



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE NATURALI

**Campionamento non invasivo e genetica di conservazione del
francolino di monte (*Tetrastes bonasia*) in un' area di studio del
Parco Naturale Paneveggio-Pale di San Martino**

Relatore

Prof. Bertorelle Giorgio

Laureando

Celva Roberto

Correlatore

Dott. Vernesi Cristiano

Secondo correlatore

Dott. ssa Crestanello Barbara

Anno Accademico 2015/2016

INDICE

RIASSUNTO-ABSTRACT.....	1
1. INTRODUZIONE.....	2
1.1 PREMESSA E SCOPO DELLA TESI.....	3
1.2 CONTESTO TERRITORIALE.....	4
1.3 IL FRANCOLINO DI MONTE.....	6
1.3.1 Morfologia.....	7
1.3.2 Distribuzione, habitat ed ecologia.....	8
1.3.3 Stato di conservazione.....	11
1.4 GENETICA DI CONSERVAZIONE.....	13
1.4.1 mtDNA (D-loop).....	14
1.4.2 Microsatelliti.....	15
2. MATERIALI E METODI.....	17
2.1 CAMPIONAMENTO.....	17
2.2 ANALISI GENETICHE DI LABORATORIO.....	19
2.2.1 Estrazione del DNA.....	19
2.2.2 Sessaggio e D-loop.....	20
2.2.3 Microsatelliti.....	22
2.3 ANALISI STATISTICA DEI DATI.....	24
3. RISULTATI.....	25
3.1 CAMPIONAMENTO.....	25
3.2 ESTRAZIONE DEL DNA E CARATTERIZZAZIONE GENETICA.....	27
3.3 ANALISI DI VARIABILITÀ E RICOSTRUZIONE FILOGENETICA.....	29
3.3.1 mtDNA.....	29
3.3.2 Microsatelliti.....	31
4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	32
5. RINGRAZIAMENTI.....	35
6. BIBLIOGRAFIA.....	36
ALLEGATO I – Scheda campioni.....	44
ALLEGATO II - Scheda transetti.....	46

RIASSUNTO-ABSTRACT

Per valutare la consistenza e lo stato di una popolazione di francolino di monte (*Tetrastes bonasia rupestris*) in un'area di studio nel territorio del Parco Naturale Paneveggio-Pale di San Martino abbiamo effettuato un campionamento non-invasivo secondo i metodi di cattura-ricattura spaziale, quindi condotto l'analisi genetica di una porzione dei campioni attraverso la determinazione del sesso, il sequenziamento della regione ipervariabile della D-loop mitocondriale e la tipizzazione di 12 marcatori microsatellite. Abbiamo riscontrato una bassa diversità aplo-tipica ($0,45 \pm 0,06$), che riflette una deriva genetica compatibile con la frammentazione della porzione alpina dell'areale di distribuzione, mentre i dati dei loci microsatellite ($F_{IS}=0,025$) supportano un interscambio genetico consistente all'interno della popolazione e ne indicano il relativo benessere.

To infer the consistency and status of a hazel grouse (*Tetrastes bonasia rupestris*) population in a study-area of Paneveggio-Pale di San Martino Natural Park (N-E Italian Alps) we have sampled it by spatial capture-recapture based, non-invasive methods, then conducted the genetic analysis on a portion of the collected samples by determination of sex, sequencing of the hypervariable region of mitochondrial D-loop and genotyping of 12 microsatellite markers. We have found low haplotype diversity ($0,45 \pm 0,06$) consistent with fragmentation of the Alpine portion of the distribution habitat, while microsatellite data ($F_{IS}=0,025$) support a relevant genetic interchange and indicates a relative fitness at the intra-population level.

1. INTRODUZIONE

We are the local embodiment of a Cosmos grown to self-awareness. We have begun to contemplate our origins: starstuff pondering the stars; organized assemblages of ten billion billion billion atoms considering the evolution of atoms; tracing the long journey by which, here at least, consciousness arose. Our loyalties are to the species and the planet. We speak for Earth. Our obligation to survive is owed not just to ourselves but also to that Cosmos, ancient and vast, from which we spring.

C. Sagan, *Cosmos*, p. 339

1.1 PREMESSA E SCOPO DELLA TESI

Il Piano Faunistico Provinciale (2010) della Provincia Autonoma di Trento auspica di “[...] individuare un metodo di monitoraggio che, ripetuto nel tempo, possa portare all'individuazione del trend e quindi delle eventuali modificazioni che dovessero sopraggiungere nel numero di specie presenti e nella loro diversificazione genetica”. Il progetto di ricerca sulla genetica e biologia del francolino di monte (*Tetrastes bonasia*) promosso dal Parco Naturale Paneveggio-Pale di San Martino (PNPPSM) procede in quest'ottica, ed il presente lavoro di tesi si propone di rispondere ai problemi evidenziati nell'edizione in vigore del Piano (2016): “La scarsità dei dati a disposizione [...] sconsiglia[no] la quantificazione delle presenze potenziali della specie. In mancanza di una attività di monitoraggio standardizzato, risulta irrealizzabile anche la formulazione di trend di evoluzione della popolazione presente e, quindi, ogni ipotesi in merito alle dinamiche di popolazione in atto.”.

Lo scopo di questa tesi è stato, quindi, di aumentare le conoscenze sulla distribuzione, la densità, il rapporto tra i sessi e i livelli di variabilità genetica del francolino di monte. Abbiamo (1) eseguito un campionamento non-invasivo secondo un protocollo di cattura-ricattura spaziale in un'area di studio del Parco Naturale di Paneveggio-Pale di San Martino, (2) avviato la tipizzazione genetica dei campioni tramite analisi della regione ipervariabile del DNA mitocondriale, la determinazione del sesso e l'analisi di 12 loci microsatellite nucleari.

1.2 CONTESTO TERRITORIALE

Il PNPPSM si estende su un territorio delle Alpi orientali per 19730,48 ettari (ha) ad altitudine compresa fra circa 1000 (imbocco val Canali) e 3192 m s.l.m. (Cima Vezzana). 7948 ha (40%) sono occupati da foreste principalmente a picetum e alpinetum (5000 e 2500 ha, rispettivamente), mentre circa 5152 ha (26%) sono gestiti a prato-pascolo.

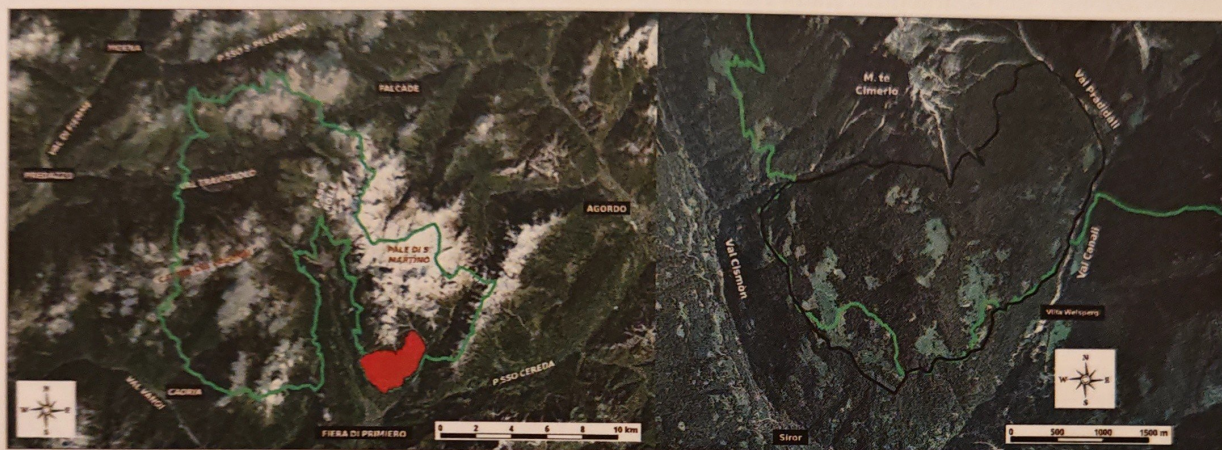


Figura 1.1: territorio del PNPPSM (in verde) e area campione (in rosso a sx, in nero a dx)

Circa il 91% della superficie del Parco è inserito nella rete ecologica europea Natura 2000, ed in conformità con le prospettive che ne derivano e gli obiettivi impliciti si propone come modello di “laboratorio all'aperto” in cui sperimentare, per le specie e gli habitat di interesse comunitario,

metodi di ricerca gestionale e di conservazione innovativi, perseguendo gli obiettivi dello sviluppo sostenibile. Il francolino di monte è, fra i tetraonidi presenti nel Parco, la specie meno conosciuta sia per areale occupato che per numero di individui. Gli avvistamenti occasionali testimoniati dal personale e i dati forniti dal Servizio Foreste e Fauna hanno permesso una stima dell'areale di distribuzione potenziale di 6826 ha, a fronte di 6594 ha occupati. (Piano del Parco 2016 - Complemento faunistico 1, vedi Figura 1.2).

L'area di studio è stata individuata da Piergiovanni Partel (PNPPSM, settore Ricerca scientifica e conservazione) sulle basi dei dati

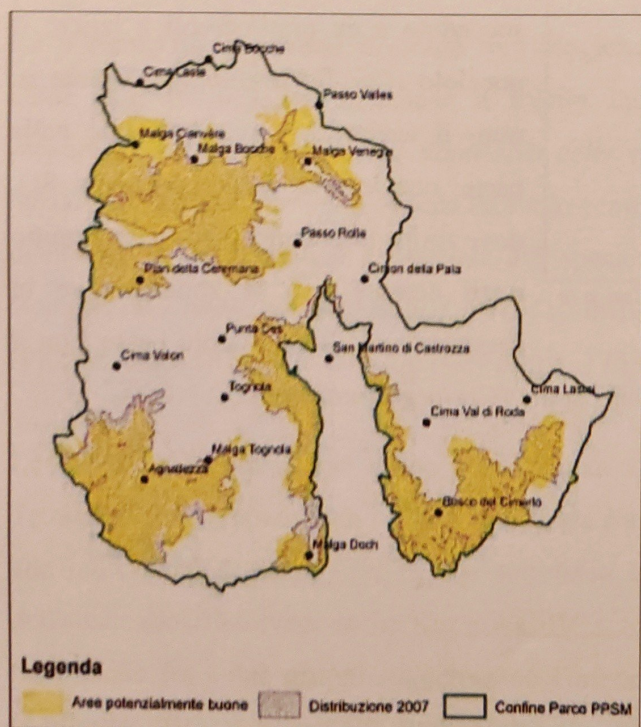


Figura 1.2: Distribuzione potenziale (attuale) e reale (2007).
Tratta dal Piano del Parco (2016)

raccolti e dell'accessibilità della zona. Rientra nella ZPS (Zona di Protezione Speciale) Lagorai e nella ZSC (Zona Speciale di Conservazione) Pale di San Martino, ricadendo sul deposito detritico della parte meridionale del gruppo dolomitico (complesso Monte Cimerlo - Sass Maor), compresa fra la val Cismon e la val Canali. Occupa circa 700 ha tra le quote 1100 e 1670 m s.l.m.

L'area rientra nella categoria B del piano di zonizzazione del Parco (zone "finalizzate alla conservazione dell'ambiente naturale comprensivo della presenza ed incidenza umana tradizionale"), essendo frequentata sia come fonte di risorse (legname, piante erbacee, funghi e cacciagione) che a scopo turistico e didattico, ed è riconducibile agli ambienti semi-naturali indicati nella Direttiva Habitat. Circa 43,5 ha esterni all'area protetta sono stati individuati al fine di poter includere nel campionamento ambienti a quote inferiori, comunque frequentati dalla specie.

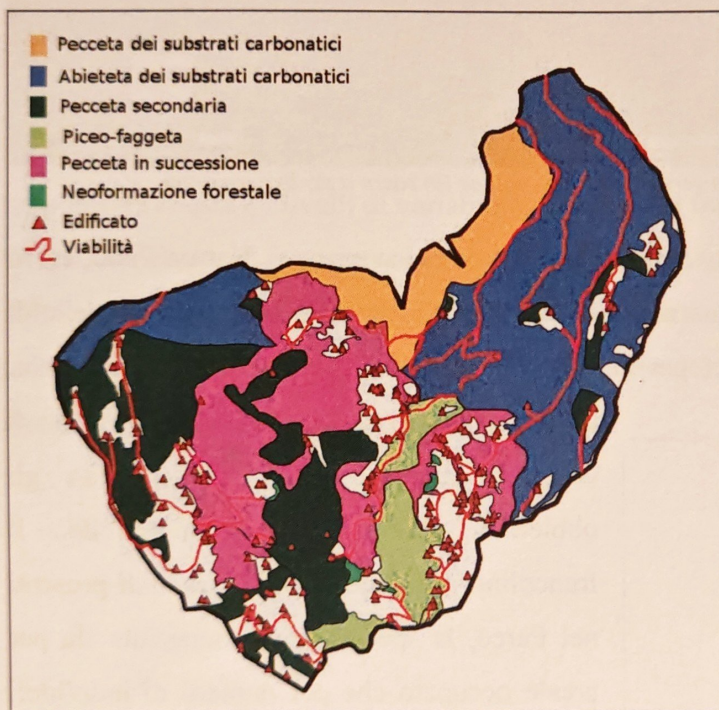


Figura 1.3: formazioni forestali, edificato e viabilità. In bianco le zone prative

Il sorbo degli uccellatori (*Sorbus aucuparia*) e il biancospino (*Crataegus monogyna*).

Gli ambienti forestali locali (Figura 1.3) comprendono associazioni di faggio (*Fagus sylvatica*), abete rosso (*Picea abies*) e abete bianco (*Abies alba*) (abietete dei substrati carbonatici), peccete dei substrati carbonatici di abete rosso e larice (*Larix decidua*) e peccete secondarie in fase di perticaia-adulto succedute a ex prati/pascoli a larice. Il nocciolo (*Corylus avellana*), presente su tutto il territorio, è più frequente nella parte occidentale ad esposizione SO, dove forma popolamenti coesi soprattutto negli ecotoni con le zone prative in associazione, alle quote più basse, con il

1.3 IL FRANCOLINO DI MONTE

Dominio: EUKARIA

Regno: ANIMALIA

Phylum: CHORDATA

Classe: AVES

Ordine: GALLIFORMES (TEMMINCK, 1820)

Famiglia: PHASIANIDAE (HORSFIELD, 1821)

Sottofamiglia: TETRAONINAE (VIGORS, 1825)

Genere: *Tetrastes* (KEYSERLING E BLASIUS, 1840)

Specie: *bonasia* (LINNAEUS, 1758)

L'ordine *Galliformes* è considerato un modello per lo studi sull'evoluzione (Shen et al., 2010) in quanto una rapida radiazione adattativa in un passato recente (Short, 1967; Kuz'mina, 1992; Drovetski, 2002 – 2003; Crowe et al., 2006) ha generato un gruppo di specie eterogeneo con uno scarso accumulo di divergenza molecolare (Ellsworth et al., 1996; Dimcheff et al., 2002; Crowe et al., 2006). Attualmente il clade comprende 19 specie (Gill e Donsker, 2016) a diffusione oloartica, i cui adattamenti principali riguardano i climi freddi, gli ambienti forestali ed una dieta ristretta (vedi Short, 1967; Kuz'mina, 1992; Potapov, 1992; Schales e Schales, 1994; Dyke et al., 2003).

La presenza di importanti diversità morfologiche, ecologiche e comportamentali all'interno del clade (e.g. Whiley, 1974), anche a livello intraspecifico, induce Ellsworth et al. (1996) a raccomandare “l'interpretazione adattativa delle variazioni morfologiche e comportamentali fra i *tetraonidi*”. Questo principio occupa un ruolo centrale anche nella storia tassonomica del francolino di monte, la cui filogenesi è correlata a 3 specie distinte ed originariamente attribuite al genere *Bonasa*: *B. umbellus* (LINNAEUS, 1766), diffusa nel continente americano, *B. sewerzowi* (PRZEWALSKI, 1876) e *B. bonasia* (LINNAEUS, 1758), rispettivamente cinese ed europea.

