione, viene proposto un piano di prelievo che prevede l'abbattimento di una quota di individui pari al 13-14% del totale stimato. I capi prelevabili vengono ripartiti tra le diverse aree in accordo con le relative densità registrate, concentrandosi nelle aree a densità più alta. I periodi di prelievo, stabiliti sulla base del calendario venatorio regionale, sono due estivi, dal 15 Giugno al 15 Luglio e dal 15 Agosto al 15 Settembre, in cui è ammesso il prelievo di soli maschi della classe di età 1 (subadulti, da 1 a 2 anni), 2 (adulti, da 2 a 7 anni) e 3 (vecchi, oltre i 7 anni), e un periodo invernale, dal 1 Gennaio al 10 Marzo, in cui è ammesso il prelievo dei maschi di classe 0 (nati l'anno precedente) e delle femmine di tutte le classi di età.

Nell'anno 2004 è stata stimata una consistenza di 3808 capi (25,4 capi/100 Ha) ed il prelievo venatorio è stato di 400 capi, pari al 10,5% della popolazione stimata. Nell'anno 2005 è stata stimata una consistenza di 3830 capi (25,6 capi/100 Ha) ed il prelievo venatorio è stato di 460 capi, pari al 12% della popolazione stimata. Nell'anno 2006 è stata stimata una consistenza di 3888 capi (26 capi/100 Ha) ed il prelievo venatorio è stato di 505 capi, pari al 13% della popolazione stimata. Nell'anno 2007 è stata stimata una consistenza di 3938 capi (26,3 capi/100 Ha) ed il prelievo venatorio è stato di 551 capi, pari al 14% della popolazione stimata.



ATC PR 4 – Con il contorno rosso si evidenzia la localizzazione del Distretto 2 (D2), destinato alla gestione del capriolo.



Suddivisione del Distretto 2 in aree e parcelle.

La scheda biometrica - In dettaglio, vi si trovano i dati relativi al cacciatore, alla data, all'ora ed al luogo di abbattimento, comprese le condizioni atmosferiche e la presenza di eventuali altri animali. Vengono poi richieste informazioni balistiche sul tiro, abbinate ai dati relativi al calibro e al peso delle palle utilizzate. La restante parte è tutta dedicata all'animale: sesso, classe di età, peso pieno, peso eviscerato, lunghezza naso-coccigea, altezza al garrese, circonferenza toracica e della base del collo, lunghezza dell'orecchio, dell'arto anteriore, di quello posteriore, della mandibola. Per i maschi, poi, vengono raccolti i dati relativi al trofeo: lunghezza delle stanghe, forma del palco e circonferenza delle rose.

La scheda biometrica permette in primo luogo di controllare la corrispondenza fra il capo assegnato al selecontrollore e l'animale abbattuto, per poi poter redigere una relazione finale sull'adempimento più o meno corretto del piano d'abbattimento. Inoltre ha grande valore per la valutazione dell'evoluzione delle condizioni della popolazione del distretto con il passare degli anni. Infine, come nel nostro caso, le informazioni contenute nella scheda biometrica sono utili per scopi scientifici e conoscitivi sulla specie.

Fascia metallica :.....		Targa n.ro:.....	
Data:.....	Sex:.....	Classe:.....	
Selecacciatore:.....		Numero ID:.....	
Distretto:.....		Zona:.....	
Ora uscita:.....		Ora rientro:.....	
Forma del trofeo:.....			
Lunghezza stanga sx:cm.....		Lunghezza stanga dx:cm.....	
N.ro punte stanga sx:.....		N.ro punte stanga dx:.....	
Circonferenza rose sx:.....		Circonferenza rose dx:.....	
(Disegno del trofeo o foto)			
Ambiente (scenzi, dove il capriolo è stato abbattuto):			
<input type="checkbox"/> Prato abbandonato <input type="checkbox"/> Prato soggetto a sfalcio <input type="checkbox"/> Campo coltivato <input type="checkbox"/> Bosco <input type="checkbox"/> Tagliata <input type="checkbox"/> Altro: _____			
Situazione			
<input type="checkbox"/> Sereno <input type="checkbox"/> Coperto <input type="checkbox"/> Pioggia <input type="checkbox"/> Forte vento <input type="checkbox"/> Nebbia <input type="checkbox"/> Altro _____			
SPARO Distanza di tiro m.: _____ Carabina munita di cannocchiale <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no			
<input type="checkbox"/> Capo isolato <input type="checkbox"/> Gruppo costituito da n. _____ formato da: _____ <input type="checkbox"/> Caduto sul posto <input type="checkbox"/> Si è allontanato ed è stato ritrovato dopo m.: _____ <input type="checkbox"/> Si è allontanato ferito <input type="checkbox"/> E' stato richiesto l'intervento del cane da traccia <input type="checkbox"/> E' stato ritrovato col cane da traccia <input type="checkbox"/> vivo <input type="checkbox"/> morto dopo m.: _____ <input type="checkbox"/> non è stato ritrovato			

Peso pieno Kg.	(p.p.):	
Peso eviscerato Kg.	(p.e.):	
Lunghezza totale cm.	(L.T.):	
Altezza al garrese cm.	(L.G.):	
Circonferenza toracica cm.	(C.T.):	
Lunghezza orecchio cm.	(L.O.):	
Lunghezza arto anteriore cm.	(L.A.A.):	
Lunghezza arto posteriore cm.	(L.A.P.):	
Circonferenza base del collo cm.	(C.C.):	
Lunghezza mandibola cm.	(L.M.):	
(Il peso eviscerato si prende la sola carcassa priva di tutti gli organi)		
Rilevazioni di carattere sanitario: _____		
Rilevazioni eventuali (descrivere qualsiasi nota che possa essere interessante): _____		
Firma Selecontrollore _____ Firma per controllo _____		
Firma accompagnatore _____		

3. STRUTTURA GENETICA E DISTRIBUZIONE DELLE POPOLAZIONI

La struttura genetica delle popolazioni

La genetica di popolazione ha lo scopo di descrivere la struttura della variabilità genetica, e di determinare le forze evolutive che l'hanno formata. Questo approccio è fondamentale per una corretta comprensione dell'evoluzione, definibile come l'insieme dei cambiamenti progressivi che subiscono le frequenze alleliche nelle popolazioni. Gli studi di genetica di popolazione hanno due principali finalità: misurare la quantità di variazione genetica esistente nelle popolazioni e spiegare come questa viene originata e mantenuta, nonché quale sia la sua importanza dal punto di vista ecologico ed evolutivo. Il dato di base di questi studi è fornito dalle frequenze alleliche di geni polimorfici.

In organismi diploidi, ogni individuo ha due copie di ogni gene o locus, e può quindi presentare tre differenti combinazioni alleliche, o genotipi. Gli individui che portano due copie dello stesso allele sono detti omozigoti, sono invece detti eterozigoti gli individui che presentano due alleli diversi. Dalle frequenze genotipiche di una popolazione, è possibile ottenere le frequenze alleliche, che costituiscono la più semplice misura della variabilità presente. Una misura più utile è data dalla frequenza totale degli eterozigoti nella popolazione, o eterozigosità (h), per ogni locus. È possibile ottenere l'eterozigosità media tra tutti i loci, (H). Se il calcolo è ottenuto dalle frequenze genotipiche osservate si ottiene l'eterozigosità media osservata, (H_{obs}), mentre se si utilizzano le frequenze alleliche per stimare l'eterozigosità che ci si attende di trovare in una popolazione panmittica (secondo il teorema di Hardy-Weinberg), questa viene definita eterozigosità attesa, (H_{exp}). La deviazione di H_{obs} da H_{exp} indica che le assunzioni alla base della stima non sono rispettate, suggerendo la possibilità di strutture interne alla popolazione, di migrazioni o di effetti dovuti alla pressione selettiva. La struttura della variabilità genetica delle popolazioni viene infatti determinata da diversi fattori, quali le suddivisioni entro e tra popolazioni, l'inbreeding e il flusso genico. Per valutare questi fattori, è importante stabilire il grado di deviazione dell'eterozigosità osservata da quella attesa, e questo viene solitamente effettuato utilizzando la statistica F (Wright, 1951).

Assumendo di avere tre livelli di strutturazione della popolazione, individui I, sottopopolazioni S e popolazione totale T, si possono considerare le eterozigotità a ciascuno di questi livelli: HI è l'eterozigotità osservata in un individuo della sottopopolazione, HS è l'eterozigotità attesa per individui della stessa sottopopolazione nell'ipotesi di incrocio casuale, HT è l'eterozigotità attesa negli individui assumendo che la popolazione totale sia panmittica, cioè che tutti gli individui di tutte le sottopopolazioni possano incrociarsi con uguale probabilità. Combinando queste misure si possono ottenere i gradi di strutturazione della popolazione, grazie a diversi indici.

L'indice di fissazione, FST, esprime il grado di strutturazione tra sottopopolazioni, può indicare la perdita di eterozigotità dovuto a deriva genetica o l'aumento dovuto a flusso genico tra sottopopolazioni. Questo indice può essere stimato in diversi modi, il più semplice dei quali è $FST = (HT - HS \text{ medio}) / HT$.

Altri indici sono il coefficiente di inbreeding $FIS = (HS \text{ medio} - HI) / HS \text{ medio}$, che esprime il livello di inbreeding entro sottopopolazione, e $FIT = (HT - HI) / HT$, che esprime gli effetti combinati dell'inbreeding e della suddivisione della popolazione.

Marcatori molecolari

La variabilità genetica è determinata da ogni variazione dei nucleotidi nel genoma degli organismi.

Lo studio della variabilità genetica è facilitato dall'utilizzo di marcatori, che rappresentano caratteristiche ereditabili e polimorfiche a livello di specie, di popolazioni e di individui. Un marcatore molecolare è un qualsiasi locus le cui varianti alleliche possono essere identificate facilmente analizzando direttamente il DNA. Un buon marcatore molecolare deve essere polimorfico, codominante, facilmente individuabile, ripetibile, neutrale rispetto alla selezione e deve possedere un meccanismo di trasmissione semplice (mendeliano o uniparentale). I marcatori morfologici, che considerano le caratteristiche fenotipiche, e numerosi marcatori molecolari (allozimi) sono influenzati enormemente dall'ambiente, mentre gruppi

sanguigni e polimorfismi del DNA determinati da mutazioni non adattative sono in genere marcatori neutri.

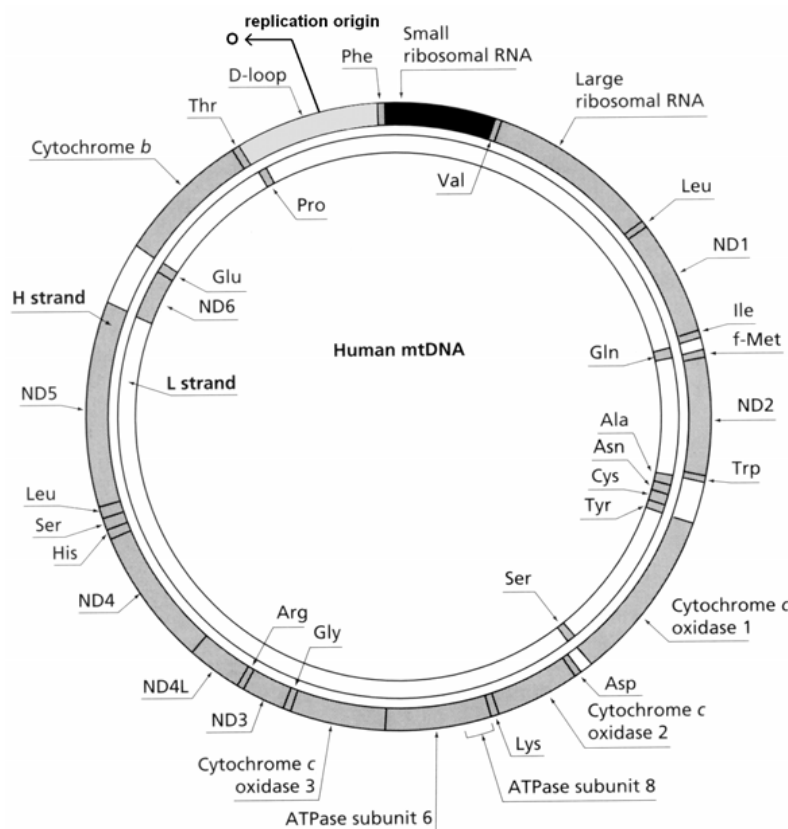
Gli allozimi (Harris, 1966) sono le varianti alleliche degli enzimi codificati da geni strutturali che differiscono in base al numero di sostituzioni aminoacidiche. La mutazione di un aminoacido porta alla variazione della carica della proteina e tale differenza può essere visualizzata tramite corsa su gel elettroforetico e conseguente colorazione. Gli allozimi sono il primo esempio di marcatore molecolare e sono stati ampiamente utilizzati in studi di genetica di popolazione e di biodiversità. Essendo marcatori poco abbondanti e poco polimorfici, sono stati sostituiti quasi completamente da marcatori basati sul DNA, che hanno come caratteristiche quelle di elevata variabilità (alto numero di loci polimorfici o di alleli per locus) e facile identificazione.

Le variazioni della sequenza genomica, che possono essere dovute a cambiamenti di singole basi, numero di ripetizioni di corte sequenze di- o tri-nucleotidiche, inserzioni, delezioni o duplicazioni, sono identificate come polimorfismi e determinano l'esistenza di diversi alleli. Le tecniche di biologia molecolare attualmente più utilizzate per l'individuazione dei differenti alleli si basano sull'utilizzo, separato o combinato, di endonucleasi di restrizione, della tecnica PCR (Mullis e Faloona, 1987) e del sequenziamento. Sull'uso delle endonucleasi di restrizione si basano i marcatori RFLP (Botstein et al., 1980), mentre i principali marcatori che si basano sulla tecnologia PCR sono i Microsatelliti, o STR (Short Tandem Repeat, Weber & May, 1989), i RAPD (Random Amplification Polymorphic DNA, Williams et al., 1990), gli AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, Vos et al., 1995) e gli SNP (Single Nucleotide Polymorphism, Landegren et al., 1998).

Marcatori mitocondriali per indagini biogeografiche

Il DNA mitocondriale - Il genoma mitocondriale, presente in tutti i metazoi, è costituito da una molecola di DNA circolare lunga in media 15-20 kp (5µm di lunghezza), localizzata vicino alle creste mitocondriali. La molecola di mtDNA è composta di 37 geni, 13 dei quali codificano per proteine coinvolte nei meccanismi respiratori della cellula, 22 codificano per tRNA, 2 codificano per RNA ribosomali. È

presente un'importante regione non codificante chiamata Regione di Controllo o Displacement-Loop (D-Loop), che comprende motivi di sequenza necessari per la replicazione, la sequenza promotore della RNA-polimerasi ed alcune sequenze con probabile funzione regolativa. Il genoma mitocondriale ha una struttura compatta, senza regioni introniche e regioni spaziatrici fra i diversi geni.



Schema dell'organizzazione della molecola di DNA mitocondriale nei mammiferi.

Alcune caratteristiche del mtDNA lo rendono particolarmente adatto per diversi tipi di indagine genetica. La molecola è di modeste dimensioni ed è presente con un elevato numero di copie in ogni cellula. Il genoma mitocondriale non si trasmette secondo un modello ereditario mendeliano, ma attraverso il meccanismo dell'eredità materna (solo la madre trasmette il proprio mtDNA alla prole, senza eventi di ricombinazione).

Sono presenti regioni di DNA altamente conservate, adatte quindi per progettare oligonucleotidi da impiegare come primers universali in reazioni di polimerizzazione a catena del DNA, o PCR (Kocher et al. 1989), mentre altre regioni mostrano un elevato tasso di mutazione.

Il tasso di mutazione generale è comunque più elevato rispetto a quello del genoma nucleare e la maggior parte delle sostituzioni che si riscontrano tra i DNA mitocondriali sono mutazioni puntiformi, con una forte preponderanza di transizioni (sostituzioni purina → purina o pirimidina → pirimidina) rispetto a transversioni (sostituzioni purina → pirimidina o viceversa). Quest'alto tasso di mutazione è dovuto ad un'elevata frequenza di errori durante la replicazione, causati sia dall'inefficienza dei meccanismi di riparo del DNA, sia dall'ambiente del citoplasma mitocondriale, fortemente ossidante per la presenza di radicali liberi e superossidi.

Inoltre, la pressione selettiva non è così efficace nei mitocondri come nel genoma nucleare: cambiamenti nelle proteine, nei tRNA e nei rRNA codificati dalle sequenze del mtDNA, potrebbero influire meno negativamente sulla fitness dell'individuo.

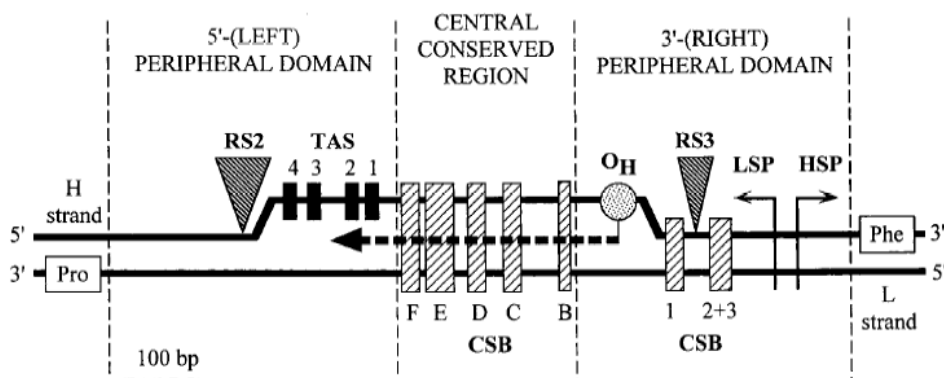
Poiché le mutazioni sono accumulate a un ritmo che può essere considerato costante, il numero di mutazioni che differenziano il DNA mitocondriale di un individuo da quello dei suoi antenati può essere utilizzato come un orologio molecolare per calcolare il tempo che li separa, fornendo uno strumento utile ma molto delicato per la ricostruzione della filogenesi degli organismi. Negli studi di popolazioni, le analisi con i marcatori mitocondriali forniscono informazioni relative alla sola linea femminile.

La Regione di Controllo - La regione di controllo (Displacement loop o D-loop) è la principale regione non codificante del DNA mitocondriale dei metazoi, che nei mammiferi si trova tra i geni tRNAPro (al 3' dell'L-strand o filamento leggero) e tRNAPhe (al 3' dell'H-strand o filamento pesante). La D-loop presenta una regione centrale conservata fiancheggiata da due domini periferici altamente divergenti. I promotori per la trascrizione dell'H-strand e del L-strand (HSP e LSP) si trovano nel dominio di destra (verso l'estremità 3' dell'H-strand), così come l'origine di replicazione dell'H-strand (OH). La maggior parte delle sintesi dell'H-strand figlio terminano a livello delle sequenze di terminazione che si trovano nel dominio periferico di sinistra, verso l'estremità 5' (TAS 1,2 e 3).

La regione centrale conservata evolve lentamente, soprattutto attraverso mutazioni puntiformi e un basso tasso di accumulo di brevi inserzioni/delezioni. Al contrario, le regioni periferiche accumulano velocemente mutazioni puntiformi, inserzioni/delezioni, e regioni ripetute in tandem (Variable Numbers of Tandem

Repeats, VNTR), grazie alle quali possono essere prodotte notevoli differenze di lunghezza tra specie diverse, ed eteroplasmia individuale.

A causa dell'alto tasso di sostituzione nucleotidica nelle regioni periferiche, la regione di controllo è ampiamente usata in studi relativi alla genetica di popolazioni e all'evoluzione dei mammiferi.



Struttura della Regione di Controllo mitocondriale (da Douzery et al., 1997)

Marcatori nucleari per indagini sulla struttura di popolazione

RAPD - I marcatori RAPD sono identificati tramite PCR utilizzando primers a sequenza casuale della lunghezza di circa 10-12 bp (con contenuto in GC \geq 50%). La miscela di frammenti ottenuta dall'amplificazione è sottoposta ad elettroforesi su gel d'agarosio e visualizzata con l'agente intercalante bromuro d'etidio.

Il numero dei prodotti di amplificazione generati dalla PCR con primer arbitrari dipende dalla presenza di siti di legame tra DNA genomico e primer e/o dalla loro relativa affinità, mentre l'assenza di un particolare frammento può derivare da delezioni, inserzioni o mutazioni di basi nel DNA stampo a livello dei siti di legame del primer o nel segmento da loro delimitato. Il vantaggio del metodo RAPD è che permette di analizzare numerosi loci in un unico esperimento e non richiede informazioni sulla sequenza del genoma che viene sottoposto ad analisi. I marcatori RAPD possono essere utili per lo studio di specie e popolazioni di cui non si hanno informazioni a livello genomico e hanno potere discriminante a livello di popolazione, di razza e di individuo. Al contrario di altre tipologie di marcatori (come i microsatelliti), i RAPD sono considerati marcatori dominanti e bi-allelici (l'allele nullo

viene considerato vera forma allelica alternativa e, in equilibrio di Hardy-Weinberg, viene utilizzato per la determinazione delle frequenze alleliche).

Microsatelliti - I microsatelliti o STR (Short Tandem Repeats), che costituiscono la classe di marcatori oggi più utilizzata per studi di biodiversità, sono corte sequenze di o tri-nucleotidiche ripetute in tandem e disperse nel genoma, solitamente in regioni non codificanti.

La presenza nel genoma di queste corte sequenze ripetute genera la possibilità di eventi di crossingover ineguale e di “slittamento” dell’elica del DNA durante la fase di replicazione. Questo porta ad una variazione (aumento o diminuzione) del numero di ripetizioni di sequenze contigue, con formazione di alleli che differiscono tra loro in lunghezza. L’identificazione di queste forme alleliche si basa sull’utilizzo della PCR: è possibile infatti disegnare primer complementari alle sequenze delle regioni conservate fiancheggianti i microsatelliti. I frammenti amplificati possono variare in lunghezza e ciò dipende dal numero di ripetizioni della sequenza base del microsatellite, ogni variazione rappresenta un allele. I marcatori STR sono estremamente variabili, multiallelici, codominanti e utili per lo studio della variabilità tra individui.

Altri tipi di marcatori molecolari - Una delle prime classi di marcatori molecolari ad essere utilizzata nell’analisi del genoma è stata quella dei marcatori RFLP (Botstein et al., 1980). I polimorfismi sono identificati mediante restrizione del DNA con endonucleasi che agiscono riconoscendo e tagliando una specifica sequenza nucleotidica e producendo una serie di frammenti diversi tra loro in lunghezza. Mutazioni puntiformi (che alterano la sequenza del DNA) o fenomeni di inserzione/delezione creano o distruggono il sito riconosciuto dall’enzima, dando origine ad un diverso profilo di restrizione del genoma e ad alleli di lunghezza differente. La tecnica RFLP consente di distinguere i diversi alleli del marcatore molecolare, di seguirne la segregazione in una popolazione scelta e di distinguere gli individui omozigoti dagli individui eterozigoti.

La tecnica dei marcatori AFLP deriva dagli RFLP poiché prevede una fase di restrizione enzimatica del DNA, ma è più complessa e selettiva in quanto prevede una ligazione di adattatori alle estremità dei frammenti prodotti e due successive reazioni PCR con primer specifici (complementari agli adattatori e con nucleotidi selettivi a una

estremità). Questa tecnologia genera una miscela di frammenti che vengono separati ed identificati tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide. I polimorfismi osservati derivano principalmente da mutazioni puntiformi nei siti riconosciuti dagli enzimi o dalle basi selettive dei primer (polimorfismo di sequenza), raramente da inserzioni/delezioni di sequenze (polimorfismo di lunghezza). I marcatori AFLP hanno gli stessi vantaggi e le stesse limitazioni dei marcatori RAPD, essendo anch'essi considerati dominanti e biallelici.

I marcatori SNP (Single Nucleotide Polymorphism) identificano principalmente mutazioni puntiformi, ma anche corte inserzioni e delezioni nella sequenza del DNA. Le mutazioni possono essere scoperte tramite sequenziamento, o con tecniche come la SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) che permette di visualizzare su gel le variazioni di singola base, o con strumenti come il DHPLC che sfrutta la denaturazione e rinaturazione del DNA e il Maldi-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight).

Gli SNP sono molto frequenti e distribuiti casualmente nel genoma. La maggior parte degli SNP risiede nelle regioni non codificanti in cui la probabilità di trovare una mutazione puntiforme è 4 volte maggiore rispetto a quella di trovarla in regioni codificanti. Gli SNP sono considerati marcatori biallelici e codominanti.

I marcatori sul cromosoma Y vengono utilizzati per identificare la struttura geografica e l'evoluzione della popolazione maschile. Il cromosoma Y è specifico degli individui maschi, è costitutivamente aploide e non subisce ricombinazione (a causa dell'incapacità di eliminare gli alleli mutati tramite ricombinazione è caratterizzato da un alto tasso di mutazione), tranne che nella porzione terminale pseudoautosomale. La regione non ricombinante ha subito una espansione nel tempo fino a costituire nell'uomo circa il 90% dell'intero cromosoma Y che possiede dunque pochi geni (sono principalmente quelli che determinano il sesso) e una lunga porzione eterocromatica costituita per lo più da DNA satellite. Come i marcatori mitocondriali, sono identificati principalmente con l'utilizzo di SNP, ma anche di microsatelliti. Le mutazioni identificate come SNP sono in genere combinate in aplotipi (combinazione di alleli a due o più loci strettamente associati su un cromosoma e generalmente ereditati come

unità) e spesso in aplogruppi. Sono quindi utili per studi evolutivi, di filogeografia e di genealogia.

Origini e struttura genetica delle popolazioni italiane ed europee ottenute da studi dei polimorfismi mitocondriali

La struttura genetica delle popolazioni di capriolo in Europa, ottenuta dall'analisi delle sequenze della regione di controllo mitocondriale (Randi et al., 2004; Vernesi et al., 2002), appare complessa e influenzata sia da antiche suddivisioni genetiche occorse durante gli eventi di glaciazione, sia da più recenti dinamiche di dispersione, colonizzazione ed intervento antropico.

La diversità del genoma mitocondriale risulta alta, con in media un diverso aplotipo ogni 4,5 individui, soprattutto nelle popolazioni orientali (Serbia, Montenegro e Kosovo), che presentano anche una maggior diversità tra aplotipi.

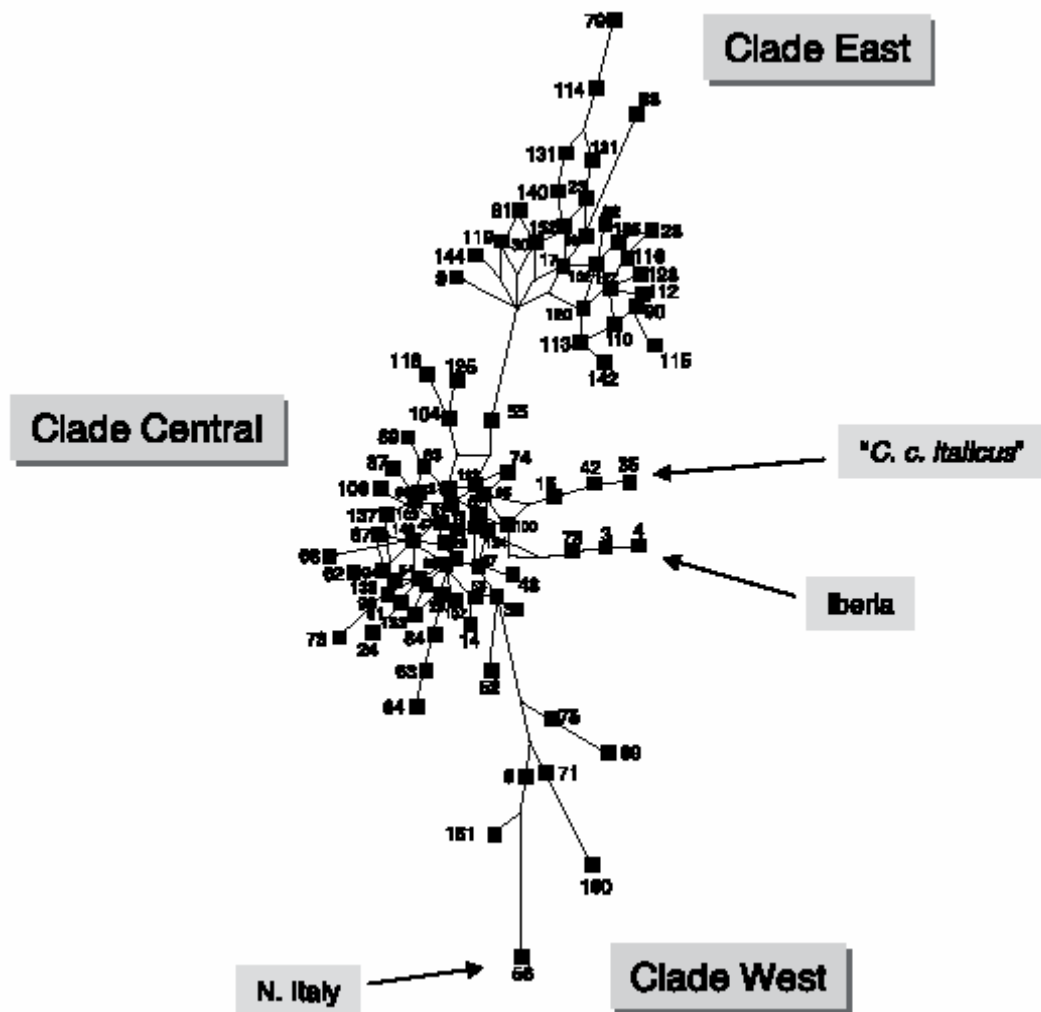
Tutti gli aplotipi europei si suddividono in tre principali cluster o cladi (fig. 2): uno orientale, rappresentato dalle popolazioni provenienti dalla Serbia, dal Montenegro, dal Kosovo e dalla Grecia, e presente anche in campioni provenienti dalle Alpi e dall'Appennino settentrionale; uno occidentale, presente in Spagna e Portogallo, e ritrovato anche nelle Alpi centrali; e infine un cluster centrale, più vicino a quello occidentale, che include aplotipi ampiamente distribuiti in tutta l'Europa e in Italia.

Un sottogruppo appartenente al cluster centrale raggruppa tutti gli aplotipi provenienti dalle popolazioni di *Capreolus capreolus italicus* (Castelporziano, Gargano, Orsomarso), ma anche aplotipi provenienti da Toscana e Emilia Romagna.

La presenza di questi tre cladi suggerisce la colonizzazione dell'Europa, in epoca postglaciale, a partire da diversi rifugi glaciali: uno presente in Spagna, da cui si è avuta una grande dispersione in Europa (clade centrale e occidentale), e uno nei Balcani (clade orientale, che ha dato un contributo minore all'attuale diversità genetica in Europa).

La differenziazione genetica tra questi due gruppi è fatta risalire all'ultimo periodo interglaciale (130.000 anni fa). Si può ipotizzare la presenza di un terzo rifugio in sud Italia durante l'ultima glaciazione (20.000 anni fa), nel quale si sia diversificata la popolazione di *C. capreolus italicus*.

In Italia la struttura delle popolazioni è stata recentemente influenzata da interventi antropici quali il disboscamento, la frammentazione dell'habitat, l'introduzione di animali di provenienza diversa per compensare la forte pressione venatoria. La deriva genetica dovuta a frammentazione, isolamento e "colli di bottiglia" ha fortemente influenzato gli attuali pattern di distanza genetica tra caprioli delle popolazioni appenniniche, portando a una rapida differenziazione tra popolazioni anche vicine tra loro.



Network costituito dagli aplotipi di D-loop mitocondriale, che risultano suddivisi in tre cladi (da Randi et al., 2004).

L'obiettivo del lavoro è quello di descrivere le caratteristiche principali della popolazione di capriolo della provincia di Parma e, più in particolare, di quella presente all'interno dell'ATC PR 4. A tale scopo sono stati condotti quattro filoni di indagine:

A. Schede biometriche – l'indagine è stata condotta su 1495 schede biometriche raccolte dal 2004 al 2007 nell'ATC PR 4. L'obiettivo della ricerca è stato quello di descrivere caratteristiche biologiche dei soggetti (modalità di accrescimento, differenze morfologiche tra maschi e femmine, effetto del periodo degli accoppiamento sul peso vivo dei soggetti maschi, differenze fra aree di caccia diverse) e variazioni di tali caratteristiche nel corso dei diversi anni. I risultati ottenuti sono stati discussi in rapporto a fattori ambientali (clima, alimentazione, etc.), biologici (momento fisiologico del campionamento) e patologici, nonché alle modalità del prelievo venatorio.

B. Craniometria – le misure morfologiche del cranio di 138 soggetti maschi abbattuti nell'anno 2006 sono state analizzate al fine di evidenziare le variazioni delle caratteristiche craniometriche in rapporto alle classi di età dei soggetti.

C. Genetica – su 73 caprioli sono state condotte indagini biomolecolari al fine di descrivere le caratteristiche genetiche dei caprioli presenti sull'Appennino parmense (ATC PR4) attraverso l'analisi del DNA mitocondriale (regione D-loop) e del DNA nucleare.

D. Genetica e morfometria – è stata verificata l'esistenza di caratteristiche biometriche in grado di discriminare anche sul piano morfologico animali appartenenti ai due diversi gruppi di capriolo individuati su base genetica.

MATERIALE RACCOLTO

Il materiale raccolto nel corso delle indagini può essere suddiviso in tre diverse categorie in funzione della sua natura:

I- misure biometriche;

II- materiale biologico (fegato, muscolo, pelo) per le indagini biomolecolari;

III- siero.



Per la raccolta del materiale relativo ai caprioli dell'**A.T.C. PR 4** sono stati utilizzati i capi abbattuti durante i piani di prelievo selettivo nelle annate 2004-2005, 2005-2006, 2006-2007 e 2007-2008, sfruttando il momento in cui gli animali vengono conferiti al Centro di Raccolta (località Le Mole di Neviano

degli Arduini) per l'eviscerazione ed i controlli routinari.

