

**Progetto di sistema dei Parchi Nazionali
per la conservazione della lepre italiana
(*Lepus corsicanus*)**



PNALM

Relazione attività inverno 2019-2020

INDICE

1. INTRODUZIONE	2
2. METODI	2
2.1 Area di studio	2
2.2 Metodi di raccolta e analisi	3
3. RISULTATI	4
3.1 Sforzo e resa di raccolta	4
3.2 Risultati delle analisi genetiche	4
4. DISCUSSIONE	5
5. BIBLIOGRAFIA	7
6. ALLEGATO	8

1. INTRODUZIONE

Dal 2019 al 2020 nel PNALM sono proseguite le indagini condotte nell'ambito del Progetto di sistema sulla conservazione della Lepre italiana (*Lepus corsicanus*). Vista la difficoltà a distinguere visivamente le due specie di lepre (lepre italiana e lepre europea) dalle immagini rilevate mediante fototrappolaggio e considerata la bassa resa della medesima tecnica riscontrata dal 2015 al 2018 (numero di eventi attribuibili a lepre italiana e numero di eventi non classificabili in termine di specie), nel 2019 si è stabilito di proseguire le indagini mediante analisi genetica su pellet fecali raccolti su terreno innevato secondo protocolli di raccolta e campionamento ben definiti. A tal fine è stata stipulato tra il Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise e il Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi Federico II di Napoli un accordo di collaborazione per lo svolgimento delle analisi genetiche.

L'obiettivo specifico delle indagini intraprese dal 2019 è quello di verificare la presenza di lepre italiana nelle aree già investigate a partire dal 2015 ma nelle quali non era stata riscontrata la presenza della lepre italiana ed espandere le indagini in aree non precedentemente investigate. Come riportato nella precedente relazione (stato di avanzamento inverno 2018-2019), sono state individuate un totale di 6 aree da monitorare, ciascuna con un diverso livello di priorità relativamente ai risultati conseguiti negli anni precedenti. Di queste 2 sono state già investigate nel 2019.

2. METODI

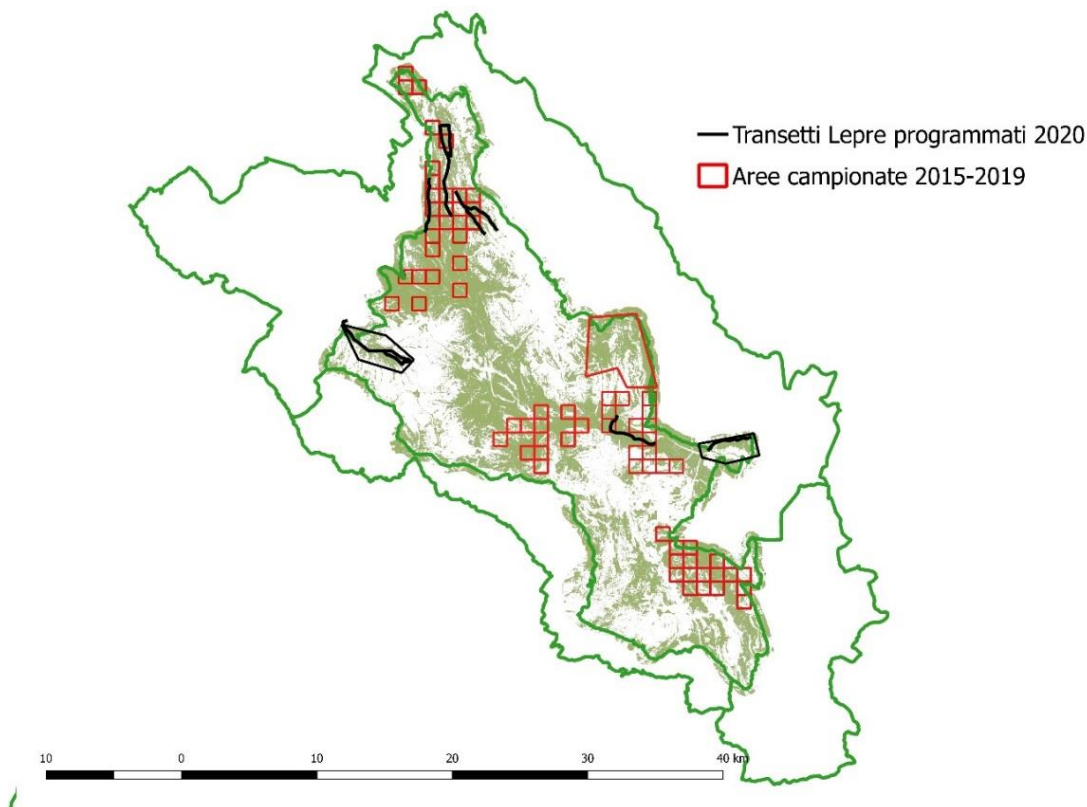
2.1 Area di studio

Nell'inverno 2019-2020 la ricerca dei campioni da destinare all'analisi genetica è stata pianificata lungo 10 transetti all'interno di 4 aree di indagine: Valle del Giovenco (Comune di Bisegna), Prati d'Angro (Comune di Villavallelonga), Camosciara (Comune di Villetta Barrea) e Valle Ianara (Comune di Barrea) (Figura 1; Tabella 1). Le aree del Giovenco e di Villetta Barrea sono già state già oggetto di campionamento nel 2016 e 2017, ma con esito negativo (Figura 1 e Tabella 1). I percorsi sono stati individuati lungo sentieri e/o sterrate che attraversano le aree di maggiore idoneità per la lepre secondo il modello di idoneità prodotto da ISPRA e includendo il maggiore numero di ambienti possibile.

Tabella 1. Aree di monitoraggio e transetti individuati per la stagione invernale 2019-2020 nel PNALM.

Area	ID percorso	N transetti	Lunghezza (km)	Storia del campionamento
Valle Giovenco	Santa Lucia	2	5,4	Campionata nel 2017 con esito negativo
	Ferriera	1	4,7	
	Lantera e Prati del Lupo	2	3,0	
	Culla del Diavolo	1	3,9	
Prati D'Angro	Fonte Astuni	1	3,1	Nuova area
	Prati D'Angro	1	5,6	Nuova area
Villetta e Barrea	Camosciara	1	4,7	Campionata nel 2016 con esito negativo
	Valle Ianara	1	3,4	Nuova area

Figura 1. Localizzazione dei transetti individuati per la ricerca di pellet di lepre da percorrere nell'inverno 2019 -2020 nel settore Nord (Valle Giovenco), Nord-Ovest (Prati D'Angro), e centro Est (Villetta Barrea e Barrea) del PNALM.