Le due specie eurasiatiche erano storicamente considerate le uniche rappresentanti del genere *Tetrastes*, e l'incorporamento nel genere *Bonasa* è avvenuto in tempi relativamente recenti in seguito alle indicazioni di Short (1967), che sottolinea la gradualità delle variazioni fra le popolazioni dell'areale oloartico (vedi anche Kuz'mina, 1992; Swenson et al., 1995). Non di meno, le differenze fenotipiche fra i due gruppi suggeriscono l'infondatezza dell'unione dei cladi paleo- e neoartico (Kuz'mina, 1992), e così gli studi molecolari che tendono a rigettare (Ellsworth et al., 1996; Gutiérrez et al., 2000; Persons et al., 2016) o mettere in discussione (Lucchini et al., 2001;

Dimcheff et.al. 2002; Drovetski 2002) l'ipotesi di unire i due generi. Nel presente elaborato si seguirà, perciò, la nomenclatura adottata dall'Integrated Taxonomic Information System (ITIS) e dalla International Ornithologists Community (IOC) (Gill e Donsker. 2016), che individua la specie paleoartica *Tetrastes bonasia* con 11 sottospecie fra cui quella alpina, *Tetrastes bonasia rupestris* (C. L. BREHM, 1831).

1.3.1 Morfologia

Il francolino di monte ha un peso corporeo che nell'adulto varia dai 360 gr della femmina ai 400 gr del maschio (Montadert e Léonard, 2009; Grzimek, 1969), con un generale aumento nel periodo invernale. Gli arti inferiori piuttosto lunghi, con muscoli flessori digitali ben sviluppati, suggeriscono l'adattamento alla vita arboricola. Come gran parte dei tetraonidi è provvisto di un diverticolo esofageo (ingluvie) utilizzato per lo stoccaggio temporaneo del cibo e di un ventriglio gastrico per favorirne la triturazione.



Figura 1.4: maschio (per cortesia del gruppo fotografico Tetraon) e femmina (per cortesia di Luca Conti)

Il piumaggio coinvolge i tarsi per la prima metà anche nelle fasi giovanili. Le penne timoniere sono generalmente in numero di 16 e sono percorse da una banda longitudinale nera, mentre le grandi copritrici della coda sono generalmente 14 (Short, 1967). All'apice della testa è disposta una fila di piume erettili che forma una piccola cresta, più evidente nel maschio. La muta è annuale e provvede ad una copertura più folta durante l'inverno (Kuz'mina, 1992).

La livrea del maschio, meno mimetica rispetto a quella della femmina, è caratterizzata da una macchia golare nera bordata di penne bianche che si estendono in una stria a circondare il collo; tipicamente maschili sono anche il maggior sviluppo delle caruncule sopraciliari, soprattutto negli individui accoppiati (Yang et.al., 2013).

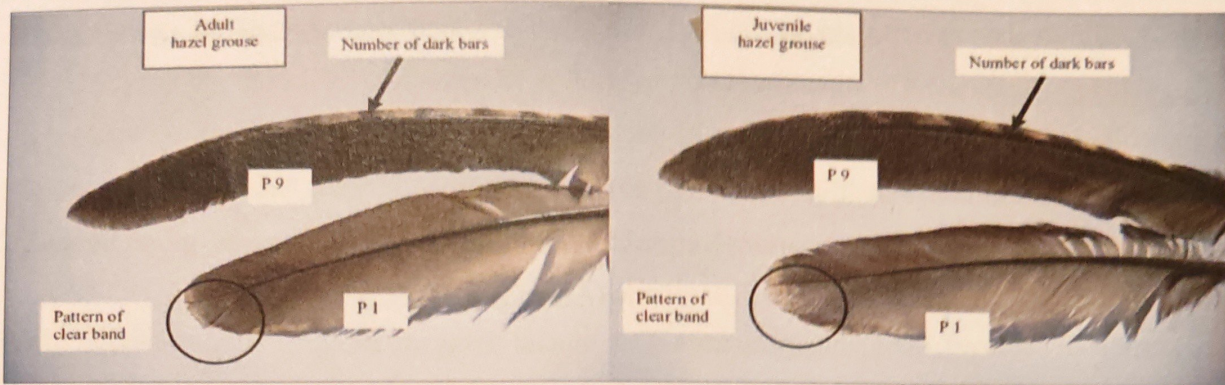


Figura 1.5: caratteristiche distintive nel piumaggio degli adulti (sx) e dei giovani dell'anno (dx). Tratto da [Montadert e Léonard, 2009](#)

Diagnostiche dell'età individuale sono la larghezza della banda chiara posta all'apice della penna primaria più interna (P1), che diminuisce gradualmente con l'età (> 2 mm nei giovani; ≤ 2 mm negli adulti dopo il primo anno di età), e l'irregolarità con presenza di macchie scure sulla banda chiara in P1 nei giovani ([Montadert e Léonard, 2009](#); vedi figura 1.5). Il conteggio del numero di bande scure sulla P9 individuato in Finlandia per *B. b. bonasia* si è rivelato un metodo di discriminazione inefficiente per *B. b. rupestris* nei Carpazi polacchi ([Bonczar e Swenson, 1992](#)) e nelle Alpi meridionali francesi ([Montadert e Léonard, 2009](#)).

1.3.2 Distribuzione, habitat ed ecologia



Figura 1.6: distribuzione di *Tetrastes* spp. e *Bonasa* sp., elaborata secondo dati forniti da [BirdLife International \(2015\)](#)

Il francolino di monte è una specie Palearctica boreale, distribuita lungo la fascia montana delle foreste temperate fra il Circolo Polare Artico e le regioni semi aride dell'Asia meridionale, dal massiccio del Giura alla Siberia (Figura 1.6). L'habitat preferito è costituito da boschi di conifere, latifoglie o misti multistrutturati a densa copertura, soprattutto nel piano che va dal suolo a circa 7

m di altezza (Storch, 2007) e che include la presenza delle specie vegetali fonte di cibo invernale (Mathys et al., 2006).

Gran parte del periodo riproduttivo è trascorso a terra, con attività volativa limitata a brevi ed agili spostamenti al di sotto della copertura vegetale (Kuz'mina, 1992). Raramente gli individui si allontanano più di 15 m da questo tipo di ambiente (Åberg et al., 1995).

La dieta è prevalentemente erbivora e basata su amenti (*Betula* sp., *Salix* sp., *Corylus* sp., *Alnus* sp., *Populus* sp. (Schäublin e Bollmann, 2010), aghi di conifere, germogli (*Fagus* sp., *Sorbus* sp.), parti carnose e foglie di suffrutici (*Fragaria* sp., *Vaccinium* sp.), piante legnose (*Sorbus* sp., *Rosa* sp., *Corylus* sp., *Sambucus* sp., *Ribes* sp.) e piante erbacee (*Oxalis* sp.), includendo il consumo di insetti in vista dell'inverno e, nella femmina, del periodo riproduttivo (Kuz'mina, 1992).

Se esaminata su scala continentale, la struttura sociale appare plastica e vincolata alla densità di copertura vegetale ed alla disponibilità di cibo invernale (Swenson et al., 1995; vedi anche Whiley, 1974; Åberg et al. 2002; Rhim, 2010). Questo permette di ipotizzare che in questa specie l'organizzazione in stormi sia favorita dalla presenza di risorse alimentari abbondanti e scarsa copertura vegetale, offrendo protezione reciproca nei riguardi dei predatori; la difesa del territorio e delle fonti di cibo individuali prevalgono invece negli ambienti protetti (Figura 1.7).

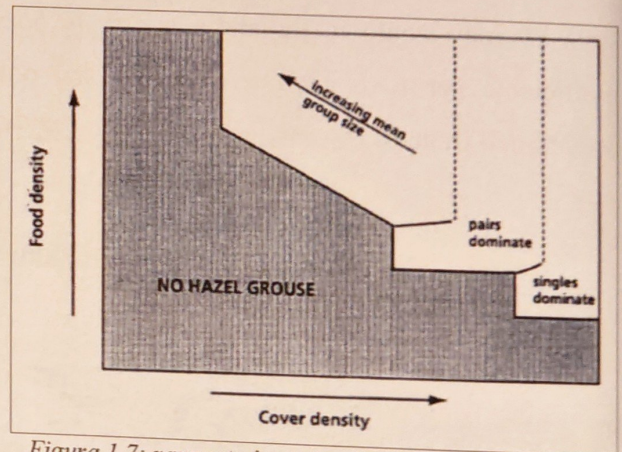


Figura 1.7: rapporto ipotetico fra disponibilità di cibo, copertura vegetale e struttura sociale. Tratta da Swenson et al. (1995)

Nelle Alpi il comportamento è tipicamente solitario e territoriale (Meschini e Frugis, 1993). In Europa centrale l'areale occupato, di pari dimensione fra i sessi, è di circa 10-20 ha (Mathys et al., 2006), mentre nelle Alpi orientali la densità media varia da 1-1,2 coppie/100 ha a 2-3 coppie/100 ha (De Franceschi, 2004).

A differenza di altri tetraonidi dell'arco alpino e di *B. umbellus*, l'attività di *lekking* è assente, ed il "tambureggiamento" con le ali, documentato per *B. umbellus*, *B. bonasia armurensis* e, in forma differente, per *T. sewerzowi*, non trova riscontro nelle popolazioni alpine (Yang et al., 2013; Scherzinger et al., 2006).

Ad esclusione di *Lagopus* sp. è l'unico tetraonide a formare coppie eterosessuali stabili (Whiley, 1974). Il periodo riproduttivo è annuale, e durante l'accrescimento delle gonadi in seguito alla regressione invernale la femmina può frequentare più maschi, alternativamente, nello stesso periodo. Il legame coniugale viene stabilito con la fertilità in aprile-maggio (Swenson e Boag, 1992; Whiley, 1974).

Nella coppia entrambi, ma in maggior misura la femmina, mantengono l'esclusività territoriale rispetto ad individui dello stesso sesso, segnalando la propria presenza con richiami vocali (Swenson, 1992; Rhim, 2010; Scherzinger et al., 2006) e stabilendo un' "alleanza cooperativa" con il partner per la mutua vigilanza contro i predatori (Swenson, 1992).

La femmina depone ed incuba al suolo da 7 a 10 uova bianco sporco-rossastre, con macchie di colore rosso-marrone (Grzimek, 1969; Swenson e Boad, 1992; vedi figura 1.8) che cova da sola in un nido a terra per 3-4 settimane (Grzimek, 1969). Può deporre una seconda covata in caso di perdita precoce della prima (*i.e.* deposizione indeterminata) e la schiusa è sincrona (Grzimek, 1969; Brichetti e Fracasso, 2004).



Figura 1.8: guscio d'uovo. Per cortesia del gruppo fotografico *Tetraon*

I pulcini dipendono dalla madre per il nutrimento, che indica loro le fonti di cibo (Whiley, 1974) includendo per le prime settimane soprattutto invertebrati; durante questo periodo, la madre può distrarre un predatore dalla nidiata simulando la rottura di un'ala (Brichetti e Fracasso, 2004; Whiley, 1974).

I primi brevi voli vengono realizzati dal quarto giorno di vita ed una completa padronanza è

Nazione o territorio				T. p. (breve termine)			T. p. (lungo termine)		
	Dimensione (coppie)	Anno (i)	Qualità	Direzione	Anno (i)	Qualità	Direzione	Anno (i)	Qualità
Austria	12,000-22,000	2001-2012	poor	0	2001-2012	poor	?		
France	5,000-15,000	2000-2010	poor	F	2000-2010	medium	-	1980-2010	medium
Germany	1,000-1,500	2005-2009	good	0	1998-2009	medium	0	1985-2009	medium
Italy	5,000-6,000	2003	poor	?			?		
Liechtenstein	10-15	2009-2014	medium	0	2003-2014	medium	0	1980-2014	medium
Slovenia	1,000-2,000	2002-2012	medium	-	2001-2012	medium	-	1980-2012	medium
Switzerland	7,500-9,000	2008-2012	medium	0	2001-2012	medium	0	1990-2012	medium

Tabella 1.1: Stato di conservazione delle popolazioni alpine. Modificato da BirdLife International, 2016

raggiunta alla seconda settimana, periodo in cui viene assunto il regime dietetico tipico dell'adulto (Grzimek, 1969); la madre si accompagna ai figli fino all'autunno, quando questi assumono la corporatura adulta. In questo periodo sia i rapporti interni alla coppia che quelli fra madre e prole si allentano, e i maschi della nuova generazione prendono possesso di un territorio cercando di attrarvi una femmina (Whiley, 1974; Montadert e Léonard, 2006). Se non accoppiati entro la primavera, anche i maschi possono intraprendere la ricerca attiva del partner con escursioni di diversa entità al di fuori del proprio territorio (Montadert e Léonard, 2006). Il tasso di dispersione varia da 900 a 1600 m (Sahlsten et.al., 2008; Montadert e Léonard, 2006) con sporadici casi di 15 – 24,9 km (Montadert e Léonard, 2006).

Nel periodo invernale il francolino si avvale di tane scavate *ex-novo* nella neve; in assenza di copertura nevosa o nel caso questa sia superficialmente ghiacciata impedendone lo scavo, vengono preferiti gli ambienti di conifere a quelli di latifoglie, che forniscono maggior copertura dal vento e minor dispersione radiante del calore corporeo (Kuz'mina, 1992; Thompson e Fritzell, 1988; Swenson and Olsson, 1991).

1.3.3 Stato di conservazione

I principali elementi di vulnerabilità del francolino di monte sono la perdita e la frammentazione dell'habitat, operata attraverso la compromissione dei boschi misti e multiplanari in favore delle monocolture forestali (Schäublin e Bollmann, 2010) e, in un'ampia fascia altitudinale nelle Alpi, dall'espansione a climax delle peccete.

Le pratiche forestali possono, quindi, essere considerate importanti per la conservazione e la gestione della specie (Mathys et.al., 2006; Rhim, 2010) favorendo la diversità specifica e strutturale del bosco. È, inoltre, opportuno preservare la connettività fra gli ambienti abitati dal tetraonide per evitare l'isolamento genetico delle popolazioni. Le distanze critiche fra due *demi* per garantire le migrazioni sono, secondo Åberg *et.al.* (1995), di 100 m con matrice agricola (campi aperti) e di 2 km con matrice silvestre mono-culturale a conifere.

L' areale di distribuzione è pressoché continuo in ampie regioni dell'Europa orientale, mentre in Europa centro-occidentale si sono registrate numerose contrazioni e cali demografici locali (Storch, 2007; Rózsa et.al., 2015).



Figura 1.9: areale alpino (dati forniti da *BirdLife International*, 2016) e distribuzione reale in Provincia di Trento (PAT-Servizio Foreste e Fauna-Ufficio Faunistico)

Le Alpi rappresentano la roccaforte della rimanente popolazione in Europa centrale. Essendo gli habitat delle foreste di bassa quota in gran parte compromessi, è probabile che definiscano il limite della nicchia ecologica fondamentale piuttosto che la nicchia ecologica ottimale (Schäublin e Bollmann, 2010). In Italia la popolazione stimata è di 5000-6000 coppie all'inizio del periodo riproduttivo (Meschini e Frugis, 1993; Bricchetti e Fracasso, 2004), e l'areale occupato comprende i territori alpini di Piemonte,

Lombardia, Trentino-Alto-Adige, Veneto e Friuli -Venezia Giulia.

Il francolino di monte rientra nell'Allegato III della Convenzione di Berna ("specie protette") e all'Allegato I della Dir. 2009/147 CE ("Uccelli selvatici": specie per cui "sono previste misure speciali di conservazione per quanto riguarda l'habitat, per garantire la sopravvivenza e la riproduzione di dette specie nella loro area di distribuzione").