Misure biometriche

In questa occasione sono state rilevate alcune misure morfometriche. La scheda biometrica utilizzata è quella esposta in precedenza. I rilievi presi in considerazione sono stati: sesso, classe di età, luogo d'abbattimento, peso pieno, lunghezza totale, altezza al garrese, circonferenza toracica, lunghezza dell'orecchio, lunghezza dell'arto anteriore e posteriore e circonferenza alla base del collo. Tutti i rilievi lineari sono stati effettuati con un metro a nastro in tela (tipo "da sarta"). Il peso pieno è stato misurato con dinamometro (sensibilità dello strumento $\pm 0,25$ kg).



Dalle analisi statistiche abbiamo escluso due punti della scheda biometria: il peso eviscerato e lunghezza della mandibola. Il peso eviscerato infatti non viene misurato bensì stimato (vengono tolti dai 3 a 5 kg in rapporto al peso pieno), mentre la lunghezza della mandibola è un rilievo che andrebbe effettuato sul preparato osseo, poiché la presenza dei tessuti molli (muscoli, sottocute, cute con peli) rende estremamente difficile ottenere ripetibilità dalle misurazioni, per la difficoltà di individuare punti di repere.

Per l'anno 2006 sono stati individuati 16 rilievi relativi al cranio al fine di rendere ancora più precisa la caratterizzazione morfologica degli animali. Le misure rilevate sono descritte in tabella B1 e in figura B1, nella parte relativa alla craniometria della sezione "RISULTATI". Tali misure sono state prese con calibro di precisione su crani adeguatamente preparati, in occasione di una manifestazione che si tiene ogni anno al termine della stagione venatoria e nella quale vengono esposti i crani con le relative mandibole (Mostra dei Trofei). E' stato possibile effettuare tali rilievi solo per i capi maschi, poiché per le femmine vengono conferite alla Mostra dei Trofei solo le mandibole per il controllo della classe di età e non il cranio *in toto*.

Materiale biologico

Campioni biologici A.T.C. PR 4 - Sempre al Centro di Raccolta sono stati prelevati circa 500-1000 mg di fegato e/o muscolo, con l'utilizzo di guanti in lattice monouso, pinze e forbici chirurgiche sterilizzate ad ogni passaggio con fiamma viva per evitare cross-contaminazioni.

Il campionamento è stato effettuato esclusivamente su capi giunti al centro di raccolta entro le 4 ore dalla morte, al fine di ottenere materiale biologico idoneo per le indagini successive.

Sui soggetti abbattuti con un colpo in addome è stato effettuato solo il prelievo di muscolo, al fine di evitare il campionamento di materiale contaminato con contenuto prestomacale o intestinale.

I campioni biologici sono stati immediatamente posti in provette in PVC con tappo a vite da 10 mL, contenenti 8 mL di Etanolo RPE 96°, conservati in cella frigorifera a 4-

8°C e trasferiti nel più breve tempo possibile in congelatore a -20°C. Su ogni provetta è stato indicato il numero identificativo del capo abbattuto e la data. Tramite il numero identificativo stesso è stato possibile risalire alla scheda biometrica.

Campioni biologici non A.T.C. PR 4 - Nell'arco dei tre anni di dottorato, ai campioni di fegato e muscolo provenienti dall'A.T.C. PR 4 si è aggiunto altro materiale biologico proveniente da **altre aree e province**.

Infatti, è stato possibile ottenere:

- campioni di pelo e/o muscolo di animali abbattuti in altri ambiti territoriali di caccia di Parma (A.T.C. PR 8 e A.T.C.PR 9);
- campioni di pelo e/o muscolo di animali feriti o in difficoltà ritrovati sull'intero territorio della provincia di Parma;
- campioni di pelo e/o muscolo di animali abbattuti durante il prelievo selettivo nella provincia di Reggio-Emilia (A.T.C. RE 4 "Montagna");
- campioni di pelo e/o muscolo di animali feriti ospitati nei Centro di Recupero per la Fauna Selvatica "Il Pettiroso" (Modena) e C.R.A.S. BO 1 "Rudi Berti" (Sasso Marconi, Bologna);
- campioni di pelo e/o muscolo di animali feriti o in difficoltà ritrovati in provincia di Piacenza;
- campioni di pelo di animali abbattuti nella Provincia Autonoma di Trento;
- campioni di pelo provenienti dalla Toscana (province di Lucca e Pisa).

La scelta di utilizzare il pelo è stata dettata in alcuni casi dall'esigenza di impiegare un sistema di campionamento non invasivo (sui capi feriti) ed in altri casi dalla volontà di rendere il prelievo semplice e rapido, anche per operatori non addestrati ed in condizioni critiche (attività venatoria nella Provincia Autonoma di Trento).

Ogni campione di pelo è stato conservato in carta assorbente e stoccato in congelatore a -20°C.

Siero

Infine, contestualmente all'eviscerazione, è stato effettuato, quando possibile, il prelievo di sangue dalla cavità toracica o dai grandi vasi cervicali (giugulari/carotidi). I

Materiali e metodi

campioni sono stati conservati in provette falcon da 50 mL e refrigerati a 4-8°C. Il sangue è poi stato centrifugato nel più breve tempo possibile a 6000 giri per 4 minuti (centrifuga ALC mod. PK 110). Il siero ottenuto è stato prelevato con pipette pasteur in plastica monouso e stoccato in congelatore a -20°C in provette in PVC con tappo a vite da 10 mL. Anche in questo caso, su ogni provetta è stato indicato il numero identificativo del capo abbattuto e la data.



Servizio Risorse Naturali Fauna Selvatica e Ittica	
SCHEDA DI VALUTAZIONE BIOMETRICA DEL CAPRIOLO Piani di Prelievo Selettivo 2005 - 2006	
ATC / AFV <u>244</u>	Distretto <u>2</u>
Selecciatore <u>Bertucci Domenico</u>	
N° Identificativo <u>945</u>	Data <u>04/04/05</u> Sesso <u>M</u> Classe <u>L</u> età
Località <u>CARDANO</u>	ora uscita <u>11:30</u> ora rientro <u>14:50</u>
Forma del trofeo <u>Falcato - bilocato - Bortone</u>	
lunghezza stanga sx cm. <u>3</u>	lunghezza stanga dx cm. <u>3</u>
punte stanga sx <u>4</u>	punte stanga dx cm. <u>4</u>
volume cc.	peso gr. punti C.I.C.
tipo di ambiente del prelievo <u>MEDICAO</u> note meteorologiche <u>sereno</u> distanza di tiro m. <u>120</u> --- ottica di tiro <u>no</u> --- Capo isolato <u>no</u> in un gruppo di _____ maschi e _____ femmine. Caduto sul posto <u>R</u> ; è stato ferito _____; si è allontanato e ritrovato dopo _____ metri; è stato richiesto l'uso del cane da traccia _____; è stato ritrovato a _____ metri; vivo _____ morto _____ non è mai più stato ritrovato _____	

VALUTAZIONI BIOMETRICHE E SANITARIE	
Peso pieno Kg.	(s.p.) <u>24</u>
Peso sviscerato Kg.	(s.e.) <u>21</u>
Lunghezza totale cm.	(l.t.) <u>118</u>
Altezza al garrese cm.	(a.g.) <u>68</u>
Circonferenza toracica cm.	(c.t.) <u>64</u>
Lunghezza orecchio cm.	(l.o.) <u>15</u>
Lunghezza arto anteriore cm.	(l.a.a.) <u>27</u>
Lunghezza arto posteriore cm.	(l.a.p.) <u>34</u>
Circonferenza base del collo cm.	(c.c.) <u>37</u>
Lunghezza mandibola cm.	(l.m.) _____

Diagramma del trofeo a foto

Note sullo stato fisico dell'animale BVOM

Altre note CAL 65x52 PALLA 93g TM

Firma Selecciatore Bertucci Accompagnatore _____

Materiali raccolti: scheda biometrica, DNA (ependorf), siero (provetta con tappo a vite da 10 mL).

ESTRAZIONE DEL DNA

Il DNA totale è stato estratto principalmente impiegando il kit di estrazione e purificazione Promega “Wizard Genomic DNA Purification”, che prevede la solubilizzazione del tessuto con proteinasi K in presenza di detergenti ionici (SDS), la digestione degli RNA con RNasi, la deproteinizzazione, ottenuta attraverso precipitazione con potassio acetato e la purificazione del DNA con precipitazione alcolica (1 : 0,8 volumi di soluzione acquosa contenente DNA e di alcol isopropilico e centrifugazione in centrifuga tipo Eppendorf per 5-10min a 13000 rpm). Il DNA purificato è stato risospeso in 50 µL di acqua o TE (10 mM TRIS-Cl, 0,1 mM EDTA, pH 8) e conservato in aliquote a -20 °C. Le caratteristiche qualitative e quantitative dei diversi campioni di DNA sono state stimate con elettroforesi su gel di agarosio-EtBr (1% agarosio in TrisAcetatoEDTA) utilizzando un'aliquota del campione (2-5 µL).

ANALISI DEI POLIMORFISMI DELLA D-LOOP

Amplificazione della regione D-loop

L'intera Regione di Controllo mitocondriale è stata ottenuta dai DNA totali estratti attraverso il metodo della reazione a catena della DNA polimerasi o PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Mullis e Faloona, 1987).

Questa tecnica permette l'amplificazione (=sintesi ripetuta) *in vitro* di DNA situato tra due sequenze nucleotidiche, utilizzando una DNA polimerasi stabile alle alte temperature estratta dal batterio *Thermophilus aquaticus* (*Taq* polimerasi). Questo enzima utilizza DNA a singola elica come stampo per la sintesi dell'elica complementare (in direzione 5'-3') partendo da un frammento di DNA a singola catena, complementare all'estremità 3' dello stampo, che funziona come innesco (*primer*) della reazione.

La PCR richiede quindi l'uso di una coppia di *primers* che si appaiano a sequenze fiancheggianti ad entrambi i lati della regione da amplificare.

La tecnica PCR prevede l'uso di un termociclatore (*Thermal cycler*), cioè di uno strumento in grado di realizzare ripetuti cicli termici e, di conseguenza, ripetuti cicli di amplificazione. La reazione consiste di tre fasi principali:

1 - Denaturazione del DNA: in seguito a riscaldamento (94-96°C) si ottiene la rottura dei legami idrogeno e quindi la separazione dei due filamenti di cui è composta la doppia elica del DNA da amplificare (DNA "stampo").

2 - Appaiamento o annealing: in seguito a rapido raffreddamento (36-68°C), le basi azotate dei *primers* formano legami idrogeno in corrispondenza di sequenze nucleotidiche complementari sul DNA stampo.

3 - Estensione o allungamento: alla temperatura di 72°C (*optimum*) la *Taq* polimerasi, partendo dagli inneschi e procedendo in direzione 5'-3', catalizza la sintesi di un nuovo filamento di DNA, complementare a quello stampo, utilizzando i dNTP presenti in soluzione.

Dato che i prodotti di un ciclo di amplificazione servono da stampo per quello successivo, alla fine di ogni serie di reazioni viene duplicato l'ammontare di DNA sintetizzato e quindi con il passare dei cicli il numero di copie aumenta in modo esponenziale. Per l'amplificazione della D-loop sono stati utilizzati i due *primers*:

L-Pro (5'-CGTCAGTCTCACCATCAACCCCAATTTTCAGTG-3'),

H-Phe (5'-GGGAGACTCATCTAGGCATTTTCAGTG-3'), descritti da Douzery e Randi (1997).

I *primers* si legano rispettivamente in posizione 15740 e 420 della sequenza mitocondriale bovina disponibile in banca dati EMBL (accession n. NC006853), amplificando un frammento di circa 1kb. Le reazioni di amplificazione sono state effettuate in un volume di 15 µL, contenente Buffer per PCR 1X, MgCl₂ 1,8 mM, dNTP 150 µM, 5 pmoli di ogni *primer* (0,2 µM), 0.8U *Taq* DNA Polymerase e 0,8 µL di DNA templato (contenenti circa 100 ng di DNA totale). E' stato utilizzato il termociclatore Perkin Elmer GenAmp PCR System 2400, con il seguente protocollo di amplificazione:

- predenaturazione a 94°C per 2';

- 3 cicli:

denaturazione a 94°C per 20'';

annealing a 52°C 30'';

estensione a 72°C 50'';

- 25 cicli:

denaturazione a 94°C 20’’;

annealing a 50°C 25’’;

estensione a 72°C 50’’;

- estensione finale a 72°C per 5’.

Una piccola parte del prodotto di amplificazione (2-5 µL) è stata analizzata con elettroforesi su minigel di agarosio all’1,5% per verificare l’avvenuta amplificazione.

Analisi di restrizione

I prodotti di amplificazione D-Loop sono stati sottoposti ad analisi di restrizione con gli enzimi HincII e HaeIII.

Per ogni reazione sono stati utilizzati 10 µL di campione e circa 3 unità d’enzima; la digestione praticamente completa è stata ottenuta con incubazione in termostato a 37°C per circa 1 ora. Le analisi dei prodotti di restrizione sono state effettuate con elettroforesi su gel di agarosio al 1,5% in tampone TAE. In ciascun pozzetto è stato caricato l’intero volume della reazione.

Sequenziamento

I DNA amplificati sono stati purificati attraverso elettroforesi su gel di agarosio all’1,5% in TAE, in presenza di EtBr. Il tassello di gel contenente la banda corrispondente alla D-loop è stato prelevato con una piccola spatola e il DNA è stato eluito utilizzando il metodo di eluizione e purificazione da banda elettroforetica “QIAquick[®] Gel Extraction Kit” (QIAGEN) oppure con la tecnica del congelamento-scongelo del gel (4 cicli di congelamento in azoto liquido e scongelamento a 50°C in termostato).

Il DNA eluito è stato precipitato con 2,5 volumi di alcol etilico assoluto e sodio acetato 0,3M. I pellet di DNA, ottenuti dalla precipitazione alcolica, sono stati seccati e inviati al servizio di sequenziamento della MWG-Biotech, D.

I risultati del sequenziamento sono stati controllati manualmente sui cromatogrammi di sequenza mediante il programma CHROMAS 1.45 (McCarthy, 1996).

Analisi dei dati di sequenza

Allineamento multiplo - L'allineamento tra due sequenze corrisponde alla sovrapposizione ottimale delle lettere delle sequenze senza cambiarne l'ordine. Dato un punteggio per le sovrapposizioni e un sistema di penalità per le sostituzioni e per i gap inseriti, l'allineamento ottimale è quello che produce il punteggio più alto.

Per sequenze nucleotidiche il punteggio di un allineamento è determinato dalla sommatoria dei punteggi dati dalle posizioni identiche e dalle posizioni che variano (a seconda del sistema di punteggio scelto, trasversioni e transizioni possono essere equiparate, o pesate in modo differente), a cui viene sottratta la sommatoria delle penalità per i gaps. Questa viene suddivisa in penalità per l'apertura di un gap e penalità per l'estensione. La scelta dei valori di penalità influenza fortemente la determinazione dell'allineamento ottimale, ed implica assunzioni sul tipo di evoluzione delle sequenze.

La ricerca combinatoriale dell'allineamento ottimale non è una strategia efficiente a causa degli elevati tempi di calcolo (il numero di combinazioni possibili per 2 sequenze di lunghezza n e m è proporzionale a 2^{nm}). Per questo vengono utilizzati algoritmi di programmazione dinamica che permettono di individuare l'allineamento ottimale con un numero di calcoli proporzionale a $n*m$.

Esistono due tipi di algoritmi di programmazione dinamica per l'allineamento di due sequenze: algoritmi di allineamento globale (Needleman e Wunsch, 1970), che sovrappongono le sequenze per l'intera lunghezza indipendentemente dalla somiglianza, e algoritmi di allineamento locale (Smith e Waterman, 1981), che riportano la sovrapposizione solo per la porzione più somigliante.

L'allineamento multiplo, cioè tra più di due sequenze, presenta due principali complicazioni.

La prima è data dalla necessità, nel calcolare il punteggio totale dell'allineamento, di attribuire un diverso peso alle diverse sequenze, in modo da aumentare il punteggio in confronti tra sequenze più distanti e diminuirlo in confronti tra sequenze vicine. Questo si ottiene con il metodo della somma pesata delle coppie in ogni colonna dell'allineamento, che permette di calcolare il punteggio complessivo attribuendo un peso proporzionalmente più alto alle posizioni non mutate delle sequenze più distanti.

Un altro problema è dato dal tempo richiesto per la ricerca dell'allineamento ottimale con metodi di programmazione dinamica, che richiedono un numero di calcoli proporzionale a

L^N , dove L è la lunghezza e N è il numero delle sequenze. Per questo motivo è possibile utilizzare algoritmi di allineamento ottimale per al massimo tre sequenze. Per un numero superiore è necessario utilizzare metodi di allineamento euristico, che non esplorano tutte le combinazioni possibili e accorciano i tempi di elaborazione, pur non fornendo necessariamente l'allineamento con il miglior punteggio.

Gli allineamenti euristici possono essere Progressivi o Iterativi, Globali o Locali.

I metodi di allineamento progressivo e globale si basano su tre passaggi:

- 1 Allineamento globale di tutte le coppie di sequenze ($N*(N-1)/2$ confronti possibili) per ottenere una matrice di distanza.
- 2 Costruzione di un dendrogramma che rappresenta la distanza tra sequenze (albero guida)
- 3 Allineamento progressivo delle sequenze secondo l'ordine stabilito dall'albero guida, partendo da quelle più vicine, e generando ad ogni passaggio una sequenza consenso a cui allineare la sequenza successiva. Il punteggio finale è calcolato attribuendo pesi diversi a seconda della distanza (somma pesata delle coppie per ogni colonna).

I metodi di allineamento iterativo seguono lo stesso procedimento, ma utilizzano il primo allineamento multiplo ottenuto per stabilire nuovi alberi-guida, nuovi pesi da assegnare alle sequenze, e nuovi allineamenti multipli fino ad un miglioramento del punteggio dell'allineamento.

Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelli disponibili in banca dati, relative a 161 aplotipi mitocondriali, caratterizzati in caprioli provenienti da diverse zone italiane ed europee (GenBank, accession n.s AY625732:AY625892), individuate utilizzando il programma di confronto BLAST (Madden *et al.*, 1996) disponibile presso il sito NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

L'allineamento delle sequenze disponibili è stato ottenuto attraverso un metodo di allineamento multiplo progressivo e globale, implementato dal programma CLUSTAL W (Thomson *et al.*, 1994). In base all'allineamento ottenuto si sono individuati due regioni interne conservate ai margini di una regione variabile, sulle quali con il programma PCGENE (IntelliGenetics, Oxford) sono stati progettati due *primers* interni da utilizzare per l'amplificazione di un frammento sufficientemente corto per essere sottoposto ad analisi SSCP (*Single-Strand Conformational Polymorphism*).

Ricostruzione di alberi filogenetici - Gli alberi filogenetici sono grafici bidimensionali in grado di visualizzare le relazioni evolutive che intercorrono tra diversi organismi, sequenze o geni.

In linea generale tanto più c'è similitudine genetica fra due elementi all'interno dell'albero, tanto maggiore sarà la vicinanza fra di essi. I nodi rappresentano un evento di separazione, o la creazione di due entità distinte a partire da un antenato comune.

I metodi utilizzati per la costruzioni di alberi filogenetici possono basarsi su singoli caratteri (*Maximum Parsimony* e *Maximum Likelihood*) oppure sulle distanze fra le sequenze (*Minimum Evolution*). I sistemi di *Minimum Evolution* comunemente utilizzati sono: *Neighbor-Joining* e *UPGMA*.

- *Maximum Parsimony*: è un sistema che ricerca l'albero che spiega le sequenze osservate con il numero minimo di sostituzioni. L'algoritmo prevede di trovare tutti gli alberi possibili, di valutare il "costo" di un albero in termini di mutazioni e di scegliere infine quello con il costo inferiore.
- *Maximum Likelihood*: è un sistema che valuta la probabilità che i dati di sequenza osservati siano stati prodotti da un determinato percorso evolutivo e filogenetico. L'algoritmo prevede di ipotizzare un modello filogenetico, di ricercare tutti gli alberi che è possibile costruire in funzione di questo modello, di valutare la probabilità che gli allineamenti ottenuti derivino dalle relazioni rappresentate da un dato albero e di scegliere infine l'albero con maggiore verosimiglianza.
- *Neighbor-Joining* (Saitou e Nei, 1987): è un sistema che per costruire un albero filogenetico non considera semplicemente la distanza tra le coppie, ma la mette in rapporto alla distanza media fra tutti gli altri punti. Esso produce alberi in cui la lunghezza dei bracci esprime la distanza genetica fra i taxa. La topologia dell'albero risulta corretta se l'evoluzione delle sequenze non segue il modello dell'orologio molecolare, cioè se non esiste una relazione lineare tra divergenza di sequenza ed il tempo evolutivo.
- *UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Average; Sneath e Sokal, 1973)*: è un sistema che raggruppa le sequenze partendo dalle più simili ed aggiungendo via via un nodo all'albero, procedendo dalle "foglie" verso la

“radice”. Esso produce alberi in cui la lunghezza dei bracci esprime il tempo di separazione tra i taxa. La topologia dell’albero risulta corretta se l’evoluzione delle sequenze segue il modello dell’orologio molecolare, cioè se esiste una relazione lineare tra divergenza di sequenza ed il tempo evolutivo.

Gli alberi filogenetici prodotti risultano senza radice (*unrooted*). Essi possono comunque essere orientati inserendo una sequenza più lontana (*outgroup*) della quale si conosca la relazione con i taxa studiati.

La stima statistica dell’affidabilità della costruzione di un albero viene individuata dal *bootstrap* (Felsenstein, 1985). Il *bootstrap* viene indicato per ogni nodo e corrisponde al numero di volte che il nodo stesso è stato ottenuto considerando un certo numero di campionamenti casuali partendo dal *database* originale.

Con il programma MEGA 3.0 (Fumar, Tamura, Nei, 2004; <http://www.megasoftware.net/>) è stata ottenuta la suddivisione in *cluster* delle sequenze allineate. Sono state utilizzate le procedure di *Neighbor-Joining* e *UPGMA* (*Minimum Evolution*). Le distanze genetiche sono state calcolate secondo il modello di “Kimura 2 parametri”. Gli alberi sono stati orientati utilizzando come *outgroup* la sequenza omologa di capriolo siberiano (*Capreolus pygargus*). L’affidabilità della costruzione è stata stimata attraverso il ricampionamento casuale del *database* originale.

Analisi SSCP su una porzione della D-loop per la determinazione di aplotipi diversi

L’analisi del polimorfismo di conformazione del singolo filamento, o SSCP (*Single-Strand Conformational Polymorphism*, Orita *et al.*, 1989) è una tecnica che permette di individuare polimorfismi di sequenza, anche relativi a mutazioni di singoli nucleotidi, in base alla mobilità elettroforetica di frammenti di DNA a singolo filamento, ottenuti attraverso PCR asimmetrica. Durante le corse elettroforetiche, le molecole di DNA a doppio filamento assumono una conformazione abbastanza uniforme, pertanto si può assumere che la mobilità sia determinata dalla lunghezza della molecola. Il DNA a singolo filamento, invece, tende a ripiegarsi in una serie di strutture a *stem-loop*, o in strutture più complesse, per rimuovere dall’ambiente acquoso esterno le basi idrofobiche. Il modo in cui la molecola si ripiega è influenzato dalla sua sequenza. Anche il cambiamento di una

singola base può influenzare significativamente la conformazione generale e quindi la mobilità elettroforetica.

Dai dati di sequenza disponibili si sono progettati *primers* interni alla D-loop, che consentono l'amplificazione di un frammento di lunghezza corrispondente a 255 bp; in quest'ultima regione è contenuta una significativa porzione della variabilità osservata con il sequenziamento (1 delezione e 3 transizioni sulle 4 totali rilevate dall'allineamento). Tale sequenza è stata ottenuta attraverso la riamplicazione di una regione della D-Loop, lunga circa 550 bp, generata con la coppia di *primers* L-Pro e HDL16 (5'-TTCACGCGGCATGGTGATTAAGCTC -3') e purificata sia con estrazione da gel che con precipitazione alcolica differenziale realizzata con ammonio acetato.

Il frammento purificato è stato quindi riamplicato con amplificazione asimmetrica, utilizzando il *primer forward* Cp1F (5'-ACACAAGCATGTAGCAACGTATG-3'); le reazioni da 10µL ciascuna, contenevano, oltre al consueto mix di reazione con *Taq* Polimerasi, circa 10 ng di DNA templatato, 10 pmoli di *primer* Cp1F, 0,5 pmoli del *primer reverse* HDL16.

I riamplicati asimmetrici sono stati denaturati con formammide (10 µL di soluzione d'amplificato e 5 µL di formammide al 95%), riscaldati a 92°C per 2' e posti in ghiaccio fino al momento dell'analisi.

L'elettroforesi su gel di poliacrilamide (MDE 0,5X in TBE 0,7X) è stata effettuata in circa 12 ore a 60 V costanti, in una cella elettroforetica verticale LKB mod.2001, con lunghezza di migrazione di 14 cm. Il gel è stato quindi colorato con SYBR[®] Green II e EtBr e le bande elettroforetiche sono state visualizzate con transilluminatore UV (λ 310nm). I diversi aplotipi sono risultati come polimorfismi di lunghezza delle sequenze a singolo filamento.

Il procedimento è stato ripetuto diverse volte usando campioni con sequenza e aplotipo noti come riferimenti.

ANALISI DEI MARCATORI RAPD

Condizioni di amplificazione e visualizzazione dei risultati

Per l'analisi RAPD sono stati testati, su alcuni campioni, 16 *primers* (LA1:16, Tabella 1) costituiti da oligonucleotidi di 10 bp di lunghezza.

Tabella 1 - Sequenza e caratteristiche degli oligonucleotidi utilizzati per analisi RAPD.

Oligo	L (mer)	%GC	T _m (°C)
LA1	5'-CGC TCA CTG T-3'	60	32,0
LA2	5'-GCA TCC ACC A-3'	60	32,0
LA3	5'-GCC TTT CCA G-3'	60	32,0
LA4	5'-TCA GAC GAG G-3'	60	32,0
LA5	5'-AAG GTC GCC T-3'	60	32,0
LA6	5'-CGA TGT TCC C-3'	60	32,0
LA7	5'-AGG CGT GTG T-3'	60	32,0
LA8	5'-TGG AGC GGA A-3'	60	32,0
LA9	5'-GCG CTA CCC T-3'	70	34,0
LA10	5'-GCT GCC ACT G-3'	70	34,0
LA11	5'-GGT CTG CGA G-3'	70	34,0
LA12	5'-GAT CCC CTG A-3'	60	32,0
LA13	5'-GAG CCC TCA A-3'	60	32,0
LA14	5'-ACG GGT TAG T-3'	50	30,0
LA15	5'-GAG TTC GCC C-3'	70	34,0
LA16	5'-TGA CGA TGC A-3'	50	30,0

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume di 10µL, contenente: tampone di reazione, dNTP, *Taq* DNA-Polimerasi premiscelati nel mix Promega “GoTaq Master Mix”, 10 pmoli di *primer* e circa 5 ng di DNA templato.

Il ciclo PCR utilizzato è stato:

- predenaturazione, 94°C 2’;

- 35 cicli:

denaturazione a 94°C 20’’;

annealing a 37°C, 40’’;

riscaldamento da 37°C a 72°C con incrementi di 0,3°C/secondo;

estensione a 72°C per 1’.

- estensione finale a 72°C per 5’;

- raffreddamento a 8°C.

I risultati sono stati visualizzati attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio (2% agarosio in TrisAcetatoEDTA, lunghezza di corsa 15 cm, colorazione con Etidio Bromuro); la dimensione dei frammenti amplificati è stata stimata utilizzando *markers* di peso molecolare (ladder 100 bp, Roche).

I *primers* che hanno fornito risultati migliori (bande di amplificazione apprezzabili) sono stati utilizzati su un totale di 30 campioni, 20 provenienti dalla provincia di Parma, 8 provenienti dalla provincia di Lucca e 2 da quella di Pisa.

Le condizioni di amplificazione e il metodo di visualizzazione sono stati gli stessi utilizzati nella prova. Tutte le reazioni relative ad uno stesso *primer* sono state effettuate in un'unica sessione sperimentale per limitare gli effetti sui risultati provocati da microvariazioni nelle condizioni di amplificazione. I gel sono stati visualizzati agli ultravioletti e fotografati; la presenza/assenza di ogni banda polimorfica è stata valutata in ogni campione attraverso confronti entro gel.

ANALISI DEI MARCATORI MICROSATELLITE

Condizioni di amplificazione di locus STR

Sono stati utilizzati i *primer* (già impiegati in caratterizzazioni della specie e descritti dalla letteratura) Roel (Fickel e Reinsch, 2000) e ILST011 (Kemp *et al.*, 1995; Vial *et al.* 2003). La sequenza microsatellite amplificata dai *primer* Roel ha una lunghezza attesa che varia da 132 a 134 bp (GenBank accession n° AF164070), quella amplificata dai *primers* ILST011 ha una lunghezza attesa di 267-277 bp (GenBank accession n° L23485).

Le condizioni di amplificazione accettabili sono state individuate con diverse prove, effettuate solo su alcuni campioni. I risultati sono stati visualizzati attraverso corse elettroforetiche in gel di agarosio e in gel di poliacrilamide nativi. I risultati migliori sono stati ottenuti con le seguenti condizioni:

reazioni da 10 μ L: $MgCl_2$ 1,8 mM, dNTP 150 μ M, *primers* 0,4 μ M, 0,5 U *Taq* DNA Polymerase e 0,7 μ L di DNA template (corrispondenti a circa 50 ng); il ciclo termico era costituito dalle seguenti fasi: predenaturazione a 94°C per 5'; 30 cicli di denaturazione (94°C 30''), *annealing* (50°C 30''), estensione (72°C 30''); estensione finale a 72°C per 5'.

Caratterizzazione allelica tramite clonaggio dei prodotti di amplificazione

Al fine di ottenere *ladders* dimensionali, da utilizzare come riferimento per la distinzione dei diversi alleli, si è proceduto al clonaggio di amplificati contenenti sequenze STR ed alla loro caratterizzazione attraverso sequenziamento.

Il prodotto di amplificazione di 2 campioni (PR987 e PR1128), è stato in parte (5 μ L) caricato su gel di poliacrilamide per verificarne la quantità e il grado di purezza, e in parte (1 μ L) utilizzato per una reazione di ligazione entro vettori plasmidici pGEM-T Easy Vector (Promega). Questo tipo di vettore permette il clonaggio attraverso le estremità T libere complementari alle estremità A libere (non templatato dipendenti) di prodotti di PCR; contiene, come marcatore di selezione, il gene per la β -lattamasi, che conferisce al batterio trasformato la resistenza all'Ampicillina (Amp^{R}). La reazione è stata condotta in un volume di 10 μ L, con 1 μ L di enzima T4 DNA ligasi, 1 μ L (20 ng) di vettore, 1 μ L di prodotto PCR e tampone di reazione (60mM Tris-HCl, pH 7,8, 20mM MgCl₂, 20mM DTT, 2mM ATP, 10% glicole-polietilenico) a 15°C per 4 ore. Il prodotto della ligazione, purificato attraverso precipitazione in alcol etilico assoluto (3 volumi) e sodio acetato 0,3M, è stato ripreso in 5 μ L di acqua, e 1 μ L è stato utilizzato per la trasformazione, attraverso elettroporazione, di cellule di *Escherichia coli* (ceppo JM101, resistenti alla Tetraciclina). Le cellule trasformate (sospensione di circa 25 mL), riprese in 600 μ L di terreno liquido LB, sono state incubate in agitazione per 1h a 37°C. Aliquote dei batteri (150 μ L circa) sono state successivamente distribuite sterilmente, sotto cappa a flusso laminare, su piastre Petri di 9 cm di diametro, contenenti 25 mL di terreno LB (bacto triptone 10g/L, estratto di lievito 5g/L, NaCl 10g/L, pH 7) agarizzato (10g/L), a cui sono stati aggiunti 100+100 mg/L di antibiotici di selezione (ampicillina e tetraciclina). Le piastre sono state incubate una notte a 37°C, ottenendo colonie del diametro di circa 0,5 mm.

Lo screening delle colonie è stato effettuato tramite *Colony PCR*, amplificando il DNA batterico ottenuto dalle colonie con i *primers* M13, che si legano a regioni del plasmidio fiancheggianti l'inserto, e visualizzando i prodotti su gel di agarosio allo scopo di identificare inserti della lunghezza attesa. Le colonie risultate positive sono state amplificate in 1,5 mL di terreno liquido LB con ampicillina e dalle cellule così ottenute si sono preparati DNA plasmidici utilizzando il kit Promega "Wizard Plus SV Miniprep". Parte dei DNA plasmidici purificati sono stati utilizzati per il sequenziamento con il *primer* M13F, l'allineamento delle sequenze ottenute con quelle dei *primers* STR ha

permesso di determinare la lunghezza di diversi alleli isolati. I plasmidi così caratterizzati costituiranno ladder di migrazione elettroforetica nelle successive fasi di analisi di popolazioni.

Amplificazione, separazione e visualizzazione degli alleli

I *primers* Roel *Forward* e ILST011 *Forward* sono stati marcati tramite polinucleotide-chinasi con ATP γ -³²P. Le due sequenze microsatellite sono state amplificate in 18 campioni della provincia di Parma (8 con aplotipo mitocondriale “centrale” e 10 con aplotipo “*italicus*”), 7 campioni della provincia di Lucca e 2 della provincia di Pisa (tutti con aplotipo “*italicus*”). Inoltre sono stati amplificati 7 campioni ottenuti da soggetti catturati nella provincia di Reggio Emilia e 9 campioni di altrettanti soggetti della provincia di Bologna. Per ottenere i ladder di riferimento sono stati anche amplificati i plasmidi purificati contenenti inserti a dimensione nota, per un totale di 87 reazioni. Ogni reazione è stata condotta in un volume di 7 μ L, alle condizioni precedentemente descritte, con l'utilizzo di 0,4 μ L di *primer* marcato in radioattivo, e con l'aggiunta di 10 μ L di olio minerale. La PCR è stata modificata portando il tempo di incubazione finale a 72°C a 15 minuti, per minimizzare l'attività terminal transferasica della polimerasi (aggiunta di un adenosina non templatato dipendente all'estremità 3' del filamento sintetizzato).