2.2 Metodi di raccolta e analisi

La ricerca di tracce di lepre lungo i percorsi viene effettuata entro 2-5 giorni da una nevicata, al fine di consentire la raccolta di escrementi freschi. Nel momento in cui lungo il percorso vengono individuate tracce di lepre, queste si seguono fino ad un eventuale sito di deposizione di pellet. Per ogni traccia viene prelevato un campione, ovvero 1 pellet fecale ed una eventuale replica dello stesso qualora deposti a distanza ravvicinata. Una volta individuata una traccia e raccolto un singolo campione di feci, nessun'altra traccia viene seguita nei 30 metri successivi (Murray et al. 2002, Buglione et al., 2017), ciò al fine di aumentare la probabilità di campionare individui diversi. In assenza di precipitazioni, gli escrementi vengono raccolti esclusivamente da tracce con contorni ben visibili sullo strato di neve vecchia (Rehnus & Bollmann, 2015). In assenza di tracce, feci immerse nella neve (> 50 cm) vengono considerate deposte prima dell'ultima nevicata e non databili con certezza e quindi non vengono raccolte. Ogni traccia intercettata viene georeferenziata, così come ogni campione raccolto. I percorsi vengono replicati in caso di non ritrovamento di escrementi. La raccolta e conservazione dei pellet viene effettuata in base al protocollo elaborato dal Dipartimento di Biologia dell'Università degli studi Federico II (Prof. Domenico Fulgione). I campioni sono analizzati: a) per l'assegnazione a livello di specie mediante l'analisi High Resolution Melting (HRM)(Wittwer et al., 2003); b) sequenziamento Sanger per l'identificazione dell'aplotipo nel caso in cui le analisi HRM indicavano lepre europea (*Lepus europaeus*); infine c) le sequenze nucleotidiche dei campioni di lepre europea sono state allineate e clusterizzate con i principali cladi europei di questa specie (Kasapidis et al., 2005)

3. RISULTATI

3.1 Sforzo e resa di raccolta

Le attività di ricerca di pellet di lepre lungo transetti sono state svolte nel periodo compreso tra il 7 ed il 10 febbraio in coincidenza delle uniche giornate in cui si sono verificate precipitazioni nevose nelle aree oggetto di indagine. In totale, sono stati percorsi 6 transetti sul totale dei 10 previsti, percorrendo 13,9 km in 18,5 ore di lavoro da parte di 4 squadre di 2 operatori. La distanza media (\pm DS) percorsa per ciascun transetto è stata di $3,5\pm 1,1$ km (min-max: 1,9-4,8 km). Per ogni percorso state seguite da 12 a 18 tracce di lepre, con una resa di raccolta di pellets variabile tra il 56 e il 100% a seconda del transetto. Il tempo medio (\pm DS) impiegato per percorrere un transetto e svolgervi tutte le attività necessarie al reperimento e alla raccolta di campioni è stato di $3,7\pm 1,0$ ore (min-max: 3,0-5,5). In tutti i percorsi tranne uno (zona Ferriera nella Valle del Giovenco), sono stati raccolti campioni fecali, di cui 41 nella Valle del Giovenco e 15 nei Prati D'Angro.

Tabella 2. Sforzo ed esito dei percorsi di raccolta per la ricerca di pellet di lepre realizzati nell'inverno 2019-2020 nelle aree di campionamento della valle del Giovenco e Prati D'Angro.

¹ Lo sforzo è calcolato come il tempo necessario a percorrere il transetto e seguire le tracce (ora fine transetto-ora inizio transetto)

Area	Transetto	Data	Km percorsi	Sforzo (ore) ¹	N tracce	N tracce con pellet	% tracce con pellet	N pellet	N repliche
Valle Giovenco	11- Ferriera	7-feb	4,8	3,5	10	0	100,0	0	0
	14 - Culla del Diavolo	8-feb	4,0	5,5	18	17	55,6	22	5
	12 - Prati del Lupo	10-feb	4,5	3,0	13	8	76,9	8	0
Prati D'Angri	13 -Lantera	10-feb	1,9	3,5	12	10	83,3	11	1
	15 - f.te Astuni/16 -prati d'Angro	9-feb	3,5	3,0	12	9	83,3	15	4
Totale			13,9	18,5	65	44	70,1	56	9

3.2 Risultati delle analisi genetiche

Il DNA è stato estratto con successo per tutti i campioni e malgrado la bassa qualità del DNA, dovuto probabilmente all'età dei campioni (raccolti a febbraio 2020 e inviati al laboratorio e analizzati a dicembre 2020), l'analisi ha permesso di determinare la specie per 49 su 56 reperti (16 sono stati assegnati a lepre italiana e 33 a lepre europea) e solo per 7 campioni, nonostante le diverse ripetute repliche, non è stato possibile recuperare il DNA degradato (resa dell'88%). In entrambe le aree investigate è stata accertata la presenza di lepre italiana (Tabella 2; Figura 2). Nel Giovenco il 22,5 % dei campioni raccolti sono stati attribuiti a lepre italiana (n=9) e la presenza è stata rilevata in tutti i percorsi in cui sono stati raccolti pellets. Nella zona di Prati d'Angro il 42,8% dei campioni analizzati sono stati attribuiti a lepre italiana (n=6). La qualità del DNA ha purtroppo inficiato le successive procedure per la determinazione dell'aplotipo *Lepus europaeus meridiei* mediante sequenziamento, infatti, non è stato possibile operare nessuna ulteriore analisi sui campioni assegnati alla specie lepre europea.

Tabella 3. Risultati delle analisi genetiche effettuate su pellet di lepre rinvenuti lungo i transetti percorsi nell'inverno 2019-2020 nelle aree della Valle del Giovenco e Prati D'Angri.