Sul territorio nazionale a statuto ordinario lo status di protezione risale al 1977, ad esclusione del periodo 1992-1997 in cui il prelievo venatorio era consentito dal 1 Ottobre al 30 Novembre. In Provincia di Trento, in conformità allo statuto di autonomia regionale, l'inclusione fra le specie cacciabili è perdurata fino al 1987.

Nella Lista Rossa degli Uccelli del Trentino (Pedrini *et.al.*, 2003) viene indicata come "specie vulnerabile", mentre nella Lista Rossa delle specie minacciate in Alto Adige (1994) risulta "minacciata" ed "in regresso" a causa di "restrizione e danneggiamento dei biotopi in conseguenza di attività edilizie e costruzione di strade" e "persecuzione diretta".

1.4 GENETICA DI CONSERVAZIONE

La genetica di conservazione è una scienza interdisciplinare che attraverso l'analisi degli acidi nucleici (DNA e RNA) ricava informazioni utili per preservare le specie in quanto entità dinamiche in grado di adattarsi alle variazioni ambientali e climatiche. Essa si prefigge di minimizzare il rischio di estinzione dovuto a fattori genetici, definire unità di importanza evolutiva (ESUs) e modalità di gestione delle popolazioni di interesse includendo, ove ritenuto opportuno, gli accorgimenti necessari riguardo ai casi di reintroduzione (Frankham *et.al.*, 2002). È una disciplina sviluppatasi dalla fine degli anni '70, unendo aspetti della genetica di popolazione e della biologia di conservazione.

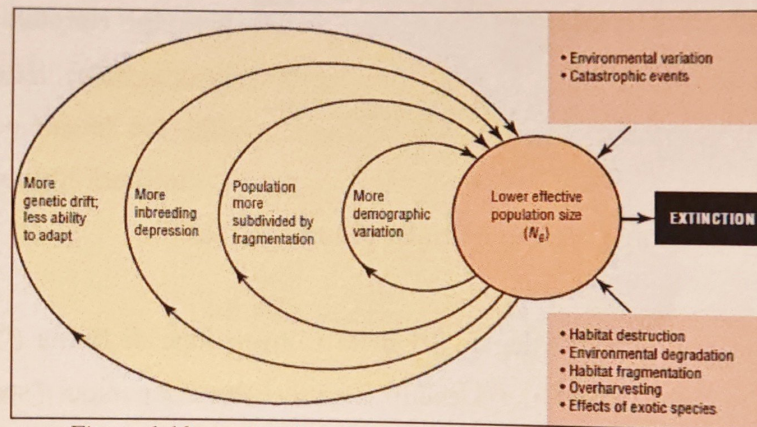


Figura 1.10: vortice di estinzione. Tratta da Guerrant (1992)

Partendo dall'assunto che il potenziale adattativo dipende dall'ampiezza dello spettro genetico su cui la selezione naturale agisce, e che un elevato tasso di inincrocio aumenta il rischio di estinzione tramite la fissazione non casuale di varianti alleliche recessive deleterie (*mutational meltdown*, Lynch *et.al.*, 1993), la genetica di conservazione si occupa di monitorare con attenzione il livello medio di diversità genetica all'interno delle popolazioni naturali. In particolare, è noto che popolazioni di scarsa entità numerica sono esposte ad un processo di rarefazione progressiva che può chiudersi con l'estinzione (Figura 1.10) quando alla deriva e all'inbreeding non sia contrapposto un sufficiente flusso genico.

Attraverso l'interpretazione degli effetti che demografia e ambiente inducono sul patrimonio genetico, la genetica di conservazione consente di ottenere informazioni riguardo a dinamiche di popolazione la cui valutazione diretta è altrimenti difficile, costosa e spesso onerosa per gli stessi animali (*e. g.* inanellamento, tracciamento radiotelemetrico), fornendo alla ricerca scientifica strumenti unici per lo studio di specie rare, elusive o vulnerabili (Taberlet *et.al.*, 1999; Goossens e Bruford, 2009). Il progresso tecnologico ha reso possibile, a partire dagli anni '80, la conduzione di

analisi genetiche a partire da materiale biologico rinvenuto in campioni non-invasivi come feci, penne/piume, peli, gusci d'uovo (etc.), riducendo ulteriormente lo stress indotto agli oggetti di studio.

Attualmente, le analisi genetiche sono incentrate su tratti comuni della sequenza nucleotidica, di dimensione relativamente breve rispetto all'intera molecola di DNA, la cui posizione all'interno del genoma è nota e che forniscono adeguati parametri di confronto intra- ed interspecifico (marcatori genetici o molecolari). La maggior parte dei marcatori molecolari impiegati in genetica di conservazione appartiene alla categoria dei loci neutrali che, non essendo soggetti all'azione specifica della selezione, riescono a fornire un quadro complessivo della variabilità genetica globale della popolazione oggetto di studio, della sua struttura sociale, delle sue dinamiche riproduttive e degli eventi demografici.

Al fine di aumentare il potere statistico delle analisi, si è andato progressivamente affermando un approccio basato sull'analisi di più loci neutrali. Beaumont e Bruford (1998) hanno espresso questo approccio in maniera particolarmente elegante:

“Mutation act as spotlights illuminating certain parts of a tree, and from this we try to infer its shape. Clearly, there are many veils that separate the genetic data from the underlying history of the populations. [...] In particular, selection will also be a powerful force affecting the shape of genealogies. However, once again, by studying many loci we may hope to disentangle selection from demographic effects. In particular, the demographic history experienced by each locus is the same, and therefore neutral loci should tell a consistent story”. (pp. 173-174)

1.4.1 mtDNA (D-loop)

Il DNA mitocondriale (mtDNA) dei vertebrati è una molecola circolare relativamente piccola (16-21 kb), compatta e ad organizzazione aploide, trasmessa prevalentemente per linea materna (Lansman *et.al.*, 1983) e collocata al di fuori del nucleo cellulare, nei mitocondri. L'abbondanza rispetto al DNA nucleare (Clayton, 2000) ne rende l'estrazione e l'analisi relativamente semplici, mentre per il tasso di evoluzione (fino a 10 volte maggiore rispetto al DNA nucleare a singola copia, Brown *et.al.*, 1979) e l'apparente mancanza di ricombinazione meiotica (Avise *et.al.*, 1979-1987; Moritz *et.al.*, 1987) assume le caratteristiche ideali di un unico locus aploide altamente polimorfico.

Nonostante alcune caratteristiche siano state messe in discussione da evidenze di una componente

paterna (*paternal leakage*) (Alexander *et al.*, 2015), evoluzione non neutrale, *hitchhiking* genico e difformità nel tasso di mutazione (e.g. Galtier *et al.*, 2009 per una rivisitazione), il mtDNA resta un marcatore molto efficace per l'identificazione tassonomica e gli studi filogeografici (Hauffe e Sbordonì, 2009). Il contenuto genico è identico in tutti i vertebrati, mentre varia la disposizione dei loci (Quinn, 1997); negli uccelli la prima sequenza è stata pubblicata da Desjardin e Morais (1990) e mostra una disposizione genica unica fra i tetrapodi e conservata: comprende i geni per 2 rRNAs, 22 tRNAs, 13 enzimi (Randi e Lucchini, 1998) e la regione di controllo (CR), una sequenza nucleotidica di circa 1 kb non codificante in cui si trova l'origine di replicazione di uno dei filamenti della molecola e l'origine di trascrizione di entrambi (Clayton, 1992).

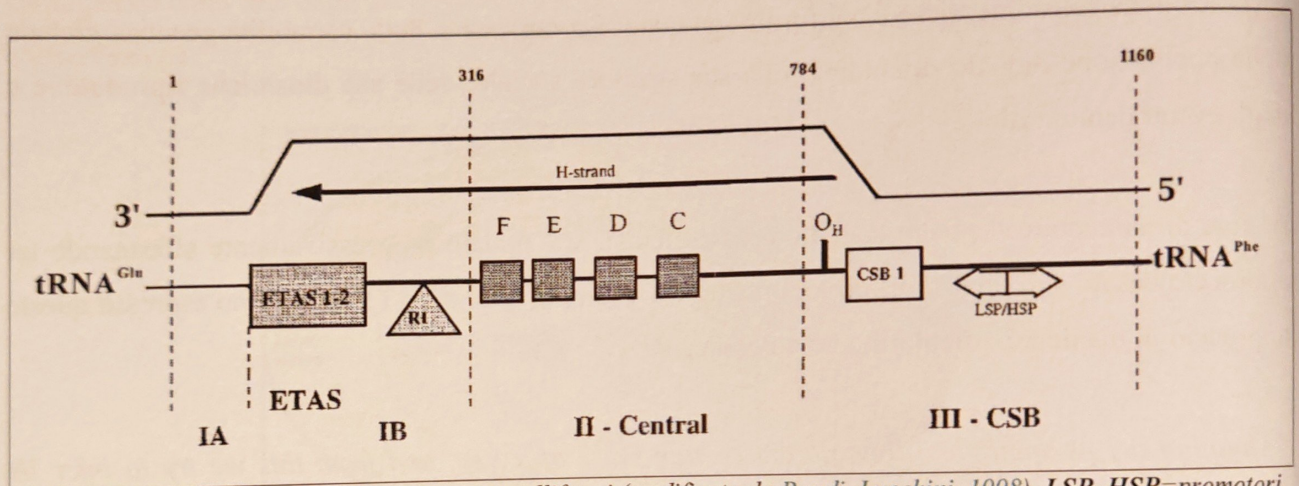


Figura 1.11: organizzazione della D-loop nei galliformi (modificata da Randi, Lucchini, 1998). LSP, HSP=promotori dei filamenti H e L-; CSB =blocchi di sequenza conservati del dominio periferico; O_H =origine di replicazione del filamento H; C, D, E, F=blocchi di sequenza conservati del dominio centrale; RI=VNTRs del dominio I; ETAS 1-2=extended termination-associated sequence

Durante le prime fasi della replicazione, in conseguenza dello sviluppo del filamento *leading* e in associazione con esso, i due filamenti si discostano formando una deformazione strutturale chiamata “*displacement-loop*” (D-loop) (figura 1.11), comunemente considerata la regione più variabile all'interno del mtDNA (Cann *et al.*, 1987). Sbisà *et al.* (1997) distinguono un dominio centrale più conservato affiancato da due regioni periferiche ipervariabili, la cui lunghezza eterogenea a livello inter- ed intraspecifico è dovuta probabilmente a slittamenti della polimerasi durante la replicazione di VNTRs (Fumagalli *et al.*, 1996), osservati soprattutto nel primo dominio.

1.4.2 Microsatelliti

Sono tratti di DNA nucleare formati da ripetizioni di un breve motivo nucleotidico (da 1 a 6 nucleotidi); sono co-dominanti, altamente polimorfici con tasso di mutazione di 10^{-5} - 10^{-3} /generazione/locus (Mc Donald e Potts, 1997; Hancock, 1998) ed i diversi alleli si distinguono per il numero di unità monomeriche ripetute all'interno della sequenza. La comparsa di nuovi alleli è dovuta principalmente a disfunzioni della polimerasi durante la

replicazione (“*slipped-strand mispairing*”, [Levinson e Gutman, 1987](#); [Wright e Bentzen, 1994](#); [Hancock, 1998](#)) (figura 1.12). Dato che le mutazioni più frequenti all'interno di un locus ripetitivo riguardano un singolo motivo ([Weber e Wong, 1993](#); [Slatkin, 1995](#)), secondo il modello di mutazione graduale di Kimura e Ohta ([1978](#)) le variabili alleliche di dimensione simile sono filogeneticamente affini ([Mc Donald e Potts, 1997](#)).

La quantità di microsatelliti contenuta nel DNA è specifica e nessun genoma analizzato fino ad ora ne è risultato privo, sia per loci codificanti dove possono ricoprire un effettivo ruolo come substrato evolutivo ([Kashi et.al., 1997](#); [Sawyer et.al., 1997](#); [Kashi e Soller, 1998](#)) che in loci non codificanti.

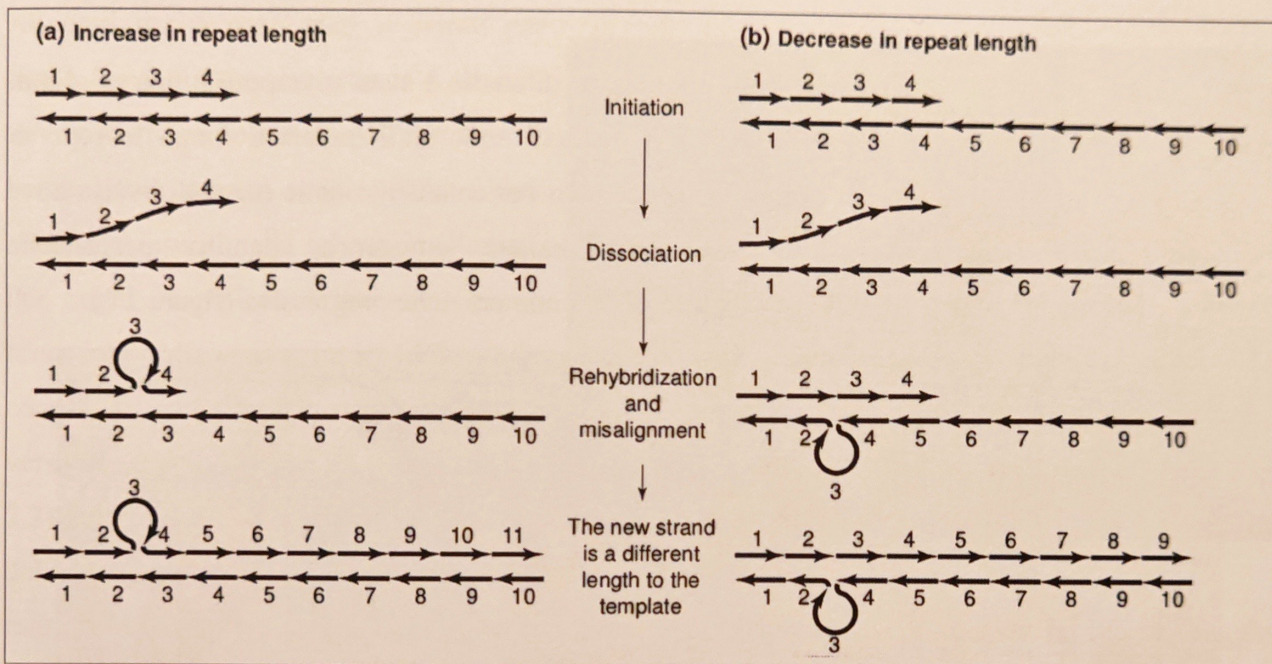


Figura 1.12: modello di mutazione per slittamento. Tratta da Ellegren (2000)