I prodotti delle 2 amplificazioni di ogni campione sono stati mescolati, e un'aliquota di 5 μ L è stata denaturata (con aggiunta di 3 μ L di formammide al 98% e riscaldamento a 95°C per 3') e caricata su un gel di poliacrilamide denaturante (6% poliacrilammide 19:1, Urea 6 M, TBE 1X) con lunghezza di corsa di 35 cm e spessore di 0,4mm (apparato elettroforetico verticale Hoefer, mod SQ3 Sequencer). La corsa elettroforetica è stata effettuata a 1300V per 4 ore, mantenendo il gel ad una temperatura di circa 50°C. Il risultato è stato visualizzato tramite autoradiografia.

ANALISI STATISTICA

Modelli applicati alle misure biometriche

- I dati raccolti e informatizzati partendo dalle schede biometriche sono stati analizzati con la procedura GLM (Modello Lineare Generalizzato) univariata, utilizzando il

software SAS (vers. 9.1.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, US), secondo il seguente modello:

$$y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l + (\alpha \beta)_{ij} + (\alpha \gamma)_{ik} + (\beta \gamma)_{jk} + (\alpha \beta \gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijklm}$$

dove:

y_{ijklm} = variabile dipendente

μ = media comune a tutte le osservazioni

α_i = effetto del fattore “classe di età” ($i = 0, \dots, 3$)

β_j = effetto del fattore “sesso” ($j = 1, 2$)

γ_k = effetto del fattore “anno” ($k = 1, \dots, 4$)

δ_l = effetto del fattore “area” ($l = 1, \dots, 5$)

ε_{ijklm} = errore residuo

Il fattore “classe di età” è stato suddiviso in 4 livelli:

0 = classe 0 = piccoli (0-11 mesi);

1 = classe 1 = subadulti (12-23 mesi);

2 = classe 2 = adulti (2-7 anni);

3 = classe 3 = vecchi (oltre 7 anni).

Il fattore “sesso” è stato ripartito secondo 2 livelli:

1 = maschio,

2 = femmina.

Il fattore “anno” è stato suddiviso in 4 livelli:

1 = 2004;

2 = 2005;

3 = 2006;

4 = 2007.

Per ogni anno sono state raccolte schede biometriche, sia delle femmine che dei maschi, relative alle due sessioni di prelievo: invernale (per femmine di tutte le classi e maschi di classe 0) ed estiva (per maschi di classe 1, 2 e 3).

Nell'anno 2004 sono state raccolte solo le schede biometriche relative agli animali abbattuti durante il piano di prelievo estivo, quindi riferite a maschi di classe 1, 2 e 3.

Il fattore “area” è stato suddiviso secondo 5 livelli, ognuno corrispondente a ciascuna delle 5 zone che compongono l’ATC PR 4 (vedi cartografia esposta in precedenza):

- 1 = area 1 (indicativamente Scurano)
- 2 = area 2 (indicativamente Bazzano)
- 3 = area 3 (indicativamente Vezzano)
- 4 = area 4 (indicativamente Langhirano)
- 5 = area 5 (indicativamente Traversetolo-Castione)

- Nel periodo fra metà luglio e metà agosto, corrispondente alla stagione degli accoppiamenti, in accordo con le linee guida dell’Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, il piano di prelievo subisce una interruzione. L’attività venatoria potrebbe infatti costituire un fattore stressante, con effetti potenzialmente negativi su un momento fisiologico tanto importante e delicato.

Per valutare l’effetto del periodo di accoppiamento sul peso pieno dei soggetti maschi di classe 1, 2 e 3, è stato utilizzato il seguente modello lineare generalizzato:

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha \beta)_{ij} + \varepsilon_{ijkl}$$

dove:

- y_{ijkl} = peso vivo dei soggetti maschi
- μ = media comune a tutte le osservazioni
- α_i = effetto del fattore “periodo di accoppiamento” ($i = 1, 2$)
- β_j = effetto del fattore “classe di età” ($j = 1, 2$)
- γ_k = effetto del fattore “anno” ($k = 1, \dots, 4$)
- ε_{ijkl} = errore residuo

Il fattore “periodo di accoppiamento” è stato ripartito in due livelli:

- 1 = peso vivo dei soggetti abbattuti nel periodo fine giugno-metà luglio;
- 2 = peso vivo dei soggetti abbattuti dalla metà di agosto alla metà di settembre.

Il fattore “classe di età” è stato suddiviso secondo 2 livelli:

- 1 = peso vivo soggetti classe di età 1;
- 2 = peso vivo dei soggetti, sia di classe 2, che di classe 3.

Il fattore “anno” è stato suddiviso in 4 livelli:

1 = 2004;

2 = 2005;

3 = 2006;

4 = 2007.

- Per valutare la significatività statistica della differenza tra le aree 1, 3 e 5, i dati sono stati elaborati per mezzo di ANOVA univariata, utilizzando il seguente modello lineare generalizzato (GLM):

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

dove:

y_{ijklm} = variabile dipendente

μ = media comune a tutte le osservazioni

α_i = effetto del fattore "classe di età" ($i = 0, \dots, 3$)

β_j = effetto del fattore "sesso" ($j = 1, 2$)

γ_k = effetto del fattore "area" ($k = 1, \dots, 3$)

ε_{ijkl} = errore residuo

Il fattore "classe di età" è stato suddiviso in 4 livelli:

0 = classe 0 = piccoli (0-11 mesi);

1 = classe 1 = subadulti (12-23 mesi);

2 = classe 2 = adulti (2-7 anni);

3 = classe 3 = vecchi (oltre 7 anni).

Il fattore "sesso" è stato ripartito secondo 2 livelli:

1 = maschio,

2 = femmina.

Il fattore "area" è stato suddiviso secondo 3 livelli, ognuno corrispondente a 3 delle 5 aree che compongono l'ATC PR 4 (vedi cartografia esposta in precedenza):

1 = area 1 (indicativamente Scurano)

2 = area 2 (indicativamente Bazzano)

3 = area 5 (indicativamente Traversetolo-Castione)

- I valori morfometrici osservati nella presente ricerca sono stati posti a confronto con quelli analoghi rilevati nella stessa ATC dall'anno 1999 all'anno 2002. La significatività statistica della differenza tra anni è stata saggiata per mezzo d ANOVA univariata (vers. 9.1.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, US), per mezzo del seguente lineare generalizzato (GLM):

$$y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l + (\alpha \beta)_{ij} + (\alpha \gamma)_{ik} + (\beta \gamma)_{jk} + (\alpha \beta \gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijklm}$$

dove:

y_{ijklm} = variabile dipendente

μ = media comune a tutte le osservazioni

α_i = effetto del fattore "classe di età" ($i = 0, \dots, 3$)

β_j = effetto del fattore "sesso" ($j = 1, 2$)

γ_k = effetto del fattore "set" ($k = 1, 2$)

δ_l = effetto del fattore "area" ($l = 1, \dots, 5$)

ε_{ijklm} = errore residuo

Il fattore "classe di età" è stato suddiviso in 4 livelli:

0 = classe 0 = piccoli (0-11 mesi);

1 = classe 1 = subadulti (12-23 mesi);

2 = classe 2 = adulti (2-7 anni);

3 = classe 3 = vecchi (oltre 7 anni).

Il fattore "sesso" è stato ripartito secondo 2 livelli:

1 = maschio,

2 = femmina.

Il fattore "area" è stato suddiviso secondo 5 livelli, ognuno corrispondente a ciascuna delle 5 zone che compongono l'ATC PR 4 (vedi cartografia esposta in precedenza):

1 = area 1 (indicativamente Scurano)

2 = area 2 (indicativamente Bazzano)

3 = area 3 (indicativamente Vezzano)

4 = area 4 (indicativamente Langhirano)

5 = area 5 (indicativamente Traversetolo-Castione)

Per quanto riguarda il fattore “set”, i due livelli considerati sono risultati diversi a seconda del confronto (a, b, c, d) tra anni considerato:

- a) 1 = valori rilevati negli anni compresi tra il 1999 e il 2002; 2 = valori rilevati negli anni compresi tra il 2004 e il 2007
- b) 1 = valori rilevati nell'anno 2000; 2 = valori rilevati nell'anno 2006
- c) 1 = valori rilevati nell'anno 2001; 2 = valori rilevati nell'anno 2007
- d) 1 = valori rilevati nell'anno 2001; 2 = valori rilevati nell'anno 2006

- Le misure morfometriche relative al cranio dei caprioli maschi abbattuti nell'anno 2006 sono stati analizzati per mezzo di ANOVA univariata (package SPSS, vers.15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, US) in accordo con il seguente modello lineare generalizzato (GLM):

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha \beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

dove:

y_{ijk} = variabile dipendente (misura craniometrica)

α_i = effetto del fattore “classe di età” ($i = 0, \dots, 3$)

β_j = effetto del fattore “area” ($j = 1, \dots, 5$)

ε_{ijk} = errore residuo

Il fattore “classe di età” è stato suddiviso in 4 livelli:

- 0 = classe 0 = piccoli (0-11 mesi);
- 1 = classe 1 = subadulti (12-23 mesi);
- 2 = classe 2 = adulti (2-7 anni);
- 3 = classe 3 = vecchi (oltre 7 anni).

Il fattore “area” è stato suddiviso secondo 5 livelli, ognuno corrispondente a ciascuna delle 5 zone che compongono l'ATC PR 4 (vedi cartografia esposta in precedenza):

- 1 = area 1 (indicativamente Scurano)
- 2 = area 2 (indicativamente Bazzano)
- 3 = area 3 (indicativamente Vezzano)
- 4 = area 4 (indicativamente Langhirano)
- 5 = area 5 (indicativamente Traversetolo-Castione)

- Per valutare differenze morfometriche tra i caprioli caratterizzati sotto il profilo mitocondriale di tipo “italicus” e di tipo “centro-europeo”, è stata utilizzata l’ANOVA univariata (package SPSS, vers.15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, US), applicando il seguente modello lineare generalizzato (GLM):

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijkl}$$

dove:

y_{ijkl} = variabile dipendente

μ = media comune a tutte le osservazioni

α_i = effetto del fattore “classe di età” ($i = 0, \dots, 3$)

β_j = effetto del fattore “area” ($j = 1, \dots, 5$)

γ_k = effetto del fattore “aplotipo mitocondriale” ($k = 1, 2$)

ε_{ijkl} = errore residuo

Il fattore “classe di età” è stato suddiviso in 4 livelli:

0 = classe 0 = piccoli (0-11 mesi);

1 = classe 1 = subadulti (12-23 mesi);

2 = classe 2 = adulti (2-7 anni);

3 = classe 3 = vecchi (oltre 7 anni).

Il fattore “area” è stato suddiviso secondo 5 livelli, ognuno corrispondente a ciascuna delle 5 zone che compongono l’ATC PR 4 (vedi cartografia esposta in precedenza):

1 = area 1 (indicativamente Scurano)

2 = area 2 (indicativamente Bazzano)

3 = area 3 (indicativamente Vezzano)

4 = area 4 (indicativamente Langhirano)

5 = area 5 (indicativamente Traversetolo-Castione)

Il fattore “aplotipo mitocondriale” è stato ripartito in 2 livelli:

1 = caprioli con aplotipo mitocondriale di tipo “italicus”;

2 = caprioli con aplotipo mitocondriale di tipo “centro-europeo”.

Analisi statistiche applicate ai tracciati RAPD

Per analizzare la struttura genetica di una popolazione utilizzando marcatori RAPD è necessario fare alcune assunzioni preliminari:

- la visualizzazione elettroforetica è da considerare come la manifestazione fenotipica dei loci biallelici presi in esame, dove le due varianti di ogni locus sono rappresentate dalla presenza o dall'assenza della banda. La variante allelica corrispondente alla presenza della banda risulta quindi essere dominante: la banda verrà visualizzata anche in presenza di eterozigosi;
- i loci analizzati sono da considerare in equilibrio di Hardy-Weinberg, affinché si possa stimare la frequenza dei due alleli.

Il *pattern* di presenza/assenza di ogni banda è stato trasferito in una matrice binaria di 0 (assenza) e 1 (presenza), delle dimensioni di 30 campioni per 253 loci, letti in modo dominante. La matrice è stata analizzata con i programmi GenAlEx6.1 (Peakall *et al.*, 2006) e PopoGen 1.32 (University of Alberta, 1997), per le seguenti variabili:

- numero di loci polimorfici, stima delle frequenze alleliche ed eterozigosità attesa media (Lynch e Milligan, 1994).

Le frequenze alleliche ad ogni locus si stimano assumendo che all'interno della popolazione gli accoppiamenti avvengano in modo casuale e che venga quindi rispettato l'equilibrio di Hardy-Weinberg

$$p_{(i)} + q_{(i)} = 1,$$

dove $p_{(i)}$ è la frequenza dell'allele dominante e $q_{(i)}$ è la frequenza dell'allele recessivo.

La frequenza dell'allele recessivo $q_{(i)}$ è data dalla radice quadrata della frequenza del genotipo recessivo (assenza di banda). Sapendo che la somma delle frequenze geniche è uguale a 1, la frequenza dell'allele dominante $p_{(i)}$ è data da $1 - q_{(i)}$. Se x è la porzione di individui che non presenta la banda ad un determinato locus, la formula $q_{(i)} = x^{1/2}$ fornisce una sottostima di q .

Una stima meno viziata è data dalla formula $q_{(i)} = x^{1/2} \{1 - [\text{Var}(x)/8x^2]\}^{-1}$, dove $\text{Var}(x) = (1-x)/4N$.

L'eterozigosità attesa $H_j(i)$ è definita come la probabilità che un individuo preso a caso dalla popolazione j risulti eterozigote al locus i ed è calcolata in base alla formula: $H_j = 2 q_j(i) [1 - q_j(i)] + 2\text{Var}[q_j(i)]$.

L'eterozigosità attesa media tra L loci nella popolazione j è data dalla formula $H_j = (1/L)\sum_{i=1,L} H_j(i)$, che esprime la diversità genetica all'interno della popolazione.

- Distanza genetica di Nei (Nei *et al.*, 1987) tra le popolazioni, calcolata con la formula:

$$D_{jk} = -\ln(J_{jk}/\sqrt{J_j J_k})$$

Dove $J_j = 1 - H_j$; $J_{jk} = 1 - H_{jk}$ e H_{jk} è la diversità genetica tra le popolazioni j e k .

Viene visualizzata una matrice di distanza e di identità che metta a confronto fra loro le popolazioni individuate. Come vedremo, nel presente studio sono stati individuati con l'analisi RAPD 3 aplogruppi (Parma "italicus", Parma "centro-europeo" e Lucca) e la matrice prodotta risulta quindi della dimensioni di 3x3.

I risultati sono visualizzati graficamente attraverso un'analisi PCA della matrice di distanza, che genera un plot con un certo numero di assi (2, nel presente lavoro) su cui si posizionano i gruppi considerati (3, nel presente lavoro).

- Suddivisione della variabilità genetica nelle sue componenti di varianza tra le popolazioni ed entro popolazioni (struttura delle popolazioni), ottenuta con G_{st} (Nei *et al.*, 1987) e Φ_{PT} (Peakall *et al.*, 1995). Questi indici sono analoghi a F_{ST} (Wright, 1951) ma sono utilizzabili per dati binari quali i RAPD, che esprimono la proporzione di varianza molecolare tra popolazioni in relazione alla varianza totale.

- G_{st} è stato calcolato con il programma Popgen1.32, secondo la formula:

$G_{st} = D_{st}/HT$, dove: HT è la diversità genica nella popolazione totale, e D_{st} corrisponde alla media delle diversità geniche tra sottopopolazioni.

- Φ_{PT} , ottenuto con il programma GenALEX6.1 tramite AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*, Excoffier *et al.*, 1992; Huff *et al.*, 1993):

$\Phi_{PT} = V_{AP} / (V_{AP} + V_{WP})$, dove V_{AP} è la varianza tra popolazioni e V_{WP} è la varianza entro popolazioni.

- Distanza genetica binaria tra coppie di campioni. Vengono considerati due tipi di distanza:

- Distanza euclidea, con la formula $D_{ij} = n(1 - n_{ij}/n)$, dove n è il n° di loci totali e n_{ij} è il numero di loci che presenta lo stesso stato (0 o 1) nei campioni i e j .

- Distanza asimmetrica, che esclude la condivisione dello stato 0, calcolata come $1 - S_{ij}$.

S_{ij} è l'indice di similarità di Jaccard (1908), che misura la proporzione di bande in comune tra individui: $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j - N_{ij})$ dove N_{ij} è il numero di bande in comune per gli individui i e j , N_i e N_j il numero totale di bande negli individui i e j rispettivamente.

- PCA (*Principal Coordinate Analysis*, Orloci, 1978), utilizzando le matrici di distanza genetica tra coppie di campioni. Dati N individui (o popolazioni), sono richieste $N-1$ dimensioni per rappresentare graficamente le distanze genetiche tra loro. L'analisi multivariata permette di rappresentare questo spazio multidimensionale in due o tre dimensioni, mantenendo la massima quantità di informazione (in termini di varianza spiegata) ed al contempo rendendo il fenomeno più comprensibile riducendone la complessità. Gli individui vengono quindi visualizzati su un grafico a due dimensioni, corrispondenti a 2 dei primi 3 assi che spiegano la maggior percentuale di varianza. La matrice di distanza ottenuta dagli indici di similarità di Jaccard è stata convertita in una matrice di covarianza. Tutti i dati utilizzati per le PCA sono stati standardizzati dividendoli per la radice quadrata di $n-1$.

A. SCHEDE BIOMETRICHE

Nella tabella A1 sono mostrate le caratteristiche descrittive del campione analizzato. I dati sono stati ottenuti da 1495 schede biometriche relative ai caprioli abbattuti nell'ambito dei prelievi venatori condotti nell'ATC PR4 negli anni 2004, 2005, 2006 e 2007. Le schede biometriche raccolte nell'anno 2004 si riferiscono solo ai caprioli maschi abbattuti nel corso del prelievo venatorio estivo. Alcune delle 1495 non sono state compilate in tutti i campi richiesti; inoltre, si è proceduto ad eliminare dal campione le misure che risultavano chiaramente sbagliate.

Tabella A1 - Statistiche descrittive del campione analizzato: dati raccolti da 1495 schede biometriche.

Misura morfometrica		Media	DS	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	CV %
Peso pieno	kg	23,4	3,7	11,0	38,0	15,6
Lunghezza totale	cm	112,9	7,4	80,0	133,0	6,6
Altezza garrese	cm	67,6	5,0	41,0	89,0	7,4
Circonferenza toracica	cm	67,4	5,4	52,0	90,0	8,0
Lunghezza orecchio	cm	14,9	1,4	11,0	20,0	9,6
Lunghezza arto anteriore	cm	26,6	1,9	15,0	43,0	7,1
Lunghezza arto posteriore	cm	34,5	2,1	23,0	45,0	6,0
Circonferenza base collo	cm	34,3	4,4	20,0	53,0	12,7

Tra le misure biometriche, la circonferenza base collo e, soprattutto, il peso pieno hanno evidenziato la maggiore variabilità, con valori del coefficiente di variazione pari, rispettivamente, al 12,7% e al 15,6%. Il coefficiente di variazione delle altre misure morfometriche ha evidenziato valori tendenzialmente più bassi e compresi tra il 6,0% (lunghezza arto posteriore) e il 9,6% (lunghezza orecchio).

Nei paragrafi successivi verranno mostrate le medie stimate e la significatività statistica delle differenze per ciascuna misura morfometrica, in rapporto ai fattori sesso, classe di età e anno. La forte stagionalità dei cicli biologici del capriolo e le modalità del prelievo venatorio nel periodo estivo – nel quale vengono abbattuti i capi maschi di classe 1, 2 e 3 e che viene interrotto fra metà luglio e metà agosto per

favorire gli accoppiamenti – hanno permesso di valutare gli effetti del periodo di accoppiamento sul peso vivo dei soggetti maschi. I risultati di questa indagine saranno esposti nell’ultimo paragrafo di questa sezione.

Analisi dei parametri

Peso pieno

Tabella A2 – Medie stimate del peso pieno (kg) dei caprioli (*Capreolus capreolus*) abbattuti nell’ATC PR4: dati relativi a 1495 schede biometriche.

Anno	2004		2005		2006		2007		ES
Sesso	M	M	F	M	F	M	F		
No.	134	188	204	179	231	224	228		
Classe di età:									
0		19,3 _A	18,3 _A	19,2 _A	18,8 _A	18,6 _A	18,2 _A		0,2
1	22,9 _A	22,8 _B	22,4 _B	22,8 _B	22,7 _B	22,8 _B	22,1 _B		0,1
2	26,2 _B	26,6 _C	25,1 _C	26,4 _C	25,0 _C	26,3 _C	24,7 _C		0,1
3	^b 27,5 _C	^b 27,1 _C	26,0 _C	^b 27,1 _C	25,6 _C	^a 25,8 _C	25,0 _C		0,2

Significatività statistica della differenza tra sessi: i due valori evidenziati in grigio sono risultati significativamente differenti tra loro per $P \leq 0,05$.

^{a, b} Significatività statistica della differenza tra gli anni nei caprioli maschi: valori con lettere diverse nella stessa riga differiscono per $P \leq 0,05$.

A, B, C Significatività statistica della differenza tra classi di età: valori con lettere diverse nella stessa colonna differiscono per $P \leq 0,05$.

Sia i maschi che le femmine hanno evidenziato un aumento statisticamente significativo ($P \leq 0,05$) del peso pieno dalla classe 0 (piccoli) alla classe 1 (subadulti) quantificabile in circa 4 kg (Tabella A2). Nel passaggio dal subadulto all’adulto (classe2), l’incremento, seppur considerevole e statisticamente significativo ($P \leq 0,05$), è apparso di minore entità e quantificabile in circa 3 kg (tra i +3,5 kg e i +3,8 kg nei maschi e tra +2,3 kg e i +2,7 kg nelle femmine). Il peso pieno dei caprioli vecchi (classe 3) è risultato del tutto analogo a quello dei caprioli adulti, ad eccezione dei campioni dell’anno 2004, in cui i maschi vecchi (classe 3) hanno registrato un peso più elevato (+1,3 kg; $P \leq 0,05$) di quello degli adulti (classe 2). Le ultime indicazioni

dell'INFS sulla suddivisione in classi di età degli animali, suggeriscono di accorpate le classi 2 e 3, anche ai fini del prelievo venatorio, poiché da punto di vista biologico sia i soggetti di classe 2 che quelli di classe 3 svolgono il medesimo ruolo all'interno della popolazione: sono i riproduttori. Anche dal punto di vista morfologico, la tendenza osservata nel presente lavoro supporta tale classificazione, poiché a partire dalla classe 2 gli animali raggiungono il *plateau* di accrescimento (Sabbioni *et al.*, 2002). Inoltre, questo andamento è riconfermato dall'analisi delle altre misure morfologiche, come vedremo oltre.

Per quanto riguarda la differenza tra sessi, i caprioli maschi adulti (classe 2) si sono caratterizzati per valori del peso pieno significativamente maggiori ($P \leq 0,05$) rispetto a quelli delle femmine della stessa classe, in tutti gli anni in cui è stato possibile effettuare il confronto (+1,5 kg nel 2005, +1,4 kg nel 2006 e +1,6 kg nel 2007). Per quanto riguarda le altre classi di età, non sono state osservate differenze significative tra maschi e femmine, in nessun anno.

L'analisi delle variazioni osservate del parametro peso pieno e, più in generale, di tutte le misure morfometriche, deve tenere conto delle diverse modalità con le quali viene effettuato il prelievo venatorio per i due sessi e della concentrazione dei parti nel mese di maggio (da metà aprile a inizio giugno). Per quanto riguarda le femmine, i soggetti di tutte le classi di età sono abbattuti nello stesso periodo dell'anno, vale a dire dalla fine di dicembre ai primi di marzo dell'anno successivo (gennaio-febbraio). Il prelievo venatorio dei maschi, invece, avviene in due fasi distinte: i maschi di classe 0 vengono abbattuti nello stesso periodo delle femmine, mentre i maschi delle classi 1, 2 e 3 sono abbattuti nel corso del prelievo venatorio estivo. Per queste ragioni, i maschi subadulti (classe 1) sono abbattuti quando hanno un'età di circa 14-16 mesi, mentre le femmine subadulte sono abbattute ad un'età di circa 20-21 mesi. Le misurazioni dei maschi di classe 1, quindi, provengono da animali che sono in media 5 mesi più giovani rispetto alle femmine della stessa classe di età. Nonostante questa differenza di età, in un periodo in cui il tasso di crescita sia dei caprioli maschi che di quelli femmina è particolarmente elevato (Soffiantini, 2002), i dati qui osservati non hanno evidenziato differenze di peso pieno tra i maschi e le femmine subadulte (classe 1). Questo significa che nei 5 mesi che intercorrono tra il prelievo invernale e quello

estivo, i maschi di classe 0 guadagnano lo stesso peso che le femmine di pari classe guadagnano nei 12 mesi che separano i due prelievi invernali. Ciò è in accordo con quanto riportato da Sabbioni *et al.* (2002), i quali, analizzando le schede biometriche di 123 caprioli abbattuti nell'ATC PR 4, hanno stimato le curve di crescita dei maschi e delle femmine utilizzando l'equazione di Gompertz (Emmans, 1989). Secondo questi autori, infatti, nel periodo considerato (tra gli 8 e i 21 mesi circa) i maschi hanno evidenziato un tasso di crescita tendenzialmente più elevato rispetto a quello delle femmine. È opportuno considerare che anche nella classe 3 (vecchi) i valori medi dei maschi sono risultati tendenzialmente più elevati rispetto a quelli delle femmine, anche se in maniera statisticamente non significativa.

Lunghezza totale

Nella tabella A3 sono mostrati valori stimati della lunghezza totale dei caprioli abbattuti in rapporto ai fattori sesso, classe di età e anno. Sia nei maschi che nelle femmine, i dati osservati indicano un incremento della lunghezza totale dei soggetti particolarmente accentuata ($P \leq 0,05$) tra i soggetti di classe 0 e quelli di classe 1 (poco più di 8 cm nei maschi e poco più di 6 cm nelle femmine). Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra maschi e femmine di classe 0, mentre, tra i subadulti (classe 1), i maschi hanno evidenziato valori che sono risultati mediamente più elevati di quelli delle femmine, tant'è che nell'anno 2005 la differenza a favore dei maschi è risultata significativa (+2,5 cm; $P \leq 0,05$). Appare importante rimarcare nuovamente che la differenza temporale tra classe 0 e subadulti (classe 1) nei maschi è di 5 mesi, mentre nelle femmine è di 12 mesi. Per cui, in questa fase, i maschi hanno registrato un incremento tendenzialmente maggiore, in un lasso di tempo inferiore (5 mesi) rispetto alle femmine (12 mesi). Tra gli adulti (classe 2) e i subadulti (classe 1) l'incremento risulta statisticamente significativo ($P \leq 0,05$) ma di entità inferiore rispetto a quanto rilevato tra soggetti di classe 0 e subadulti e pari a circa 5 cm nei maschi e circa 4 cm nelle femmine. La lunghezza totale nei soggetti vecchi (classe 3) non è risultata differente rispetto alla misura rilevata negli adulti, a conferma di quanto

Risultati

osservato per il peso pieno. Sia i maschi adulti che quelli vecchi hanno evidenziato valori della lunghezza totale significativamente maggiori ($P \leq 0,05$) rispetto a quelli delle femmine di pari classe di età e compresa tra i +3,1 e +4,8 cm nella classe degli adulti (classe 2) e tra +3,9 e +6,0 cm nei soggetti vecchi (classe 3).

Tabella A3 – Medie stimate della lunghezza totale (cm) dei caprioli (*Capreolus capreolus*) abbattuti nell'ATC PR4: dati relativi a 1495 schede biometriche.

Anno	2004		2005		2006		2007		ES
Sesso	M	M	F	M	F	M	F		
No.	134	189	205	177	225	225	227		
Classe di età:									
0		104,4_A	^a 101,8_A	104,7_A	^b 105,6_A	105,8_A	^b 105,2_A		0,4
1	^a 111,6_A	^{ab} 112,7_B	110,2_B	^{ab} 113,1_B	111,2_B	^b 113,9_B	111,5_B		0,3
2	116,9_B	117,8_C	^a 113,0_C	118,9_C	^b 115,6_C	118,3_C	^b 115,2_C		0,3
3	^a 116,9_C	^a 118,0_C	114,1_C	^b 119,8_C	113,9_C	^b 120,1_C	114,1_C		0,4

Significatività statistica della differenza tra sessi: i due valori evidenziati in grigio sono risultati significativamente differenti tra loro per $P \leq 0,05$.

^{a, b} Significatività statistica della differenza tra gli anni nei caprioli femmina: valori con lettere diverse nella stessa riga differiscono per $P \leq 0,05$.

^{a, b} Significatività statistica della differenza tra gli anni nei caprioli maschi: valori con lettere diverse nella stessa riga differiscono per $P \leq 0,05$.

A, B, C Significatività statistica della differenza tra classi di età: valori con lettere diverse nella stessa colonna differiscono per $P \leq 0,05$.

Altezza al garrese

Nella tabella A4 sono mostrati valori stimati dell'altezza al garrese dei caprioli abbattuti in rapporto ai fattori sesso, classe di età e anno.

Tabella A4 – Medie stimate dell'altezza al garrese (cm) dei caprioli (*Capreolus capreolus*) abbattuti nell'ATC PR4: dati relativi a 1495 schede biometriche.

Anno	2004		2005		2006		2007		ES
Sesso	M	M	F	M	F	M	F		
No.	124	189	203	180	228	224	227		
Classe di età:									
0		63,7 _A	62,5 _A	64,9 _A	64,4 _A	64,0 _A	63,9 _A		0,3
1	67,5 _A	67,2 _B	66,3 _B	68,5 _B	66,7 _B	68,1 _B	67,1 _B		0,2
2	69,1 _{AB}	69,6 _C	68,1 _C	70,0 _B	68,7 _C	70,7 _C	69,3 _C		0,2
3	70,4 _B	69,3 _C	70,4 _D	69,9 _B	69,1 _C	69,6 _C	70,4 _C		0,3

Significatività statistica della differenza tra sessi: i due valori evidenziati in grigio sono risultati significativamente differenti tra loro per $P \leq 0,05$.

A, B, C, D Significatività statistica della differenza tra classi di età: valori con lettere diverse nella stessa colonna differiscono per $P \leq 0,05$.

Sia nei caprioli maschi che nelle femmine, i soggetti subadulti (classe 1) hanno evidenziato valori dell'altezza al garrese significativamente maggiori ($P \leq 0,05$) rispetto a quelli rilevati nei soggetti di classe 0; la differenza è risultata compresa tra + 3,6 e + 4,1 cm nei maschi e compresa tra + 2,3 e +3,8 cm nelle femmine. I soggetti adulti (classe 2) di entrambi i sessi hanno evidenziato valori significativamente più elevati ($P \leq 0,05$) rispetto a quelli osservati nei subadulti (classe 1); in questo caso la differenza è risultata di entità inferiore e compresa tra +1,5 e +2,6 cm nei maschi e tra +1,8 e +2,2 cm nelle femmine. Tuttavia, negli anni 2004 e 2006, i maschi adulti (classe 2) hanno registrato valori di altezza al garrese non significativamente differenti dai valori dei maschi subadulti, anche se mediamente più elevati. Tra soggetti vecchi e adulti non sono state osservate differenze statisticamente significative, come già osservato per il peso pieno e per la lunghezza totale. Unica eccezione sono le femmine del 2005, i cui soggetti vecchi (classe 3) hanno fatto registrare un valore significativamente maggiore

(+2,3 cm; $P \leq 0,05$) rispetto alle femmine adulte (classe 2). Non sono state osservate differenze significative tra i due sessi in nessuna classe di età, evidenziando la mancanza di dimorfismo sessuale per questo parametro.

Per questa misura morfometrica non sono state osservate variazioni statisticamente significative nemmeno tra i soggetti di pari classe, in uno stesso sesso, nei diversi anni del prelievo venatorio.

Circonferenza toracica

Tabella A5 – Medie stimate della circonferenza toracica (cm) dei caprioli (*Capreolus capreolus*) abbattuti nell'ATC PR4: dati relativi a 1495 schede biometriche.

Anno	2004	2005		2006		2007		ES
Sesso	M	M	F	M	F	M	F	
No.	134	189	204	179	227	225	228	
Classe di età:								
0		^b 65,2 _A	^b 63,3 _A	^b 64,5 _A	^b 64,0 _A	^a 62,3 _A	^a 61,3 _A	0,3
1	^b 65,1 _A	^a 64,2 _A	68,3 _B	^b 65,9 _{AB}	68,2 _B	^b 65,4 _B	67,7 _B	0,2
2	67,1 _B	68,6 _B	^a 70,7 _C	67,4 _{BC}	^b 71,2 _C	67,5 _C	^b 71,2 _C	0,2
3	67,1 _B	67,2 _B	72,3 _C	68,2 _C	70,8 _C	67,1 _C	71,4 _C	0,3

Significatività statistica della differenza tra sessi: i due valori evidenziati in grigio sono risultati significativamente differenti tra loro per $P \leq 0,05$.

^{a, b} Significatività statistica della differenza tra gli anni nei caprioli femmina: valori con lettere diverse nella stessa riga differiscono per $P \leq 0,05$.

^{a, b} Significatività statistica della differenza tra gli anni nei caprioli maschi: valori con lettere diverse nella stessa riga differiscono per $P \leq 0,05$.

A, B, C Significatività statistica della differenza tra classi di età: valori con lettere diverse nella stessa colonna differiscono per $P \leq 0,05$.