Area	Transetto	N pellet		NR
		<i>L. corsicanus</i>	<i>L. europea</i>	
Giovenco	11 - Ferriera	–	–	–
	14 - Culla del Diavolo	5	16	1
	12 - Prati del Lupo	2	5	1
	13 - Lantera	2	5	3
Prati D'Angro	15 - F.te Astuni	7	7	1
	16 - Prati d'Angro			
Totale		16	33	6

4. DISCUSSIONE

Unendo tutti i dati raccolti a partire dal 2015 ad oggi, la presenza della lepre italiana in simpatria con la lepre europea è stata confermata nei principali settori del PNALM (settentrionale, centrale e meridionale) in territorio abruzzese e molisano (Tabella 4; Figura 3). Rimane tuttavia da confermare in tempi recenti la presenza della specie nel versante laziale, dove tuttavia esistono dati meno recenti di presenza raccolti dalla Regione Lazio. Per quanto riguarda la lepre europea, i dati finora raccolti hanno rilevato la presenza dell'aplotipo arcaico *meridiei* in 3 campioni prelevati da carcasse provenienti da 3 aree differenti (Ferroio; Gioia dei marsi; Castel di Sangro – area esterna al PNALM). Per quanto riguarda gli sviluppi per l'inverno 2020-2021, si contemplano i seguenti obiettivi, come riportato in Tabella 5:

- completare il campionamento nelle aree Parco non effettuate durante il 2019 a causa della ridotta stagione nevosa (Villetta Barrea e Barrea);
- completare il campionamento nel versante laziale del Parco;
- ampliare il campionamento nella area contigua in aree di sovrapposizione con le attività di caccia nella Regione Abruzzo.

Tabella 4. Esito delle indagini su lepre italiana nel PNALM dal 2015 al 2020

Area	Anno	Tipo indagine			
		Genetica		Fototrappolaggio	
		<i>L.italica</i>	<i>L.europea</i>	<i>L.italica</i>	<i>L.europea</i>
Cicerana	2015-2016	no	si	si	si
Pescasseroli	2015-2016	si	si	si	si
	2018	-	-	si	si
Opi	2016	-	-	si	si
Villetta	2016	-	-	no	si
Mainarde	2017	-	-	no	si
	2019	si	si	-	-
Giovenco	2017	-	-	no	si
Giovenco	2019	si	si	-	-
Ferroio	2019	si	si	-	-
Prati D'angro	2020	si	si	-	-

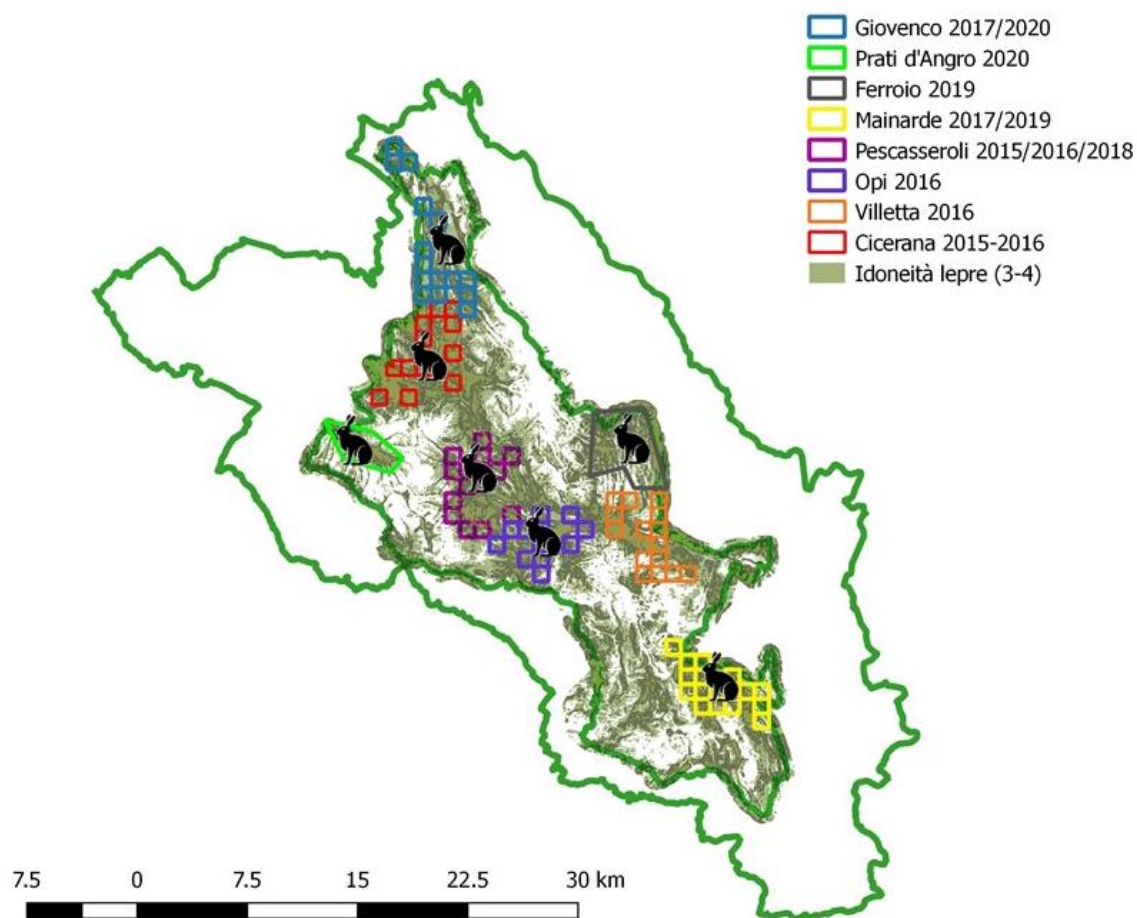


Figura 3. Aree monitorate dal 2015 al 2020 tramite foto-trappole e/o genetica per la determinazione della presenza di lepre italiana nel PNALM. L'icona della lepre rappresenta le aree in cui è stata rilevata la presenza di lepre italiana. La lepre europea è stata invece rilevata in ogni area indagata.