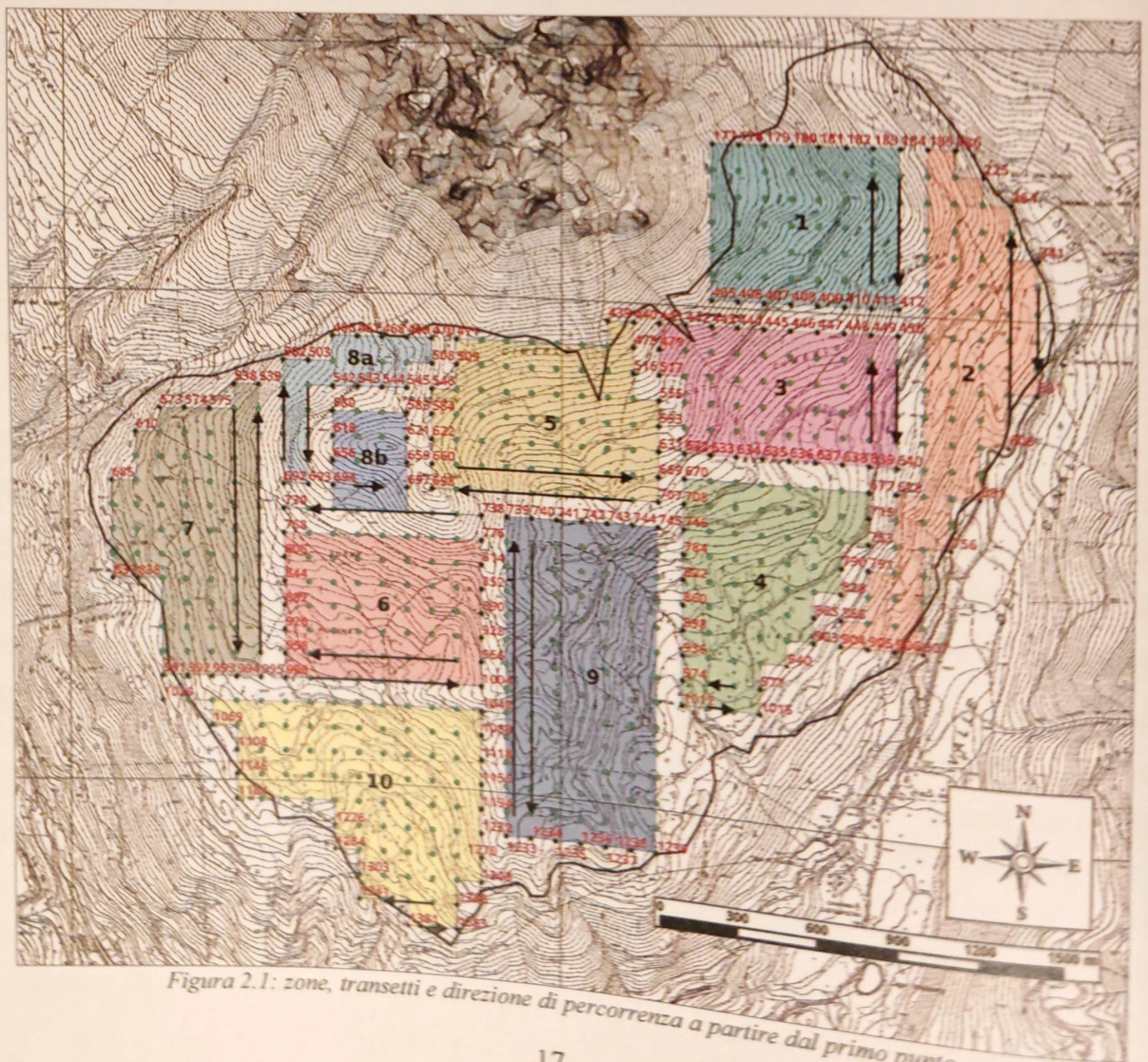
Date la versatilità e l'alta specificità dei microsatelliti e la relativa facilità di distinzione (per dimensione) dei diversi alleli, il loro utilizzo come marcatori molecolari è diffuso e comprende, oltre agli studi di popolazione, le analisi di parentela e paternità (e.g. [Blouin et. al., 1996](#)), l'identificazione individuale in ambito forense, la definizione di pedigree familiari, gli studi di popolazione a piccola scala (e.g. [Bowcock et.al, 1996](#)) e il monitoraggio di specie rare, potendo consentire il tracciamento individuale degli esemplari (*tagging* genetico) (e.g. monitoraggio genetico dell'orso).

2. MATERIALI E METODI

2.1 CAMPIONAMENTO

Il metodo di campionamento è stato indicato da Davide Scridel (dottorando presso il MUSE) ed il trattamento dei campioni da Barbara Crestanello del Gruppo Genetica di Conservazione del Dipartimento di Biologia ed Ecologia Molecolare (GC-DBEM) della Fondazione Edmund Mach (FEM), mentre il campionamento è stato eseguito da me e Piergiovanni Partel.

Utilizzando il programma QGIS 2.0.1-Doufour all'area di studio è stata sovrapposta una griglia di punti georeferenziati distanti fra loro 100 m. I transetti sono stati impostati lungo le rette di direzione N-S od E-O passanti per i punti, assecondando l'orientamento delle curve di livello dove possibile, quindi suddivisi in 10 zone a direzione omogenea, ognuna percorribile approssimativamente in una giornata ed identificate con numerazione progressiva (figura 2.1).



Per affinare il successo di campionamento alla popolazione presente, includendo le migrazioni temporanee dai territori adiacenti, ogni zona è stata percorsa 5 volte, mantenendo al più possibile l'ordine di percorrenza per ottenere dei parametri fra loro uniformi (vedi allegato II)

Per fornire un riscontro su campo dell'inizio e della fine dei transetti, in corrispondenza od in prossimità del punto è stato applicato dove possibile del nastro da cantiere (che è stato rimosso nel corso dell'ultima uscita). Nel corso del campionamento la direzione è stata mantenuta con l'ausilio dello strumento GPS e di una bussola.

Ad ogni uscita sono stati registrati per tutti i transetti l'ora di partenza e l'ora di arrivo, lo sforzo sostenuto dall'operatore e la copertura nevosa media. Tutti i dati sono stati inseriti nella scheda in allegato. Per ogni campione rinvenuto si è proceduto alla marcatura GPS delle coordinate con lo strumento orientato verso N ad una distanza di 10 cm (figura 2.2), alla registrazione su scheda cartacea dell'identificatore (ID) campione, dei



Figura 2.2: geolocalizzazione e raccolta dei campioni

fattori ambientali nel raggio di circa 10 m (stimati empiricamente, vedi allegato I), allo stoccaggio in provetta (Sarstedt 15 cl) ed etichettatura del reperto. La raccolta comprendeva tutti i frammenti rinvenuti, per evitare di ricampionare lo stesso indice di presenza nelle uscite successive.

Al fine di ridurre la contaminazione per contatto del campione, quando necessario per la raccolta e lo stoccaggio sono stati utilizzati pinzette (sterilizzate con ipoclorito di sodio e pulite con alcol) o guanti monouso. In attesa delle analisi di laboratorio i campioni sono stati conservati a -20°C .

Il periodo di campionamento si è protratto dalla messa a punto dei transetti (22 Dicembre 2015) al 29 Aprile 2016; in caso di nevicate le uscite venivano rimandate di almeno 3 giorni, per permettere la deposizione degli indici di presenza.

2.2 ANALISI GENETICHE DI LABORATORIO

Tutte le successive fasi di manipolazione dei campioni e di elaborazione dei dati si sono svolte nei laboratori del gruppo di Genetica di Conservazione (GC-DBEM) presso la sede FEM di San Michele all'Adige.

Per la tipizzazione dei campioni sono stati amplificati tramite PCR (*Polymerase chain reaction*) ed in seguito analizzati i seguenti marcatori molecolari: un frammento di 449 bp della D-loop mitocondriale per ottenere un inquadramento filogeografico degli individui; un locus nucleare per la determinazione del sesso; 12 loci microsatellite nucleari per la distinzione degli individui campionati.

Per diminuire la probabilità di contaminazione incrociata i processi di estrazione (pre-PCR), preparazione della miscela per l'amplificazione e reazioni post-PCR sono stati svolti in settori del laboratorio fisicamente separati, forniti di strumentazione dedicata e deputati alla conservazione e manipolazione dei campioni durante le varie fasi.

Le amplificazioni sono state realizzate utilizzando la Taq polimerasi termostabile GoTaq[®] G2 Hot Start (Promega) (tasso di replicazione 1 kb/min circa), con il relativo tampone (5X GoTaq[®] Flexi Buffer) e MgCl₂ 25 mM. Questa polimerasi richiede una attivazione iniziale di 2 minuti a 95°C, permettendo di limitare le possibili amplificazioni a-specifiche a temperature inferiori (e.g. dimerizzazione degli inneschi).

In tutte le amplificazioni è stato inserito un controllo negativo (K-) contenente solo i reagenti. È stata utilizzata acqua ultrapura Milli-Q[®] (Merck Millipore[™]) e termociclatori Veriti[™] Thermal Cycler (Applied Biosystems[™]).

2.2.1 Estrazione del DNA

Per l'unico campione di penne/piume raccolto (09816) il protocollo seguito ed i reagenti utilizzati sono inclusi nel QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN[®]). Sono stati utilizzati 20 mg dei calami, ottenendo 360 µL di prodotto di estrazione. Un'aliquota di 25 µL è stata prelevata e conservata in frigorifero per procedere con il test-cross degli inneschi e le successive analisi, mentre la rimanenza è stata conservata in congelatore a -20°C.

Per l'estrazione da feci è stato in prima istanza testato il protocollo sviluppato per il progetto MAZE.ROE (Orusa *et.al.*, 2015) a partire dal protocollo Mag-Bind® Stool DNA 96 kit per KingFisher™ Flex (Omega bio-tek). Nella piastra di estrazione sono stati inseriti 8 controlli negativi (soli reagenti), che sono risultati contaminati da *T. bonasia* in seguito al loro sequenziamento. Si è quindi deciso di scartare il materiale ottenuto e di procedere con un nuovo protocollo.

Per le estrazioni successive è stato utilizzato il kit E.Z.N.A.® Stool DNA-Human DNA Detection Protocol (Omega bio-tek), utilizzando circa 100 mg di campione e risospesando il DNA in 200 µL di Elution buffer. Rispetto al protocollo suggerito dal produttore i seguenti accorgimenti accessori sono stati seguiti: al punto 1, campione ed SLX-Mlus buffer sono stati omogeneizzati manualmente tramite bacchette batteriologiche; al punto 8 sono stati trasferiti 1,2 mL di surnatante anziché 600 µL; al punto 35 l'incubazione a temperatura ambiente della colonnina è stata protratta per 5' anziché per 2'.

Le centrifugazioni sono state effettuate a 9000 RPM (provette da 15 mL) e 14000 RPM (tutti gli altri passaggi). Si è proceduto ad estrarre 11 campioni per volta, includendo una provetta di controllo negativo contenente i soli reagenti.

2.2.2 Sessaggio e D-loop

Per la determinazione del sesso è stato amplificato un introne del gene CHD, che presenta un polimorfismo di lunghezza nei cromosomi sessuali (W e Z) a cui è vincolato, utilizzando gli inneschi universali 1237L (5'-GAG AAA CTG TGC AAA ACA G-3') e 1272H (5'-TCC AGA ATA TCT TCT GCT CC- 3') (Kahn *et. al.*, 1998) secondo il protocollo indicato in tabella 2.1.

SESSAGGIO	REAGENTI (µL)									
	H ₂ O	Buffer	BSA	MgCl ₂	1237L	1272H	DNTPs	Taq	Mix	DNA
	11,75	5	0,5	1,5	0,5	0,5	2	0,25	22	3
PROFILO TERMICO										
94°C	1' 30"		94°C	30"		94°C	30"		54°C	1'
94°C	30"		55-58°C	1'		59°C	1'		65°C	2'
54°	1'	x5	65°C	1' 10"	x2	65°C	1' 10"	x30		
65°C	1' 10"									

Tabella 2.1: protocollo di amplificazione per il sessaggio. I vari passaggi del profilo termico sono necessari per l'amplificazione dei due alleli differenti nel sesso eterozigote

Il prodotto di PCR è stato analizzato tramite elettroforesi capillare utilizzando lo strumento QIAxcel® DNA Fast Analysis (Qiagen®): per il sesso eterozigote (femminile, ZW) l'amplificato determina due bande di 274 e 234 bp, mentre per quello omozigote (maschile, ZZ) una banda singola di 234 bp (figura 2.3).

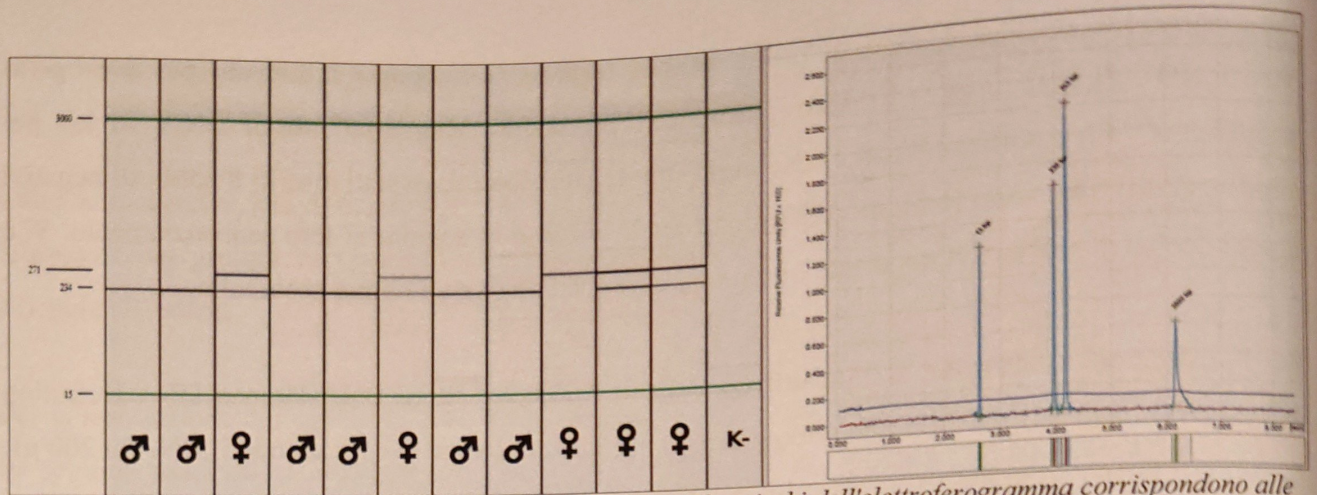


Figura 2.3: visualizzazione di elettroforesi capillare. A destra, i due picchi dell'elettroferogramma corrispondono alle due bande ottenute per un individuo femminile.

Il frammento ipervariabile adiacente al locus tRNA_{glu} della D-loop mitocondriale è stato amplificato utilizzando gli inneschi F esterno PHDL (5'-AGG ACT ACG GCT TGA AAA GC-3') (Fumihito et.al., 1995) e R interno PH-H521 (5'-TTA TGT GCT TGA CCG AGG AAC CAG-3') (Randi e Lucchini, 1998) (Tabella 2.2).

D-loop	REAGENTI (μL)										PROFILO TERMICO	
	H ₂ O	Buffer	BSA	MgCl ₂	PHDL	PH-H521	dNTPs	Taq	Mix	DNA	95°C	2'
	8,7	4	0,5	1,6	1	1	2	0,2	19	1	94°C <td>30"</td>	30"
											55°C <td>15"</td>	15"
											72°C <td>1'30"</td>	1'30"
											72°C <td>10'</td>	10'

Tabella 2.2: protocollo di amplificazione della D-loop mitocondriale

In presenza di un amplificato di qualità e quantità adeguata, determinata tramite elettroforesi capillare, si è proceduto alla purificazione dei prodotti tramite protocollo ExoSAP-IT® (USB Corporation-USA) secondo i parametri indicati in tabella 2.3. Il protocollo provvede all'idrolisi degli eventuali frammenti genomici alieni e la rimozione dei gruppi fosfato dei dNTPs residuali per mezzo degli enzimi esonucleasi I (EXO) e fosfatasi alcalina (SAP, *Shrimp Alkaline Phosphatase*).

ExoSAP	REAGENTI (μL)		PROFILO TERMICO	
	Amplificato	ExoSAP	37°C	15'
	5	2	80°C	15"

Tabella 2.3: protocollo di purificazione con ExoSAP

Metà del prodotto purificato, miscelata con 1 μL di innesco 3,2 μM e diluita con 1,5 μL di acqua ultrapura, veniva quindi avviata in piattaforma di sequenziamento.