Negli anni 2005, 2006 e 2007, sia i soggetti maschi che le femmine, hanno evidenziato un tendenziale aumento della circonferenza toracica all'aumentare della classe di età, seppur con peculiarità distintive nei due sessi (Tabella A5). Per quanto riguarda i maschi, i soggetti subadulti hanno evidenziato valori di circonferenza toracica che negli anni 2005 e 2006 sono risultati non differenti, dal punto di vista statistico, rispetto a quelli osservati nei soggetti di classe 0; nell'anno 2007, invece, i

maschi subadulti (classe 1) si sono caratterizzati per un valore significativamente più elevato ($P \leq 0,05$) rispetto a quello dei maschi di classe 0 (+3,1 cm). I maschi adulti (classe 2) hanno fatto registrare valori di circonferenza toracica significativamente più elevati (tra + 2,1 cm e + 4,4 cm; $P \leq 0,05$) rispetto a quelli dei subadulti (classe 1), eccezion fatta per l'anno 2006, in cui non sono state osservate differenze significative tra i soggetti delle due classi. Anche per questo parametro, tra maschi vecchi (classe 3) e maschi adulti (classe 2) in nessun caso sono state osservate differenze significative. Riguardo le femmine, i soggetti subadulti (classe 1) hanno registrato un valore di circonferenza toracica significativamente più elevato ($P \leq 0,05$) rispetto a quello delle femmine di classe 0; la differenza a favore delle subadulte è risultata compresa tra +5,0 cm e +6,4 cm. Le femmine adulte (classe 2) a loro volta hanno fatto registrare valori di circonferenza toracica significativamente maggiore ($P \leq 0,05$) rispetto a quelli delle subadulte, con una differenza variabile tra 2,4 cm e 3,5 cm, quindi di entità inferiore rispetto a quella osservata tra femmine classe 0 e subadulte. Come osservato nei maschi, tra femmine adulte (classe 2) e vecchie (classe 3) non sono state osservate differenze. A partire dai soggetti subadulti (classe 1) fino a quelli vecchi (classe 3), le femmine di capriolo hanno evidenziato valori significativamente più elevati ($P \leq 0,05$) di quelli osservati nei maschi di pari classe di età. Tra i soggetti di classe 0 non sono state osservate differenze di circonferenza toracica tra maschi e femmine.

Per valutare correttamente le peculiarità emerse nello studio di questo parametro biometrico, con particolare riferimento alle differenze tra maschi e femmine, è utile ricordare le modalità di prelievo venatorio ed alcune caratteristiche biologiche dei caprioli. È noto che nel periodo invernale il mantello del capriolo risulta più voluminoso rispetto al mantello estivo e, come in precedenza riportato, le femmine delle classi 1, 2 e 3 vengono abbattute in inverno, mentre i maschi di pari classe di età vengono abbattuti in estate. Per queste ragioni, la maggiore dimensione della circonferenza toracica delle femmine rispetto ai maschi osservata nelle classi 1, 2 e 3 è ascrivibile al maggiore spessore del mantello invernale rispetto a quello estivo.

Sia i maschi che le femmine di classe 0 abbattuti nell'anno 2007 hanno evidenziato un valore di circonferenza toracica più basso rispetto a quanto osservato nei soggetti della stessa età abbattuti nell'anno 2005 e nell'anno 2006.

Lunghezza orecchio

Tabella A6 – Medie stimate della lunghezza orecchio (cm) dei caprioli (*Capreolus capreolus*) abbattuti nell'ATC PR4: dati relativi a 1495 schede biometriche.

Anno	2004		2005		2006		2007		ES
Sesso	M	M	F	M	F	M	F		
No.	134	187	204	180	229	225	229		
Classe di età:									
0		14,4 _A	14,2 _A	14,4 _A	14,0 _A	14,4 _A	13,8 _A		0,1
1	^b 15,2 _A	^b 15,2 _B	^b 15,1 _B	^{ab} 14,9 _{AB}	^b 14,6 _B	^a 14,5 _A	^a 14,4 _B		0,1
2	^b 15,9 _B	^{ab} 15,3 _B	^b 15,8 _C	^{ab} 15,2 _{BC}	^{ab} 15,5 _C	^a 15,3 _B	^a 15,3 _C		0,1
3	^b 15,7 _{AB}	^b 15,6 _B	^b 15,8 _C	^b 15,6 _C	^b 15,1 _C	^a 14,6 _A	^{ab} 15,5 _C		0,1

Significatività statistica della differenza tra sessi: i due valori evidenziati in grigio sono risultati significativamente differenti tra loro per $P \leq 0,05$.

^{a, b} Significatività statistica della differenza tra gli anni nei caprioli femmina: valori con lettere diverse nella stessa riga differiscono per $P \leq 0,05$.

^{a, b} Significatività statistica della differenza tra gli anni nei caprioli maschi: valori con lettere diverse nella stessa riga differiscono per $P \leq 0,05$.

A, B, C Significatività statistica della differenza tra classi di età: valori con lettere diverse nella stessa colonna differiscono per $P \leq 0,05$.

In linea generale, la lunghezza orecchio ha evidenziato un progressivo e significativo aumento all'aumentare della classe di età dei soggetti, sia nei maschi che nelle femmine (Tabella A6). Rispetto ai soggetti di classe 0, le femmine subadulti (classe 1) hanno registrato un valore di lunghezza dell'orecchio maggiore ($P \leq 0,05$), di un'entità compresa tra 0,6 cm e 0,9 cm. Nei maschi, la stessa differenza è risultata non significativa negli anni 2005 e 2006, mentre, nell'anno 2007, la differenza a favore dei soggetti subadulti è risultata significativa ($P \leq 0,05$) e pari a 0,8 cm. In questo caso, probabilmente, il minor intervallo temporale che intercorre tra il prelievo venatorio dei maschi 0 e quelli di classe 1 rispetto a quello tra le femmine di pari età, potrebbe essere insufficiente a generare una differenza chiara per questo parametro tra i maschi di classe 0 e quelli subadulti (classe 1). Per quanto riguarda i soggetti adulti (classe 2), le femmine di capriolo si sono caratterizzate per valori di lunghezza orecchio significativamente più elevati (tra 0,7 cm e 0,9 cm; $P \leq 0,05$) rispetto a quanto osservato

nelle femmine subadulte (classe 1). I valori osservati nelle femmine di classe 3 (vecchie) sono risultati non diversi da quelli delle femmine adulte. Nei caprioli maschi le variazioni di questo parametro per classe di età sono risultate meno chiare e variabili in rapporto all'anno del prelievo venatorio. Tuttavia, si può affermare che i maschi adulti (classe 2), in tutti gli anni del prelievo, hanno evidenziato valori significativamente più elevati ($P \leq 0,05$) rispetto a quelli di classe 0, con differenza variabile tra 0,8 cm e 0,9 cm. Per quanto riguarda il confronto tra i sessi, è stata osservata una sola differenza statisticamente significativa tra i soggetti di classe 3 abbattuti nell'anno 2007. È probabile, quindi, che per la lunghezza dell'orecchio non esistano chiare differenze tra i due sessi all'interno di una stessa classe di età.

Rispetto ai diversi anni di prelievo, nelle classi di età 1, 2 e 3, il parametro ha registrato una tendenziale diminuzione dall'anno 2004 all'anno 2007, sia nei maschi che nelle femmine.

L'esiguità delle variazioni lineari di questo parametro in corrispondenza del passaggio da una classe di età a quella successiva (per i maschi, sempre inferiore a 1,0 cm), conferma la sua utilità al fine dell'attribuzione della classe di età stessa. Durante i censimenti o nei momenti che precedono il prelievo venatorio, quando è necessario stabilire la classe di età degli animali osservandoli a distanza con ottiche di precisione, fra i tanti elementi anatomici e comportamentali che vanno considerati per i soggetti maschi, vi è anche l'altezza del trofeo. Poiché, in queste condizioni di osservazione, è facile fare errori di valutazione in termini assoluti anche dell'ordine di 5-10 cm, risulta comodo fare ipotesi sulla classe di età dell'animale valutando l'altezza del trofeo rispetto all'altezza dell'orecchio. Poiché questa misura rimane infatti apparentemente costante per un osservatore a distanza e sapendo che essa si aggira intorno ai 15 cm (media 14,9 cm), è possibile ottenere informazioni relativamente precise osservando se il trofeo sia al di sotto dell'apice dell'orecchio, o valutando di quanto sporga da esso.

Lunghezza arto anteriore

Tabella A7 – Medie stimate della lunghezza arto anteriore (cm) dei caprioli (*Capreolus capreolus*) abbattuti nell'ATC PR4: dati relativi a 1495 schede biometriche.

Anno	2004		2005		2006		2007		ES
Sesso	M	M	F	M	F	M	F		
No.	132	189	204	179	227	225	228		
Classe di età:									
0		25,9 _A	25,7 _A	26,0 _A	25,9 _A	26,3 _A	25,6 _A		0,1
1	26,6	26,8 _B	26,2 _A	26,5 _{AB}	26,3 _A	26,6 _A	26,2 _A		0,1
2	26,9	27,0 _B	27,0 _B	26,9 _{BC}	27,1 _B	26,6 _A	26,9 _B		0,1
3	26,9	27,0 _B	27,3 _B	27,4 _C	27,4 _C	26,8 _A	27,5 _B		0,1

A, B, C Significatività statistica della differenza tra classi di età: valori con lettere diverse nella stessa colonna differiscono per $P \leq 0,05$.

Sia nei caprioli maschi che in quelli femmina, i soggetti subadulti hanno fatto registrare valori di lunghezza dell'arto anteriore mediamente più elevati rispetto a quelli dei soggetti di classe 0 (Tabella A7); tuttavia, tali differenze non sono risultate statisticamente significative, eccezion fatta per il caso dei maschi dell'anno 2005, anno in cui i subadulti hanno registrato un valore significativamente più elevato ($P \leq 0,05$) rispetto a quanto rilevato nei maschi di classe 0.

In uno studio sulle allometrie del 2003, Soffiantini *et al.* hanno mostrato che i valori di coefficiente allometrico (b) per la lunghezza degli arti sono i più bassi fra tutti i parametri considerati, sia rispetto al peso pieno che rispetto all'altezza al garrese, come peraltro descritto anche in altre specie (Franci *et al.*, 1989). Una spiegazione potrebbe essere legata al fatto che alla nascita, fra i tratti infantili tipici del cucciolo, come in molti altri erbivori, vi è anche la notevole lunghezza degli arti, in particolar modo quelli anteriori, che di conseguenza crescono poi proporzionalmente più lentamente rispetto ad altri parametri. Questo sarebbe confermato dal fatto che, per cogliere differenze significative fra classi di età, si debbano considerare non due classi vicine

(classe 0 e classe 1), ma considerare un intervallo di tempo maggiore, saltando almeno una classe (classe 0 e classe 2, oppure classe 0 e classe 3).

Ad eccezione dell'anno 2006, tra le altre classi di età, le femmine adulte (classe 2) e quelle vecchie (classe 3) si sono caratterizzate per valori non diversi tra loro, ma significativamente più elevati ($P \leq 0,05$) rispetto a quelli osservati nelle femmine subadulte e di classe 0. Nei maschi, le variazioni tra le diverse classi di età sono risultate differenti tra i diversi anni di prelievo, anche se, in linea generale, sembrano indicare differenze poco significative.

Per questo parametro non sono state osservate differenze tra maschi e femmine in nessuna classe di età e nemmeno variazioni tra i soggetti di uno stesso sesso tra anni diversi.

Lunghezza arto posteriore

Tabella A8 – Medie stimate della lunghezza arto posteriore (cm) dei caprioli (*Capreolus capreolus*) abbattuti nell'ATC PR4: dati relativi a 1495 schede biometriche.

Anno	2004		2005		2006		2007		ES
Sesso	M	M	F	M	F	M	F		
No.	133	188	202	180	228	224	229		
Classe di età:									
0		^a 33,1 _A	32,6 _A	^{ab} 33,7 _A	33,1 _A	^b 34,1 _A	33,1 _A		0,1
1	^a 34,2 _A	^{ab} 34,8 _B	34,0 _B	^b 35,0 _B	34,3 _B	^b 35,2 _B	34,3 _B		0,1
2	^a 34,4 _B	^{ab} 35,2 _B	34,8 _C	^b 35,8 _C	34,9 _B	^b 35,6 _B	35,3 _C		0,1
3	^a 34,5 _C	^{ab} 35,1 _B	35,2 _C	^b 35,8 _C	34,7 _B	^b 35,4 _B	35,2 _C		0,1

Significatività statistica della differenza tra sessi: i due valori evidenziati in grigio sono risultati significativamente differenti tra loro per $P \leq 0,05$.

^{a, b} Significatività statistica della differenza tra gli anni nei caprioli maschi: valori con lettere diverse nella stessa riga differiscono per $P \leq 0,05$.

A, B, C Significatività statistica della differenza tra classi di età: valori con lettere diverse nella stessa colonna differiscono per $P \leq 0,05$.

Sia nei maschi che nelle femmine, i soggetti subadulti (classe 1) hanno evidenziato valori della lunghezza arto posteriore significativamente più elevati ($P \leq 0,05$) rispetto a

quelli osservati nei caprioli di classe 0 (Tabella A8). La differenza è risultata all'incirca della stessa entità nei maschi e nelle femmine; in particolare, compresa tra 1,1 cm e 1,7 cm nei maschi e compresa tra 1,2 cm e 1,4 cm nelle femmine. Nei soggetti adulti (classe 2) di entrambi i sessi, i valori osservati sono risultati mediamente più elevati rispetto a quelli osservati nei caprioli subadulti, tuttavia la differenza a favore degli adulti è risultata statisticamente significativa nell'anno 2006, per i maschi, e negli anni 2005 e 2007 per le femmine.

Nel corso degli anni di campionamento, le differenze osservate tra maschi e femmine non hanno permesso di delineare una tendenza chiara, anche se, quando è stata raggiunta la significatività statistica ($P \leq 0,05$), la differenza è risultata sempre a favore dei soggetti maschi: tra i soggetti di classe di età 0 nell'anno 2007, tra i soggetti di classe 1 (subadulti) negli anni 2005 e 2007, tra quelli di classe 2 negli anni (adulti) e tra quelli di classe 3 (vecchi) nell'anno 2006.

Nelle femmine, i valori osservati non sono risultati differenti tra i diversi anni del campionamento. Per quanto riguarda i maschi, invece, è stato osservato un tendenziale incremento in tutte le classi di età, dal 2004 al 2007.

Come accennato per l'arto anteriore, anche la lunghezza dell'arto posteriore sembra avere una crescita più lenta rispetto agli altri parametri: i suoi valori di coefficiente allometrico sono in effetti i più bassi dopo quelli dell'arto anteriore, sia rispetto al peso pieno che rispetto all'altezza al garrese (Soffiantini *et al.*, 2003). Con buona probabilità ciò può essere messo in relazione al fatto che alla nascita l'arto posteriore, come già visto per l'anteriore, abbia già una notevole lunghezza.

Circonferenza base collo

Nella tabella A9 sono mostrati i valori stimati del parametro circonferenza base collo dei caprioli abbattuti in rapporto ai fattori sesso, classe di età e anno.

Sia per i maschi che per le femmine, i soggetti subadulti (classe 1) hanno registrato valori della circonferenza base collo tendenzialmente più elevati rispetto a quelli rilevati nei soggetti di classe 0; tuttavia, la significatività statistica della differenza

($P \leq 0,05$) a favore dei subadulti (classe) è stata osservata solo nell'anno 2007 per i maschi e negli anni 2006 e 2007 per le femmine. Anche per questo parametro è probabile che il minor arco temporale che intercorre tra i maschi di classe 0 e quelli di classe 1 sia insufficiente per permettere di generare differenze apprezzabili sotto il profilo statistico; ciò risulta ancora più evidente se si confrontano le differenze tra subadulti e soggetti di classe 0 nei maschi e nelle femmine: nei maschi, anche quando statisticamente significativa, la differenza a favore dei subadulti è risultata di 1,7 cm, mentre nelle femmine la stessa differenza è risultata compresa tra 2,8 cm e 3,0 cm. Sia gli adulti (classe 2) maschi che quelli femmina hanno registrato valori di circonferenza base collo significativamente maggiori ($P \leq 0,05$) di quelli dei soggetti subadulti (classe 1), eccezion fatta per le femmine dell'anno 2006 e dei maschi dell'anno 2007, anno in cui il valore del parametro, seppur mediamente più elevato negli adulti, è risultato statisticamente non diverso da quello dei soggetti di classe 0.

Tabella A9 – Medie stimate della circonferenza base collo (cm) dei caprioli (*Capreolus capreolus*) abbattuti nell'ATC PR4: dati relativi a 1495 schede biometriche.

Anno	2004		2005		2006		2007		ES
Sesso	M	M	F	M	F	M	F		
No.	133	188	202	180	228	224	229		
Classe di età:									
0		35,5 _A	32,3 _A	32,5 _A	30,8 _A	31,8 _A	30,8 _A		0,3
1	32,3 _A	33,5 _A	33,2 _A	32,5 _A	33,6 _B	33,5 _B	33,8 _B		0,2
2	36,4 _B	37,7 _B	35,3 _B	37,9 _B	34,7 _B	36,3 _B	36,1 _C		0,2
3	^b 38,2 _C	^b 38,7 _B	^b 36,5 _B	^b 38,5 _B	^a 34,6 _B	^a 36,2 _B	^{ab} 36,1 _C		0,3

Significatività statistica della differenza tra sessi: i due valori evidenziati in grigio sono risultati significativamente differenti tra loro per $P \leq 0,05$.

^{a, b} Significatività statistica della differenza tra gli anni nei caprioli femmina: valori con lettere diverse nella stessa riga differiscono per $P \leq 0,05$.

^{a, b} Significatività statistica della differenza tra gli anni nei caprioli maschi: valori con lettere diverse nella stessa riga differiscono per $P \leq 0,05$.

A, B, C Significatività statistica della differenza tra classi di età: valori con lettere diverse nella stessa colonna differiscono per $P \leq 0,05$.

Appare importante rilevare che l'entità della differenza tra adulti e subadulti è risultata tendenzialmente più elevata nei maschi (tra 2,8 cm e 5,4 cm) che nelle femmine (tra 1,1 cm e 2,3 cm). In entrambi i sessi, ancora una volta, i soggetti vecchi (classe 3) hanno registrato valori di circonferenza base collo statisticamente non differenti rispetto a quelli osservati nei soggetti adulti (classe 2), tranne che per i maschi vecchi abbattuti nell'anno 2004 il cui valore di circonferenza base collo è risultato significativamente più elevato (+ 1,8 cm; $P \leq 0,05$) di quello degli adulti.

Per quanto riguarda la differenza tra sessi, i maschi hanno mostrato valori tendenzialmente maggiori rispetto alle femmine (tranne nel 2006 e 2007 per la classe 1), anche se statisticamente significativi solo negli anni 2005 e 2006, dove i maschi adulti e quelli vecchi hanno fatto registrare valori di circonferenza base collo significativamente più elevati ($P \leq 0,05$) di quelli delle femmine di pari classe di età.

E' interessante soffermarsi brevemente sulle differenze fra sessi emerse per questo parametro. Anche per la circonferenza base collo, come per la circonferenza toracica, va considerato l'effetto potenzialmente distorsivo della muta. Prendendo in considerazione le singole classi di età è possibile fare le seguenti riflessioni. Per gli animali di classe 0, i maschi hanno mostrato valori tendenzialmente maggiori rispetto alle femmine, anche se statisticamente non significativi. Si ricorda che per questa classe di età, i soggetti di sesso diverso vengono abbattuti contemporaneamente, quindi alla stessa età (8-9 mesi) e con la stessa muta (invernale). Le differenze registrate, seppur non statisticamente significative, sono quindi da mettere in relazione al dimorfismo sessuale. Per gli animali di classe 1, va ricordato che le femmine vengono abbattute quando hanno 5 mesi in più dei maschi e durante l'inverno, quando hanno il voluminoso mantello invernale. Nonostante questo, non sono state registrate differenze significative e le tendenze non hanno dato una chiara indicazione (valori maggiori nei maschi nell'anno 2005; valori maggiori nelle femmine negli anni 2006 e 2007).

Per le classi di età 2 e 3, sia nel 2005 che nel 2006 i maschi hanno mostrato valori statisticamente maggiori rispetto alle femmine e, nel 2007, questa tendenza si è mantenuta, anche se non in modo statisticamente significativo. Sebbene le femmine vengano abbattute e misurate quando hanno la muta invernale, i maschi fanno comunque registrare valori maggiori, confermando che la circonferenza del collo sia

un carattere sessuale secondario. Inoltre, i maschi vengono abbattuti poco prima e poco dopo il periodo degli amori quando, sotto l'impulso del testosterone, essi subiscono modificazioni morfologiche e comportamentali che sono funzionali alla riproduzione. Fra questi cambiamenti pare vi sia anche l'aumento della circonferenza del collo (Mattioli, comunicazione personale), anche a fronte di una diminuzione del peso corporeo (vedi paragrafo successivo).

Effetto del periodo degli accoppiamenti sul peso pieno dei soggetti maschi di classe 1, 2 e 3

Nella tabella A10 sono mostrate le medie stimate del peso vivo dei maschi subadulti (classe di età 1) e dei maschi adulti (classi di età 2 e 3) prima e dopo il periodo degli accoppiamenti. Per quanto riguarda i maschi subadulti, non sono state osservate variazioni statisticamente significative del peso pieno tra i due periodi considerati. Il peso pieno dei maschi adulti (classe di età 2 + classe di età 3) rilevato nel periodo metà agosto-fine settembre, invece, è risultato significativamente più basso (-7%; $P \leq 0,05$) rispetto al valore rilevato nel periodo fine giugno-luglio. La differenza è risultata statisticamente significativa e della stessa entità circa in tutti gli anni del campionamento (2004, 2005, 2006 e 2007).

Tabella A10 – Medie stimate del peso pieno (kg) dei caprioli maschi abbattuti nei due periodi di che caratterizzano il prelievo venatorio estivo nell'ATC PR 4: dati relativi alle schede biometriche raccolte negli anni 2004, 2005, 2006 e 2007.

Periodo	1 ¹	2 ²	ES
No.	220	264	
Classi di età:			
1	22,9	22,5	0,2
2-3	28,0_A	26,0_B	0,2

¹ primi quindici giorni di luglio;

² dalla metà di agosto alla metà di settembre;

_{A, B} valori con lettere diverse nella stessa riga differiscono per $P \leq 0,05$

Questi riscontri quantificano e avvalorano le conoscenze relative alla biologia della specie.

Innanzitutto la mancanza di differenze significative all'interno della classe 1, conferma la scarsa partecipazione degli animali subadulti alle dinamiche riproduttive.

Al contrario, la presenza di differenze significative all'interno delle classi adulte (classi 2 e 3) confermano come il periodo degli accoppiamenti sia un momento molto dispendioso per i maschi di capriolo, in termini energetici. Essi, infatti, sfruttando una

strategia riproduttiva di tipo territoriale, durante il periodo degli amori pattugliano costantemente il territorio che si sono conquistati al fine di difenderlo da eventuali rivali intrusi e al fine di intercettare e corteggiare le femmine che vi transitano. Questo incessante impegno causa notevole perdita di energie ed inoltre costringe gli animali a ridurre il tempo da dedicare alla brucatura: aumenta il dispendio a fronte di una riduzione dell'ingestione.

Confronto fra animali abbattuti in aree diverse

Al fine di facilitare la gestione faunistica-venatoria, l'ATC PR 4 è suddiviso in 5 aree (1, 2, 3, 4, 5), di superficie simile fra loro. Queste unità territoriali sono state individuate cercando di rispettare quanto possibile la presenza di confini naturali (es. presenza di corsi d'acqua) o artificiali (es. presenza di strade).

E' stata effettuata un'elaborazione statistica delle misure morfologiche tenendo conto, oltre che dei fattori sesso e classe di età, anche dell'area di abbattimento. In questa analisi è stata omessa la variabile anno, al fine di evitare di scomporre eccessivamente il campione.

Poiché il numero di animali da prelevare in ogni area è funzione dalla densità di popolazione stimata, la numerosità del campione non è stata sempre omogenea. In linea generale, per le aree 1, 2 e 5, le dimensioni del campione possono essere considerate buone ed equilibrate fra loro, per tutti gli anni di osservazione, da un minimo di 102 capi dell'area 5 nel 2006 ad un massimo di 157 capi dell'area 2 nel 2007. L'area 3 ha mostrato una numerosità che, indipendentemente dall'anno, si è rivelata la metà di quella delle tre aree appena descritte (1, 2, 5). L'area 4, infine, ha sempre evidenziato una numerosità al di sotto del 10% di quella delle aree 1, 2 e 5. Se si tiene conto che il campione riferito ad ogni area è poi stato suddiviso per sesso e per classi di età, è comprensibile come per le aree 3 e 4 esso è risultato eccessivamente "diluito". Questo può spiegare almeno in parte il comportamento talvolta ambiguo che hanno mostrato alcune misure biometriche dei caprioli delle aree 3 e 4, se confrontati con i caprioli delle aree 1, 2 e 5 (dati non mostrati).

Escludendo quindi le aree 3 e 4 dalla discussione, è stato possibile individuare la tendenza dei caprioli dell'area 1 a differenziarsi con valori che, per tutti i parametri, sono risultati inferiori, soprattutto rispetto a quelli dell'area 5 (Tabella A11 e Tabella A12). In modo particolare, le differenze significative si sono concentrate per l'arto posteriore e per la lunghezza totale. I soggetti dell'area 2 sono risultati avere caratteristiche intermedie fra quelle dei caprioli dell'area 1 e quelli dell'area 5.

La prima ipotesi che è possibile avanzare è legata alle caratteristiche ambientali:

- l'area 1 si estende per la maggior parte su territorio collinare medio-alto: le altimetrie sono sempre comprese fra i 400 m s.l.m. ed i 1115 m s.l.m. della vetta del Monte Fuso;
- l'area 5 si colloca in un ambiente di pianura e prima collina con altimetrie che variano dai 150 m s.l.m. ai 570 m s.l.m. del Monte Sommariva, ma con valori che si aggirano per la maggior parte sui 300-350 m s.l.m.;
- l'area 2, sviluppandosi in senso longitudinale, tocca sia aree pressoché pianeggianti sia aree di media collina: le altimetrie variano dai 150 m s.l.m. ai 519 m s.l.m. del Monte Rosso.

In linea generale l'ambiente più favorevole al capriolo è quello di pianura e media collina, dove le fonti alimentari sono spesso molto ricche e disponibili costantemente nel corso di tutto l'anno, poiché legate alle colture agricole (es. erba medica e cereali autunno-vernini). Sulla collina medio-alta, invece, sono meno frequenti colture agricole ed inoltre, in questi ambienti, è possibile che durante l'inverno vi sia una copertura nevosa di maggiore entità e con maggiore persistenza.

Il presente lavoro sembra suggerire che sono apprezzabili alcune differenze biometriche anche fra animali che vivono in territori le cui altimetrie differiscono per poche centinaia di metri. Ad ogni modo, al fine di valutare con maggiore precisione l'impatto dell'ambiente sulle caratteristiche morfologiche dei caprioli sarebbe opportuno ottenere informazioni più dettagliate almeno sulle caratteristiche del territorio, sull'impatto antropico, sulle caratteristiche meteorologiche e sull'esposizione dei versanti.

Risultati

Tabella A11 – Medie stimate delle caratteristiche biometriche (peso pieno, lunghezza totale, altezza garrese, circonferenza toracica) dei caprioli abbattuti nelle aree 1, 2 e 5 negli anni 2004÷2007 nell'ATC PR 4.

Area	Peso pieno kg			Lunghezza totale cm			Altezza garrese cm			Circonferenza toracica cm		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5	1	2	5
N.	407	464	384	374	434	363	374	437	364	376	437	363
Classe di età-sesso:												
0-F	18,4	18,0	18,3	103,1	103,9	104,5	62,2	64,3	63,4	61,1 _A	63,2 _B	63,8 _B
0-M	19,4	18,7	18,9	103,4 _A	106,3 _B	104,6 _{AB}	63,4	64,3	64,4	63,4	64,1	65,2
1-F	22,7 _{AB}	21,8 _A	22,8 _B	109,6	111,2	111,4	65,2 _A	67,2 _B	66,9 _B	67,3 _A	68,7 _{AB}	69,3 _B
1-M	22,6	22,4	22,9	111,6 _A	112,5 _A	114,4 _B	67,6	67,8	67,7	65,6	64,8	65,0
2-F	25,1	24,4	25,2	111,7 _A	115,9 _B	115,2 _B	69,1	68,5	67,8	71,1	71,2	71,4
2-M	25,8 _A	25,9 _{AB}	26,8 _B	116,4 _A	117,0 _A	119,4 _B	69,5	69,6	70,0	67,8	66,8	68,6
3-F	25,8	25,5	25,7	113,1	114,2	113,1	67,9 _A	70,2 _B	70,7 _B	72,0	71,6	72,9
3-M	26,1 _A	26,3 _A	27,7 _B	116,5 _A	119,2 _B	120,1 _B	68,4 _A	69,5 _{AB}	71,2 _B	67,0	67,7	68,5
ES	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2

_{A,B,C} valori con lettere diverse nella stessa riga differiscono per $P \leq 0,05$.

Tabella A12 – Medie stimate delle caratteristiche biometriche (lunghezza orecchio, lunghezza arto anteriore, lunghezza arto posteriore, circonferenza base collo) dei caprioli abbattuti nelle aree 1, 2 e 5 negli anni 2004÷2007 nell'ATC PR 4.

Area	Lunghezza orecchio kg			Lunghezza arto anteriore cm			Lunghezza arto posteriore cm			Circonferenza base collo cm		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5	1	2	5
N.	377	439	361	348	437	360	377	436	176	378	435	359
Classe di età-sesso:												
0-F	13,7	14,1	14,1	25,5	26,0	25,9	32,5 _A	32,7 _{AB}	33,4 _B	30,4	30,9	30,9
0-M	14,2	14,3	14,6	25,0 _A	26,4 _B	26,8 _B	32,5 _A	33,7 _B	34,1 _B	31,4	31,7	33,0
1-F	14,5 _A	14,7 _{AB}	15,0 _B	26,0	26,2	26,5	33,6 _A	34,1 _{AB}	34,6 _B	33,4	33,6	33,2
1-M	14,7	14,9	15,0	26,2 _A	26,5 _B	26,9 _B	34,3 _A	34,6 _A	35,3 _B	31,8 _A	32,6 _{AB}	33,6 _B
2-F	14,8 _A	15,8 _B	15,9 _B	26,4 _A	27,2 _B	27,5 _B	33,7 _A	35,3 _B	35,7 _B	34,9	35,5	34,5
2-M	15,3	15,5	15,1	26,6	27,0	27,1	34,9	35,3	35,3	37,1	36,1	36,9
3-F	15,2	15,4	15,3	27,3	27,2	27,8	34,4 _A	34,8 _{AB}	35,6 _B	35,3	34,6	35,3
3-M	15,4 _{AB}	15,0 _A	15,7 _B	26,6	27,0	27,4	34,4 _A	34,9 _A	36,0 _B	36,4	37,6	38,3
ES	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2

_{A,B,C} valori con lettere diverse nella stessa riga differiscono per $P \leq 0,05$.

Effetto del fattore tempo sulle caratteristiche morfologiche degli animali

Poiché il confronto fra le misure morfologiche raccolte in anni diversi fra il 2004 ed il 2007 non ha evidenziato un *pattern* chiaro, si è pensato di sfruttare 178 schede biometriche riferite ad animali abbattuti nell'ATC PR 4 fra il 1999 ed il 2002, in occasione della stesura di una tesi di laurea (Soffiantini, 2002), al fine di allungare l'intervallo di osservazione e favorire l'emergere di eventuali tendenze.

In primo luogo è stato effettuato un confronto fra i due set di dati: set 1 (1999, 2000, 2001 e 2002) e set 2 (2004, 2005, 2006 e 2007) (Tabella A13; Tabella A14).

In secondo luogo è stato effettuato un confronto fra gli estremi temporali del database globale (1999÷2002 + 2004÷2007), al fine di esaltare eventuali differenze. Per questa osservazione sono stati scelti i dati relativi al 2000 e quelli relativi al 2007 (Tabella A15; Tabella A16). Si è evitato di utilizzare il campione del 1999 per la scarsissima numerosità (n=6).

Poiché nel campione del 2000 non sono presenti femmine di capriolo di classe 3, è stata effettuata una elaborazione confrontando i dati relativi al 2001 e quelli del 2007 (Tabella A17; Tabella A18).

Infine, per evitare che il comportamento particolare dell'anno 2007 evidenziato nell'analisi della varianza esposta in precedenza potesse aver falsato il confronto fra l'anno 2001 e l'anno 2007, sono stati confrontati il 2001 con il 2006 (Tabella A19; Tabella A20).

Confronto fra set 1 (1999÷2002) e set 2 (2004÷2007)

Dal confronto fra i due set non sono emerse differenze significative se non nei maschi di classe 1 per l'arto posteriore, nelle femmine di classe 2 per altezza al garrese e per la circonferenza toracica e nei maschi di classe 2 per l'arto posteriore. Inoltre, tali differenze sono risultate a favore del set 1 piuttosto che del set 2 in modo non univoco. Per queste ragioni, sembra possibile definire pressoché “analogo” la morfologia degli animali del set 1 e del set 2.

Confronto fra gli estremi temporali del database

Né il confronto fra i due set, né i confronti fra gli estremi temporali del database hanno permesso di evidenziare modificazioni morfologiche dei caprioli nel corso degli anni. Per nessuno dei confronti sono emerse differenze significative per il peso pieno. Gli altri parametri hanno mostrato alcune differenze, la cui distribuzione non ha permesso di ipotizzare l'esistenza di una tendenza che porti al cambiamento della morfologia degli animali. Le differenze registrate potrebbero essere interpretate come fluttuazioni "fisiologiche" che possono emergere nello studio di fenomeni biologici.

Questo tipo di risultato può essere definito rassicurante nell'ottica della gestione faunistico-venatoria. Condurre un'indagine di questo tipo su una popolazione di animali soggetta a gestione faunistica e a prelievo venatorio selettivo può dare un indice degli effetti che questi due fattori hanno sulla popolazione in esame.

Considerando che la gestione del capriolo all'interno dell'ATC PR 4 è iniziata nel 1997 e che da allora la popolazione è stata soggetta ad un prelievo venatorio sempre maggiore, a fronte di una sempre maggiore densità, per il momento sembra possibile affermare che questo tipo di attività non abbia avuto effetto sulle caratteristiche degli animali, almeno dal punto di vista morfologico.