Tabella 5. Proposta di monitoraggio per l'inverno 2020-2021

Area	Percorsi/zone	Sforzo minimo (in assenza di repliche)	Numero campioni previsti (stima)
VILLETTA/BARREA	Camosciara	1 giorno (2 operatori)	10
	Ianara	1 giorno (2 operatori)	10
ATC SULMONA	6 percorsi (2 zone: Mitola - Olmo - Bobbi)	6 giorni (2 operatori/percorso)	60
ATC AVEZZANO	3 percorsi (1 zona: Guardia - Lecce Vecchio)	3 giorni (2 operatori/percorso)	30
PNALM LAZIO	Val Canneto	1 giorno (2 operatori)	10
	Venafrana	1 giorno (2 operatori)	10

5. BIBLIOGRAFIA

- Buglione M, Maselli V, Ripa D, de Filippo G, Trapanese M, Fulgione D. (2017). A pilot study on the application of DNA metabarcoding for non-invasive diet analysis for the Italian hare. *Mammalian Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.mambio.2017.10.010>.
- Murray, D. L., Roth, J. D., Ellsworth, E., Wirsing, A. J., & Steury, T. D. (2002). Estimating low-density snowshoe hare populations using fecal pellet counts. *Canadian Journal of Zoology*, 80(4), 771-781.
- Kasapidis P, Suchentrunk F, Magoulas A, Kotoulas G. 2005. The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34(1): 55-66.
- Rehnus, M., & Bollmann, K. (2016). Non-invasive genetic population density estimation of mountain hares (*Lepus timidus*) in the Alps: systematic or opportunistic sampling?. *European journal of wildlife research*, 62(6), 737-747.
- Santini A, Lucchini V, Fabbri E and Randi E. 2007. Ageing and environmental factors affect PCR success in wolf (*Canis lupus*) excremental DNA samples. *Molecular Ecology Notes* 7:955-961.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteegen JG and Pryor RJ. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry* 49: 853-860

6. ALLEGATO

RELAZIONE UNIVERSITÀ DI NAPOLI FEDERICO II



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI *FEDERICO II*
Scuola Politecnica e delle Scienze di Base
Dipartimento di Biologia



Caratterizzazione genetica di campioni di DNA estratti da escrementi e tessuti di lepre raccolti nel Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise nell'ambito di un accordo di collaborazione scientifica tra Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise e Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Napoli Federico II per la realizzazione di un progetto di ricerca sulla lepre italiana (CUP C26C19000120005)

dicembre 2020





In data 26/03/2019 il Prof. Domenico Fulgione del Dipartimento di Biologia dell'Università di Napoli Federico II riceve 52 campioni di lepre (Gruppo 1 - Tabella 1 e Figura 1) inviati dalla Dott.ssa Roberta Latini del servizio scientifico del Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise (PNALM).

I campioni sono stati analizzati:

- per l'assegnazione a livello di specie mediante l'analisi High Resolution Melting (HRM) (Wittwer *et al.*, 2003; Buglione *et al.*, 2020);
- per la determinazione dell'aplotipo mediante sequenziamento Sanger, solo nel caso in cui le analisi HRM indicavano lepre europea (*Lepus europaeus*).

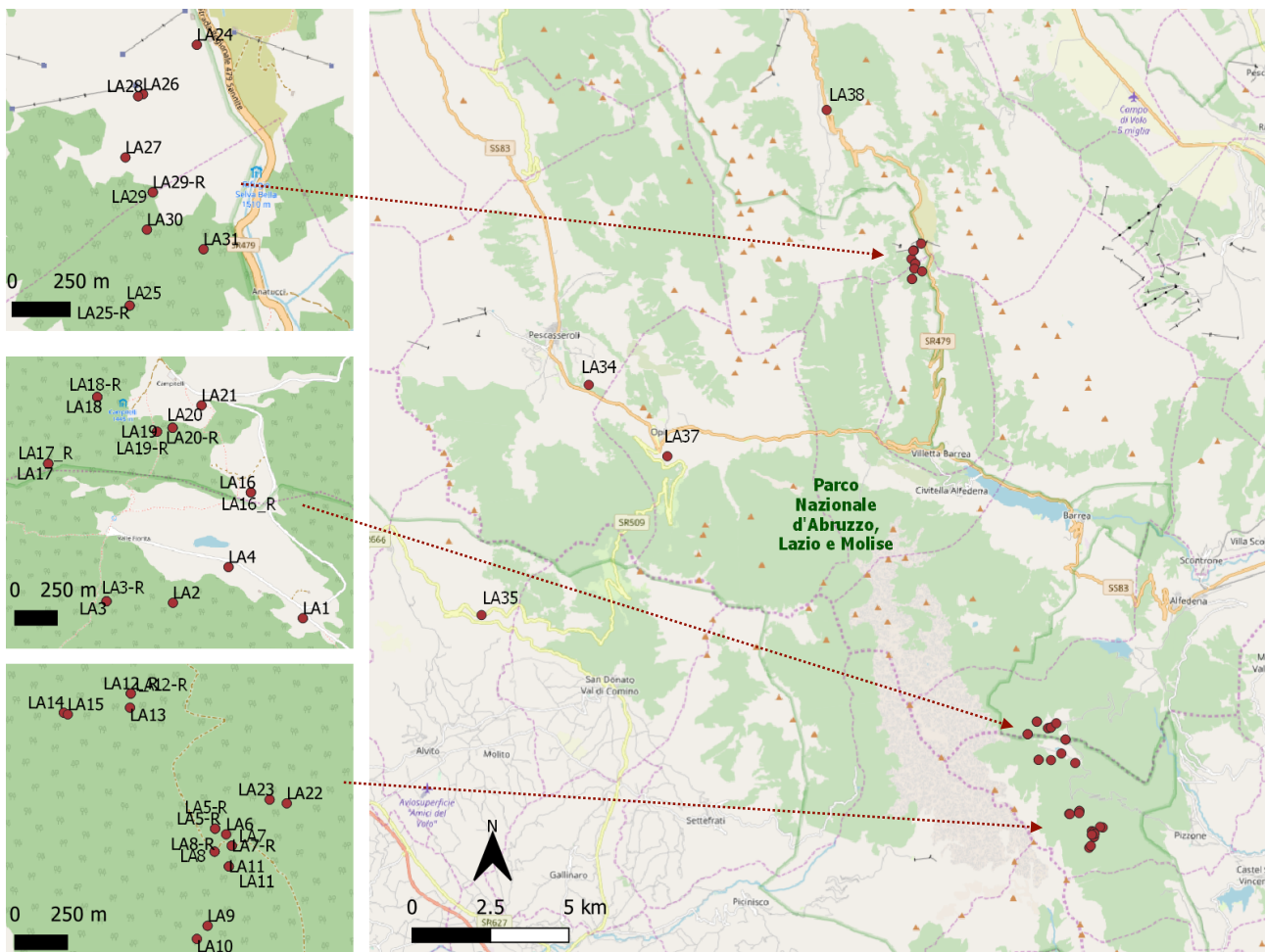


Figura 1: Spazializzazione dei campioni di lepre (gruppo 1) provenienti dal Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise per i quali erano note le coordinate geografiche.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
Scuola Politecnica e delle Scienze di Base
Dipartimento di Biologia