Le sequenze mitocondriali ottenute sono state analizzate e corrette con Sequencher® (Gene Codes Corporation-USA). Eliminando il picco di innesco all'estremo R ed il tratto finale in corrispondenza della regione complementare all'innesco F dei frammenti è stato definito un frammento di 449 bp.

2.2.3 Microsatelliti

Per valutare la possibilità di amplificazione eterologa dei loci microsatellite si è proceduto al test-cross dei seguenti inneschi: TUT1, TUT2 e TUT3 identificati per *Tetrao urogallus* (Segelbacher *et al.*, 2000), BG4, BG6, BG15, BG16, BG18, BG20 identificati per *Tetrao tetrix* (Pierney e Höglund, 2001), ADL142, ADL184, ADL230 (Cheng e Crittenden, 1994) indentificati per *Gallus gallus*. La maggior parte degli inneschi erano già stati utilizzati dal gruppo di Genetica di Conservazione per campioni non invasivi di altri tetraonidi (gallo cedrone, gallo forcello, pernice bianca), ed alcuni utilizzati su campioni invasivi di francolino di monte in Sahlsten *et al.* (2008), Rutkowski *et al.* (2011-2016), Rózsa *et al.* (2015).

INNESCO	5'-3'	3'-5'	STR	RANGE DI AMPLIFICAZIONE
TUT1	6FAM-GGTCTACATTGGCTCTGACC	ATATGGCATCCAGCTATGG	(CTAT) ₁₂	MPX1
TUT2	VIC-CCGTGTCAAGTCTCCAAC	TTCAAAGCTGTGTTTCATTAGTTG	(GATA) ₁₂	
TUT3	PET-CAGGAGGCTCAACTAATCACC	CGATGCTGGACAGAAGTGAC	(TATC) ₁₁	
BG15	VIC-AAATATGTTTCTAGGCTTAC	TACATTTTCATTGTGGACTTC	(CTAT) ₁₆	MPX2
BG16	6FAM-GTCATTAGTGTCTGTCTATCT	TGCTAGGTAGGTA AAAATGG	(CTAT) ₁₅	
BG18	PET-CCATAACTAACTGCACTTTC	CTGATACAAGATGCCTACAA	(CTAT) ₁₇	
ADL142	PET-CAGCCAATAGGATAAAAAGC	CTGTAGATGCCAAGGAGTGC	(CA) ₁₁	MPX3
ADL184	NED-GCCTCTCACCCACAAAACC	TCAGTAACACCACGAATGCC	(CA) ₁₈	
ADL230	PET-GCCAAATAGTAATCCACTGC	TCGCTCTTGCCTTGTAAAGT	(TG) ₁₇	
BG4	NED-ATTCATCAAGTTGGCTTGGGA	TCAAGTCTTTGGGTGTCATAG	(GATA) ₁₃	MPX4
BG6	PET-AAAGAGGCAAGCACTCACAATG	CCCTTGGAAATATCCTTTAACA AAAAC	(GATA) ₁₅	
BG20	6FAM-AAGCACTTACAATGGTGAGGAC	TATGTTTCCCTTTCAGTGGTATG	(GATA) ₁₇	

Tabella 2.4: a sx: sequenza degli inneschi utilizzati nella tipizzazione, fluorocromo e sequenza ripetuta. A dx: range di amplificazione dei primer (il colore del tratto è quello reso dal fluorocromo)

Per consentire la discriminazione dei frammenti su sequenziatore automatico gli inneschi F utilizzati sono stati marcati all'estremità 5' con fluorocromi della Matrice G5 (6-FAMTM, VIC[®], PET[®] o NEDTM, Applied BiosystemsTM). Dopo aver scartato i loci meno variabili (BG10, BG19, ADL257, LEI098) e quelli che hanno presentato difficoltà di amplificazione (TUT4, BG12) sono stati definiti, in base alle condizioni di reazione necessarie all'appaiamento degli inneschi e al rispettivo range definito (Figura 2.4), i protocolli per le amplificazioni multilocus (MPX) rappresentati in tabella 2.5.

REAZIONE	REAGENTI (µL)										PROFILO TERMICO					
MPX 1	H2O	Buffer	Myci2	TUT1		TUT2		TUT3		dNTPs	Taq	Mix	DNA	95°C 4" 94°C 30" 58°C 30" 72°C 45" 72°C 10" x50		
				F	R	F	R	F	R							
4,29	2	0,8	0,1	0,1	0,15	0,15	0,08	0,08	1	0,25	9	1				
MPX 2	H2O	Buffer	Myci2	BG15		BG16		BG18		dNTPs	Taq	Mix	DNA		95°C 4" 94°C 1" 54°C 30" 72°C 30" 72°C 5" x 50	
				F	R	F	R	F	R							
3,95	2	0,8	0,15	0,15	0,15	0,15	0,2	0,2	1	0,25	9	1				
MPX 3	H2O	Buffer	Myci2	ADL142		ADL184		ADL230		dNTPs	Taq	Mix	DNA	95°C 4" 94°C 30" 54°C 20" 72°C 30" 72°C 1" x45		
				F	R	F	R	F	R							
3,91	2	0,8	0,17	0,17	0,15	0,15	0,2	0,2	1	0,25	9	1				
MPX 4	H2O	Buffer	Myci2	BG4		BG6		BG20		dNTPs	Taq	BSA	Mix		DNA	95°C 4" 94°C 30" 58°C 30" 72°C 45" 72°C 10" x50
				F	R	F	R	F	R							
3,67	2	0,8	0,12	0,12	0,15	0,15	0,12	0,12	1	0,25	0,5	9	1			

Tabella 2.5: protocolli definitivi per le amplificazioni multilocus

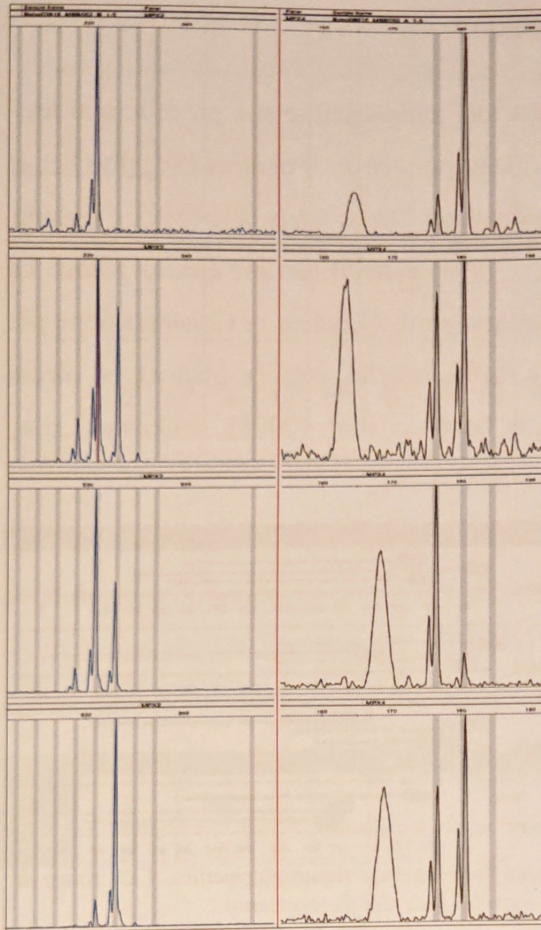


Figura 2.5: visualizzazione dei microsatelliti su GeneMapper®: esempi di sbilanciamento e drop-out allelico in due eterozigoti ai loci BG16 (sx) e BG4 (dx)

In seguito all'amplificazione 1 μ L di prodotto, diluito in acqua a concentrazione 1:10, 1:5 o 1:2 a seconda della resa del marcatore in questione, veniva caricato in una soluzione al 0.54% di standard dimensionale (500LIZ®, Applied Biosystems™) in formammide ed inviato alla piattaforma di sequenziamento della FEM.

Gli elettroferogrammi sono stati visualizzati, marcati e corretti manualmente tramite il programma GeneMapper® 5.0 (Applied Biosystems™), consentendo la genotipizzazione dei campioni. Per diminuire l'influenza di alleli falsi, nulli e di dropout allelico i marcatori microsatellite sono stati amplificati e tipizzati più volte (approccio multi-tube, Taberlet *et.al.*, 1996), fino ad ottenere quattro conferme per gli alleli omozigoti e due per quelli eterozigoti (vedi figura 2.5).

2.3 ANALISI STATISTICA DEI DATI

Le analisi statistiche sono state svolte considerando gli animali campionati come appartenenti ad un'unica popolazione.

La diversità genetica mitocondriale è stata stimata con il programma Arlequin ([Excoffier et al., 2005](#)), utilizzando diversi indici statistici. Per ottenere un inquadramento filogenetico è stato generato un cladogramma *neighbour-joining* (NJ) secondo il modello di sostituzione nucleotidica a 2 parametri di Kimura ([1980](#)). La robustezza del cladogramma è stata testata generando 1000 pseudo-repliche di *bootstrap* ([Felsenstein, 1985](#)).

Tramite [PopArt](#) è stato generato un *network median-joining* ([Bandelt et al., 1999](#)), che offre una maggior definizione delle distanze genetiche a livello intraspecifico.

Presupponendo un'alta affinità genetica all'interno della popolazione campionaria, per ottenere una maggior risoluzione degli aplotipi il parametro ϵ (epsilon), che regola le distanze genetiche minime fra cui generare il reticolo, è stato impostato a 0.

La correttezza della genotipizzazione è stata valutata con MICRO-CHECKER ([Van Oostrehout et al., 2004](#)). I genotipi considerati tipizzati sono quindi stati sottoposti ad analisi con GenAlEx 6.5 ([Peakall e Smouse, 2012](#)) per essere ricondotti agli individui di provenienza. Oltre ai dati relativi alla resa dei microsatelliti sono stati estrapolati gli indici di eterozigosità osservata (H_{Oss}) e attesa (H_{Att}), il coefficiente di inbreeding (F_{IS}) e la deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg per ciascun locus.

Per ottenere una rappresentazione grafica della distanza genetica fra gli individui è stata effettuata un'analisi fattoriale delle corrispondenze ([Benzécri, 1973](#)) con il programma Genetix ([Belkhir et al., 1996-2004](#)).

3. RISULTATI

3.1 CAMPIONAMENTO

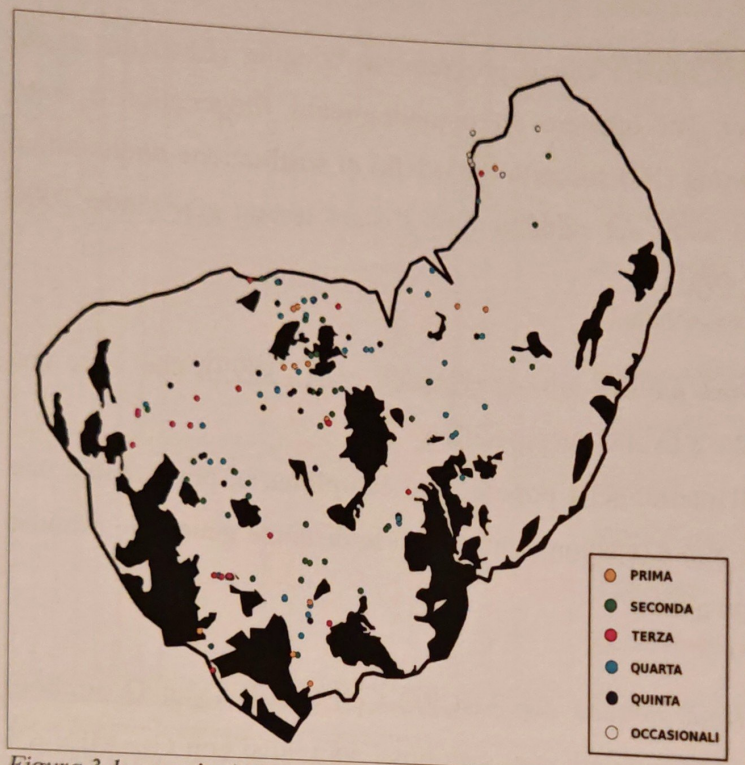


Figura 3.1: campioni rinvenuti, distinti per uscita (in legenda). Alcuni risultano sovrapposti nell'immagine. In nero le zone a prato/pascolo

In 48 giornate di campionamento sono stati raccolti 132 campioni fecali (13 la prima uscita, 42 la seconda, 21 la terza, 35 la quarta e 21 la quinta), 1 campione di penne e piume (la quarta uscita), ed effettuati 3 avvistamenti (1 la quarta e 2 la quinta uscita). Altri 11 campioni fecali sono stati raccolti durante la fase di messa a punto precedente al campionamento ed inclusi nelle analisi genetiche. I richiami territoriali sono stati frequenti durante tutto il periodo, ed in circa un quarto dei casi rispondevano ad una provocazione con richiamo acustico.

Il 77% dei campioni è stato rinvenuto in presenza di copertura vegetale >50%, ed il 76% in ambiente caratterizzato dalla presenza di strutturazione forestale fornita dagli stadi giovanili di *P. abies* (spessaia, novellame o rinnovamento). Soltanto 1 campione (07115) è stato raccolto in assenza di copertura vegetale, a distanza di circa 15 m dal bosco, mentre nessun campione è stato trovato all'interno di spessaie trattate (Figura 3.2).

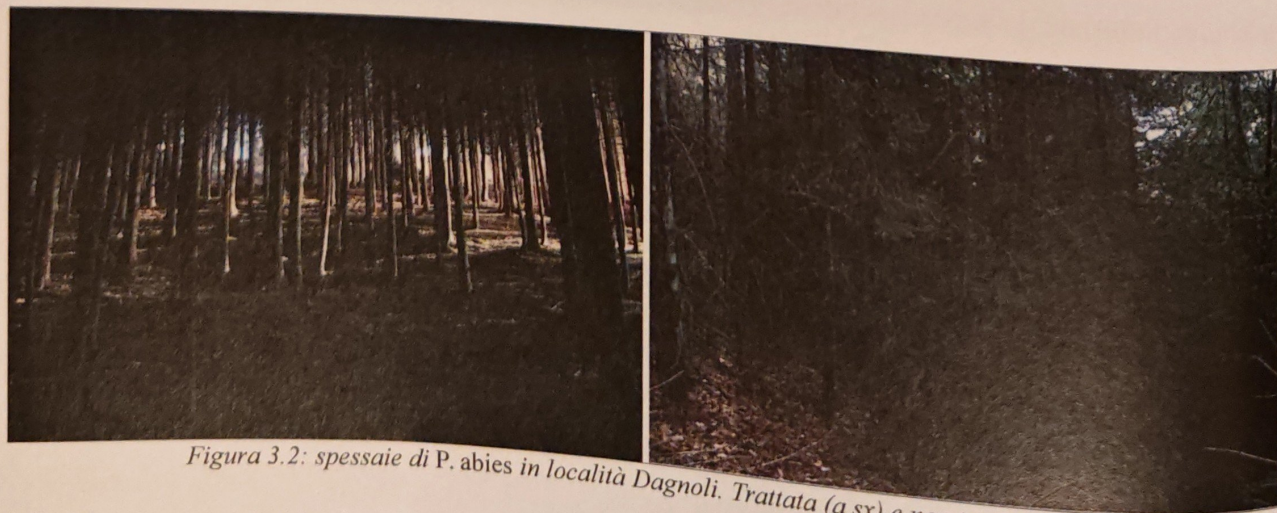


Figura 3.2: spessaie di *P. abies* in località Dagnoli. Trattata (a sx) e non trattata (a dx)



Figura 3.3: morfologia eterogenea dei campioni fecali raccolti

La frequenza dei ritrovamenti è stata maggiore nelle aree con popolamenti vegetazionali eterogenei e con abbondanti ecotoni, la cui presenza nell'area campione è legata alle formazioni forestali recenti (peccete in successione e secondarie) e alle zone di interfaccia fra bosco e zone prative, e che forniscono importanti fonti di cibo invernale per il francolino di monte (principalmente nocciolo, sorbo degli uccellatori e biancospino). Nelle zone in cui la popolazione forestale è rappresentata principalmente da abete rosso (abietete dei substrati carbonatici) la resa del campionamento è stata inferiore, aumentando con la presenza del faggio, i cui germogli rappresentano un'ulteriore fonte alimentare.