Per esser certi che eventuali modificazioni non siano emerse a causa dell'inadeguatezza dell'intervallo temporale considerato (1999-2007) perché si esplicitino fenomeni biologici così complessi, è auspicabile continuare la raccolta dei dati annuali in modo preciso e sistematico, anche nell'ottica di quella che è stata definita "gestione adattativa", cioè una gestione faunistica che prevede il continuo e pianificato controllo dei risultati e degli effetti ottenuti al fine di modulare le scelte successive.

Risultati

Tabella A13 – Medie stimate delle caratteristiche biometriche (peso, pieno, lunghezza totale, altezza garrese, circonferenza toracica) dei caprioli abbattuti negli anni 1999+2002 (99+02) e negli anni 2004-2007 (04+07) nell'ATC PR 4.

Parametro	Peso pieno (kg)		Lunghezza totale (cm)		Altezza garrese (cm)		Circonferenza toracica (cm)	
	99+02	04+07	99+02	04+07	99+02	04+07	99+02	04+07
Anni								
No.	178	1483	177	1476	178	1479	178	1480
Classe di età-sesso:								
0-F	17,5	18,4	102,3	104,3	63,8	63,5	60,9	62,9
0-M	18,9	18,9	104,6	104,7	64,0	64,0	63,9	64,2
1-F	22,6	22,3	109,6	111,0	66,2	66,6	67,8	68,3
1-M	23,3	22,8	111,8	112,9	67,2	67,8	64,2	65,3
2-F	25,5	24,8	114,1	114,6	71,2	68,6	68,8	71,2
2-M	26,9	26,3	115,9	118,0	70,2	69,8	66,5	67,8
3-F	26,5	25,5	116,9	114,1	68,9	69,9	70,7	71,6
3-M	26,4	26,8	117,1	118,8	69,1	67,7	67,2	67,6
ES	0,3	0,1	0,6	0,2	0,4	0,1	0,4	0,1

I valori evidenziati in grigio sono risultati significativamente differenti tra loro per $P \leq 0,05$.

Tabella A14 – Medie stimate delle caratteristiche biometriche (lunghezza orecchio, lunghezza arto anteriore, lunghezza arto posteriore, circonferenza base collo) dei caprioli abbattuti negli anni 1999+2002 (99+02) e negli anni 2004+2007 (04+07) nell'ATC PR 4.

Parametro	Lunghezza orecchio (cm)		Lunghezza arto anteriore (cm)		Lunghezza arto posteriore (cm)		Circonferenza base collo (cm)	
	99+02	04+07	99+02	04+07	99+02	04+07	99+02	04+07
Anni								
No.	177	1483	176	1478	175	1479	178	1472
Classe di età-sesso:								
0-F	14,1	14,0	25,8	25,8	32,0	32,9	30,7	31,0
0-M	14,2	14,3	26,4	26,2	32,3	33,5	32,1	31,9
1-F	15,0	14,7	26,2	26,2	33,5	34,1	33,8	33,4
1-M	15,2	14,9	26,6	26,6	35,6	34,8	33,5	32,8
2-F	15,1	15,5	26,6	27,0	34,4	34,9	36,7	35,2
2-M	15,6	15,4	26,8	26,9	34,2	35,2	36,7	36,9
3-F	15,7	15,4	26,6	27,5	35,1	34,9	37,0	35,5
3-M	15,6	15,3	27,0	27,0	34,6	35,1	38,7	37,6
ES	0,1	0,03	0,1	0,05	0,2	0,1	0,3	0,1

I valori evidenziati in grigio sono risultati significativamente differenti tra loro per $P \leq 0,05$.

Risultati

Tabella A15 – Medie stimate delle caratteristiche biometriche (peso pieno, lunghezza totale, altezza garrese, circonferenza toracica) dei caprioli abbattuti nell'anno 2000 e nell'anno 2006 nell'ATC PR 4.

Parametro	Peso pieno (kg)		Lunghezza totale (cm)		Altezza garrese (cm)		Circonferenza toracica (cm)	
	2000	2006	2000	2006	2000	2006	2000	2006
Anno								
No.	50	442	50	433	50	440	50	437
Classe di età-sesso:								
0-F	17,6	18,1	102,7	105,0	62,0	63,8	61,7	61,4
0-M	19,0	18,4	114,0	105,9	60,0	64,0	70,0	62,5
1-F	22,2	22,0	105,7	111,5	69,7	67,0	68,5	67,9
1-M	24,2	22,7	112,4	113,9	67,7	68,0	64,9	65,5
2-F	24,7	24,5	110,0	115,0	70,7	69,1	71,5	71,3
2-M	27,3	26,2	114,2	118,4	70,1	70,6	66,3	67,7
3-F								
3-M	26,5	25,7	116,0	120,0	70,6	69,5	67,3	67,2
ES	0,5	0,2	1,0	0,4	0,7	0,2	0,7	0,3

I valori evidenziati in grigio sono risultati significativamente differenti tra loro per $P \leq 0,05$.

Tabella A16 – Medie stimate delle caratteristiche biometriche (lunghezza orecchio, lunghezza arto anteriore, lunghezza arto posteriore, circonferenza base collo) dei caprioli abbattuti nell'anno 2000 e nell'anno 2006 nell'ATC PR 4.

Parametro	Lunghezza orecchio (cm)		Lunghezza arto anteriore (cm)		Lunghezza arto posteriore (cm)		Circonferenza base collo (cm)	
	2000	2006	2000	2006	2000	2006	2000	2006
Anno								
No.	50	441	50	438	49	440	50	431
Classe di età-sesso:								
0-F	15,2	13,8	26,4	25,6	32,0	33,0	32,3	30,5
0-M	13,0	14,4	25,0	26,4	24,0	34,1	33,0	31,6
1-F	14,3	14,4	24,7	26,2	33,7	34,2	33,1	33,6
1-M	14,7	14,5	27,3	26,6	35,3	35,1	34,6	33,3
2-F	15,2	15,2	25,2	26,9	34,2	35,2	38,2	35,8
2-M	15,3	15,3	26,8	26,6	34,1	35,5	37,8	36,1
3-F								
3-M	15,3	14,6	27,2	26,8	34,6	35,3	39,5	36,0
ES	0,2	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,6	0,2

I valori evidenziati in grigio sono risultati significativamente differenti tra loro per $P \leq 0,05$.

Risultati

Tabella A17 – Medie stimate delle caratteristiche biometriche (peso pieno, lunghezza totale, altezza garrese, circonferenza toracica) dei caprioli abbattuti nell'anno 2001 e nell'anno 2007 nell'ATC PR 4.

Parametro	Peso pieno		Lunghezza totale		Altezza garrese		Circonferenza toracica	
	(kg)		(cm)		(cm)		(cm)	
Anno	2001	2007	2001	2007	2001	2007	2001	2007
No.	74	503	74	503	74	501	74	504
Classe di età-sesso:								
0-F	18,4	18,1	102,3	105,0	65,3	63,8	59,0	61,4
0-M	19,0	18,4	100,0	105,9	65,0	64,0	60,0	62,5
1-F	22,7	22,0	109,5	111,5	66,5	67,0	67,6	67,9
1-M	22,7	22,7	111,1	113,9	66,5	68,0	63,7	65,5
2-F	25,8	24,5	115,4	115,0	72,3	69,1	67,6	71,3
2-M	26,5	26,2	117,2	118,4	70,2	70,7	66,6	67,7
3-F	27,1	25,0	114,5	114,3	68,5	70,4	72,5	71,6
3-M	26,4	25,7	118,0	120,0	67,6	69,5	67,2	67,2
ES	0,4	0,2	0,9	0,3	0,6	0,2	0,6	0,2

I valori evidenziati in grigio sono risultati significativamente differenti tra loro per $P \leq 0,05$.

Tabella A18 – Medie stimate delle caratteristiche biometriche (lunghezza orecchio, lunghezza arto anteriore, lunghezza arto posteriore, circonferenza base collo) dei caprioli abbattuti nell'anno 2001 e nell'anno 2007 nell'ATC PR 4.

Parametro	Lunghezza orecchio		Lunghezza arto anteriore		Lunghezza arto posteriore		Circonferenza base collo	
	(cm)		(cm)		(cm)		(cm)	
Anno	2001	2007	2001	2007	2001	2007	2001	2007
No.	73	505	74	504	74	504	74	503
Classe di età-sesso:								
0-F	13,6	13,8	25,6	25,6	32,5	33,0	29,4	30,5
0-M	17,0	14,4	29,0	26,4	35,0	34,1	30,0	31,6
1-F	15,3	14,4	25,8	26,2	32,9	34,2	32,7	33,6
1-M	15,2	14,5	25,9	26,6	32,3	35,1	32,7	33,3
2-F	15,1	15,2	27,1	26,9	34,7	35,2	35,0	35,8
2-M	15,8	15,3	26,8	26,6	34,4	35,5	35,7	36,1
3-F	14,9	15,5	26,5	27,5	34,9	35,2	35,2	36,0
3-M	15,7	14,6	26,8	26,8	34,7	35,3	37,8	36,0
ES	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,5	0,2

I valori evidenziati in grigio sono risultati significativamente differenti tra loro per $P \leq 0,05$.

Risultati

Tabella A19 – Medie stimate delle caratteristiche biometriche (peso pieno, lunghezza totale, altezza garrese, circonferenza toracica) dei caprioli abbattuti nell'anno 2001 e nell'anno 2006 nell'ATC PR 4.

Parametro	Peso pieno		Lunghezza totale		Altezza garrese		Circonferenza toracica	
	(kg)		(cm)		(cm)		(cm)	
Anno	2001	2006	2001	2006	2001	2006	2001	2006
No.	74	442	74	433	74	440	74	437
Classe di età-sesso:								
0-F	18,4	18,8	102,3	105,7	65,3	64,3	59,0	64,2
0-M	19,0	19,2	100,0	104,0	65,0	64,6	60,0	64,9
1-F	22,7	22,6	109,5	111,2	66,5	66,6	67,6	68,4
1-M	22,7	22,7	111,1	112,9	66,5	68,4	63,7	66,0
2-F	25,8	24,9	115,4	115,7	72,3	68,7	67,6	71,3
2-M	26,5	26,4	117,2	118,9	70,2	69,9	66,6	67,6
3-F	27,1	25,6	114,5	114,1	68,5	69,2	72,5	71,1
3-M	26,4	27,0	118,0	119,8	67,6	69,8	67,2	68,4
ES	0,4	0,2	0,9	0,3	0,6	0,2	0,6	0,2

I valori evidenziati in grigio sono risultati significativamente differenti tra loro per $P \leq 0,05$.

Tabella A20 – Medie stimate delle caratteristiche biometriche (lunghezza orecchio, lunghezza arto anteriore, lunghezza arto posteriore, circonferenza base collo) dei caprioli abbattuti nell'anno 2001 e nell'anno 2006 nell'ATC PR 4.

Parametro	Lunghezza orecchio		Lunghezza arto anteriore		Lunghezza arto posteriore		Circonferenza base collo	
	(cm)		(cm)		(cm)		(cm)	
Anno	2001	2006	2001	2006	2001	2006	2001	2006
No.	73	441	74	438	74	440	74	431
Classe di età-sesso:								
0-F	13,6	14,0	25,6	25,9	32,5	33,0	29,4	30,6
0-M	17,0	14,2	29,0	26,1	35,0	33,5	30,0	32,0
1-F	15,3	14,6	25,8	26,3	32,9	34,2	32,7	33,4
1-M	15,2	14,8	25,9	26,5	32,3	34,8	32,7	32,2
2-F	15,1	15,5	27,1	27,1	34,7	34,8	35,0	34,6
2-M	15,8	15,2	26,8	27,0	34,4	35,8	35,7	37,8
3-F	14,9	15,1	26,5	27,5	34,9	34,6	35,2	34,5
3-M	15,7	15,5	26,8	27,4	34,7	35,7	37,8	38,3
ES	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,5	0,2

I valori evidenziati in grigio sono risultati significativamente differenti tra loro per $P \leq 0,05$.

B. CRANIOMETRIA

Per 138 crani di caprioli maschi abbattuti nell'ATC PR 4 nell'anno 2006 si è cercato di rilevare 16 misure morfometriche. Tuttavia, per alcuni crani non è stato possibile effettuare tutte le rilevazioni (per mancanza di parti scheletriche) e, di conseguenza, il numero di osservazioni per alcuni parametri è risultato al di sotto di 138.

Le misure sono state scelte sulla base di quanto descritto da Lorenzini *et al.* (1996) e Argon *et al.* (1997) relativamente alle caratteristiche di caprioli provenienti da diverse regioni dell'Italia e dell'Europa.

Nella tabella B1 sono riportate le 16 misure effettuate, con la relativa definizione e nella figura B1 sono indicate le modalità di rilevamento.

Tabella B1 – Definizioni delle misure craniometriche rilevate in questo studio e corrispondenza con le analoghe definizioni riportate da Lorenzini *et al.* (1996) e da Argon *et al.* (1997).

Codice misura	Definizione misura	Dicitura riportata da Lorenzini <i>et al.</i> (1996) o da Argon <i>et al.</i> (1997)	Sigla
A	Lunghezza condilobasale	<i>Condylbasal lenght</i>	<i>CBL</i>
B	Lunghezza totale del cranio	<i>Total skull lenght</i>	<i>TSL</i>
C	Distanza fra l'osso incisivo e P2	<i>Lenght from prosthion to P2</i>	<i>PML</i>
D	Distanza fra l'osso incisivo e M3	<i>Lenght from prosthion to M3</i>	<i>M3LE</i>
E	Massima lunghezza dell'osso incisivo	<i>Greatest prosthion lenght</i>	<i>PRL</i>
F	Diametro del peduncolo destro	<i>Width of the right pedicle</i>	<i>RPW</i>
G	Diametro del peduncolo sinistro	<i>Width of the left pedicle</i>	<i>LPW</i>
H	Larghezza del neurocranio	<i>Neurocranium width</i>	<i>NEUW</i>
I	Ampiezza zigomatica	<i>Zygomatic width</i>	<i>ZYW</i>
J	Massima larghezza del nasale	<i>Greatest width across the nasals</i>	<i>NASW</i>
K	Lunghezza basale	<i>Basal lenght</i>	<i>BASL</i>
L	Larghezza dei condili occipitali	<i>Width of the occipidal condyles</i>	<i>COW</i>
M	Distanza fra il punto più rostrale del margine alveolare sul piano mediano ed il condilo	<i>Lenght of the mandible from infradentale to condyle</i>	<i>COLM</i>
N	Altezza della mandibola	<i>Hight of mandible</i>	<i>HEM</i>
O	Lunghezza della linea premolare della mandibola	<i>Lenght of the premolar row of the mandible</i>	<i>PRLM</i>
P	Altezza del neurocranio	<i>Neurocranium hight</i>	<i>HPC</i>

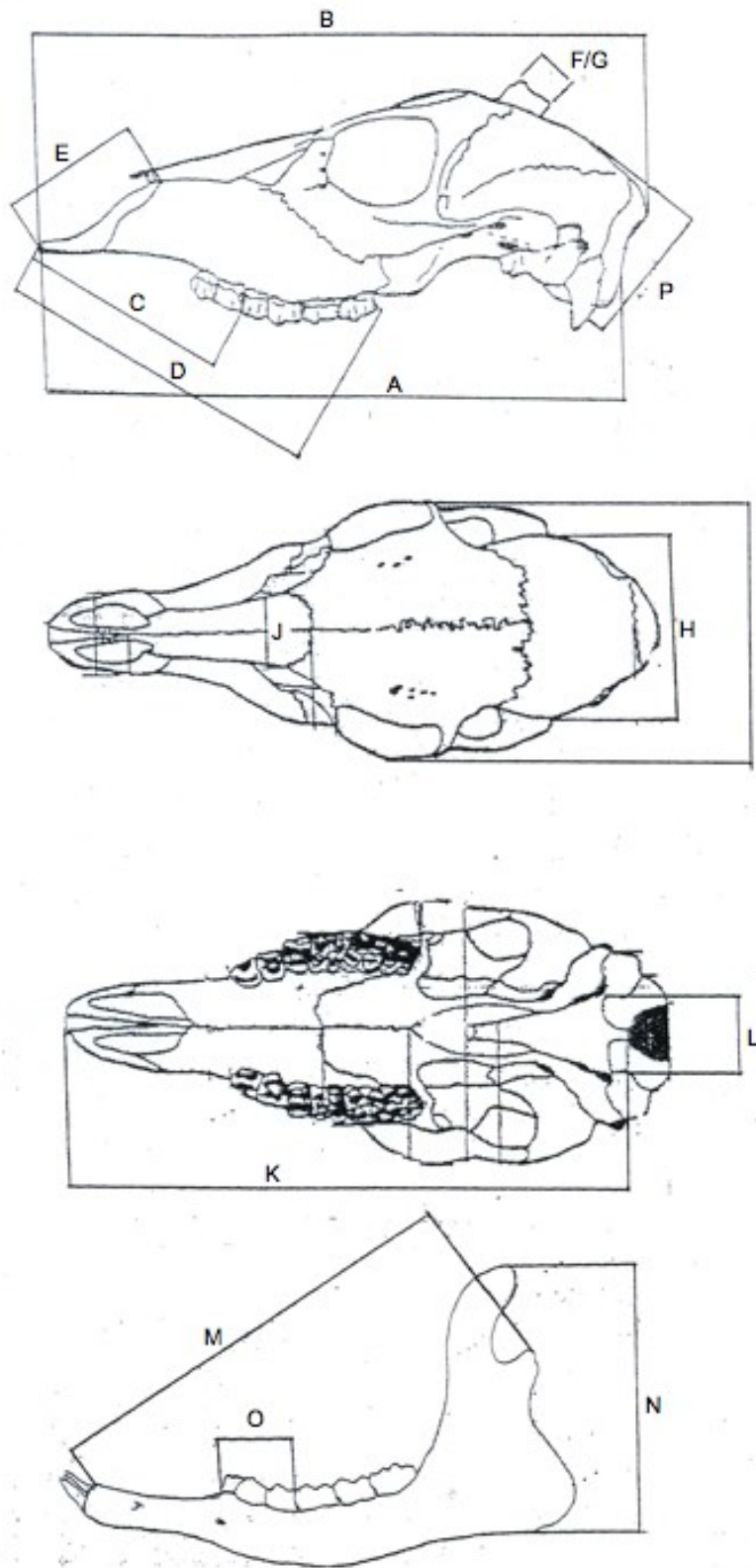


Figura B1 – Modalità di rilievo delle misure craniometriche considerate.

Tabella B2 - Statistiche descrittive del campione analizzato: dati raccolti da 138 crani di caprioli maschi abbattuti nell'anno 2006 nell'ATC PR 4.

Misura craniometrica		N.	Media	DS	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	CV %
A	mm	96	185,1	6,6	160,0	197,0	3,5
B	mm	96	194,1	7,2	171,0	207,0	3,7
C	mm	98	74,7	3,4	65,0	84,0	4,5
D	mm	99	114,1	3,9	98,0	121,0	3,4
E	mm	102	45,9	3,6	36,0	53,0	7,9
F	mm	135	19,1	4,5	7,0	27,0	23,5
G	mm	136	19,1	4,6	7,0	31,0	24,4
H	mm	138	60,1	2,6	51,0	65,0	4,4
I	mm	138	89,8	4,9	77,0	100,0	5,5
J	mm	129	24,2	2,2	19,0	30,0	9,0
K	mm	96	173,1	6,3	149,0	184,0	3,7
L	mm	122	35,8	1,5	33,0	40,0	4,2
M	mm	130	146,5	6,6	128,0	160,0	4,5
N	mm	129	86,8	5,0	73,0	99,0	5,7
O	mm	129	26,8	1,7	22,0	37,0	6,4
P	mm	131	52,0	2,0	47,0	56,0	3,9

Da un'analisi descrittiva delle misure considerate (Tabella B2) spicca l'elevata variabilità dei parametri F e G (diametro dei peduncoli destro e sinistro) come evidenziato dal valore dei coefficienti di variazione, pari rispettivamente a 23,5% e 24,4%. Nella tabella B3 sono mostrate le variazioni delle misure craniometriche in rapporto alla classe di età dei caprioli maschi. La maggior parte dei parametri ha evidenziato un incremento statisticamente significativo ($P \leq 0,05$) all'aumentare della classe di età dei soggetti.

Risultati

Tabella B3 - Medie stimate delle misure craniometriche (mm) di 138 caprioli maschi abbattuti nell'anno 2006 nell'ATC PR 4.

	Classe di età				ES
	0	1	2	3	
N. oss	10	46	68	14	
Misure craniometriche:					
A	176,0 A	181,2 A	187,1 B	190,6 B	0,6
B	185,0 A	190,5 A	196,3 B	198,8 B	0,7
C	70,0 A	72,2 A	75,6 B	77,4 B	0,3
D	100,5 A	112,7 B	115,3 C	115,9 C	0,4
E	39,5 A	44,8 B	47,4 B	48,0 B	0,4
F	10,1 A	15,5 B	21,7 C	22,8 C	0,4
G	10,1 A	15,3 B	21,4 C	24,1 D	0,4
H	57,2 A	59,2 B	61,1 C	61,1 C	0,2
I	80,3 A	86,9 B	93,2 C	92,2 C	0,4
J	22,8 A	22,9 A	24,5 B	25,9 B	0,2
K	162,5 A	168,9 A	174,6 B	179,0 C	0,7
L	35,2 A	35,4 A	36,0 A	36,4 A	0,1
M	135,9 A	143,6 B	149,7 C	151,7 C	0,6
N	78,7 A	85,5 B	89,3 C	87,6 C	0,5
O	29,1 A	27,0 B	26,5 BC	25,7 C	0,2
P	49,9 A	50,9 A	52,4 B	53,6 B	0,2

A,B,C, D valori con lettere diverse nella stessa riga differiscono per $P \leq 0,05$.

Fa eccezione il parametro O (lunghezza della linea premolare della madibola), i cui valori hanno evidenziato una diminuzione statisticamente significativa ($P \leq 0,05$) all'aumentare della classe di età. Per il parametro L (larghezza dei condili occipitali) non sono state osservate differenze significative tra le diverse classi di età, come se tale misura durante i primi 8-10 mesi di vita (età alla quale corrispondono le misure effettuate sui soggetti di classe 0) avesse già raggiunto le sue dimensioni definitive. Per semplicità di esposizione, le misure craniometriche sono state suddivise in due gruppi in funzione del comportamento osservato in rapporto alla classe di età: il gruppo delle misure D, E, F, G, H, I, M, N e O, la cui caratteristica comune è quella di evidenziare variazioni statisticamente significative ($P \leq 0,05$) tra i soggetti di classe 0 e i subadulti, e il gruppo delle misure A, B, C, J, K, L e P, in cui le misure rilevate nei soggetti di classe 0 e nei subadulti sono risultate tra loro non differenti.

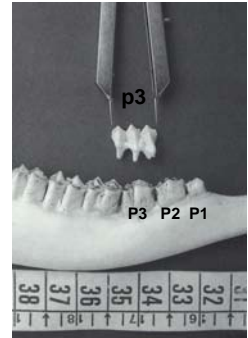
Gruppo misure D, E, F, G, H, I, M, N e O

Per le misure D, E, F, G, H, I, M e N i valori osservati nei caprioli maschi subadulti sono risultati significativamente maggiori ($P \leq 0,05$) rispetto a quelli osservati nei soggetti di classe 0. Tra questi parametri, spicca il netto incremento percentuale osservato nelle misure F e G, in cui i valori medi dei subadulti sono risultati oltre il 50% più elevati rispetto a quelli rilevati nei maschi di classe 0. Per le altre misure l'incremento è risultato chiaramente più contenuto e variabile tra il 3,4% (misura H, larghezza del neurocranio) e il 13,4% (misura E, massima lunghezza dell'osso incisivo). In termini assoluti, si distingue chiaramente la differenza per il parametro D, pari a poco più di 12 mm; per le altre misure la differenza è variata tra 1,9 mm (misura H) e 7,7 mm (misura M). Anche per la misura O, il valore osservato nei maschi di classe 1 è risultato significativamente differente ($P \leq 0,05$) rispetto a quello osservato nei maschi di classe 0, ma, come accennato in precedenza, più basso. La riduzione di tale parametro nei soggetti di classe 1 è risultata pari 2,1mm rispetto al valore dei maschi di classe zero, corrispondente al -7,4%.

Le misure D, F, G, H, I, M e N (tutte eccetto la E) hanno fatto registrare un incremento statisticamente significativo ($P \leq 0,05$) anche nel passaggio da subadulto (classe 1) ad adulto (classe 2); anche in questo caso si distingue nettamente la variazione percentuale osservata nelle misure F e G, in cui il valore degli adulti (classe 2) è risultato 40% circa più elevato rispetto a quello dei subadulti (classe 1); per le altre misure, la stessa variazione, seppur significativa, è risultata nettamente meno accentuata e compresa tra 2,3% e 7,7%. Per quanto riguarda la misura O, seppur tendenzialmente più basso, il valore osservato nell'adulto (classe 2) è risultato non differente rispetto a quello osservato nei subadulti. Non sono state osservate differenze significative tra le misure rilevate nei soggetti vecchi e in quelli adulti per le misure (D, E, F, H, I, M, N e O), eccezion fatta per la G, nella quale i soggetti vecchi hanno registrato un valore significativamente più elevato ($P \leq 0,05$) rispetto a quello degli adulti (+12,5%). Si ritiene rilevante riportare che, seppur statisticamente non significativa, anche per la misura F la differenza a favore dei vecchi è risultata mediamente piuttosto elevata e pari al 5,1%. I peduncoli sono le basi ossee sulle quali si sviluppano le due stanghe del palco. Essi si accrescono prima in altezza e con gli

anni acquistano progressivamente vigore (aumenta il loro diametro), proporzionalmente al potenziale genetico dell'animale e alla presenza di fattori ambientali favorevoli o limitanti (es. disponibilità alimentari, stress,...).

Con riferimento al parametro O, corrispondente alla lunghezza della linea premolare della mandibola, cioè alla lunghezza del tratto di mandibola occupato dai tre premolari, la differenza a favore degli animali più giovani registrata fra la classe 0 e la classe 1 è spiegabile poiché il terzo premolare da latte è tricuspido e quindi più lungo del terzo premolare definitivo che presenta due sole cuspidi. La sostituzione di p3 con P3 avviene intorno al dodicesimo mese di vita, quindi in corrispondenza del passaggio dalla classe 0 alla classe 1. Anche p1 e p2 vengono sostituiti dai definitivi (P2 e P3) fra i 12 ed i 14 mesi. Riguardo alla significatività registrata fra la classe 1 e la classe 3, a favore della classe 1, è opportuno fare alcune considerazioni. Innanzi tutto, se si escludono le misure G ed F che, corrispondendo a due diametri e sono facilmente misurabili, la misura O è quella che in termini assoluti è risultata di più difficile acquisizione, sia per la sua entità (varia da 25,7 mm a 29,1 mm), sia perché i punti di repere sono a volte ambigui. Per questi motivi, il parametro O è quello che può risentire più facilmente di errori personali e strumentali. Infine, è anche possibile che la lunghezza della linea premolare risulti maggiore negli animali di classe 1 rispetto a quelli di classe 3 per la progressiva usura della corona dei denti che può causare una alterazione dei riferimenti anatomici.



In merito allo sviluppo di questo parametro, anche in cervidi diversi dal capriolo, la bibliografia è di scarso aiuto. L'unica indagine condotta in un ambito simile è quella di Governo *et al.* (2006) sul cervo a coda bianca americano (*Odocoileus virginianus*). Gli autori hanno valutato la possibilità di sfruttare la lunghezza di tutta la linea dentale mandibolare (premolari e molari) per attribuire l'età agli animali. In quel caso, fra i capi di 12 mesi e quelli di 24 è stata individuata una proporzionalità diretta fra lunghezza ed età, mentre nel presente lavoro, fra animali di classe 1 e animali di classe 2, nonostante le differenze non siano statisticamente significative, la proporzionalità registrata è inversa. Alla luce di questi risultati, si ritiene preferibile condurre ulteriori

approfondimenti al fine di poter verificare l'andamento nel tempo di tale misura e valutarne le eventuali utilità ai fini gestionali.

Gruppo misure A, B, C, J, K, L e P

Per questo gruppo di rilievi cranioметриci, non sono state osservate variazioni statisticamente significative tra i soggetti di classe 0 e i subadulti (classe 1). I valori osservati nei maschi adulti (classe 2) sono risultati significativamente più elevati rispetto sia a quelli osservati nei soggetti di subadulti (classe 1) che in quelli di classe 0. Gli incrementi osservati negli adulti rispetto ai valori dei subadulti sono risultati compresi tra + 1,7% e + 6,8%. I valori osservati nei soggetti vecchi (classe 3) sono risultati non differenti rispetto a quelli rilevati nei soggetti adulti (classe 2), eccezion fatta per la misura K. Per questa misura, i soggetti vecchi si sono caratterizzati per un valore significativamente più elevato ($P \leq 0,05$) rispetto a quello degli adulti: la differenza a favore dei vecchi è risultata pari a +2,5%.

C. GENETICA

Analisi della D-loop

Estrazione del DNA e amplificazione della D-loop

Con il protocollo di estrazione e purificazione “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega) sono stati estratti i DNA totali di circa 200 campioni.

Su circa 80 di questi, è stata effettuata elettroforesi di aliquote di DNA che ha evidenziato bande corrispondenti a frammenti di dimensione superiore alle 10 kbp (DNA di buona qualità) e modeste quantità di DNA degradato.

I *primers* e la procedura di amplificazione dei DNA totali descritti precedentemente hanno consentito l’amplificazione di un frammento di circa 1 kbp corrispondente alla D-loop (Figura C1) e alle sequenze fiancheggianti tRNA prolina e fenilalanina (tRNA^{Pro} e tRNA^{Phe}).

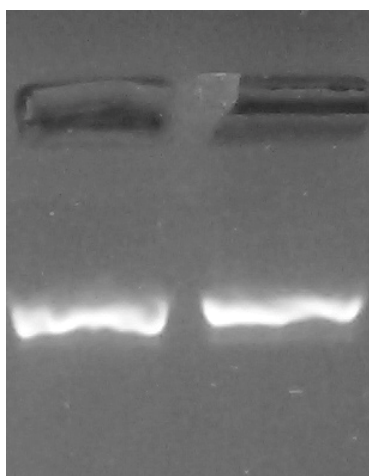


Figura C1 – Analisi D-loop: esempio di elettroforesi d’amplificato D-loop.

Analisi di restrizione

I prodotti di amplificazione sono stati digeriti, in reazioni separate, con gli enzimi di restrizione HaeIII e HincII con lo scopo principale di verificare qualitativamente l'assenza di DNA contaminanti (da uomo, per esempio) nei campioni amplificati con PCR e di valutare l'efficacia diagnostica di profili di restrizione per scopi forensi.

Le elettroforesi su gel d'agarosio di restrizioni con HaeIII hanno risolto 4 bande principali (Figura C2), a fronte di un atteso (costruito sulla base delle sequenze nucleotidiche disponibili in banche dati di DNA) di 5 frammenti, uno dei quali lungo 10 bp e pertanto non rilevabile con il sistema elettroforetico impiegato.

Concordanza assoluta tra atteso e sperimentale si è osservata anche nei profili di restrizione ottenuti con l'enzima HincII; sono evidenti due bande elettroforetiche, una di circa 430 bp e l'altra di circa 600 bp (Figura C2).

Restrizioni con HincII consentono l'identificazione della specie *C. capreolus* rispetto al bovino (*Bos taurus*), al maiale (*Sus scrofa*), al cervo (*Cervus elaphus*), al cane (*Canis familiaris*), specie che possono costituire materiale di sofisticazione commerciale.

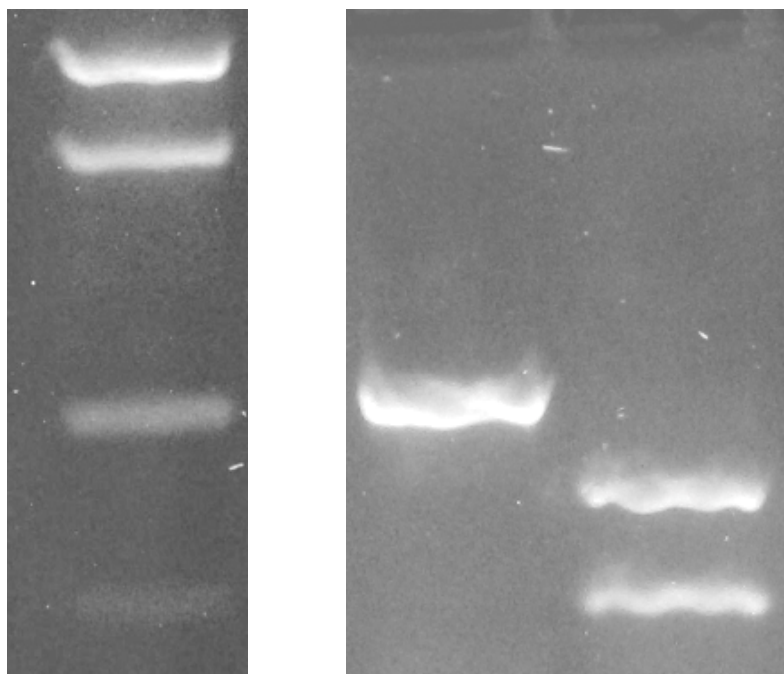


Figura C2 – Analisi D-loop: profili di restrizione della D-loop con gli enzimi HaeIII (a sinistra) e HincII (a destra, nel primo lane la D-loop intera).

Analisi dei dati di sequenza

Sono stati sequenziati 16 campioni dall'ATC PR4 (CCI, PR1185, 1287, 1140, 998, 885, 945, 987, 1128, 1292, 1305, 1442, 1433, 1514, 1449, 1406), 5 campioni dalla provincia di Lucca (LU50094, 51084, 51137, 51139, 51149), un campione dalla provincia di Pisa (PI2), 4 campioni dalla provincia di Reggio Emilia (Re 53, 55, 56, 3A) e un campione di Bologna (BO 2), per un totale di 27 sequenze.