Tabella 1: Campioni di lepre analizzati (gruppo 1).

CODICE_PARCO	CODICE_UNINA	SPECIE	FONTE
PNALM_2019_01	LA1	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_02	LA2	DNA degradato	escremento
PNALM_2019_03	LA3	<i>L.europaeus</i>	escremento
PNALM_2019_03_R	LA3-R	<i>L.europaeus</i>	escremento
PNALM_2019_04	LA4	<i>L.europaeus</i>	escremento
PNALM_2019_05	LA5	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_05_R	LA5-R	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_06	LA6	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_07	LA7	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_07_R	LA7-R	<i>L.europaeus</i>	escremento
PNALM_2019_08	LA8	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_08_R	LA8-R	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_09	LA9	<i>L.europaeus</i>	escremento
PNALM_2019_10	LA10	<i>L.europaeus</i>	escremento
PNALM_2019_11	LA11	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_11_R	LA11_R	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_12	LA12	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_12_R	LA12_R	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_13	LA13	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_14	LA14	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_15	LA15	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_16	LA16	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_16_R	LA16_R	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_17	LA17	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_17_R	LA17_R	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_18	LA18	DNA degradato	escremento
PNALM_2019_18_R	LA18-R	DNA degradato	escremento
PNALM_2019_19	LA19	DNA degradato	escremento
PNALM_2019_19_R	LA19-R	DNA degradato	escremento
PNALM_2019_20	LA20	<i>L.europaeus</i>	escremento
PNALM_2019_20_R	LA20-R	<i>L.europaeus</i>	escremento



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI **FEDERICO II**
Scuola Politecnica e delle Scienze di Base
Dipartimento di Biologia



CODICE_PARCO	CODICE_UNINA	SPECIE	FONTE
PNALM_2019_21	LA21	DNA degradato	escremento
PNALM_2019_22	LA22	DNA degradato	escremento
PNALM_2019_23	LA23	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_24	LA24	DNA degradato	escremento
PNALM_2019_25	LA25	DNA degradato	escremento
PNALM_2019_25_R	LA25-R	<i>L.europaeus</i>	escremento
PNALM_2019_26	LA26	<i>L.europaeus</i>	escremento
PNALM_2019_27	LA27	DNA degradato	escremento
PNALM_2019_28	LA28	<i>L.corsicanus</i>	escremento
PNALM_2019_29	LA29	<i>L.europaeus</i>	escremento
PNALM_2019_29_R	LA29-R	<i>L.europaeus</i>	escremento
PNALM_2019_30	LA30	<i>L.europaeus</i>	escremento
PNALM_2019_31	LA31	<i>L.europaeus</i>	escremento
3495	LA32	<i>L.europaeus</i>	padiglione auricolare
4622	LA33	<i>L.corsicanus</i>	muscolo
4786	LA34	<i>L.europaeus</i>	muscolo
8445	LA35	<i>L.corsicanus</i>	padiglione auricolare
8473	LA36	<i>L.europaeus</i>	padiglione auricolare
8579	LA37	<i>L.europaeus</i>	muscolo
8832	LA38	<i>L.europaeus</i>	muscolo
8895	LA39	<i>L.europaeus</i>	muscolo

Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA è stata fatta da 1 a 3 giorni dopo l'arrivo dei campioni. Per l'estrazione è stato utilizzato:

- il QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH Valencia, CA, USA) nel caso di escrementi, processando la porzione più esterna del pellet;
- il metodo del Fenolo Coloroformio/Alcool isoamilico, nel caso di tessuti.

Per monitorare potenziali contaminazioni sono stati usati ad ogni estrazione controlli negativi (acqua pura). L'integrità del DNA estratto è stata valutata attraverso corsa elettroforetica in gel di agarosio 1% e in *Buffer* TBE (Tris, Acido Borico, EDTA) e per confronto con un marcatore



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
Scuola Politecnica e delle Scienze di Base
Dipartimento di Biologia



molecolare di peso noto. La concentrazione degli acidi nucleici e il loro grado di purezza da fenoli e proteine sono stati valutati spettrofotometricamente attraverso il Nanodrop ND-2000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA).

Il DNA è stato estratto con successo nel 100% dei 52 campioni, con concentrazioni che variano da 12 ng/ul a 800 ng/ul, valori di purezza da fenoli compresi tra 1.58 e 2.27 e valori di purezza da proteine compresi tra 0.9 e 1.9.

Caratterizzazione della specie tramite HRM

La determinazione della specie per i DNA estratti è stata fatta tramite HRM (Buglione et al., 2020), condotta con il Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH Valencia, CA, USA) e il Type-it HRM PCR Kit (QIAGEN GmbH Valencia, CA, USA). L'assegnazione è stata fatta sulla base del profilo di melting e del rapporto tra la derivata dell'intensità della fluorescenza e della temperatura (dF/dT) e la temperatura di melting (T_m).

Su 52 campioni di DNA, 22 sono stati assegnati a lepre italiana e 20 a lepre europea. Per 10 campioni di DNA non è stata possibile la determinazione della specie (Tabella 1).

Caratterizzazione dell'aplotipo per i campioni di DNA assegnati a lepre europea

Tutti i campioni assegnati a lepre europea sono stati sottoposti a sequenziamento Sanger per la determinazione dell'aplotipo, analizzando un frammento di circa 650 bp che include una parte della citocromo B e del Dloop mitocondriale e, inoltre, l' interno tratto nucleotidico utilizzato in Pierpaoli et al. 1999 per l'identificazione dell'aplotipo B-III riferibile a *L. europaeus meridiei*.