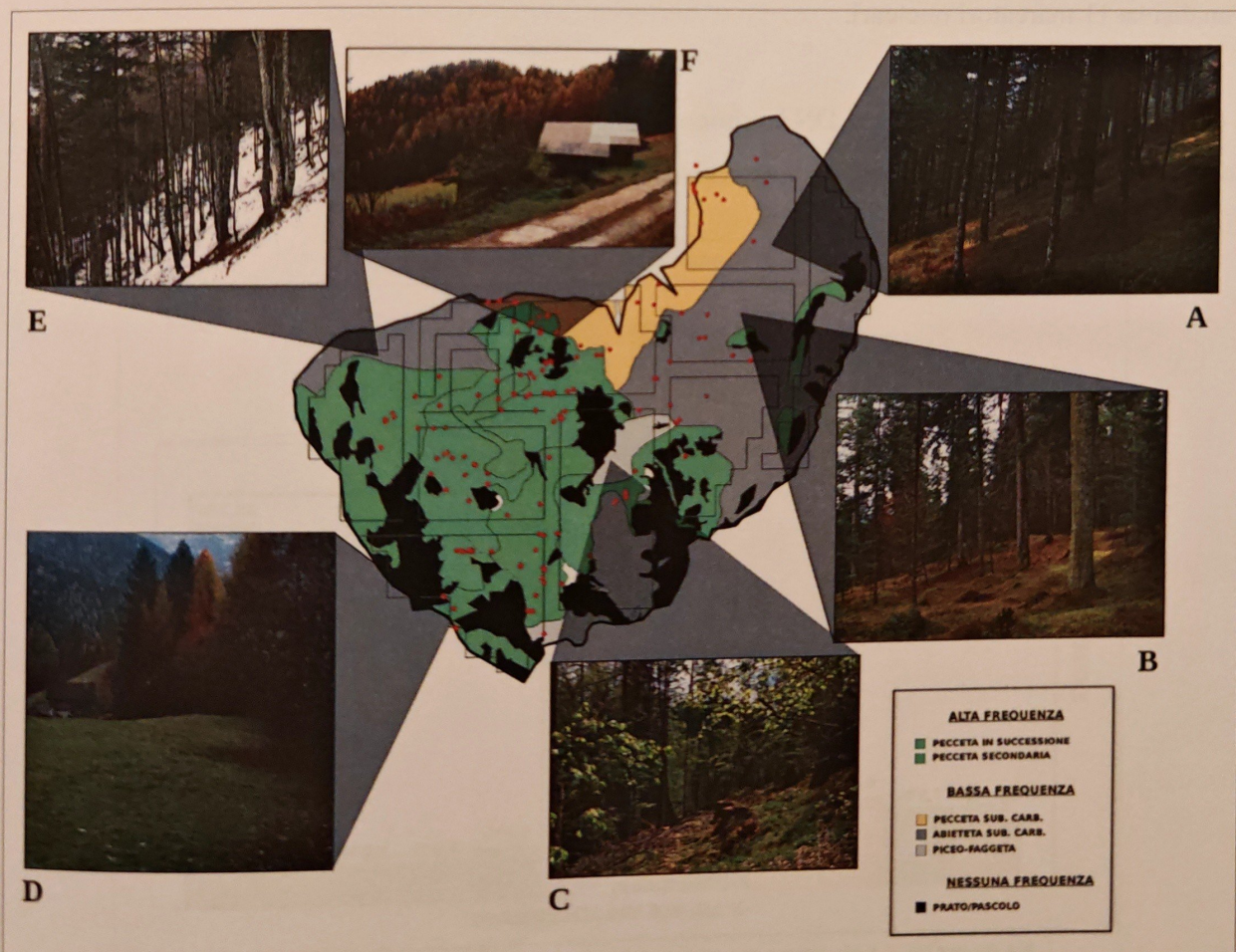


Figura 3.4: area studio suddivisa per frequenza di campionamento e tipologie vegetazionali. In rosso i campioni rinvenuti. A=bosco a prevalenza di abete rosso, versante O della val Pradidali; B=bosco misto a prevalenza di abete rosso, abete bianco e faggio in località Sorapiana; C=piceo-faggeta a S dei prati Fosne; D= ecotono a corileto in località Zaut; E=bosco a prevalenza di faggio e abete bianco; F=pecceta in successione a lariceto in località Rodena

3.2 ESTRAZIONE DEL DNA E CARATTERIZZAZIONE GENETICA

Il 71% dei campioni raccolti sono stati sottoposti ad estrazione ed analisi genetica. Per il campione 05316, non avendo più a disposizione materiale biologico, si è utilizzato il prodotto di estrazione inizialmente ottenuto con protocollo per KingFisher™. Le successive amplificazioni non hanno dato segnali di contaminazione. Per 93 prodotti di PCR (92% degli estratti) il frammento mitocondriale è stato sequenziato con buon esito; confrontando le sequenze ottenute con quelle depositate utilizzando BLAST® (Zhang et. al., 2000) l'appartenenza alla specie oggetto di studio è stata confermata per la totalità dei campioni. Il sesso è stato determinato in 76 campioni (l'82% dei positivi al mtDNA, il 75% dei campioni estratti), di cui 44 sono risultati maschili e 32 femminili.

In seguito all'analisi dei microsatelliti gli inneschi BG6 e BG20 sono risultati amplificare lo stesso locus, i cui alleli risultavano reciprocamente traslati della distanza che intercorre fra le regioni di appaiamento dei rispettivi primers. Il primer BG20 è stato perciò rimosso dal set, proseguendo l'analisi su 11 marcatori nucleari.

I 46 campioni sessati, tipizzati al DNA mitocondriale e ad almeno 7 loci microsatellite (nel riquadro in figura 3.5) sono stati utilizzati nelle successive analisi statistiche.

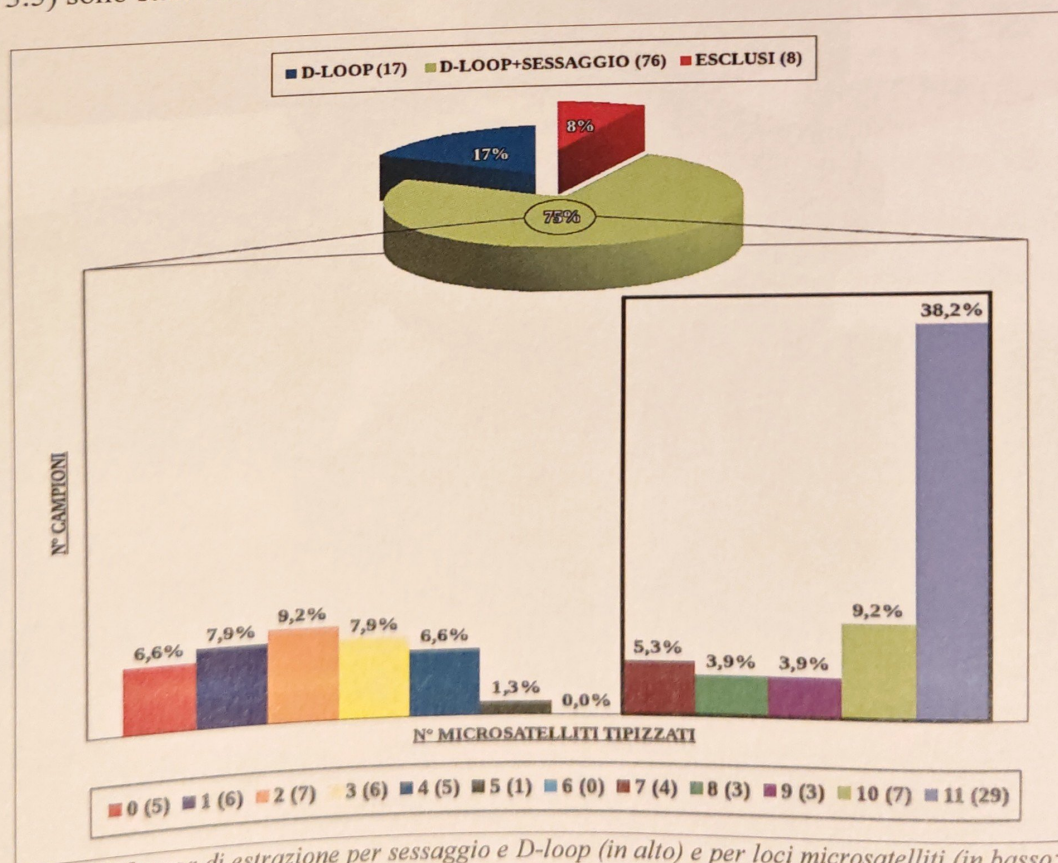


Figura 3.5: resa di estrazione per sessaggio e D-loop (in alto) e per loci microsatelliti (in basso; nel riquadro la porzione dei campioni considerati tipizzati). In didascalia, fra parentesi, il numero di campioni rappresentati nei grafici.

Tutti i loci nucleari analizzati sono risultati polimorfici. La frequenza dell'allele 115 al locus ADL184 (92%) rende questo marcatore il meno informativo del set, mentre l'analisi dei dati con MICRO-CHECKER ha riportato la presenza di alleli nulli e *stuttering* solo per il locus TUT1, nella popolazione nel complesso e nella popolazione femminile.

Mediante l'esclusione di campionamenti multipli dello stesso individuo, identificati sulla base di identità genotipica, è stato possibile analizzare i genotipi di 31 individui differenti (tabella 4.1). La resa dei singoli marcatori è riportata in tabella 3.2.

Locus	BG4	BG6	TUT1	TUT2	TUT3	BG15	BG16	BG18	ADL142	ADL184	ADL230
N tipizzati	31	30	27	28	26	31	26	30	28	31	30
Resa (%)	100,00	96,77	87,10	90,32	83,87	100,00	83,87	96,77	90,32	100,00	96,77

Tabella 3.2: resa per campioni tipizzati (N) e resa percentuale dei marcatori microsatellite

3.3 ANALISI DI VARIABILITÀ E RICOSTRUZIONE FILOGENETICA

3.3.1 mtDNA

Utilizzando FaBox (Villesen, 2007), le sequenze identiche sono state collassate e confrontate con gli aplotipi di riferimento ottenuti dalla banca dati GenBank®. I 31 individui tipizzati hanno

riportato due aplotipi depositati rinvenuti nell'area carpatica della Polonia meridionale (aplotipi H10 e H13, Rutkowski et al., 2012). Fra questi, le sequenze attribuite a 6 individui hanno riportato una base ambigua (Y) alla posizione 165 del frammento, risultando tutte equamente compatibili sia con l'aplotipo H13 che con l'aplotipo Bb113, anch'esso rinvenuto in Polonia (Rutkowski et al., 2016). Non avendo riscontrato la presenza di quest'ultimo nei campioni analizzati finora, per l'analisi delle frequenze questi individui sono stati ricondotti all'aplotipo H13. I due aplotipi differiscono per una mutazione (transizione) alla posizione 179 del frammento: la diversità aplotipica (h) è risultata pari a 0,45, la diversità nucleotidica (π) di 0,0020 e gli alleli sono presenti alle frequenze di 0,68 (H10) e 0,32 (H13).

All'interno del campione è stata inoltre rilevata una sequenza non depositata, già rinvenuta nel Trentino occidentale durante il progetto CEDRO-GEN; trattandosi di campioni non ancora tipizzati ai microsatelliti, l'aplotipo non rientra nelle analisi di frequenza ma è incluso nella ricostruzione filogenetica con il nome Bbns1.

Utilizzando CLUSTALX 2.0 (Larkin et al., 2007) si è proceduto ad un allineamento delle sequenze rinvenute con quelle depositate in GenBank® (Baba et al., 1997 -non pubblicato-, a.n. AB006674.1; Lucchini et al., 2001, a.n. AJ297155.1; Drovetski, 2002, a.n. AF532418.1-AF532420.1; Shen et al., 2010, a.n. FJ752435.1; Rutkowski et al., 2012, a.n.

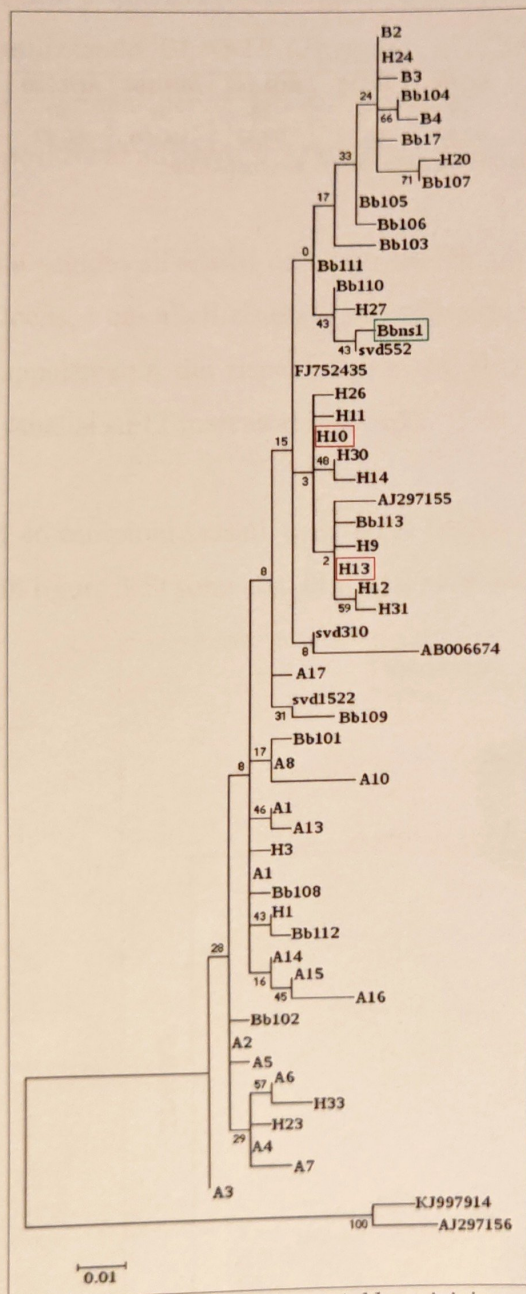


Figura 3.7: cladogramma neighbour joining ottenuto analizzando gli aplotipi rinvenuti nel presente studio (evidenziati) con quelli depositati

in GenBank® (Baba et al., 1997 -non pubblicato-, a.n. AB006674.1; Lucchini et al., 2001, a.n. AJ297155.1; Drovetski, 2002, a.n. AF532418.1-AF532420.1; Shen et al., 2010, a.n. FJ752435.1; Rutkowski et al., 2012, a.n.

JN935902.1-JN935922.1.; [Rutkowski et al., 2016](#), a.n. KU756240.1-KU756252.1; [Riauba e Butkauskas, 2012](#), a.n. JX971630.1-JX971650.1). La lunghezza dell'allineamento fra tutti gli aplotipi è di 230 bp. Utilizzando il programma MEGA 5.2 ([Tamura et al., 2011](#)) è stato prodotto un cladogramma *neighbour-joining* (figura 3.7), includendo come outgroup due sequenze di *T. sewerzowi* (a.n. KJ997914, [Li et al., 2014](#); AJ297156, [Lucchini et al., 2001](#)). A parte la posizione basale della specie cinese, gran parte dei nodi nella ricostruzione filogenetica non sono statisticamente supportati, probabilmente a causa della presenza di numerose omoplasie (mutazioni indipendenti allo stesso sito) e alla ridotta struttura geografica.