Il sequenziamento della regione di controllo con il *primer* L-Pro ha prodotto letture utili (senza importanti ambiguità) estese tra 570 e 935 bp.

L'allineamento multiplo delle sequenze ottenute consente di individuare due principali gruppi distinti, differenziati tra loro da 1 delezione e 4 transizioni (3 G→A, 1 T→C). Ad un gruppo appartengono 21 campioni, all'altro 5. Un campione risulta distinto da entrambi i gruppi principali.

Utilizzando l'algoritmo Kimura 2 Parametri, disponibile nel pacchetto informatico MEGA 3.0, si è ottenuta una matrice di distanze genetiche dalla quale, con la procedura di *Neighbour-Joining* e *UPGMA*, si sono elaborati alberi filogenetici che evidenziano la suddivisione dei campioni analizzati in due gruppi distinti (Figura C3). Nella costruzione degli alberi filogenetici sono state omesse per semplicità 10 delle 27 sequenze disponibili (6 dell'ATC PR 4 e 4 della provincia di Lucca), poiché sono risultate esattamente sovrapponibili alle sequenze appartenenti al gruppo composto dai campioni PR1185, 945, 987, 1128, 1292, 1305, L51149, Re55, Re 56, RE 3A, PI2.

L'allineamento multiplo con 161 sequenze rappresentative di altrettanti aplotipi descritti da Randi (2004), disponibili in banca dati di DNA, e la successiva ricostruzione di un albero basato sulle distanze genetiche, permette di collocare i campioni considerati nei diversi cladi precedentemente descritti (Figura C4). Il gruppo più rappresentato risulta collocato in prossimità degli aplotipi H60 e H15, riferibili ad esemplari provenienti dagli Appennini e costituenti il sottoclade di *C.c.italicus* (in verde). L'altro gruppo risulta collocato in prossimità dell'aplotipo H18, che fa parte del clade centrale più diffuso, descritto in esemplari provenienti da diverse zone delle Alpi, degli Appennini e dell'Europa (in azzurro). Il campione proveniente da Bologna viene posizionato entro il clade costituito da aplotipi caratterizzati nell'Est Europa, da

cui provengono la maggior parte dei soggetti utilizzati in operazioni di ripopolamento (in viola).

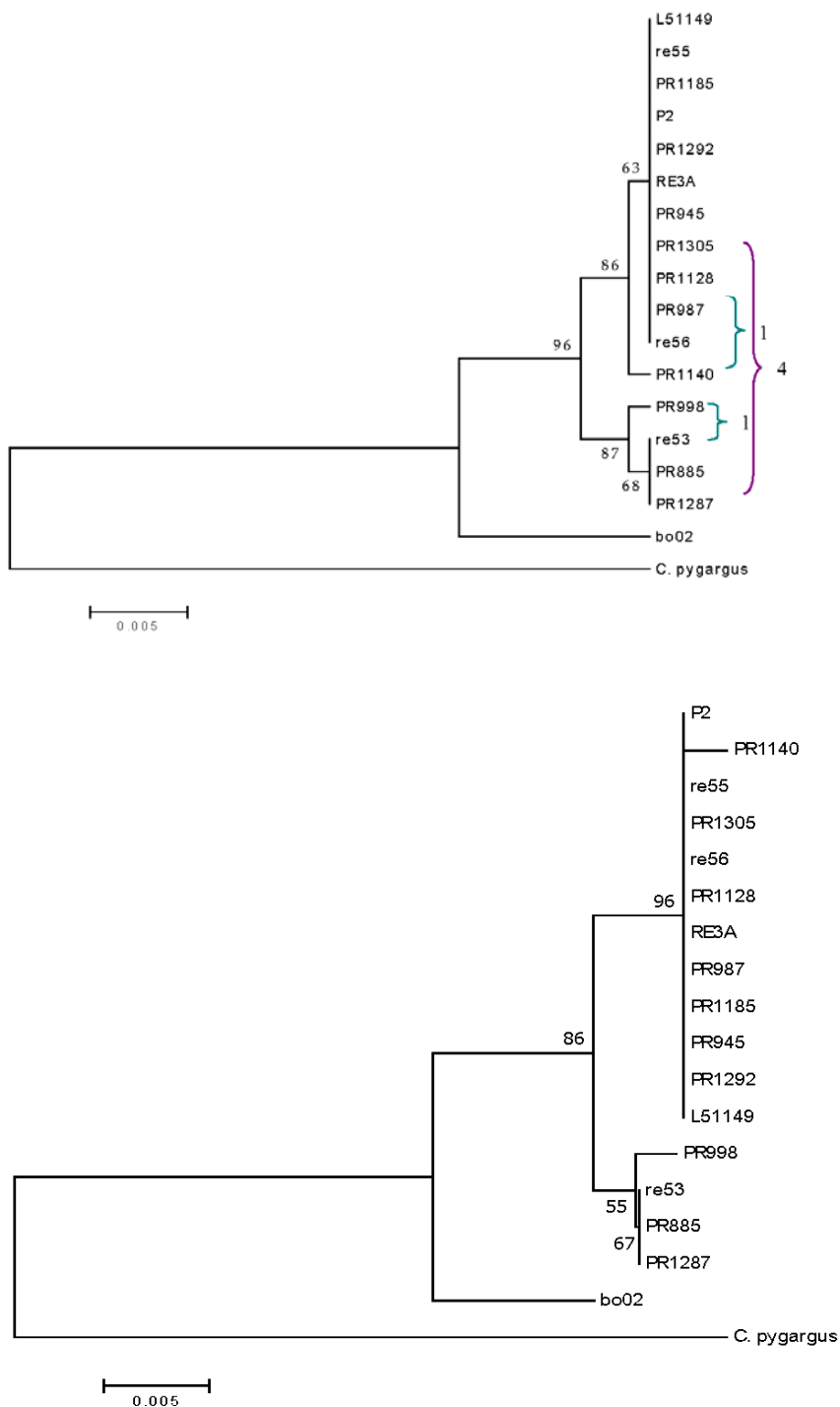


Figura C3 – Analisi D-loop: albero UPGMA (sopra) e NJ (sotto) di 17 sequenze. Vengono individuati due cladi principali, distinti tra loro da 4/6 mutazioni. I valori di bootstrap supportano i nodi principali.

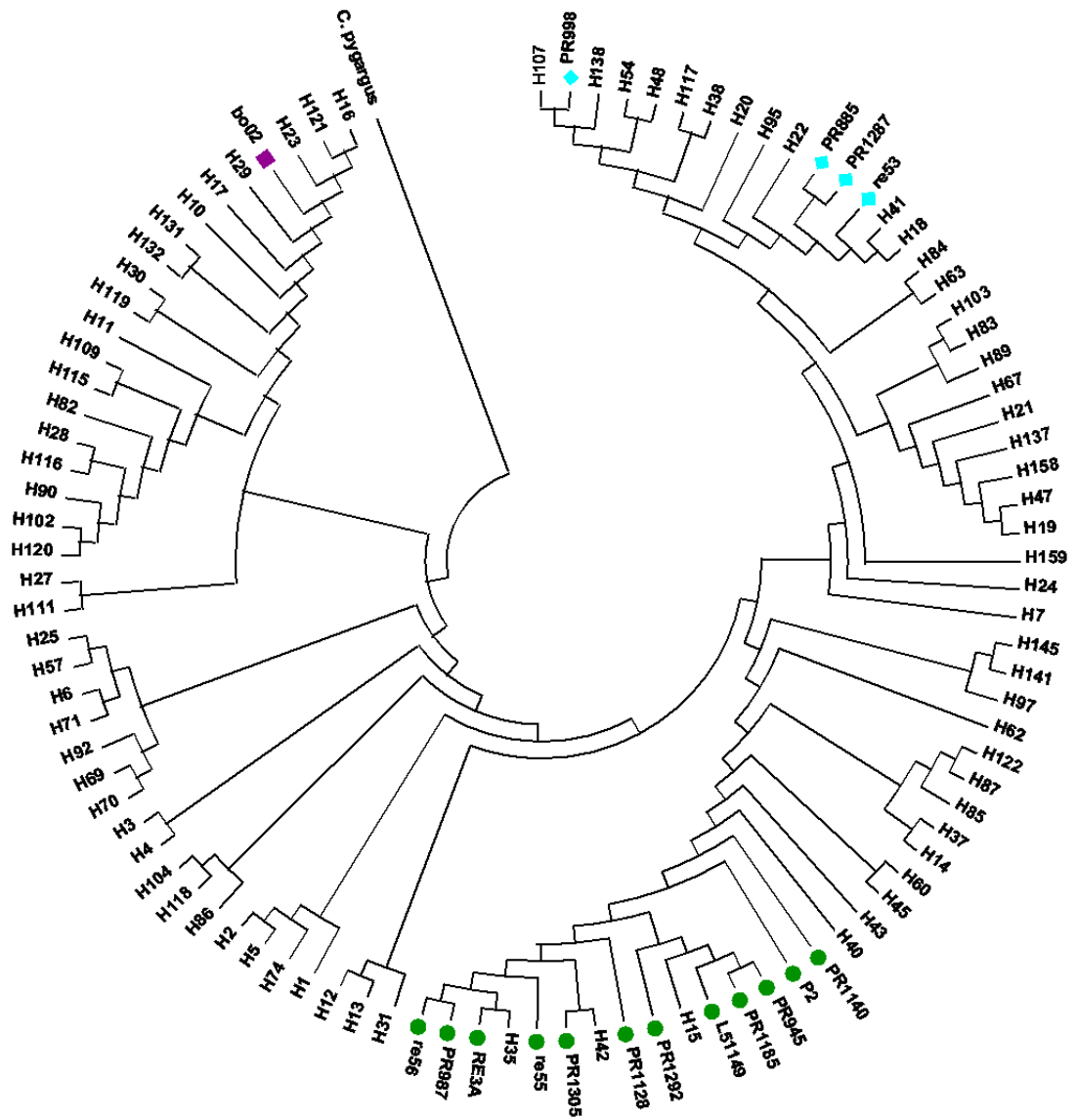


Figura C4 – Analisi D-loop: collocazione delle 17 sequenze qui analizzate all'interno di un albero UPGMA ricostruito utilizzando 161 sequenze D-loop caratterizzate da Randi (2004) e presenti in banca dati.

Basandosi sull'allineamento di alcune sequenze, è stato possibile individuare un frammento “ipervariabile” della regione D-Loop di 255 bp (Figura C5), entro il quale sono infatti localizzate 4 mutazioni che differenziano i due aplogruppi individuati. Con il programma PCGENE sono stati individuati due *primers* interni (Cp1F e HDL16) che consentono l'amplificazione di tale frammento (Figura C6).

ITALICUS	ATTAATATAGTTCAAAAACCAAGAACTTTACCAGTATTAAATTTTAA	50
CENTRALE	A-----AACCAAGAACTTTACCAGTATTAAATTTTAA	34
	* *****	
ITALICUS	AATCTTCAGTAATTTAATTCAGTTTGTACTCAATACCCAATTATATACG	100
CENTRALE	AATCTTCAGTAATTTAATTCAGTTTGTACTCAATACCCAATTATATACG	84

ITALICUS	CTACATATAATTAACCTACACAAGCATGTAGCAACGTATGTACGAATAAC	149
CENTRALE	CTACATATAATTAACCTACACAAGCATGTAGCAACGTATGTACGATATAAC	134
	Cp1F ACACAAGCATGTAGCAACGTATG	

ITALICUS	TTAATGCGCTTATAGTACATTAAATTAATGTATTAGGACATAATATGTAT	199
CENTRALE	TTAATGCGCTTATAGTACATTAAATTAATGTATTAGGACATAATATGTAT	184

ITALICUS	AATAGTACATTATATTATATGCCCCATGCTTATAAGCAAGTCCATAAAGT	249
CENTRALE	AATAGTACATTATATTATATGCCCCATGCTTATAAGCAAGTCCATGAAGT	234

ITALICUS	CATTAATAGTACATAGTACATTATGTTATTGATCGTACATAGCGCATTAA	299
CENTRALE	CATTAATAGTACATAGTACATTATGTTATTGATCGTACATAGCGCATTAA	284

ITALICUS	GTCAAATCTGTCCTTGTC AACATGCGTATCCCGCCCCTAGATCAGGAGC	349
CENTRALE	GTCAAATCTGTCCTTGTC AACATGCGTATCCCGCCCCTAGATCAGGAGC	334
	GAGC	

ITALICUS	TTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC	399
CENTRALE	TTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC	384
	TTAATCACCATGCCGCGTGAA HDL 16 (complementare)	

Figura C5 – Analisi D-loop: allineamento tra due sequenze appartenenti ai due diversi aplogruppi principali. In azzurro le mutazioni comprese tra le regioni di annealing dei primer progettati.

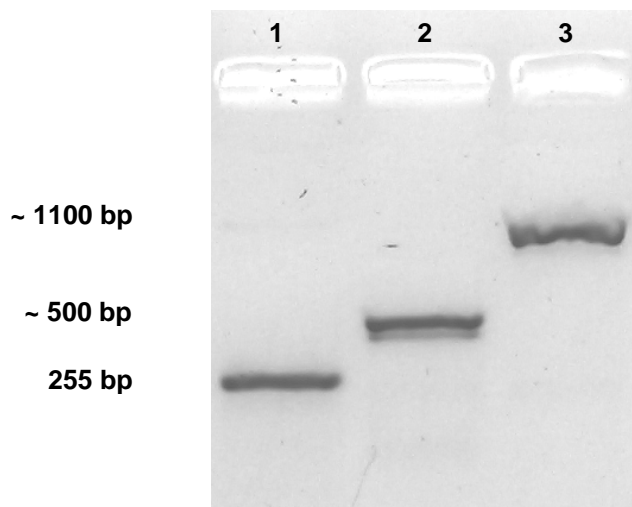


Figura C6 – Analisi D-loop: elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti con le coppie di primer: Cp1F/HDL16 (lane 1), L-Pro/HDL16 (lane 2), L-Pro/H-Phe (lane 3).

Analisi SSCP

L'estensione del frammento ipervariabile individuato (255 pb) è compatibile con analisi cromatografiche in grado di discriminare modificazioni della conformazione dei singoli filamenti in funzione della loro composizione in basi. In altri termini è possibile ottenere “aplotipi conformazionali” in accordo con gli aplotipi di sequenza ottimizzando in questo modo i costi di caratterizzazione.

A questo scopo, al frammento di 255 pb è stato applicato il metodo SSCP (*Single-Strand Conformational Polymorphism*), che consente di rilevare mutazioni attraverso l'osservazione di variazioni della mobilità elettroforetica in brevi sequenze denaturate di DNA (<500 basi) fatte correre su gel elettroforetici nativi (Orita et al., 1989). In figura C7 sono riportati, a titolo d'esempio, alcuni risultati ottenuti con analisi SSCP.

In una prima fase è stato controllato il comportamento elettroforetico dei campioni dei quali era già nota la sequenza, al fine di valutare la corrispondenza delle due tecniche di diagnosi aplotipica: i risultati si sono dimostrati sovrapponibili.

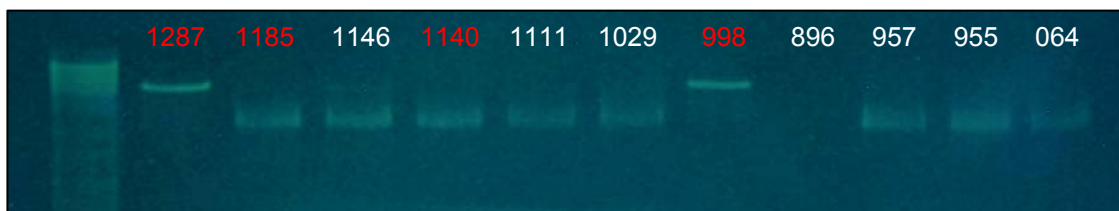


Figura C7 – Esempio di analisi D-loop: elettroforesi su gel di poliacrilammide di amplificati asimmetrici single strand ottenuti con Cp1F a partire da amplificati L-Pro/HDL16. I campioni in rosso sono stati utilizzati come riferimento poiché di essi era nota la sequenza. I campioni 1287 e 998 hanno mostrato la medesima sequenza nucleotidica e le stesse caratteristiche di migrazione; i campioni 1185 e 1140 differiscono dai due sopra citati per 4 posizioni nucleotidiche e le caratteristiche di migrazione sono coerenti con tali differenze.

Con il metodo SSCP sono stati analizzati complessivamente 46 campioni: 9 campioni sono risultati uguali ai campioni di riferimento 1287 e 998 (Clade centrale), mentre i rimanenti 37 campioni risultano invece uguali ai campioni di riferimento 1185 e 1140 (Clade appenninico-italico).

Frequenze aplotipiche nelle popolazioni considerate

Complessivamente sono stati caratterizzati gli aplotipi di 73 campioni (27 con sequenziamento e 46 con SSCP), i risultati ottenuti sono riassunti nella tabella C1.

Tabella C1 – Analisi D-loop: numero campioni caratterizzati, aplotipi ritrovati e loro frequenza.

Popolazione	N.	Clade Centrale	Subclade <i>italicus</i>	Clade Est
Parma	58	13 (0,22)	45 (0,78)	-
Lucca	8	-	8 (1)	-
Pisa	2	-	2 (1)	-
Bologna	1	-	-	1 (1)
Reggio Emilia	4	1 (0,25)	3 (0,75)	-
Totale	73	14 (0,19)	58 (0,79)	1 (0,02)

Discussione D-loop

Gli aplotipi e le frequenze ad essi ascrivibili, supportano l'ipotesi che il popolamento delle aree della provincia di Parma investigate sia derivato

principalmente da un'espansione o dall'immissione di individui provenienti dalla Toscana, piuttosto che da azioni di ripopolamento effettuate con individui provenienti dalle Alpi e dall'Europa dell'Est.

La variabilità mitocondriale racchiude informazioni sulla storia biogeografica delle linee materne indagate, storia non influenzata da rimescolamenti genetici legati soprattutto alla ricombinazione meiotica, alla riproduzione sessuata e alla formazione di ibridi tra gruppi di diversa origine.

La struttura mitocondriale rilevata nelle popolazioni indagate trova corrispondenza in informazioni desumibili dalla variabilità nucleare? Esiste qualche forma di limitazione al flusso genico tra soggetti o gruppi appartenenti a linee aploipiche diverse? Possibili risposte a questi problemi vengono fornite da analisi della variabilità mendeliana (nucleare) a livello di popolazioni.

Allo scopo sono stati considerati marcatori RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), per un'indagine rapida e relativamente poco dispendiosa, ma informativa sulla effettiva variabilità disponibile nei campioni.

In fase preliminare è stata valutata anche la variabilità di due marcatori microsatellite STR (*Short Tandem Repeat*). I risultati di questa indagine verranno mostrati nell'ultimo paragrafo di questo capitolo.

Analisi dei marcatori RAPD

Risultati dell'amplificazione

Un *pool* di 30 campioni (20 della provincia di Parma e 10 della provincia di Lucca) è stato sottoposto a PCR con tecnica RAPD, utilizzando 16 *primers* (Tabella 1 nella sezione "MATERIALI E METODI"). I risultati sono stati visualizzati attraverso una corsa elettroforetica (Figura C8). Dei 16 *primers* testati, solo 13 hanno fornito un *pattern* di bande valutabili: i *primers* LA1, 2 e 7 sono stati esclusi. Ogni *primer* ha individuato da un minimo di 13 ad un massimo di 36 loci per ogni campione. Dalle analisi successive sono stati esclusi i loci per i quali il *pattern* di presenza è risultato identico per tutti e 30 i campioni: i loci polimorfici individuati sono stati 311. Inoltre,

sono stati esclusi altri 58 loci per i quali il *pattern* di amplificazione (presenza/assenza di banda) non è parso chiaramente valutabile per ognuno dei 30 campioni.

La matrice descrittiva di presenza/assenza che ne è derivata è risultata di 30 campioni per 253 loci, per un totale di 7590 posizioni.

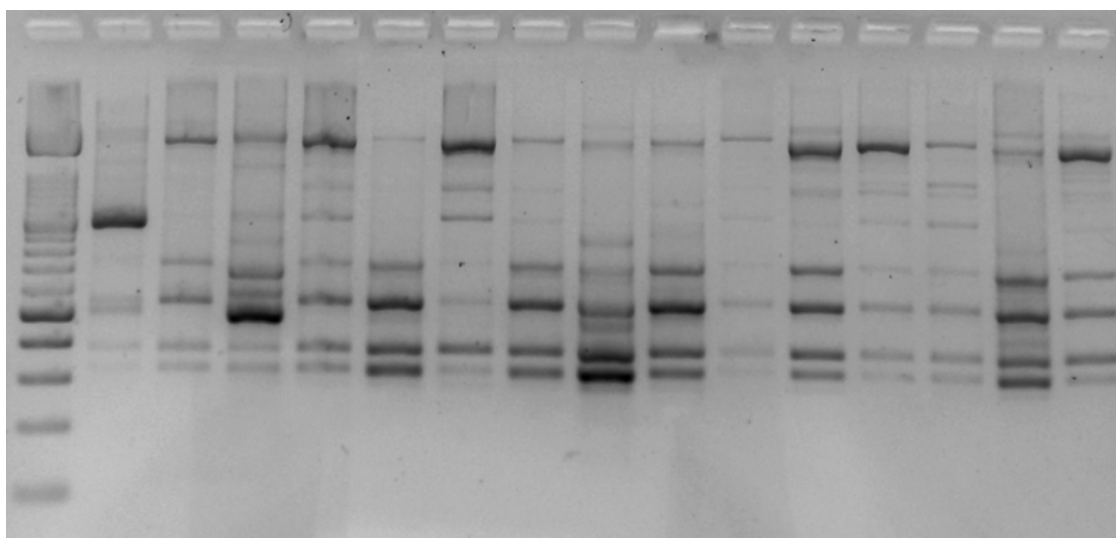


Figura C8 – Analisi marcatori RAPD: elettroforesi dei prodotti di amplificazione ottenuti con i primer LA16.

Analisi statistiche

- Numero di loci polimorfici, numero di bande rilevate, numero di bande private ed eterozigotità attesa media (Figura C9, Tabella C2).

La percentuale di loci polimorfici è la percentuale di loci che all'interno di un certo gruppo aplo-tipico (Parma "italicus", Parma "centrale" e Lucca) hanno presentato entrambe le forme alleliche (presenza e assenza). Per il gruppo Parma "italicus" la percentuale di loci polimorfici è risultata dell' 83,40%, per il gruppo Parma "centrale" è risultata del 55,34% e per il gruppo di Lucca è risultata intermedia agli altri due gruppi, con una percentuale di 61,26%. La percentuale media dei loci polimorfici fra i 3 gruppi di campioni analizzati è risultata essere del 66,6%.

Il numero di bande rilevate corrisponde al numero totale di bande che è stato possibile osservare per ognuno dei 3 gruppi aplo-tipici.

Per numero di bande private si intende il numero di bande che sono risultate esclusive di un certo gruppo aplotipico.

L'eterozigosità media attesa esprime la diversità genetica all'interno di un gruppo aplotipico (Parma "italicus", Parma "centrale" e Lucca) e viene calcolata a partire dai valori stimati delle frequenze alleliche. Le frequenze alleliche vengono a loro volta calcolate presupponendo che la frequenza del fenotipo recessivo (assenza di banda) corrisponda alla frequenza del genotipo recessivo, dal quale poter calcolare la frequenza dell'allele recessivo ($q_{(i)}$), assumendo quindi che nella popolazione sia rispettato l'equilibrio di Hardy-Weinberg ($p_{(i)}+q_{(i)}=1$).

Il gruppo aplotipico che ha mostrato maggior numero di bande, maggior numero di bande private e maggiore eterozigosità attesa media è quello definito come Parma "italicus".

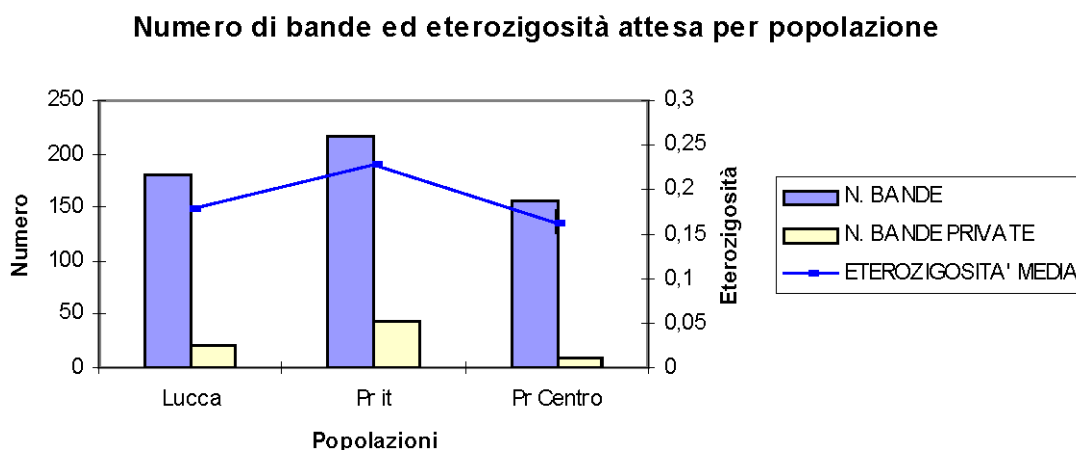


Figura C9 – Analisi marcatori RAPD: numero di bande ed eterozigosità attesa per popolazione.

Tabella C2 – Analisi marcatori RAPD: numero bande rilevate, numero bande private e eterozigosità media attesa per ogni gruppo.

Gruppo	Lucca	PR <i>italicus</i>	PR Centrale
% loci polimorfici	61,26	83,40	55,34
N. bande	180	217	156
N. bande private	21	43	10
Eterozigosità media	0,177	0,228	0,163

- Distanza genetica di Nei tra le popolazioni.

E' stata prodotta una matrice di distanza e di identità delle dimensioni di 3x3, per i 3 aplogruppi considerati (Parma "italicus", Parma "centrale" e Lucca).

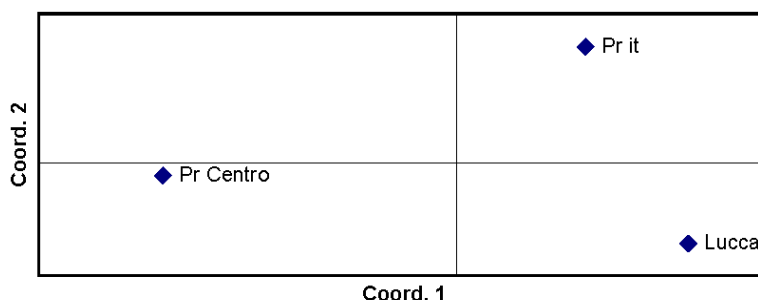
Le distanze genetiche ottenute non sono risultate correlate alla distanza geografica dei gruppi in esame. Infatti, il gruppo parmigiano con aplotipo "italicus" risulta più vicino geneticamente al gruppo toscano, che presenta lo stesso aplotipo mitocondriale, rispetto al gruppo con aplotipo "centrale", proveniente dallo stesso popolamento ($0,039 > 0,061$).

I risultati, riportati nella tabella C3, sono stati rappresentati graficamente tramite un'analisi PCA della matrice di distanza (Figura C10), che riassume le componenti di varianza su 2 assi principali, su cui si posizionano i 3 gruppi. L'asse che spiega la maggior parte della variabilità (79,91%) determina la separazione dei gruppi a seconda dell'aplotipo mitocondriale presentato.

Tabella C3 – Analisi marcatori RAPD: distanza genetica di Nei tra le popolazioni di caprioli.

Nei D	Lucca	PR <i>italicus</i>	PR Centrale
Lucca	0		
PR <i>italicus</i>	0,039	0	
PR Centrale	0,072	0,061	0

Coordinate Principali



Axis	1	2
%	79,91	20,09
Cum %	79,91	100,00

Figura C10 – Analisi dei marcatori RAPD: rappresentazione grafica tramite PCA delle distanze genetiche di Nei.

- Suddivisione della variabilità genetica nelle sue componenti di varianza tra popolazioni ed entro popolazioni (struttura delle popolazioni), ottenuta con G_{st} e Φ_{PT} (Tabella C4).

I valori di Φ_{PT} ottenuti sono espressi nella parte inferiore della matrice, mentre nella parte superiore sono espressi i valori di G_{st} .

Tabella C4 - Analisi marcatori RAPD: struttura delle popolazioni con G_{st} (in grigio) e Φ_{pt} (in giallo).

	Lucca	PR <i>italicus</i>	PR Centrale
Lucca	0	0,077	0,10
PR <i>italicus</i>	0,022	0	0,084
PR Centrale	0,144	0,086	0

I valori di G_{st} e Φ_{pt} riflettono lo stesso *pattern* di differenziazione tra i gruppi, che risulta concorde all'aplotipo mitocondriale.

- Distanza genetica binaria tra coppie di campioni.

La distanza genetica binaria è stata visualizzata attraverso 2 diverse matrici di 30x30 (435 possibili confronti):

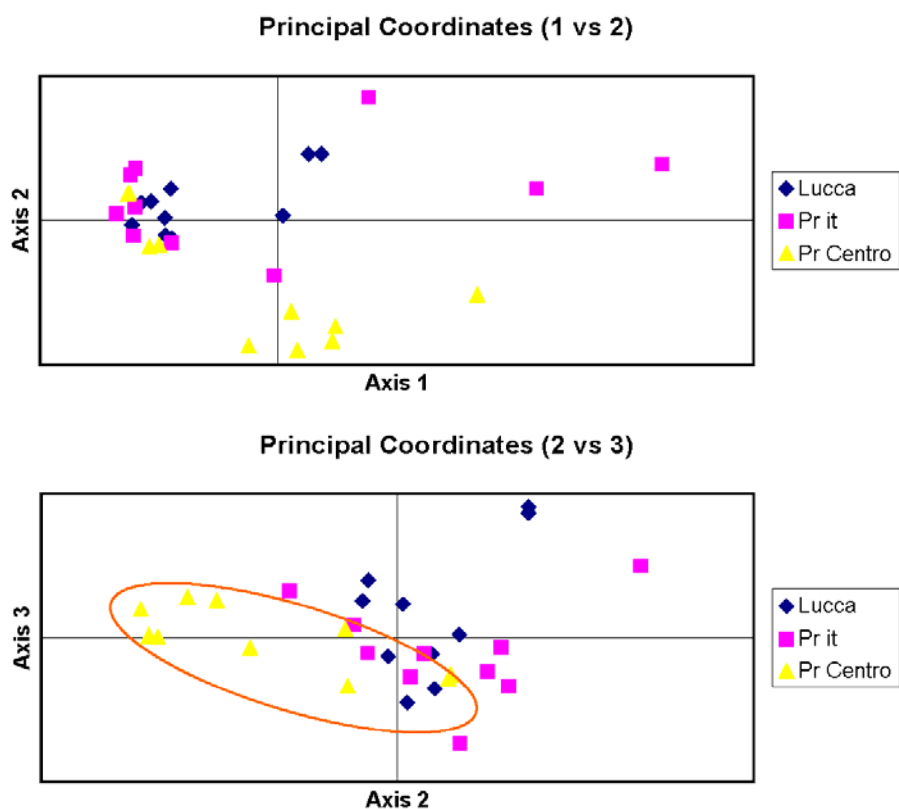
-matrice di distanza euclidea che considera il numero di loci che presenta lo stesso stato (assenza = 0 o presenza = 1) per entrambi i campioni della coppia in esame;

-matrice di distanza asimmetrica basata sugli indici di similarità di Jaccard, che considera solo il numero di loci che presentano in comune lo stato di presenza. Infatti la situazione in cui entrambi i campioni della coppia presentino assenza di banda, può dipendere non solo dal fatto che entrambi i campioni abbiano lo stesso allele, ma anche da fattori legati alla tecnica di analisi che come effetto finale danno l'assenza di banda, mascherando la vera situazione genotipica. Inoltre, è possibile che l'assenza di banda in entrambi i campioni dipenda dal fatto che essi abbiano forme alleliche diverse da quella dominante, non necessariamente uguali fra loro (locus multiallelico).

I valori della matrice di distanza euclidea variano da 16 a 122 in un range che va da 0 a 253, e da 0,063 a 0,482 se normalizzati al numero di loci. I valori della matrice di distanza basata sugli indici di similarità di Jaccard variano da 0.19 a 0.9. Le due matrici sono riportate in tabella C5 e tabella C6.

Di seguito, ognuna delle due matrici è stata rappresentati graficamente tramite un'analisi PCA, in grado di riassumere le componenti di varianza su 3 assi principali, su cui si posizionano i 30 campioni.

- PCA (Principal Coordinate Analysis), utilizzando la matrice di distanza genetica euclidea tra coppie di campioni, con standardizzazione dei dati. I primi tre assi spiegano il 75,89% della varianza totale (Figura C11).