La caratterizzazione dell'aplotipo è risultata interpretabile per 17 campioni di lepre europea (Tabella 1). I cromatogrammi sono stati assemblati ed analizzati con il software Geneious v. R10 (Kearse et al., 2012). Le sequenze di lepre europea da caratterizzare sono state allineate con aplotipi di lepre europea presenti in GenBank (Accession number: AF157433-AF157453 da Pierpaoli et al., 1999 e AY466782-AY466853-AF149725-AF149726-AF149727 da Kasapidis et al., 2005). E' stato costruito un albero filogenetico utilizzando la matrice di distanza Tamura-Nei implementata in Geneious v.R10. e una sequenza di *Lepus capensis* (Accession number AJ287960) per radicare



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
Scuola Politecnica e delle Scienze di Base
Dipartimento di Biologia



l'albero. L'assegnazione è stata fatta attraverso un confronto, a livello degli SNP discriminativi, tra le *query* e le sequenze di riferimento.

Le sequenze nucleotidiche dei campioni di lepre europea sono state allineate e clusterizzate con i principali caldi europei di questa specie (Kasapidis et al., 2005) (Figura 2). Nella costruzione dell'albero sono state incluse anche le sequenze di due lepri italiane, utili, insieme alla sequenza di *L. capensis*, a radicare l'albero.

Tutte le sequenze di lepre europea caratterizzate in questa procedura clusterizzano nei caldi dell'Europa occidentale (Clade B). In particolare, tutti i campioni ricadono nel clade B-VII (che include aplotipi provenienti dall'Italia, Germania, Ungheria, Austria, Serbia e Romania), eccetto i campioni LA36, LA38 ed LA39, che clusterizzano nel clade B-III. Quest'ultimo comprende anche gli aplotipi autoctoni arcaici leu1 e leu2 identificati in Pierpaoli et al. 1999 (Figura 2).

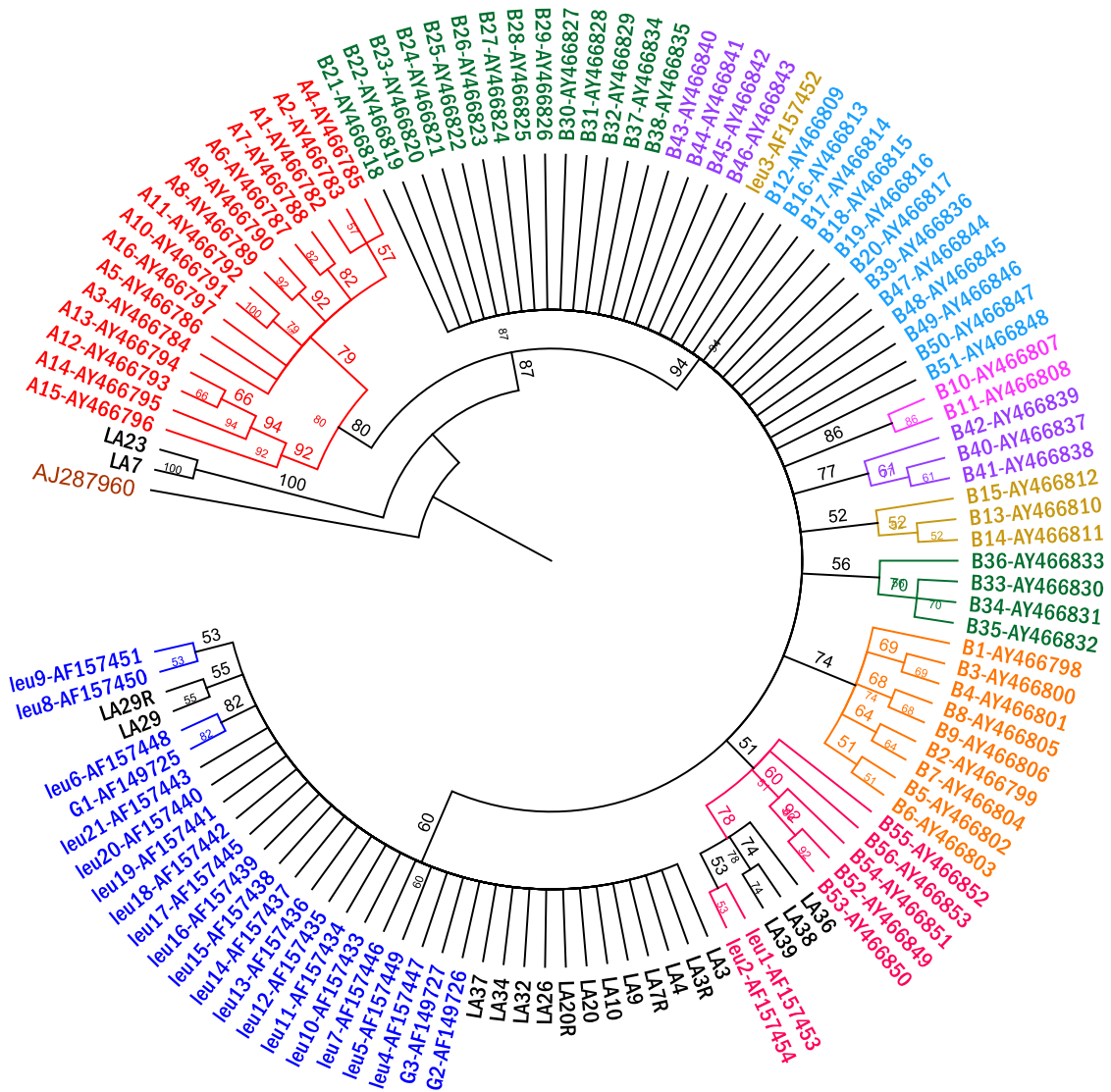


Figura 2 - Cluster delle sequenze mitocondri di Lepre (Tamura-Nei in Geneious v.R10). Le sequenze di *Lepus capensis* (AJ287960) e lepre italica sono state usate per radicare l'albero. In rosso, Clade A; in verde, Clade B-I; in viola, Clade B-II; in rosa scuro, Clade B-III; in rosa chiaro, clade B-IV; in arancione, Clade B-V; in giallo, Clade B-VI; in blu, Clade B-VII; in azzurro, il resto del Clade B secondo Kasapidis et al. 2005; in nero, sequenze di lepri provenienti dal Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise. I numeri indicano l'affidabilità (%) dei nodi.