Utilizzando [PopArt](#) si è quindi proceduto alla ricostruzione di un network di aplotipi (figura 3.8), un metodo più adatto allo studio di sequenze a livello intraspecifico. Come atteso, il network evidenzia la presenza di numerosi loop (dovuti ad ambiguità associate a mutazioni ricorrenti), e la ridotta (o assente) struttura geografica, risultando in un reticolo fitto in cui gli aplotipi sono in gran parte interconnessi da sostituzioni singole, come già riscontrato per la specie in [Baba et al. \(2002\)](#) e in [Riauba e Butkauskas \(2012\)](#). A parte il differenziamento del Giappone (un aplotipo molto divergente), i campioni provenienti dalle altre regioni si distribuiscono in maniera abbastanza omogenea in tutto il reticolo. Gli individui tipizzati in questo studio rappresentano forse l'unica eccezione: a causa della loro ridotta variabilità (solo due aplotipi presenti) si localizzano tutti in una specifica posizione del reticolo, insieme ad aplotipi polacchi. Il numero ridotto di popolazioni, e soprattutto il forte sbilanciamento tra le dimensioni campionarie nelle diverse popolazioni, non permette però di escludere altre ipotesi.

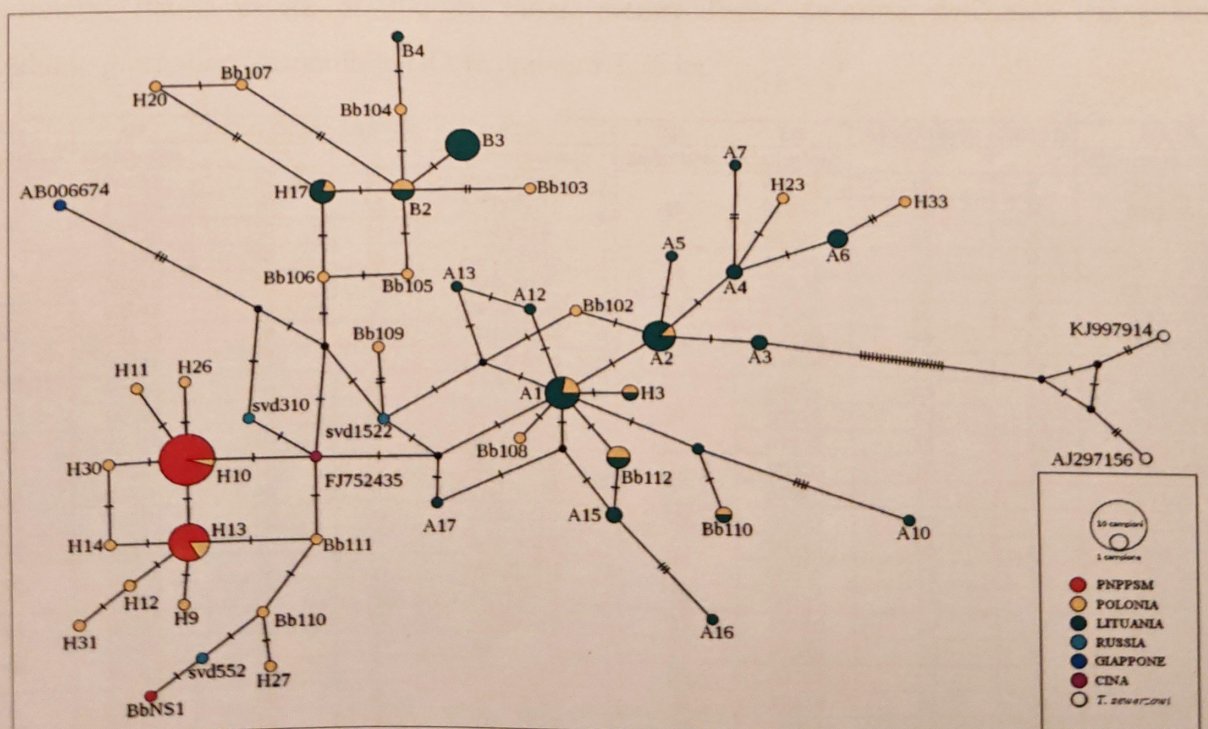


Figura 3.8: network degli aplotipi. Nel quadrante in basso a sinistra, le sequenze rinvenute nel campione (in rosso)

3.3.2 Microsatelliti

Le analisi sui dati microsatellite non sono ancora terminate, ma è possibile vedere in tabella 3.2 i valori di diversità per locus e in media riscontrati finora.

Locus	Na	Ho	He	F_{IS}	P-HWE	Sign.
BG4	3	0,71	0,59	-0,20	0,389	ns
BG6	6	0,83	0,78	-0,07	0,576	ns
TUT1	3	0,41	0,64	0,36	0,038	*
TUT2	5	0,43	0,43	0,01	0,153	ns
TUT3	4	0,65	0,64	-0,03	0,929	ns
BG15	5	0,42	0,54	0,23	0,345	ns
BG16	9	0,92	0,84	-0,10	0,378	ns
BG18	3	0,50	0,50	0,01	0,960	ns
ADL142	4	0,64	0,67	0,03	0,322	ns
ADL184	2	0,16	0,15	-0,09	0,625	ns
ADL230	4	0,33	0,38	0,12	0,060	ns
media	4,36	0,55	0,56	0,03		

Tabella 3.2: diversità genetica ai loci microsatellite. *N*=numero campioni tipizzati; *Na*=numero di alleli; *Ho*=eterozigosità osservata; *He*=eterozigosità attesa; *F_{IS}*=indice di fissazione; *P-HWE*=probabilità di equilibrio di Hardy-Weimberg; *Sign*=significatività deviazione HWE (ns=non significativo; *=significativo)

Il livello medio del coefficiente di inbreeding (F_{IS}) è praticamente pari a zero, mentre il livello di eterozigosità medio (56%) assume un valore che, seppur non altissimo, non è sicuramente preoccupante in termini di perdita di variabilità genetica attesa entro piccole popolazioni.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questa tesi abbiamo svolto un campionamento non invasivo per una specie la cui situazione in termini conservazionistici non è chiara, principalmente a causa dell'elusività che ne caratterizza il comportamento e che ne rende difficile sia il censimento che la distinzione ed il monitoraggio degli individui. L'analisi parziale dei campioni raccolti (32% sul totale dei rinvenimenti) ha permesso di ottenere numerose informazioni la cui valutazione risulta altrimenti dispendiosa e causa di disturbo agli animali studiati. Per alcune di queste (e.g. densità di popolazione, areale di coppia) risulta invece prematuro riportare qui delle conclusioni.

La popolazione presente nell'area campione risulta numerosa rispetto alle aspettative, il rapporto fra i sessi è bilanciato (1,21) e non sembra al momento particolarmente minacciata; va tuttavia considerato che la sua sussistenza in quanto entità geneticamente coesa è vincolata all'interconnessione degli ambienti fruibili, in particolare quelli caratterizzati dalle fonti alimentari di elezione, tramite ecosistemi anche ristretti ("corridoi") purché strutturati soprattutto nella fascia vegetativa inferiore. Gli spostamenti a distanze maggiori di 100 m, sia interni che esterni al territorio stagionale, sono sempre riconducibili ad una porzione continua di superficie boscata.

I ricampionamenti registrati durante la medesima uscita (cerchiati in bianco in figura 4.1) possono dare un'indicazione riguardo alla dimensione dell'areale occupato. La distanza media tra questi rinvenimenti risulta essere di 200 m. circa, mentre l'area descritta dall'unica triangolazione individuale giornaliera disponibile (ID 16) misura 2,36 ha.

ID Individuo	ID Campione	APLOTIPO	SESSO	DATA Campionamento	ID Individuo	ID Campione	APLOTIPO	SESSO	DATA Campionamento
1	00915	10	M	19/12/2015	17	06816	10	F	29/1/2016
2	01515	10	M	20/12/2015		07016	10	F	29/1/2016
	09716	10	M	6/4/2016		08716	10	F	26/3/2016
3	02115	10	M	24/12/2015	18	07115	13	F	27/12/2015
	09816	10	M	6/4/2016		07215	13	F	27/12/2015
4	02415	10	F	26/12/2015	19	07916	10	F	23/2/2016
5	02515	10	F	27/12/2015	20	02715	10	M	28/12/2015
6	02615	13	M	27/12/2015		08616	10	M	26/3/2016
7	02816	13	M	17/1/2016	21	05816	13	M	26/1/2016
	02916	13	M	17/1/2016		05916	13	M	26/1/2016
8	03016	10	F	18/1/2016		08916	13	M	26/3/2016
9	03116	13	M	18/1/2016	22	00615	10	F	19/12/2015
10	03216	10	F	22/1/2016		09016	10	F	27/3/2016
11	03316	13	M	22/1/2016	23	09216	10	F	29/3/2016
12	03416	10	F	22/1/2016		09116	13	M	29/3/2016
13	02215	10	M	26/12/2015	24	09316	13	M	29/3/2016
	03516	10	M	22/1/2016		09616	13	F	6/4/2016
14	03616	13	M	22/1/2016	25	05016	10	M	24/1/2016
15	03816	10	F	22/1/2016	26	05416	10	M	26/1/2016
	04016	10	F	22/1/2016	27	05716	13	F	26/1/2016
16	04416	10	F	24/1/2016	28	06116	10	M	2/2/2016
	04616	10	F	24/1/2016	29	06216	10	M	12/2/2016
	04816	10	F	24/1/2016	30	06516	10	M	28/1/2016
					31				

Tabella 4.1: individui tipizzati

I ricampionamenti effettuati in uscite differenti (cerchiati in giallo in figura 4.1), in particolare quelli coincidenti con i periodi critici della biologia della specie (fine periodo invernale-inizio attività riproduttiva), possono riflettere una selezione stagionale dell'areale. In questa casistica, esclusi un individuo (ID 3) deceduto per probabile predazione (campione di penne/piume 09816) ed uno (ID 13) ricampionato a breve termine, la maggior evidenza di uno spostamento straordinario rispetto a quanto osservato a livello quotidiano è fornito dalla femmina 17, il cui terzo campione viene rinvenuto a fine Marzo a circa 1400 m di distanza dai primi, all'interno di quello che sembra essere stato almeno da fine Gennaio l'areale del maschio 20.



Figura 4.1: campioni tipizzati (numerati con ID blu i maschi, rosa le femmine). In tabella sono elencati i campioni provenienti da singoli individui, con le date di ricampionamento. I campionamenti cerchiati sono quelli effettuati durante una singola uscita, mentre le frecce in giallo indicano quelli successivi

Il livello di variabilità genetica al marcatore mitocondriale, quando confrontato con altre aree europee (tabella 4.2), risulta sensibilmente inferiore. La dimensione campionaria, ma soprattutto l'area geografica molto ridotta del campionamento, potrebbero spiegare questo risultato. È possibile infatti che la frammentazione delle popolazioni porti ad una ridotta variabilità in piccole aree geografiche; questa ipotesi, che può implicare una forte struttura genetica su bassa scala geografica (supportata dal fatto che il francolino ha areali piuttosto contenuti, come descritto in precedenza), ma anche una ridotta struttura e un livello ridotto di variabilità a scala geografica maggiore (per esempio, le Alpi), deve essere verificata con ulteriori studi.

	<i>N</i>	<i>N_a</i>	<i>h</i>	π
Lituania	51	21	0,93	0,040
Polonia (NE)	77	11	0,84	0,01
Polonia (S)	41	10	0,84	0,005
Qst. studio	31	2	0,45	0,002

Tabella 4.2: diversità al marcatore mitocondriale confrontata con studi analoghi in letteratura

	<i>N</i>	<i>N_a</i>	<i>H_{ATT}</i>	<i>H_{OSS}</i>	<i>F_{IS}</i>
Svezia	613	10,50		0,47	0,163
PL (NE)	77	8,00	0,58	0,50	0,141
PL (S)	41	7,25	0,66	0,64	0,052
F (Jura N)	28	6,24	0,64	0,59	0,070
F (Alpi N)	20	4,40	0,53	0,48	0,099
F (Alpi S)	83	3,48	0,44	0,40	0,077
Qst. studio	31	4,36	0,56	0,55	0,025

Tabella 4.3: diversità ai marcatori microsatellite confrontata con studi analoghi in letteratura

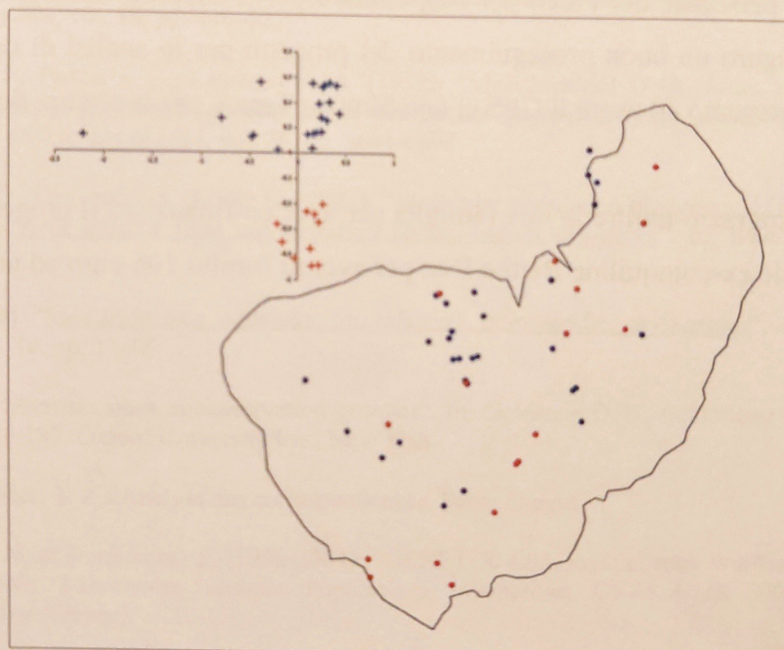


Figura 4.2: confronto fra distanza genetica ricavata con Genetix e la distribuzione geografica dei campioni tipizzati

In ogni caso, è importante anche considerare il fatto che le prime analisi effettuate sui loci microsatellite escludono forti riduzioni di variabilità genetica al DNA nucleare nella popolazione del PNPPSM, tali da far pensare a rischi genetici. Se confrontata con altre aree geografiche (tabella 4.3), gli indici di diversità a questi marcatori assumono valori comparabili. La ridotta variabilità al DNA mitocondriale potrebbe far pensare ad un effetto di deriva genetica recente che, come previsto dalla teoria, tende a manifestarsi più intensamente sui marcatori del mitocondrio rispetto a quelli del nucleo. Anche questa ipotesi verrà considerata in dettaglio in future analisi.

5. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio innanzitutto il mio relatore e i miei correlatori, in particolar modo la dott. ssa Crestanello che mi ha guidato e seguito, con la calma e la pazienza di un monaco zen, durante le fasi di laboratorio e di analisi dei dati. Particolare riconoscenza va inoltre a Matteo Girardi e Chiara Rossi del gruppo di Genetica di Conservazione, che mi hanno assistito ed insegnato un sacco di cose; a Fausta Rosso, Andrea Gandolfi, Heidi Christine Hauffe, Marco Ballardini per consigli, aiuti e caffè; alle mie colleghe più esperte Fanny, Cristina, Alice, Cleopatra, Francesca, e grazie di cuore al settimo e all'ottavo nano, a cui ho affidato la gratitudine verso coloro che non mi sto ricordando.

Ringrazio Piergiovanni Partel per la collaborazione in fase di raccolta dati e la revisione del testo ed il personale del Parco per l'ospitalità e per il supporto cartografico; grazie a Davide Scridel, a cui auguro un buon proseguimento del progetto per le analisi di cattura-ricattura spaziale, per avermi insegnato ad usare il GPS e, con Simone Tenan, per la stesura del metodo di campionamento.

Ringrazio inoltre la mia famiglia per aver co-finanziato il progetto, mia morosa per la pazienza e le mie ex-coinquiline Betti e Dan per avermi fornito 106 euro ed una carta di credito giusto in tempo.