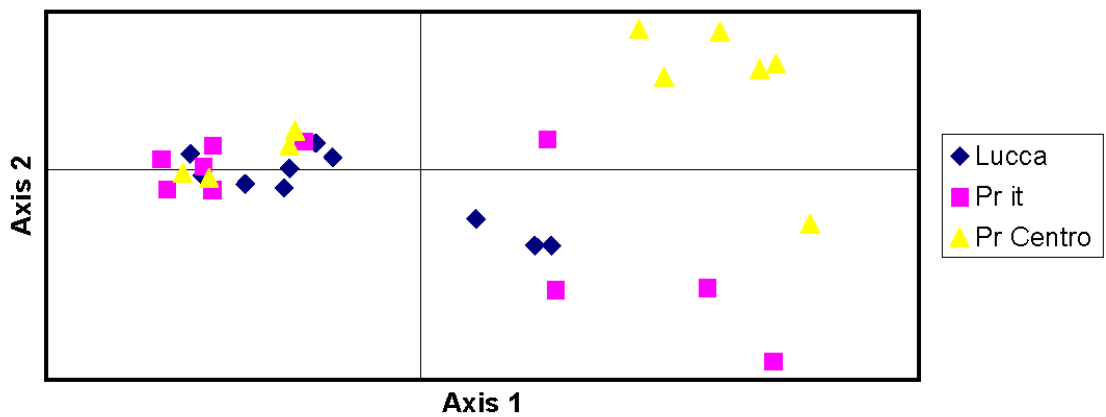


Axis	1	2	3
%	47,72	16,59	11,58
Cum %	47,72	64,31	75,89

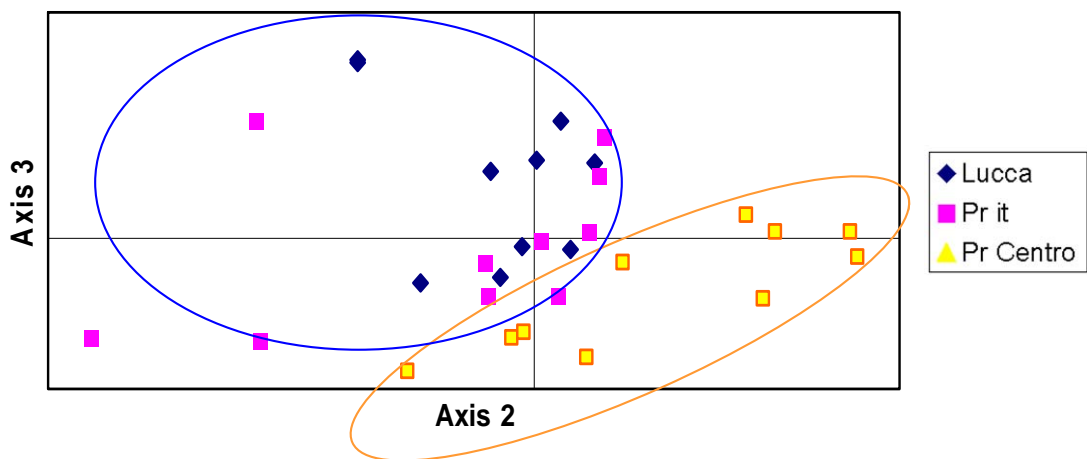
Figura C11 – Analisi dei marcatori RAPD: PCA utilizzando la matrice di distanza genetica euclidea tra coppie di campioni con standardizzazione dei dati.

- PCA (Principal Coordinate Analysis), utilizzando la matrice di distanza genetica ottenuta dagli indici di similarità di Jaccard, con il metodo della covarianza e la standardizzazione dei dati. I primi tre assi spiegano il 66,19% della variazione totale (Figura C12)

Principal Coordinates (1 vs 2)



Principal Coordinates (2 vs 3)



Axis	1	2	3
%	33,15	20,02	13,02
Cum %	33,15	53,17	66,19

Figura C12 – Analisi dei marcatori RAPD: PCA utilizzando la matrice di distanza genetica ottenuta con gli indici di similarità di Jaccard, con il metodo delle co-varianze e la standardizzazione dei dati.

Sia nella PCA effettuata sulla matrice euclidea, sia nella PCA effettuata sulla matrice asimmetrica (indici di Jaccard), la visualizzazione del primo e del secondo asse di varianza non è in grado di suddividere i campioni secondo alcun *pattern* identificabile (posizione geografica, aplotipo mitocondriale), dimostrando che la percentuale maggiore della variabilità totale risiede tra individui all'interno dello stesso gruppo e non tra gruppi diversi, in accordo con i risultati ottenuti tramite AMOVA.

Il secondo e il terzo asse, invece, sono in grado di identificare una suddivisione tra gli individui a seconda dell'aplotipo mitocondriale, separando anche gli individui con diverso aplotipo provenienti dalla stessa zona geografica.

Discussione marcatori RAPD

La vicinanza genetica tra la popolazione toscana e quella parmigiana, suggerita dalla caratterizzazione della regione di controllo mitocondriale, viene riconfermata dai risultati relativi a marcatori nucleari ricombinanti.

La PCA effettuata considerando i campioni della provincia di Parma illustra graficamente la corrispondenza tra aplotipo mitocondriale e variabilità nucleare.

Per studiare la struttura delle popolazioni considerate sono stati utilizzati due diversi approcci nel trattamento dei dati.

Il primo comporta un'analisi a livello di popolazione e fornisce analoghi dell' F_{st} a partire da stime delle frequenze alleliche (G_{st}) o da stime della frazione della variabilità entro e tra gruppi basate sulla condivisione delle bande degli individui (Φ_{pt}).

Il secondo approccio si basa sul confronto dei fenotipi degli individui. La condivisione delle bande viene utilizzata per la costruzione di matrici di distanza, da cui si ottiene una rappresentazione grafica delle relazioni genetiche tra individui (plot PCA o alberi). Questo tipo di indagine fenetica non fornisce un'analisi quantitativa, ma una descrizione visiva da cui dedurre la struttura genetica delle popolazioni.

Il primo approccio è da considerarsi più attendibile nel caso di ampi campioni, mentre il secondo risulta adatto per analisi che considerano pochi individui per campione, valutati per molti loci polimorfici (Hollingsworth e Ennos, 2004).

Nel complesso i risultati ottenuti con i marcatori RAPD supportano l'ipotesi di presenza di flusso genico tra le popolazioni delle aree considerate nelle province di Parma e di Lucca, dal momento che parte degli individui provenienti dalla popolazione di Parma risultano geneticamente più vicini a individui toscani piuttosto che ad altri individui parmigiani. Questo risulta più evidente dalla visualizzazione grafica delle componenti principali della varianza, che costituisce anche l'approccio più valido per il tipo di dati raccolti.

Il ridotto flusso genico che sembra esistere tra i due gruppi con differenti aplotipi all'interno della popolazione parmigiana potrebbe rispecchiare un recente mescolamento per immissione ad opera dell'uomo o per migrazione, piuttosto che un'effettiva limitazione agli accoppiamenti tra individui dei due gruppi.

Analisi dei marcatori microsatellite (STR)

Caratterizzazione dimensionale degli alleli

Attraverso il procedimento di clonaggio in cellule di *Escherichia coli*, vengono isolati due alleli per il locus Roe1 e due alleli per ILST011. La caratterizzazione di tali alleli attraverso sequenziamento permette di ottenerne la lunghezza, che risulta essere 132 e 134 bp per Roe1, e 271 bp per ILST011 (Figura C13).

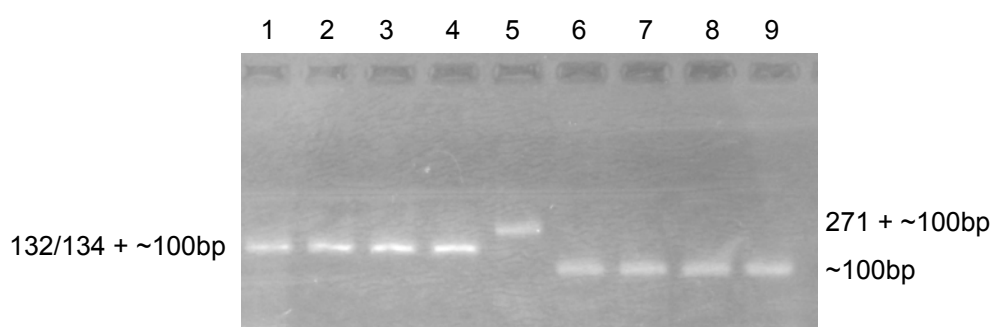


Figura C13 – Analisi marcatori microsatellite: *screening* di cloni trasformati tramite Colony-PCR. Prodotti di amplificazione da DNA estratto da colonia, con i *primers* M13, visualizzati su gel di agarosio; lane 1, 2, 3 e 4 inserti Roe 1, lane 5 inserto ILST011. Nelle lane 6, 7, 8 e 9, amplificazione ottenuta da plasmide richiuso senza inserto.

Il dato di sequenza ottenuto, confrontato con quello disponibile in banca dati, permette di individuare le sequenze ripetute che determinano la variabilità del locus.

Amplificazione e visualizzazione dei risultati

Su un totale di 43 campioni amplificati, ne sono risultati valutabili 37 per il locus Roe1 e 40 per il locus ILST011. Nel complesso 36 campioni sono risultati analizzabili per entrambi i loci. Ogni locus risulta polimorfico, con due diversi alleli.

Gli alleli presenti nelle popolazioni risultano essere:

Locus Roe 1 : allele 132 bp caratterizzato da 7 ripetizioni della sequenza GT; allele 134 bp caratterizzato da 8 ripetizioni delle sequenza GT;

Locus ILST011: allele 271 bp caratterizzato da 19 ripetizioni della sequenza TG; allele 273 bp caratterizzato da 20 ripetizioni della sequenza TG.

Le tabelle C7 e C8 e le figure C14 e C15 e C16 riassumono i risultati ottenuti dalle amplificazioni.

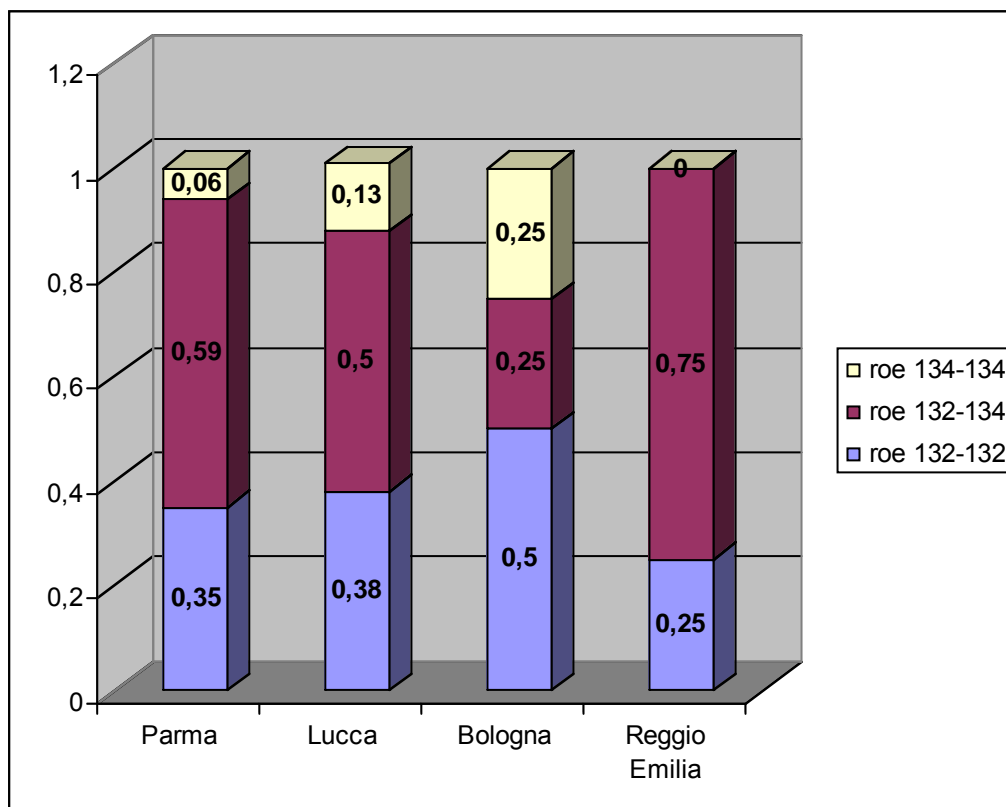


Figura C14 – Analisi marcatori microsatellite: frequenze dei diversi genotipi per il locus Roe 1 in ogni popolazione.

Tabella C7 – Analisi marcatori microsatellite: numero di genotipi trovati in ogni popolazione per il locus Roe 1.

	N.	132-132	132-134	134-134
Parma	17	6	10	1
Lucca	7	3	3	1
Bologna	8	4	2	2
Reggio Emilia	4	1	3	0
Pisa	1	0	1	0
Totale	37	14	19	4

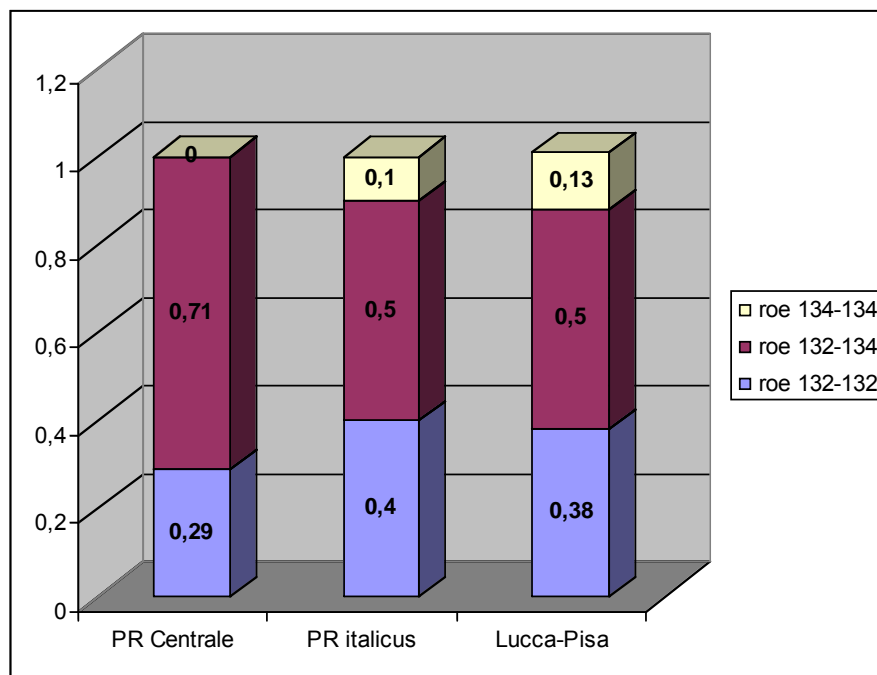


Figura C15 – Analisi marcatori microsatellite: frequenze dei genotipi per il locus Roe 1 nei gruppi aploipici di Parma, confrontati con la popolazione di Lucca e Pisa.

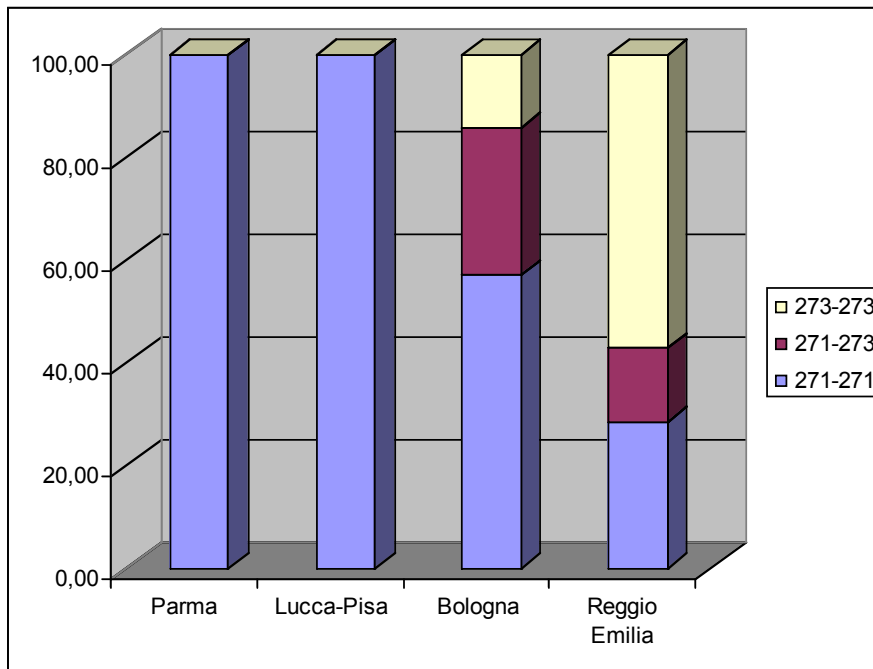


Figura C16 – Analisi dei marcatori microsatellite: frequenze (%) dei diversi genotipi per il locus ILST011 in ogni popolazione.

Tabella C8 – Analisi dei marcatori microsatellite: numero di genotipi trovati in ogni popolazione per il locus ILST011.

	N.	271-271	271-273	273-273
Parma	17	17	0	0
Lucca	7	7	0	0
Bologna	7	4	2	1
Reggio Emilia	7	2	1	4
Pisa	2	2	0	0
Totale	40	32	3	5

Nelle popolazioni di Parma, Lucca e Pisa il locus ILST011 risulta monomorfico. In generale le frequenze di queste due popolazioni risultano simili. Per il locus Roe1 le frequenze alleliche del campione lucchese risultano più simili a quelle del gruppo con aplotipo “italicus” che a quelle del gruppo con diverso aplotipo.

Discussione marcatori microsatellite STR

I risultati finora ottenuti confrontando i gruppi in base all’aplotipo mitocondriale, supportano il pattern evidenziato dai marcatori RAPD, dimostrando la mancata correlazione tra distanza genetica e geografica. Il numero di campioni e di alleli considerato, però, obbliga a considerare con cautela la loro attendibilità. L’analisi svolta finora è da ritenersi preliminare a indagini effettuate con un maggior numero di loci STR, e un campione più ampio.

I risultati STR, rispetto a quanto ottenuto con analisi RAPD, consentiranno:

- a) una stima diretta della composizione genetica (equilibrio) dei campioni analizzati;
- b) una possibilità di confronto con risultati ed osservazioni condotte su popolazioni diverse, in altri tempi e da altri Autori,
- c) un più probabile impiego del dato genetico per applicazioni e necessità gestionali.

D. GENETICA E MORFOMETRIA

Di 54 caprioli maschi caratterizzati a livello di DNA mitocondriale (regione D-loop), per mezzo di sequenziamento diretto e attraverso la tecnica SSCP, erano disponibili anche i dati biometrici. Nelle tabelle D1 e D2 sono mostrate le medie delle caratteristiche biometriche dei caprioli classificati tipo “italicus” e di quelli classificati tipo “centro-europeo”. L’analisi statistica non ha evidenziato differenze significative ($P \leq 0,05$) tra i due gruppi genetici, per nessuna delle caratteristiche biometriche analizzate. Alla luce di questa osservazione, quindi, la chiara distinzione genetica osservata sia a livello di DNA mitocondriale (analisi D-loop) che a livello di DNA nucleare (RAPD) non trova riscontro sotto il profilo morfologico. In realtà, almeno per quanto riguarda il DNA mitocondriale, le analisi sono state condotte in una regione del DNA (D-loop) caratterizzata da una variabilità “neutrale”, vale a dire non sottoposta a pressione selettiva.

In uno studio condotto nel 1925 su 7 caprioli provenienti dalla Tenuta Presidenziale di Castelporziano e donati dal re Vittorio Emanuele III al Museo Zoologico di Torino nel 1921, Festa ipotizza che “il capriolo dell’Italia centrale sia notevolmente diverso dal capriolo che abita le foreste delle Alpi orientali”, tanto da ritenerlo una sottospecie distinta e suggerendo appunto il nome di *Capreolus capreolus italicus*. Secondo Festa, “esso differisce dal *Capreolus capreolus transylvanicus* (capriolo presenti sulle Alpi orientali) per le dimensioni minori, per la tinta generale del pelame nell’abito invernale più volgente al bruno, con le punte dei peli fulvo-giallicce, per il colorito della fronte e della regione nasale più scuro di quello delle altre parti del corpo e per la mancanza delle macchie bianchicce sulla gola e sul collo”. I risultati preliminari ottenuti con il presente lavoro smentiscono quanto sostenuto da Festa riguardo le dimensioni, che risultano statisticamente non differenti fra il ceppo “italicus” e quello “centro-europeo”. Riguardo il mantello, si è evitato di prendere in considerazione le valutazioni sulla tonalità delle punte dei peli poiché risultano poco ripetibili. Per quanto riguarda invece l’osservazione delle macchie golarie bianche sul mantello invernale, Apollonio (2007) suggerisce che anche in questo caso, non vi sia correlazione fra la loro presenza e l’appartenenza al ceppo europeo.

Risulterebbe comunque utile ampliare il campione di riferimento ed abbinare allo studio delle misure presenti sulla scheda biometrica anche quello delle misure di craniometria. Queste ultime, infatti, potrebbero far emergere eventuali differenze, anche esigue, fra i due aplotipi.

Tabella D1 – Medie stimate delle caratteristiche biometriche (peso pieno, lunghezza totale, altezza garrese, circonferenza toracica) dei caprioli abbattuti nell'ATC PR 4: confronto tra i soggetti con aplotipo mitocondriale di tipo "italicus" e i soggetti con aplotipo mitocondriale di tipo "centro-europeo".

Parametro	Peso pieno		Lunghezza totale		Altezza garrese		Circonferenza toracica	
	(kg)		(cm)		(cm)		(cm)	
Aplotipo mit.	Italicus	CE	Italicus	CE	Italicus	CE	Italicus	CE
No.	41	13	41	13	41	13	41	13
Classe di età:								
1	21,7	24,2	112,4	117,5	67,4	69,0	63,2	64,0
2	25,7	25,1	118,4	119,7	69,0	69,7	67,7	64,3
3	26,3	27,0	122,2	119,4	69,0	69,0	66,2	63,8
ES	0,5	0,7	0,9	1,3	0,5	1,7	0,7	0,6

Tabella D2 – Medie stimate delle caratteristiche biometriche (lunghezza orecchio, lunghezza arto anteriore, lunghezza arto posteriore, circonferenza base collo) dei caprioli abbattuti nell'ATC PR 4: confronto tra i soggetti con aplotipo mitocondriale di tipo "italicus" e i soggetti con aplotipo mitocondriale di tipo "centro-europeo".

Parametro	Lunghezza orecchio		Lunghezza arto anteriore		Lunghezza arto posteriore		Circonferenza base collo	
	(cm)		(cm)		(cm)		(cm)	
Aplotipo mit.	Italicus	CE	Italicus	CE	Italicus	CE	Italicus	CE
No.	41	13	41	13	41	13	41	13
Classe di età-sesso:								
1-M	14,6	16,5	26,4	27,0	34,7	35,5	33,6	38,0
2-M	15,4	15,5	26,7	26,5	34,8	37,2	36,1	37,5
3-M	15,1	16,2	27,6	27,0	36,4	35,0	37,0	38,0
ES	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	1,0	0,6	1,2

Al fine di descrivere le caratteristiche morfologiche della popolazione di capriolo presente in un Ambito Territoriale di Caccia della provincia di Parma (ATC PR 4), sono stati analizzati i dati desunti dalle schede biometriche compilate dopo l'abbattimento degli animali e dai rilievi di craniometria effettuati sui preparati ossei.

L'analisi delle variazioni delle caratteristiche morfometriche dei capi abbattuti nell'ATC PR 4 fra il 2004 ed il 2007 ha permesso di trarre alcune conclusioni sulle modalità di accrescimento dei caprioli. La morfologia di questi animali sembra assumere la sua conformazione adulta entro i due anni età (Soffiantini, 2002). In linea generale, i valori di gran parte delle misure biometriche sono aumentati considerevolmente nel passaggio dalla classe 0 (da 0 a 11 mesi di vita) alla classe 1 (da 12 a 23 mesi di vita). Tali incrementi sono risultati significativi, seppur in maniera meno accentuata, anche nel confronto fra i subadulti (classe 1) e gli adulti (classe 2: dal compimento del 2° fino al 7° anno di età). Nel confronto fra animali di classe 2 ed animali di classe 3 (oltre il settimo anno di vita), invece, non vengono registrate differenze significative per quasi la totalità dei parametri morfologici considerati. Questo giustifica la nuova classificazione proposta dall'Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica (INFS), che prevede in futuro l'utilizzo di tre sole classi, accorpendo le attuali classi 2 e 3: gli animali appartenenti a queste due classi, infatti, svolgono lo stesso ruolo biologico all'interno della popolazione (sono riproduttori) e sono difficilmente distinguibili dall'anatomia di superficie. I soli parametri che fanno registrare un incremento ancora significativo, passando dalla classe 2 alla classe 3, sono quelli legati alla struttura del palco (F, diametro del peduncolo destro, e G, diametro del peduncolo sinistro) e alla lunghezza basale del cranio (K).

Un importante contributo alle conoscenze sulla biologia della specie è stato fornito dal confronto fra i pesi pieni rilevati prima e dopo il periodo degli amori (metà luglio-metà agosto) nei caprioli maschi di classe 2 e 3 (riproduttori). In questo modo è stato possibile confermare e quantificare le conoscenze aneddotiche secondo le quali la fase degli accoppiamenti sarebbe molto dispendiosa in termini energetici per i maschi coinvolti. Tale indagine è stata condotta su dati relativi a 4 anni consecutivi (2004, 2005, 2006, 2007) e, alla fine del periodo degli amori, il peso pieno degli animali riproduttori è risultato inferiore rispetto al peso pieno rilevato prima degli

accoppiamenti. Questa differenza è risultata pressoché costante per tutti gli anni e si è attestata sul 7%, corrispondente a 2,0 kg. Ulteriore conferma del fenomeno deriva dall'osservazione dei pesi pieni rilevati poco prima il 15 luglio e poco dopo il 15 agosto negli animali subadulti (classe 1), che per definizione non partecipano attivamente alla riproduzione: i valori sono risultati pressoché costanti. Pare quindi giustificata la scelta gestionale che prevede appunto di interrompere il prelievo venatorio estivo per i 30 giorni nei quali si concentra l'attività riproduttiva (difesa del territorio, scontri con i rivali, corteggiamenti, accoppiamenti), al fine di evitare di aggiungere un ulteriore evento stressante (presenza dei cacciatori sul territorio).

Grazie ai dati a disposizione è stato possibile condurre un confronto fra le caratteristiche morfologiche di animali abbattuti in aree diverse (aree 1, 2, 3, 4, 5) dell'ATC PR 4. In questo caso, per le dimensioni e la ripartizione del campione, non è si è potuta mantenere la suddivisione in anni di abbattimento, ma è stata considerata la suddivisione del campione per sessi, classi di età ed aree. Sempre per le caratteristiche del campione, si è ritenuto opportuno escludere le aree 3 e 4 dalla discussione. Fra le altre tre aree, gli animali dell'area 1 si sono distinti piuttosto nettamente da quelli dell'area 5 per le dimensioni tendenzialmente più ridotte. Le caratteristiche degli animali dell'area 2 sono risultate spesso intermedie a quelli delle aree 1 e 5. Come si vedrà oltre, tali differenze non sono sembrate dipendere da differenze di carattere genetico, bensì dalla variabilità legata all'effetto che l'ambiente ha sugli animali che ospita. Come primo passo, nel presente lavoro ci si è limitati a considerare le altimetrie che caratterizzano le diverse aree ed è emerso che il "gradiente" grossolanamente registrato per le dimensioni (1→2→5) corrisponde a quello registrato per le quote: all'aumentare dell'altimetria in linea generale è corrisposta una flessione delle dimensioni. Ad ogni modo, al fine di valutare con maggiore precisione l'impatto dell'ambiente sulle caratteristiche morfologiche dei caprioli sarebbe opportuno ottenere informazioni più dettagliate almeno sulle caratteristiche del territorio, sull'impatto antropico, sulle caratteristiche meteorologiche e sull'esposizione dei versanti. Sarebbe inoltre opportuno utilizzare software e sistemi informatici in grado di integrare, elaborare e visualizzare le variabili coinvolte.

Grazie all'opportunità di aggiungere i dati morfologici collezionati in un precedente lavoro alla banca dati del presente studio, è stato possibile valutare l'evolversi delle caratteristiche biometriche della popolazione di capriolo dell'ATC PR 4 in anni diversi. Sono stati effettuati confronti a vari livelli fra animali abbattuti durante i piani di prelievo di 1999, 2000, 2001, 2002, 2004, 2005, 2006 e 2007. Non sono state evidenziate differenze che possano descrivere un pattern evolutivo: la morfologia sembra rimanere pressoché costante. A questo punto è stato possibile fare una valutazione seppur parziale dell'effetto che la gestione venatoria ha sulla popolazione. I dati forniti dai censimenti (stime di presenza, densità e struttura della popolazione) e quelli mostrati da questo confronto annuale delle caratteristiche morfologiche, infatti, hanno suggerito che le attività gestionali, prelievo venatorio compreso, attuati nell'ultimo decennio, non hanno influenzato e modificato le caratteristiche della popolazione stessa. Ai fini di una gestione faunistica conservativa, questo risultato è da considerare con soddisfazione. Ritenendo comunque che ogni valutazione debba essere prudentiale, nel caso in cui questo risultato possa dipendere dal fatto che l'intervallo temporale studiato è troppo ristretto perché emergano effetti rilevabili, si auspica ad una raccolta costante e sistematica di questi dati, anche per gli anni futuri. Ciò sarebbe inoltre in accordo con il concetto di gestione adattativa, secondo il quale ogni scelta gestionale futura sia subordinata alla valutazione degli effetti delle attività gestionali già intraprese.

Riguardo lo studio della morfometria, risulta interessante ricordare che il comportamento talvolta anomalo di alcuni parametri contenuti nella scheda biometrica (lunghezza orecchio, lunghezza arto posteriore, lunghezza arto anteriore), ha suggerito l'importanza di chiarire le modalità di misurazione al fine di evitare campionamenti erranei. La possibilità per ogni Ambito Territoriale di Caccia di avere a disposizione un certo numero di "misuratori biometrici" qualificati, migliorerebbe la qualità dei dati raccolti. Già dalla prossima stagione venatoria (2008-2009), l'ATC PR 4 si avvarrà di questi esperti.

Le caratteristiche genetiche dei caprioli dell'ATC PR 4 sono state investigate con l'utilizzo di marcatori molecolari, sia a livello di DNA mitocondriale che di DNA nucleare.

Il genoma mitocondriale (mtDNA) per definizione non si trasmette secondo un modello ereditario mendeliano, ma attraverso il meccanismo dell'eredità materna: solo la madre trasmette il proprio mtDNA alla prole, senza eventi di ricombinazione. Le indagini a livello di DNA mitocondriale sono state condotte sulla regione di controllo (D-loop), per la sua capacità di accumulare mutazioni senza subire pressione selettiva su di esse. Sono stati sfruttati sia il sequenziamento, sia la tecnica SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism) che si è rivelata affidabile ed economica. Quest'ultima, infatti, sfrutta la possibilità di determinare il polimorfismo conformazionale del DNA a singolo filamento dovuto a differenze nelle sequenze, attraverso il diverso comportamento elettroforetico del singolo filamento stesso. All'interno dell'ATC PR 4 sono stati individuati 2 aplogruppi mitocondriali che, messi a confronto con quelli caratterizzati in diverse popolazioni italiane ed europee, sono risultati appartenere rispettivamente al clade che raggruppa aplotipi diffusi in Europa centrale ("centro-europeo") ed al sottoclade che raggruppa aplotipi diffusi in Italia Centro-Meridionale ("italicus").

L'aplogruppo più diffuso, ritrovato nel 77% degli individui del campione della provincia di Parma, è risultato simile a quelli caratterizzanti le popolazioni di *C.c. italicus* e già descritti anche in popolazioni toscane ed emiliane. La stessa indagine condotta su popolazioni al di fuori della provincia di Parma, ha consentito di confrontare dati provenienti da diverse aree geografiche (Lucca, Pisa, Reggio Emilia, Bologna). Il campione toscano è risultato essere costituito interamente da aplotipi del sottoclade "italicus", in accordo con osservazioni disponibili in letteratura (Lorenzini *et al.*, 2002). Il campione proveniente dalla provincia di Reggio Emilia ha presentato una composizione aplotipica comparabile a quella provincia di Parma, mentre in campioni provenienti da Bologna si è rilevata la presenza di aplotipi descritti in popolazioni dell'Est-Europa.

La presenza preponderante del cosiddetto aplotipo "italicus" rispetto a quella di aplotipi "centro-europei" ha portato alla formulazione di nuove ipotesi sulle possibili origini del popolamento della provincia di Parma (in particolare ATC PR 4), che aneddoticamente sono ritenute legate a reintroduzioni/ripopolamenti, spesso effettuati con soggetti provenienti dal Nord Italia e dall'Est Europa. Questi risultati suggeriscono

infatti una possibile influenza delle popolazioni toscane sulla composizione genetica del popolamento della provincia di Parma. Questa influenza potrebbe derivare da traslocazioni non registrate di individui dalla Toscana, o dalla presenza di “corridoi” naturali che permetterebbero il passaggio e la migrazione di individui, con la formazione di un unico e continuo habitat tra i due versanti appenninici.