L'assegnazione mediante clusterizzazione è stata validata mediante analisi manuale delle sequenze dei campioni LA36, LA38 ed LA39. Da un allineamento multiplo tra le sequenze di questi campioni e le sequenze leu 1, leu2 e leu3 (Figura 3) emerge una identità di siti tra LA36 e Leu2 del 99.7% (su un allineamento di 291 bp). Un discorso analogo può essere fatto per LA38 ed LA39, che presentano una identità di sequenza del 99.0% rispetto a Leu2 (su un allineamento di 292 bp). Con buona approssimazione, sui frammenti nucleotidici utilizzati e sulle elaborazioni di comparazione mediante clusterizzazione, possiamo ascrivere queste lepri all'aplotipo autoctono della nostra penisola (Figura 2).

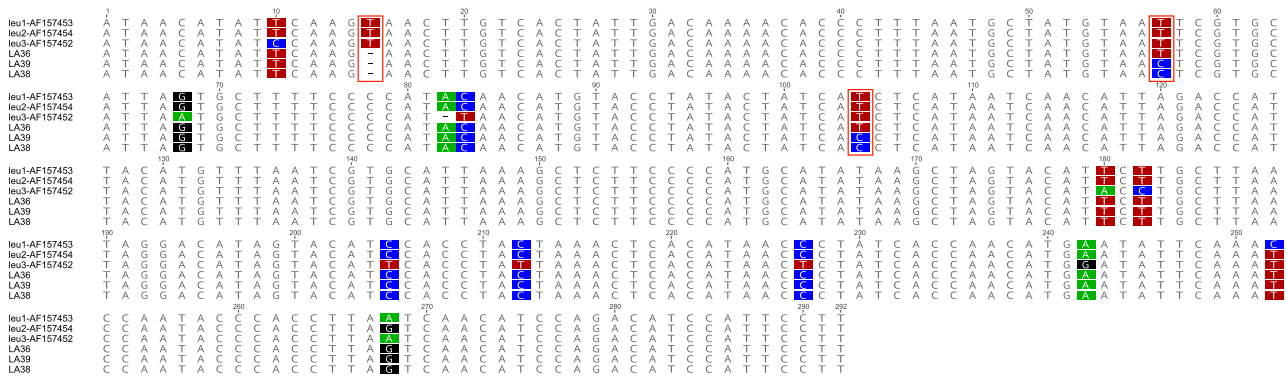


Figura 3: Allineamento multiplo (in Geneious v. R10) tra leu1, leu2, leu3 (Pierpaoli et al., 1999), LA36, LA38 e LA39. Nei riquadri rossi le posizioni che differenziano le sequenze dell'aplotipo autoctono arcaico dai campioni di lepri europea in esame.

I tre campioni assegnati all'aplotipo arcaico sono stati raccolti in tre località differenti: Gioia dei Marsi, Ferroio e Castel di Sangro, rispettivamente per LA36, LA38 ed LA39. Purtroppo non sono disponibili le coordinate geografiche di LA36 e LA39 che potevano essere utilizzate per interessanti estrapolazioni distributive di questi animali.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
Scuola Politecnica e delle Scienze di Base
Dipartimento di Biologia



In data 04/12/2020, altri 56 campioni di lepre (Gruppo 2, Tabella 2 e Figura 4) sono stati inviati dal Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise al laboratorio di biologia molecolare del Prof. Fulgione.

Tabella 2: Campioni di lepre analizzati (gruppo 2).

CODICE_PARCO	CODICE_UNINA	SPECIE	FONTE
PelletPNALM_2020_012	LA40	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_013	LA41	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_014	LA42	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_015	LA43	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_016	LA44	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_017	LA45	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_018	LA46	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_019	LA47	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_019_Replica_A	LA48	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_020	LA49	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_021	LA50	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_021_Replica_A	LA51	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_022	LA52	DNA degradato	escremento
PelletPNALM_2020_023	LA53	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_024	LA54	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_025	LA55	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_025_Replica_A	LA56	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_026	LA57	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_026_Replica_A	LA58	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_027	LA59	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_027_Replica_A	LA60	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_028	LA61	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_029	LA62	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_030	LA63	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_031	LA64	DNA degradato	escremento
PelletPNALM_2020_032	LA65	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_033	LA66	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_034	LA67	DNA degradato	escremento
PelletPNALM_2020_035	LA68	DNA degradato	escremento
PelletPNALM_2020_036	LA69	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_037	LA70	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_038	LA71	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_039	LA72	DNA degradato	escremento
PelletPNALM_2020_040	LA73	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_040_Replica_A	LA74	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI **FEDERICO II**
Scuola Politecnica e delle Scienze di Base
Dipartimento di Biologia



PelletPNALM_2020_041	LA75	DNA degradato	escremento
PelletPNALM_2020_042	LA76	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_043	LA77	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_044	LA78	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_045	LA79	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_045_Replica_A	LA80	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_046	LA81	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_047	LA82	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_048	LA83	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_049	LA84	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_050	LA85	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_051	LA86	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_051_Replica_A	LA87	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_052	LA88	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_053	LA89	DNA degradato	escremento
PelletPNALM_2020_054	LA90	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_055	LA91	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_056	LA92	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_057	LA93	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_058	LA94	<i>Lepus europaeus</i>	escremento
PelletPNALM_2020_059	LA95	<i>Lepus corsicanus</i>	escremento

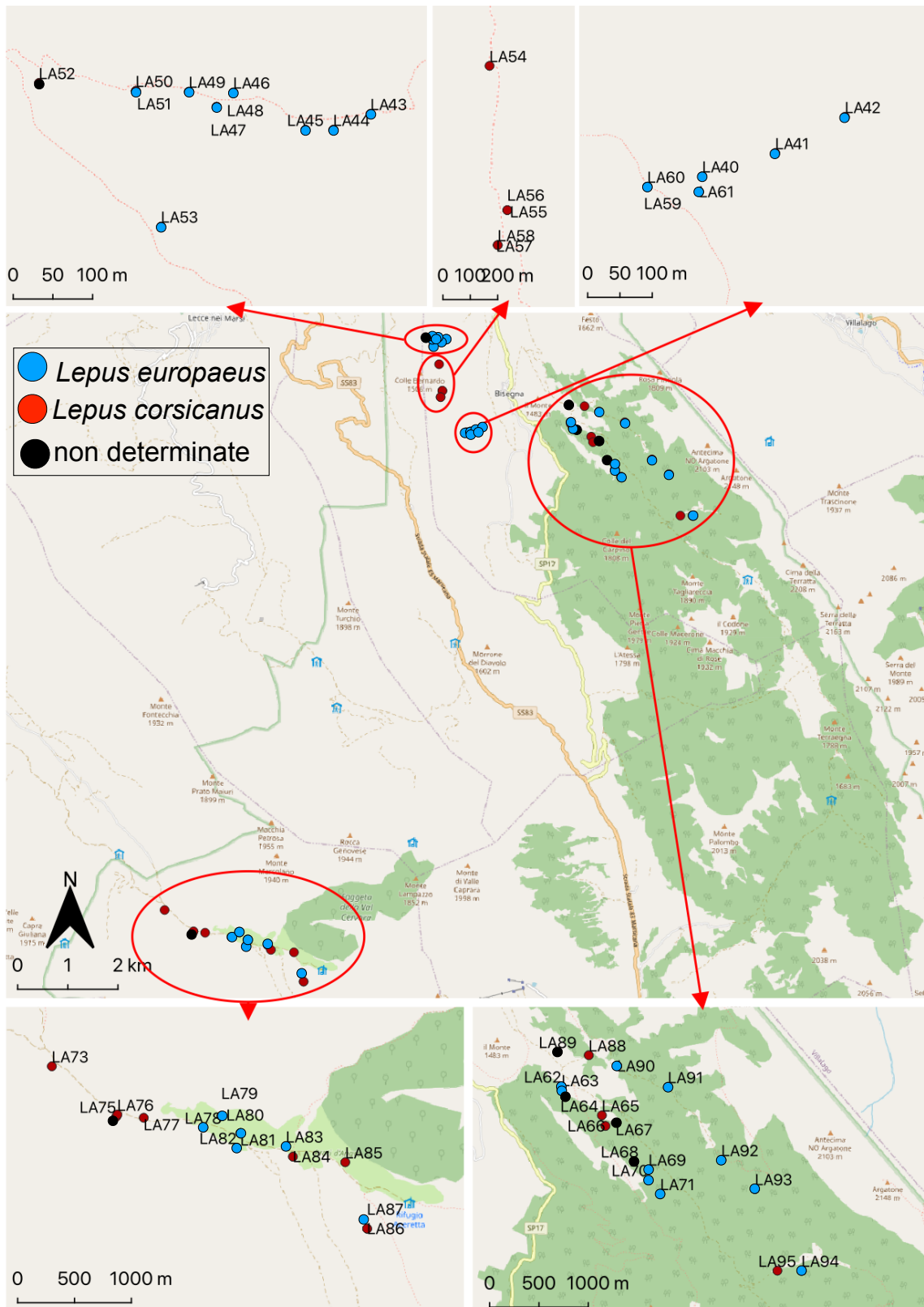


Figura 4: Spazializzazione dei campioni di lepore (gruppo 2) provenienti dal Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise per i quali erano note le coordinate geografiche.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
Scuola Politecnica e delle Scienze di Base
Dipartimento di Biologia



I campioni sono stati analizzati:

- a) per l'assegnazione a livello di specie mediante l'analisi High Resolution Melting (HRM) (Wittwer et al., 2003; Buglione et al., 2020);
- b) per la determinazione dell'aplotipo mediante sequenziamento Sanger, solo nel caso in cui le analisi HRM indicavano lepre europea (*Lepus europaeus*).

Il DNA è stato estratto con successo per tutti i campioni, con concentrazioni che variano da 11.8 ng/ul a 136 ng/ul, valori di purezza da fenoli compresi tra 1.71 e 2.28 e valori di purezza da proteine compresi tra 0.9 e 1.6.

Malgrado la bassa qualità del DNA, dovuto probabilmente all'età dei campioni (raccolti a febbraio 2020), l'analisi HRM ha permesso di determinare la specie per 49 su 56 reperti (16 sono stati assegnati a lepre italiana e 33 a lepre europea) e solo per 7 campioni, nonostante le diverse ripetute repliche, non abbiamo potuto recuperare il DNA degradato (Tabella 1).

Il problema della qualità del DNA ha purtroppo inficiato le successive procedure per la determinazione dell'aplotipo *Lepus europaeus meridiei* mediante sequenziamento, infatti, non è stato possibile operare nessuna ulteriore analisi sui campioni assegnati tramite HRM alla specie lepre europea.

In sintesi, su 108 campioni di lepre analizzati (100 escrementi + 8 tessuti), 38 campioni sono stati assegnati a lepre italiana, 53 a lepre europea e solo per 17 (tutti escrementi) non è stato possibile effettuare una assegnazione di specie, probabilmente a causa della natura degradata del DNA. Dei campioni di lepre europea la cui qualità del DNA era tale da permettere di effettuare l'analisi di sequenza, tre sono stati assegnati all'aplotipo arcaico *L. europaeus meridiei*.



Riferimenti Bibliografici

- Buglione M, Petrelli S, Notomista T, de Filippo G, Gregorio R, Fulgione D. 2020. Who is who? High Resolution Melting analysis to discern between hare species using non-invasive sampling. *Conservation Genetics Resources* 12: 727–732.
- Kasapidis P, Suchentrunk F, Magoulas A, Kotoulas G. 2005. The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34(1): 55-66.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P and Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647-1649. Geneious v 5.5. <http://www.geneious.com>.
- Pierpaoli M, Riga F, Trocchi V and Randi E. 1999. Species distinction and evolutionary relationships of the Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Ecology* 11: 1805-17.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG and Pryor RJ. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry* 49: 853-860.