Per verificare tale ipotesi e per chiarirne le dinamiche, è stato valutato se a livello nucleare esistesse una corrispondenza al dato mitocondriale. L’analisi condotta con marcatori nucleari RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e STR (Short Tandem Repeat), in grado di individuare differenze entro e tra popolazioni, ha evidenziato un buon livello di variabilità genetica che non sembra però essere correlata alla distanza geografica, supportando l’ipotesi di un flusso genico tra le popolazioni toscane ed emiliane. Gli individui che hanno presentato lo stesso aplotipo mitocondriale sono infatti risultati geneticamente più vicini sotto il profilo nucleare, indipendentemente dalla regione di campionamento: i soggetti appartenenti al gruppo “italicus” della provincia di Parma sono risultati geneticamente più vicini ai soggetti appartenenti al gruppo “italicus” provenienti dalla Toscana, piuttosto che ai caprioli della stessa provincia di Parma ma appartenenti al gruppo “centro-europeo”. Poiché non sembrano esserci evidenze di impedimenti all’accoppiamento tra individui delle due linee aplotipiche, il fatto che i marcatori rivelino ancora un certo grado di corrispondenza fra situazione mitocondriale e situazione nucleare può suggerire due possibili scenari:

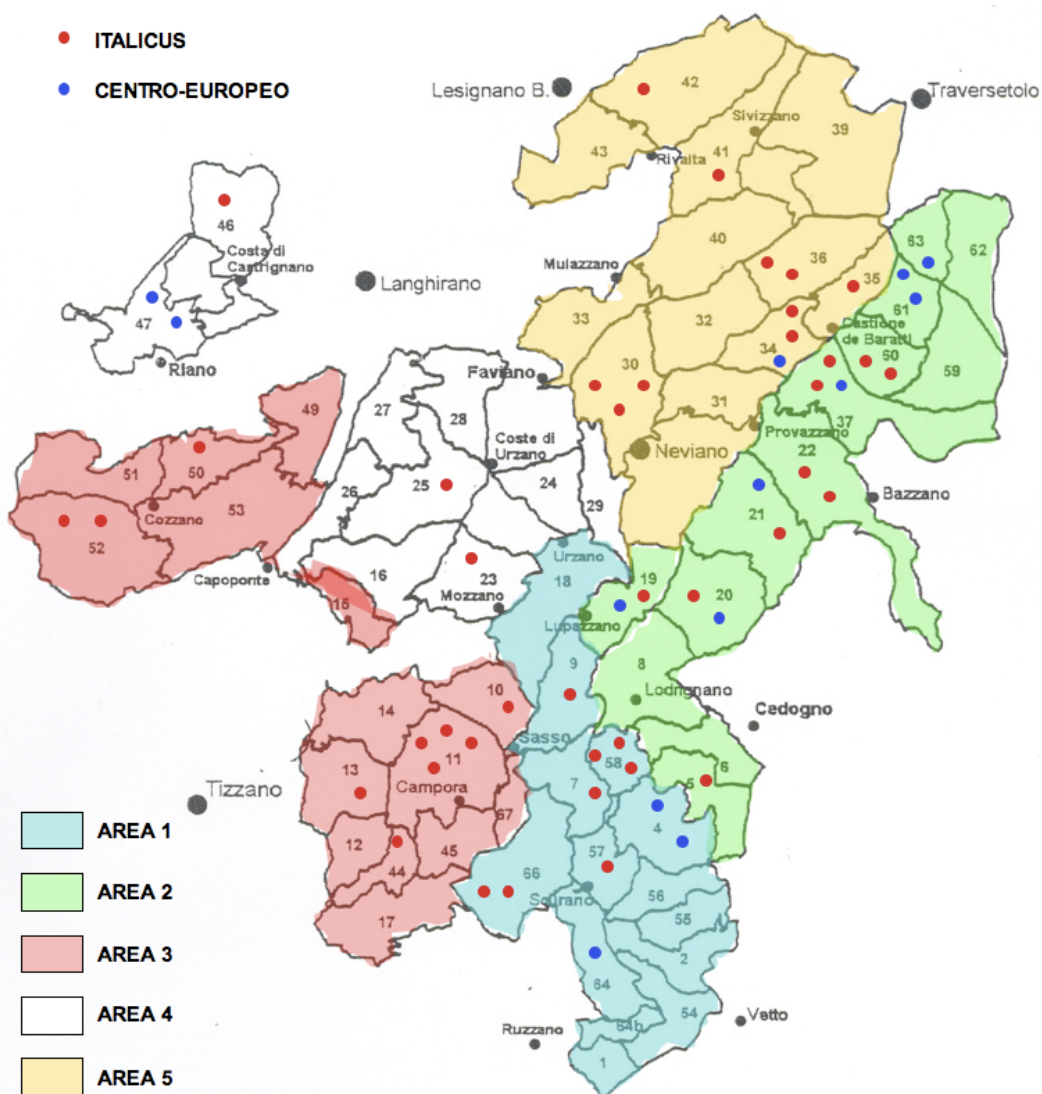
a) se si ipotizza che le popolazioni parmensi siano la conseguenza di reintroduzioni, i risultati preliminari delle indagini di biologia molecolare indicano che queste reintroduzioni sono state fatte sia con individui provenienti dalle Alpi e dall’Europa Centrale (come noto), sia con individui appartenenti a popolazioni peninsulari di capriolo “italicus” (non documentate), verosimilmente dalla Toscana, e che questo fenomeno deve essere avvenuto in tempi recenti, tanto da consentire tuttora una distinzione genetica anche a livello nucleare, nonostante l’assenza di barriere fisiche o biologiche fra le popolazioni ascrivibili ai due ceppi. Tale ipotesi però potrebbe non giustificare il fatto che l’aplotipo toscano (“italicus”) costituisca la frazione principale;

b) se si ipotizza invece che le popolazioni parmensi siano derivate in parte da reintroduzioni di individui provenienti dalle Alpi e dall'Europa centrale ed in parte dal flusso migratorio di individui appartenenti al ceppo "italicus" provenienti dalla Toscana, i risultati preliminari delle indagini di biologia molecolare indicano che questo flusso è avvenuto in tempi recenti o che addirittura è tuttora in corso, per il *continuum* geografico costituito dall'Appennino Tosco-Emiliano. Inoltre, le frequenze aplotipiche rilevate ("italicus" 77% e "centro-europeo" 23%) suggerirebbero che il fenomeno di migrazione dalla Toscana sia (e/o sia stato) "quantitativamente" più determinante ai fini della costituzione dell'attuale popolazione parmense, rispetto alle operazioni di traslocazioni artificiali dalle Alpi e dall'Europa centrale.

I 54 campioni provenienti dall'ATC PR 4 caratterizzati a livello mitocondriale, sono stati collocati sulla mappa del distretto di gestione del capriolo (D2), all'interno delle parcelle e delle aree di abbattimento con lo scopo di valutare la distribuzione geografica dei 2 aplotipi mitocondriali. Come è possibile vedere dalla figura riportata nella pagina seguente, risulta difficile descrivere un pattern preciso. Tenendo conto del fatto che il numero dei campioni non è distribuito in modo omogeneo per le diverse aree, poiché rispecchia a grandi linee la pressione venatoria in ognuna di esse in funzione delle densità di popolazione, si può comunque notare che all'interno dell'area 3 non sono stati campionati animali appartenenti al gruppo "centro-europeo". Al momento attuale delle indagini, tuttavia, sembra prudente non avanzare ulteriori interpretazioni. Anche in questo caso sarebbe utile aumentare il numero di campioni e collocare geograficamente gli stessi con sistemi di georeferenziazione.

A conclusione del presente lavoro, per i 54 caprioli maschi provenienti dall'ATC PR 4 per i quali erano disponibili sia la caratterizzazione mitocondriale, sia le misure biometriche, è stata valutata la corrispondenza fra differenze di tipo genetico ed eventuali differenze di tipo morfologico (schede biometriche). L'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative ($P > 0,05$) tra i due gruppi genetici "italicus" e "centro-europeo", per nessuna delle caratteristiche biometriche analizzate. Alla luce di questa osservazione, quindi, la chiara distinzione genetica osservata sia a livello di DNA mitocondriale che a livello di DNA nucleare non trova riscontro sotto il profilo morfologico. Nel suo complesso, questo risultato va considerato in termini di indagine

preliminare. Inoltre, lo studio dei parametri craniometrici potrebbe essere utile per affinare questo confronto: è possibile che alcune misure del cranio facciano emergere differenze fra diversi gruppi aplotipici (“italicus” e “centro-europeo”) fino ad oggi non rilevate (Montanaro *et al.*, 2003).



Grazie ai risultati forniti dal presente lavoro, è possibile individuare la direzione che dovrebbe essere presa da ulteriori indagini, condotte alla luce delle informazioni fin qui ottenute. Ai fini conoscitivi della specie e per il monitoraggio della situazione della popolazione in esame (ATC PR 4) risulta utile continuare costantemente con la raccolta dei dati biometrici e craniometrici annuali. Per la valutazione delle relazioni fra animali e ambiente è necessario affinare la tecnica di indagine con sistemi che consentono di raccogliere e ponderare le informazioni relative all'orografia, l'utilizzo del suolo, la meteorologia, ecc. Al fine di valutare più chiaramente l'impatto delle attività antropiche (fra cui la gestione venatoria), di eventuali fenomeni patologici, dell'azione dei predatori naturali, di eventi naturali (climatologia, migrazioni) sarebbe interessante poter integrare i dati morfologici con le informazioni di natura biomolecolare raccolte annualmente ed eventualmente con informazioni sulla situazione sierologica. Per descrivere con maggiore precisione le frequenze aplotipiche mitocondriali è opportuno procedere con l'analisi di altri campioni. Chiarimenti sull'origine delle popolazioni di capriolo della provincia di Parma e sulla dinamica di migrazione potranno essere forniti da ulteriori studi condotti con marcatori STR (microsatelliti), prendendo in considerazione un sufficiente numero di loci, un adeguato numero di campioni ed includendo nell'indagine altre popolazioni (province di Massa-Carrara, Piacenza, La Spezia, Genova, Asti, Alessandria, Pavia). Infine, dal punto di vista epidemiologico, il costante aggiornamento della banca di sieri consentirà di effettuare studi conoscitivi o retrospettivi sulla popolazione in esame.

Portare avanti le indagini seguendo le suddette linee guida, consentirebbe di ottenere importanti informazioni spendibili per una migliore gestione della specie, che nell'area considerata riveste una notevole importanza dal punto di vista dell'impatto sulle attività antropiche - non tanto per i danni sulle colture, quanto per i problemi causati alla viabilità -, dal punto di vista ecologico e dal punto di vista dello sfruttamento venatorio.

Lo scopo principale del presente lavoro è stato quello di descrivere le caratteristiche genetiche della popolazione di capriolo (*Capreolus capreolus*) in provincia di Parma, con particolare riferimento all'Ambito Territoriale di Parma 4 (ATC PR 4), e di fare ipotesi sulle origini. L'ATC PR 4 risulta ripartita in 5 aree a loro volta suddivise in parcelle, 64 in totale.

I dati qui analizzati sono stati raccolti su 1495 caprioli abbattuti nell'ATC PR 4 negli anni 2004, 2005, 2006 e 2007. Per ciascun capo sono state raccolte alcune misure biometriche desunte dalla scheda di abbattimento (peso pieno, lunghezza totale, altezza al garrese, circonferenza toracica, lunghezza orecchio, lunghezza arto anteriore e posteriore e circonferenza base collo). Per 54 animali inoltre è stato possibile estrarre DNA da materiale biologico (muscolo e/o fegato). Per 138 soggetti invece si sono potuti misurare alcuni parametri craniometrici (Lorenzini *et al.*,1996; Argon *et al.*,1997) in occasione dell'annuale esposizione dei preparati ossei degli animali abbattuti. Per 201 animali, infine, è stato collezionato un campione di siero allo scopo di creare una banca dati dalla quale attingere per indagini epidemiologiche conoscitive o retrospettive. L'analisi statistica delle caratteristiche morfologiche è stata condotta con ANOVA univariata ed in generale, le variabili considerate sono state: sesso, classe di età, anno di abbattimento, area di abbattimento. Il DNA estratto è stato analizzato sia a livello mitocondriale (D-loop) che a livello nucleare (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA). Per quanto riguarda l'analisi mitocondriale è stato utilizzato sia il sequenziamento diretto della regione D-loop che l'analisi della stessa per mezzo di SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism). Le sequenze D-loop ottenute sono state poste a confronto con quelle analoghe di capriolo già caratterizzate e analizzate per mezzo di algoritmi di allineamento multiplo. Le relazioni filogenetiche ottenute sono state rappresentate per mezzo di alberi (UPGMA e Neighbor-Joining). I traccianti RAPD (13 primers) sono stati analizzati attraverso algoritmi di genetica quantitativa al fine di ricavare indici in grado di descrivere la struttura genetica tra ed entro popolazione. Inoltre dagli stessi traccianti sono stati ricavati diversi indici di distanza genetica (Nei, euclidea, Jaccard) ed i risultati sono stati rappresentati per mezzo di PCA.

In una prima fase è stata condotta un'indagine morfologica sulle misure biometriche e sulle misure craniometriche. Gli animali sembrano assumere una conformazione adulta entro i due anni età (Soffiantini, 2002). In linea generale, i valori di gran parte delle misure biometriche sono aumentati in modo significativo nel passaggio dalla classe 0 (da 0 a 11 mesi di vita) alla classe 1 (da 12 a 23 mesi di vita). Tali incrementi sono risultati significativi, seppur in maniera meno accentuata, anche nel confronto fra subadulti (classe 1) ed adulti (classe 2: dal compimento del 2° fino al 7° anno di età). Nel confronto fra animali di classe 2 ed animali di classe 3 (oltre il settimo anno di vita), invece, non sono state registrate differenze significative per quasi la totalità dei parametri morfologici considerati. I soli parametri che hanno mostrato un incremento ancora significativo, passando dalla classe 2 alla classe 3, sono quelli legati alla struttura del palco (diametro del peduncolo) e alla lunghezza basale del cranio.

Il confronto fra i pesi pieni dei caprioli maschi prima e dopo il periodo degli amori (metà luglio-metà agosto) ha permesso di quantificare il dispendio energetico dei soggetti che partecipano alla riproduzione (classe 2 e 3): gli animali perdono mediamente il 7% del loro peso pieno.

La morfologia degli animali è risultata pressochè costante negli anni considerati, suggerendo che, almeno da questo punto di vista, la gestione faunistica ed in particolar modo il prelievo venatorio non hanno modificato le caratteristiche dei caprioli.

Alcune differenze sono invece emerse nel confronto della morfologia di animali abbattuti in aree diverse. In particolare, si è riscontrata la tendenza degli animali dell'area 1 a differenziarsi da quelli dell'area 5 per parametri biometrici in molti casi di valore inferiore. Si è ipotizzato che questo possa in parte essere dovuto a differenze ambientali, legate anche all'orografia: l'area 1 mostra altimetrie che risultano mediamente 300-400 m maggiori rispetto all'area 5.

In una seconda fase sono state condotte indagini biomolecolari sulla regione di controllo del DNA mitocondriale (D-loop) sfruttando sia il sequenziamento che la tecnica SSCP. In questo modo è stato possibile determinare che all'interno della popolazione studiata sono presenti due aplotipi mitocondriali che messi a confronto con quelli caratterizzati in diverse popolazioni italiane ed europee, sono risultati appartenere rispettivamente al clade che raggruppa aplotipi diffusi in Europa centrale

(“centro-europeo”) ed al sottoclade che raggruppa aplotipi diffusi in Italia Centro-Meridionale (“italicus”). Le frequenze aplotipiche sono risultate essere 77% per “italicus” e 23% per “centro-europeo”.

Al fine di valutare la corrispondenza fra dati mitocondriali e dati nucleari, il DNA nucleare è stato indagato con marcatori RAPD. Ai campioni della provincia di Parma sono stati aggiunti 10 campioni provenienti dalla Toscana (8 da Lucca e 2 da Pisa). I risultati ottenuti hanno suggerito che vi sia un elevato grado di corrispondenza fra situazione mitocondriale e situazione nucleare. I caprioli dell’ATC PR 4 classificati come “italicus” a livello di aplotipo mitocondriale hanno evidenziato profili nucleari RAPD più prossimi a quelli dei caprioli di Lucca e Pisa che non a quelli rilevati nei caprioli dell’ATC PR 4 con aplotipo mitocondriale “centro-europeo”: ciò suggerisce l’ipotesi di un flusso genico fra popolazioni toscane ed emiliane.

I risultati di biologia molecolare hanno portato alla formulazione di nuove ipotesi sulle possibili origini del popolamento della provincia di Parma, che aneddoticamente sono ritenute legate a reintroduzioni/ripopolamenti, effettuati con soggetti provenienti dal Nord Italia e dall’Est Europa. Essi suggeriscono infatti una possibile influenza delle popolazioni toscane sulla composizione genetica del popolamento della provincia di Parma. Questa influenza potrebbe derivare da traslocazioni non registrate di individui dalla Toscana, o dalla presenza di “corridoi” che permetterebbero il passaggio e la migrazione di individui, con la formazione di un unico e continuo habitat tra i due versanti appenninici. Vista la conservazione della differenziazione anche a livello nucleare, si può supporre che queste migrazioni siano avvenute in tempi recenti o che siano tutt’ora in atto. Inoltre, le frequenze aplotipiche, suggeriscono che questo fenomeno abbia avuto un peso preponderante nella costituzione dell’attuale popolazione.

I 54 campioni caratterizzati a livello mitocondriale, sono stati collocati sulla mappa dell’ATC PR 4 in funzione della parcella di abbattimento con lo scopo di valutare la distribuzione geografica dei 2 aplotipi. Allo stato attuale delle indagini gli aplotipi risultano posizionati senza descrivere un pattern preciso.

Per i 54 caprioli maschi provenienti dall’ATC PR 4 per i quali erano disponibili sia la caratterizzazione mitocondriale, sia le misure biometriche, è stata valutata la

corrispondenza fra differenze di tipo genetico ed eventuali differenze di tipo morfologico. L'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative ($P \leq 0,05$) tra i due gruppi genetici "italicus" e "centro-europeo", per nessuna delle caratteristiche biometriche analizzate. Alla luce di questa osservazione, quindi, la chiara distinzione genetica osservata sia a livello di DNA mitocondriale che a livello di DNA nucleare non trova riscontro sotto il profilo morfologico.

Nel complesso, i risultati ottenuti evidenziano l'utilità di una prosecuzione nella raccolta e nell'analisi di dati morfologici e genetici, al fine di definire con maggiore precisione le dinamiche proprie della popolazione studiata.

Genetic characterization of roe deer (*Capreolus capreolus*) in Parma province

Data were collected from 1495 roe deer (*Capreolus capreolus*) shot in a Hunting Zone of Parma (ATC PR 4) during 2004, 2005, 2006 and 2007. Body weight and linear parameters were measured on each head (body length, height at withers, chest circumference, ear length, fore leg length, hind leg length and circumference of neck's base). Moreover, the DNA of 54 subjects was extracted from tissue samples (muscle or liver). Craniometric measures were registered from 138 subjects. Finally, a sample of blood serum was collected from 201 heads. Morphometric measures were analysed by ANOVA univariate and the following factors were considered: sex, age class, year, area. DNA was analysed both at mitochondrial (D-loop) and nuclear level (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA). The D-loop region of mitochondrial DNA (mtDNA) was sequenced and analysed by means of SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism). D-loop sequences were compared with those of roe deer characterised in previous studies and were analysed with multiple alignment algorithms (CLUSTAL W). Phylogenetic relationships were represented with UPGMA and Neighbor-Joining trees. RAPD profiles were analysed with quantitative genetic methods to obtain descriptors of the genetic structure into and among populations. Moreover, genetic distance indexes were obtained from the same profiles and the results were represented by PCA.

The first step was to investigate the morphology of the population. The animals seemed to reach an adult conformation within the first 2 years of life. In general many biometric parameters have significantly increased from class 0 (from 1st to 11th month) to class 1 (from 12th to 23rd month). The increase has also been detected from class 1 to class 2 (from 2nd to 7th year), even if with a lower evidence. On the contrary, the comparison between class 2 and class 3 (over 7th year) did not show significant differences for any measurements, except for a parameter correlated to the structure of the antler (width of the pedicles) and for the basal length of the skull.

The comparison between the total weight of the reproductive males (class 2 and 3) before and after the rutting season (from 15th July to 15th August) showed a

considerable loss of weight probably linked to the reproduction activity (7%, corresponding to 2,0 kg).

Considering different years, the morphology seemed to keep constant. This result suggests that the hunting management did not affect the population, at least from a biometric point of view.

Comparing animals shot in different areas, it was possible to detect the tendency of roe deer from area 1 to be significantly smaller, for some parameters, than roe deer from area 5. This could be put in relation to the different habitat accordingly to a different orography: area 1 showed an altitude on average 300-400 m higher than area 5.

Biomolecular analyses of the mtDNA D-loop region were carried out with direct sequencing and SSCP. MtDNA D-loop sequences of Parma roe deer were compared with those of European and Italian roe deer sequences already characterised in previous researches. 13 samples out of the 54 collected in Parma, clusterized within the clade represented by aplotypes diffused in central Europe ("central-europe"), while 41 clusterized within the subclade comprising aplotypes of Central-South Italy ("italicus"). Aplotypes frequencies were 77% and 23% for "italicus" and "central-europe", respectively.

Nuclear DNA was investigated with RAPD markers to evaluate the correspondence between mtDNA and nuclear results: as well as 30 samples from Parma, 10 samples from Tuscany (8 from Lucca and 2 from Pisa) were analysed for RAPD. Data showed a strong correspondence between mtDNA and nuclear situation.

RAPD profiles of samples from Parma, classified as "italicus" at mtDNA level, were more similar to the samples collected in Lucca and Pisa than to the profiles shown by animals classified as "central-europe" (mtDNA) within the stock of Parma. This suggests the hypothesis of a genetic flux between the populations of Tuscany and Emilia-Romagna.

The roe deer population of Parma was historically believed to originate from subjects coming from the North of Italy and Eastern Europe. The results arise new hypothesis about this origins: a possible influence of populations from Tuscany is suggested. This influence can be the consequence of reintroductions as well as

migration phenomena. As the 2 mtDNA aplogroups (“italicus” and “central-europe”) were different even at nuclear level, it is possible to suppose that such migration lasted till few years ago or that this movement is still going on. Furthermore, mtDNA frequencies suggest that this phenomena has been very relevant in the determination of the genetic structure of the current roe deer population.

When the genotyped samples are put on a map of ATC PR 4, no pattern can be detected.

Weight and linear measures were available for 54 genotyped animals (mtDNA level) and the last step of this research was to evaluate if a genetic diversity is associated to a morphologic one. In this concern, no significant differences were observed between the 2 mtDNA aplogroups.

Apollonio M (2007), comunicazione personale.

Aragon S, Blaza F, San Joe C, Fandos P (1997). *Variation in skull morphology of roe deer (Capreolus capreolus) in Western and Central Europe*, Journal of Mammology, 79: 131-140.

Azorit C, Munoz-Cobo J, Hervas J, Analla M (2004). *Aging through growth marks in teeth of Spanish red deer*. Wildlife Society Bulletin, 32(3): 702-710.

Clutton-Brock J (2001). *Storia naturale della domesticazione dei mammiferi*. Ed. Bollati Boringhieri.

Douzery E, Randi E (1997) *The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content*. Molecular Biology and Evolution, 14: 1154-1166.

Emmans G.C. (1989). *The growth of turkeys*. In "Recent advances in turkey science", Nixey C. and Grey T.C. Ed., Butterworths.

Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992). *Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data*. Genetics, 131: 479-491.

Felsenstein J (1985). *Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap*. Evolution, 39:783-791.

Ferloni M (1998). *Principi e tecniche di gestione faunistico-venatoria*, di Simonetta A. M. e Dessì-Fulgheri F., Ed. Greentime.

Festa E (1925). *Il capriolo dell'Italia Centrale*. Bollettino del Museo di zoologia dell'Università di Torino, vol. XL, Nuova Serie, N. 37 (Napoli).

Fickel J, Reinsch A (2000). *Microsatellites markers for the European Roe Deer* (*Capreolus capreolus*). *Molecular Ecology*, 9: 994.

Franchi O, Giorgetti A, Gremoli G, Zappa A (1989). *Evoluzione delle caratteristiche morfologiche nel cavallo Avelignese in accrescimento*. *Zootecnica Nutrizione Animale*, 15: 373-380.

Governo RM, Shea SM, Somers G, Ditchkoff SS (2006). *Using mandibular tooth row length to age yearling White-Tailed Deer*. *Wildlife Society Bulletin*, 34(2): 345-350.

Hollingsworth PM, Ennos RA (2004). *Neighbour joining trees, dominant markers and population genetic structure*. *Heredity*, 92: 490-498.

Huff DR, Peakall R, Smouse PE (1993). *RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss* [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm]. *Theoretical and Applied Genetics*, 86: 927-934.

Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica (2006). *Comunicazione personale*.

Jaccard P (1908). *Nouvelles recherches sur la distribution florale*. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 44: 223-270.

Kemp SJ, Hishida O, Wambugu J (1995). *A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers*. *Animal genetics*, 26: 299-306.

Ladini F (1989). *Il capriolo*, Ghedina e Tassoni.

Lambert RT (1998). *Delayed implantation. The enigma of the female roe deer*. *Deer, Journal of the British Deer Society*, 10: 7, 409-413.

Lambert RT (2005). *A pregnancy-associated glycoprotein (PAG) unique to the roe deer (Capreolus capreolus) and its role in the termination of embryonic diapause and maternal recognition of pregnancy*. Israel Journal of Zoology, vol. 51, n. 1, 1-11.

Lambert RT, Ashworth CJ, Beattie L, Gebbie FE, Hutchinson JS, Kyle DJ, Racey PA (2001). *Temporal changes in reproductive hormones and conceptus-endometrial interactions during embryonic diapause and reactivation of the blastocyst in European roe deer (Capreolus capreolus)*. Reproduction, 121: 863-871.

Lambert RT, Racey PA, Ashworth CJ. *The pre-oestrus signal, variation in pregnancy length and photoperiod manipulation of pregnant roe deer does (Capreolus capreolus)*, dal sito www.roedeer.com.

Lehmann (von) E (1973). *Die Säugetiere der Hochlagen des Monte Caramolo (Lucanischer Apennin, Nordkalabrien)*. Suppl. Ricerche Biol. Selavaggina, Vol. V, N. 4 (Bologna).

Lorenzini R, Lovari S, Masetti M (2002). *The rediscovery of the Italian roe deer: genetic differentiation and management implications*. Italian Journal of Zoology, 69: 367-379.

Lorenzini R, Mattioli L, Rustoni M, Patalano M (1996). *Allozyme and craniometric variability in the Roe Deer (Capreolus capreolus L.) from Central Italy*. Zeitschrift für Säugetierkunde – International Journal of Mammology, 61: 7-24.

Lynch M, Milligan BG (1994). *Analysis of population genetic structure with RAPD markers*. Molecular Ecology, 3: 91-99.

Madden TL, Tatusov RL, Zhang J (1996). *Applications of network BLAST server*. Methods in Enzymology, 266: 131-141.

Mattioli S e Nicoloso S (2000). *Il cervo*, Edizioni D.R.E.Am. Italia.

McCarthy C (1996) Chromas. www.technelysium.com.au/chromas.html, Queensland, Australia.

McCollough DR, Beier P (1986). *Upper vs. lower molars for cementum annuli age determination of deer*. Journal of Wildlife Management, 50(4): 705-706.

Mitchell B (1967). *Growth layers in dental cement for determining the age of red deer (Cervus elaphus L.)*. Journal of Animal Ecology, 36(2): 279-293.

Montanaro P, De Marinis AM, Riga F, Focardi S (2003). *Variabilità craniometrica in alcune popolazioni italiane di capriolo*. Hystrix, Italian Journal of Mammology, 14(s.i.): 169-170

Mullis KB, Faloona FA (1987). *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction*. Methods in Enzymology, 155:335-350.

Mustoni A, Pedrotti L, Zanon E, Tosi G (2002). *Ungulati delle Alpi*, Nitida Immagine Editrice.

Needleman SB, Wunsch CD (1970). *A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins*. Journal of Molecular Biology, 48, 443-453.

Nei M (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

Orita MY, Suzuki T, Hayashi K (1989). *Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction*. Genomics, 5: 874-879.

- Orloci L (1978). *Multivariate Analysis in vegetation research*. The Hague: Dr W. Junk B.V.
- Peakall R, Smouse PE (2006). *GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research*. *Molecular Ecology Note*, 6: 288-295.
- Peakall R, Smouse PE, Huff DR (1995) *Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid population of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides**. *Molecular Ecology*, 4: 135-147.
- Pedrotti L, Dupre' D, Preatoni D, Toso S (2001). *Banca Dati Ungulati: status, distribuzione, consistenza, prelievo venatorio e potenzialità delle popolazioni di ungulati in Italia*. *INFS, Biologia e Conservazione della Fauna*, 109: 1-132.
- Pelagalli GV, Botte V (1989). *Trattato di anatomia sistematica e comparata*, EDI-ERMES.
- Perco F (1987). *Ungulati*. Carlo Lorenzini Editore, Udine.
- Perco F, Perco D (1979). *Il capriolo*. Ed. Carso, Sgonico, Trieste.
- Perco F. (1955). *La gestione faunistica del capriolo*. Habitat editore.
- Ponti F (1992). *Il patrimonio capriolo*. Carlo Lorenzini editore.
- Randi E, Alvez PC, Carranza J, Milosevic- Zlatanovic S, Sfougaris A, Mucci N (2004). *Phylogeography of Roe Deer (*Capreolus capreolus*) populations: the effects of historical genetic subdivision and recent nonequilibrium dynamics*. *Molecular Ecology*, 13: 3071-3083.
- Randi E, Pierpaoli M, Danilkin A (1998) *Mitochondrial DNA polymorphism in populations of Siberian and European roe deer (*Capreolus pygargus* and *C. capreolus*)*. *Heredity*, 80: 429-437.

Robbins CT (1993), *Wildlife feeding and nutrition*, Academic Press Inc.

Sabbioni A, Soffiantini CS, Beretti V, Pisani GM, Sussi C, Superchi P (2002). *Misurazioni somatiche e curve di crescita nella popolazione di caprioli dell'Appennino Parmense*. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma, XXII: 135-153.

Saitou N, Nei M (1987). *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Molecular Biology and Evolution, 4: 406-425.

Schams D, Barth D, Karg H (1980). *LH, FSH and progesterone concentrations in peripheral plasma of the female roe deer (Capreolus capreolus) during the rutting season*. Journal of Reproduction and Fertility, 60: 109-114.

Smith TF, Waterman MS (1981). *Identification of common molecular subsequences*. Journal of Molecular Biology, 147: 195-197.

Sneath PHA, Sokal RR (1973) *Numerical taxonomy*. San Francisco: W.H. Freeman.

Soffiantini CS (2002). *Confronto fra le popolazioni di capriolo dell'Appennino Parmense in base ai parametri dell'accrescimento*. Tesi di laurea in Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.

Soffiantini CS, Sabbioni A, Beretti V, Pisani GM, Sussi C, Superchi P, Zanon A, (2003). *Relative growth of body traits of roe deer (Capreolus capreolus) in Parma Apennines*. Atti del III International Symposium on Wild Fauna, Ischia-Italy, May 24-28, 2003, pp. 300-303.

Spagnesi M e Toso S (1991). *I Cervidi: biologia e gestione*, Istituto Nazionale di Biologia della Selvaggina, Documenti Tecnici, 8.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680.

Vernesi C, Pecchioli E, Caramelli D, Tiedemann R, Randi E, Bertorelle G (2002). *The genetic structure of natural and reintroduced roe deer (Capreolus capreolus) population in the Alps and Central Italy, with reference to the mitochondrial DNA phylogeography of Europe*. Molecular Ecology, 11: 1285-1297.

Vial L, Maudet C, Luikart G (2003). *Thirty-four polymorphic microsatellites for European roe deer*. Molecular Ecology Notes, 3: 523-527.

White G (1974). *Age determination of roe deer (Capreolus capreolus) from annual growth layers in the dental cementum*. Journal of Zoology, 174(4): 511-516.

Whitehead GK (1972). *Deer of the world*, Constable, London, UK.

Wright S (1951). *The genetic structure of populations*. Annal of Eugenics, 15: 323-354.

Grazie di cuore all'ATC PR 4 ed a tutti i cacciatori per avermi accolto ed aiutato. Grazie per avermi confermato ancora una volta che è possibile lavorare seriamente anche col sorriso. Un grazie particolare al Presidente Gino Galvani per la sua capacità di vedere lontano. Grazie a Claudio (Iemmi), Domenico (Beatrici), Bruno (Araldi), Michele (Mistrali), Stefano (Fontanesi), Cabrè (Mauro Cabrini), Antonio (Roncai), Mauro Fontana, per avermi sempre assecondato e sostenuto. Sono fiera dell'amicizia che ci lega.

Grazie alla splendida famiglia di Ulisse Rossi per avermi offerto ospitalità a qualsiasi ora, estate ed inverno, in occasione della raccolta dei campioni.

Grazie al sig. Silvano Valenti, per la caparbietà e la competenza con le quali si prende cura dei suoi caprioli.

Grazie alla Provincia di Parma, Ufficio Risorse Naturali, per aver reso possibile il campionamento sugli animali oggetto di recupero.

Grazie al sig. Renzo Bruschi, Presidente dell'ATC PR 9, per l'interesse dimostrato, con la speranza che possa proseguire una proficua collaborazione.

Grazie all'ATC RE 4 "Montagna" per aver permesso il campionamento su alcuni dei capi abbattuti.

Grazie ai centri di recupero per la fauna selvatica di Sasso Marconi (Monte Adone) e Modena (Il Pettiroso) per aver offerto grande disponibilità, nonostante i mille impegni giornalieri.

Grazie alla sezione di Parma dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna ed al suo direttore (Dott. Giuseppe Barigazzi) per la competenza e la gentilezza dimostrate in ogni occasione.

Grazie al Dott. Santiago Aragon Albillos per aver fornito materiale scientifico con estrema cortesia e tempi da record.

Grazie al Prof. James Tagliavini per il suo impegno, nonostante stia "abbastanza male", e per la sua capacità critica.

Grazie a Greta (Dott.ssa Gandolfi) per la precisione e la passione nello svolgere il duro lavoro di laboratorio.

Grazie alla Dott.ssa Isabella La Fata per aver condotto parte delle indagini di statistica.

Grazie a tutti i componenti di Zootecnica e Alimentazione.

Grazie al Prof. Alberto Sabbioni per la fiducia.

Grazie a Valentino (Dott. Beretti) per aver salvato diverse situazioni critiche.

Grazie a Stefano (futuro Dott. Tamanini) per aver gentilmente fornito i campioni della Provincia Autonoma di Trento.

Grazie al Prof. Primo Mariani per la sua presenza attenta e discreta.

Grazie al Prof. Andrea Summer per non aver mai fatto mancare il suo appoggio.

Grazie a Paolo (Dott. Formaggioni) per la sua presenza inquietante e rassicurante al tempo stesso.

Grazie a Piero (Dott. Franceschi) per la disponibilità incondizionata e per l'allegria.

Ringraziare Max (Dott. Malacarne) mi sembra ridicolo: semplicemente, senza il suo aiuto questo lavoro non sarebbe stato possibile. Grazie per aver dato forma e concretezza ad un'idea talvolta nebulosa.

Grazie a Gino (Gino Davoli) per le cose che ha voluto insegnarmi. Non lo dimenticherò.

Grazie a Gianmaria (Dott. Pisani) per la sua capacità di dirmi con estrema tranquillità "Sto aiutando il circo Orfei a svezzare un canguro..." e per quella che ha di dirmi "Ho macchiato la camicia..." con aria molto preoccupata. Grazie ancora una volta per il suo tempo.

Grazie alle Mie Amiche che cercano pazientemente di seguire il mio percorso un po' disordinato senza dare segni di insofferenza.

Grazie alla mia grande e chiassosa famiglia che, nonostante non abbia forse chiaro cosa significhi "tesi di dottorato" ("...non eri già laureata?"), mi è sempre vicina e, come una legione romana, non arretra di un passo. Mai.