6. BIBLIOGRAFIA

- Åberg J., Jansson J., Swenson J. E., Angelstam P. (1995): "The effect of matrix on the occurrence of hazel grouse (*Bonasa bonasia*) in isolated habitat fragments". In: *Oecologia*, vol. 103, No. 2, pp. 265-269
- Åberg J., Swenson J. E., Angelstam P. (2002): "The habitat requirements of hazel grouse (*Bonasa bonasia*) in managed boreal forest and applicability of forest stand descriptions as a tool to identify suitable patches". In: *Forest Ecology and Management*, vol. 175, pp. 437-444
- Alexander M., Ho S. Y. W., Molak M., Barnett R., Carlborg Ö., Dorshorst B., Honaker C., Besnier F., Wahlberg P., Dobney K., Siegel P., Andersson L., Larson G. (2015): "Mitogenomic analysis of a 50-generation chicken pedigree reveals a rapid rate of mitochoevolution and evidence for paternal mtDNA inheritance". In: *Biology Letters*, vol. 11
- Akhmetiev M. A. (2007): "Paleocene and Eocene Floras in Russia and Adjacent Regions: Climatic Conditions of Their Development". In: *Paleontological Journal*, vol. 41, No. 11, pp. 1032-1039
- A.O.U. (2006): Forty-seventh supplement to the American Ornithologists' Union check-list of North American birds. In: *The Auk*, vol. 123, pp.926-936
- Avise J. C., Arnold J., Ball R. M., Bermingham E., T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Rib, N. C. Saunders (1987): "Intraspecific phylogeography – the mitochondrial-DNA bridge between population genetics and systematics". In: *Annual Review of Ecology and Systematics*, vol. 18, pp. 489-522
- Avise J. C., Giblin-Davidson C., Laerm J., Patton J. C., Lansman R. A. (1979): "Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, vol. 76, pp. 6694-6698
- Baba Y., Fujimaki Y., Klaus S., Butorina O., Drovetskii S., Koike H. (2002): "Molecular population phylogeny of the hazel grouse *Bonasa bonasia* in East Asia inferred from mitochondrial control-region sequences". In: *Wildlife Biology*, vol. 8, no. 4, pp. 283-291
- Bandelt H. J., Forster P., Röhl A. (1999) "Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies". In: *Molecular Biology and Evolution*, vol. 16, pp. 37-48
- Beaumont A. M., Bruford W. M. (1998): "Microsatellites in conservation genetics". In: Goldstein D. B., Schlötterer C. (Ed.ri, 1998): "Microsatellites", pp.165-182. Oxford University Inc., New York
- Benzécri J. P. (1973): "L'Analyse des Données: T. 2, l'Analyse des correspondances. Paris: Dunod
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. (1996-2004): "GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Blouin M. S., Parsons M., Lacaille V., Lotz S. (1996): "Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness". In: *Molecular Ecology*, vol. 5, pp. 393-401
- Bocheński Z. (1991): "Pliocene grouse of the genus *Lagopus* from Poland". In: *Acta Zoologica Cracoviensia*, vol. 34, No. 2, pp. 563-577
- Boev Z. (2002): "Tetraonidae VIGORS, 1845 (Galliformes-Aves) in the Neogene-Quaternary record of Bulgaria and the origin and evolution of the family". In: *Acta zoologica Cracoviensia*, vol. 45 (special issue), pp. 263-282
- Bowcock A. M., Ruiz-Linares A., Tomfohrde J., Minch E., Kidd J. R., Cavalli-Sforza L. L. (1996): "High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites". In: *Nature*, vol. 368, pp. 455-457
- Bonczar Z., Swenson J.E. (1992): "Geographical variation in spotting patterns on Hazel Grouse *Bonasa bonasia* primary feathers: consequences for age determination". In: *Ornis Fennica*, vol. 69, pp. 193-197
- Brichetti P., Fracasso G. (2004): "Ornitologia Italiana", vol. 2. Alberto Perdisa Editore, Bologna

- Brown W. M., George Jr. M., Wilson A. C. (1979): "Rapid evolution of animal mitochondrial DNA". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, vol. 76, pp. 1967-1971
- Callen D. F., Thompson A. D., Shen Y., Phillips H. A., Richards R. I., Mulley J. C., Sutherland G. R. (1993): "Incidence and origin of 'null' alleles in the (A C) n microsatellite markers". In: *American Journal of Human Genetics*, vol. 52, no. 5, pp. 922-927
- Cann L. R., Stoneking M., Wilson A. C. (1987): "Mitochondrial DNA and human evolution". In: *Nature*, vol. 325, pp. 31-36
- Cheng H. H., Crittenden L. B. (1994): "Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken". In: *Poultry Science*, vol. 73, No. 4, pp. 539-546
- Chien A., Edgar D. B., Trela J. M. (1976): "Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile *Thermus aquaticus*". In: *Journal of Bacteriology*, vol. 127, No. 3, pp. 1550-1557
- Clayton D. A. (1982): "replication of animal mitochondrial DNA". In: *Cell*, vol. 28, pp.693-705
- Clayton D. A. (1992): "Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs". In: *International review of cytology*, vol. 141, pp. 217-323
- Clayton D. A. (2000): "Transcription and replication of mitochondrial DNA". In: *Human Reproduction*, vol. 15 (suppl. 2), pp. 11-17.
- Crowe T. M., Bowie R. C. K., Bloomer P., Mandiwana T. G., Hedderson T. A. J., Randi E., Pereira S. L., Wakeling J. (2006): "Phylogenetics, biogeography and classification of, and character evolution in, gamebirds (Aves: Galliformes): effects of character exclusion, data partitioning and missing data". In: *Cladistics*, vol. 22, No. 6, pp. 495-532
- Dawson W. R., Whittow G. C. (2000): "Regulation of body temperature". In: Whittow G. C (Ed, 2000): "Sturkie's Avian Physiology, Fifth Edition", pp. 343-390. Academic Press, San Diego
- De Franceschi P. F. (2004): "Francolino di monte". In: Spagnesi M., Serra L. (ed. ri) (2004): "Uccelli d'Italia. Quaderni di Conservazione della Natura, no. 21. Ministero dell'Ambiente-Istituto Nazionale di Fauna Selvatica.
- Desjardin P., Morais R. (1990): "Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates". In: *Journal of Molecular Biology*, vol. 212, no. 4, pp. 599-634
- Dimcheff D. E., Drovetski S. vedi, Mindell D. P. (2002): "Phylogeny of Tetraoninae and other galliform birds using mitochondrial 12S and ND2 genes". In: *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 24, No. 2, pp. 203-215
- Drovetski S. vedi (2002): "Molecular phylogeny of grouse: individual and combined performance of w-linked autosomal, and mitochondrial loci". In: *Systematic Biology*, vol. 51, pp. 930-945
- Drovetski S. vedi (2003): "Plio-Pleistocene climatic oscilations, Holoartic biogeography and speciation in an avian subfamily". In: *Journal of Biogeography*, vol. 30, pp. 1173-1181
- Dyke G. J., Gulas B. E., Crowe T. M. (2003): "Suprageneric relationship of galliform birds (Aves, Galliformes): a cladistic analysis of morphological characters". In: *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 137, pp. 227-244
- Ellegren H. (2000): "Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference". In: *Trends In Genetics*, vol. 16, no. 12, pp. 551-558
- Ellsworth D. L., Honeycutt R. L., Silvy N. J. (1996): "Systematics of grouse and ptarmigan determined by nucleotide sequences of the mitochondrial Cytochrome-B gene". In: *The Auk*, vol. 113, no. 4, pp. 811-822
- Excoffier L., Laval G., S. Schneider (2005): "Arlequin ver. 3.0 : An integrated software package for population genetics data analysis". In: *Evolutionary Bioinformatics Online*, no. 1, pp. 47-50
- Felsenstein J., (1981): "Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach". In: *Journal of Molecular Evolution*, vol 17, pp.1 386-376

- Felsenstein J., (1985): "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap". In: *Evolution*, vol. 39, no. 4, pp. 783-791
- Frankham R., Ballou J. D., Briscoe D. A. (2002): "Introduction to Conservation Genetics", Cambridge University Press, New York
- Fumagalli L., Taberlet P., Favre L., Hausser J. (1996): "Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews". In: *Molecular Biology*, vol. 13, pp. 31-46
- Fumihito A., Miyake T., Takada M., Ohno S., Kondo N. (1995): "The genetic link between the Chinese bamboo partridge (*Bombusica thoracica*) and the chicken and junglefowls of the genus *Gallus*". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, vol. 92, pp. 11053-11056
- Galtier N., Nabholz B., Glémin S., Hurst G. D. D. (2009): "Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal". In: *Molecular Ecology*, vol. 18, pp. 4541-4550
- Gibbs M., Dawson D. A., McCamley C., Wardle A. F., Armour J. A., Burke T. (1997): "Chicken microsatellite markers isolated from libraries enriched for simple tandem repeats". In: *Animal Genetics*, vol. 28, No. 6, pp.401-417
- Gill F., Donsker D. (Eds). 2016. IOC World Bird List (v 6.3). doi: 10.14344/IOC.ML.
- Goossens B., Brufoord M. W. (2009): "Non-invasive genetic analysis in conservation". In: G. Bertorelle, M. W. Brufoord, H. C. Hauffe, Rizzoli A., Vernesi C. (Ed.ri, 2009): "Population genetics for animal conservation", pp. 3-9. Cambridge University Press, New York
- Grzimek B. (1969): "Vita degli animali", vol. 7, pp. 493-495, Bramante Editori, Milano
- Guerrant E. O. (1992): "Conservation biology: the theory and practice of nature conservation, preservation and management". New York, Chapman & Hall
- Gutiérrez R. J., Barrowclough G. F., Groth J. G. (2000): "A classification of the grouse (Aves: Tetraoninae) based on mitochondrial DNA sequences". In: *Wildlife Biology*, vol. 6, no. 4, pp. 205-211
- Hamanda H., Seidman M., Howard B. H., Gorman C. M. (1984): "Enhanced gene expression by the poly (dT-dG) poli (dC-dA) sequence". In: *Molecular and Cellular Biology*, vol. 4, no. 12, pp. 2622-2630
- Hancock J. M. (1998): "Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanism". In: Goldstein D. B., Schlötterer C. (Ed.ri, 1998): "Microsatellites". Oxford University Inc., New York
- Hauffe H. C., Sbordoni vedi (2009): "The synergy between conservation biology and genetics". In: G. Bertorelle, M. W. Brufoord, H. C. Hauffe, Rizzoli A., Vernesi C. (Ed.ri, 2009): "Population genetics for animal conservation", pp. 3-9. Cambridge University Press, New York
- Hedrick P. W. (2001): "Conservation genetics: where are we now?". In: *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 16, no. 11, pp. 629-636
- Höglund J. (2009): "Evolutionary Conservation Genetics". Oxford University Press Inc., New York
- Holman J. A. (1964): "Osteology of gallinaceous birds". In: *Quarterly Journal of the Florida Academy of Science*, vol. 27, pp. 230-252
- Innis M. A., Myambo K. B., Gelfand D. H., Brown M. A. D. (1988): "DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, vol. 85, pp. 9436-9440
- Lansmann R. A., Avise J. C., Huettel M. D. (1983): "Critical experimental test of the possibility of "paternal leakage" of mitochondrial DNA". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, vol. 80, pp. 1969-1971
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. J. (2007): "Clustal W and Clustal X version 2.0". In: *Bioinformatics*, vol. 23, pp. 2947-2948
- Levinson G., Gutman G. A. (1987): "Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution". In: *Molecular Biology and Evolution*, vol. 4, no. 3, pp. 203-221

- Lewtonin R. C. (1979): "Sociobiology as an adaptationist program". In: *Systems Research and Behavioral Science*, vol. 24, no. 1, pp. 5-14
- Li X. J., Huang Y., Lei F. M. (2014): "Complete mitochondrial genome sequence of *Bonasa sewerzowi* (Galliformes: Phasianidae) and phylogenetic analysis". In: *Zoological Systematics*, vol. 39, no. 3, pp. 359-371
- Lucchini, vedi, Höglund J., Klaus S., Swenson J., Randi E. (2001): "Historical biogeography and a mitochondrial DNA phylogeny of grouse and ptarmigan". In: *Molecular Phylogenetic and Evolution*, vol. 20, No. 1, pp. 149-162
- Lynch M., Bürger L., Butcher D., Gabriel W. (1993): "The Mutational Meltdown in Asexual Populations". In: *Heredity*, vol. 47, pp. 1744-1757
- Janossy D. (1976): "Plio-Pleistocene bird remains from the Carpathian basin I. Galliformes. I. Tetraonidae". In: *Aquila*, vol. 82, pp. 13-36
- Kahn N. W., St. John J., Quinn T. W. (1998): "Chromosome-specific intron size differences in the avian CHD gene provide an efficient method for sex identification in birds". In: *The Auk*, Vol. 115, No. 4, pp. 1074-1078
- Kajtoch L., Zmihorski M., Bonczar Z. (2012): "Hazel grouse occurrence in fragmented forests: habitat quantity and configuration is more important than quality". In: *European Journal of Forest Research*, vol. 131, no. 6, pp. 1783-1795
- Kashi Y., King D., Soller M. (1997): "Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation". In: *Trends in Genetics*, vol. 13, pp. 74-78
- Kashi Y., Soller M. (1998): "Functional role of microsatellites and minisatellites". In: Goldstein D. B., Schlötterer C. (Ed.ri, 1998): "Microsatellites". Oxford University Inc., New York
- Kimura M., Ohta T. (1978): "Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, vol. 75, no. 6, pp. 2868-2872
- Kimura M. (1980): "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences". In: *Journal of Molecular Evolution*, vol. 16, pp. 111-120
- Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H.G. (1971): "Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases". In: *Journal of Molecular Biology*, vol. 56, pp. 341-361
- Kuz'mina M. A. (1992): Tetraonidae and phasianidae of the URRS: eco-morphological characteristics". Smithsonian Institution Libraries and The National Science Foundation, Whashington, D. C.
- Mattedi S., T. Sitzia (2006): "Studio dell'habitat del francolino di monte (*Bonasa bonasia*): relazione scientifica"
- Mai D. H. (1987): "Development and regional differentiation of the European vegetation during the Tertiary". In: *Plant Systematic and Evolution*, no. 162, pp. 79-91
- Mathys L., Zimmermann N. E., Zbinden N., Suter W. (2006): "Identifying habitat suitability for hazel grouse *Bonasa bonasia* at the landscape scale". In: *Wildlife Biology*, vol. 12, no. 4, pp. 357-366
- Mindell D. P., Sorenson M. D., Huddleston C. J., Miranda H. C. Jr, Knight A., Sawchuk S. J., Yuri T. (1997): "Phylogenetic relationship among and within select avian orders based on mitochondrial DNA". In Mindell D. P. (Ed., 1997): "Avian molecular evolution and systematics", Academic Press, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495, USA
- Mc Donald D. B., Potts W. K. (1997): "DNA microsattelites as genetic markers at several scales". In Mindell D. P. (Ed., 1997): "Avian molecular evolution and systematics". Academic Press, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495, USA
- Mc Kenna M. (1983): "Cenozoic paleogeography of North Atlantic land bridges". In: Bott M. H. P., Saxov S., Talwani M., Thiede J. (ed. ri) (1983): "Structure and development of the Greenland-Scotland Ridge", *NATO Conference Series IV, Marine Sciences* vol. 8, pp. 351-400

- Meschini E., Frugis S. (1993): "Atlante degli uccelli nidificanti in Italia - Supplemento alle Ricerche di Biologia della Selvaggina", vol. XX
- Merilä J., Crnokrak P. (2001): "Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits". In: *Journal of Evolutionary Biology*, vol. 14, no. 6, pp. 892-903
- Mlíkowský J. (1996): "Tertiary avian faunas of Europe". In: *Acta Universitatis Carolinae. Geologica*, vol. 39, pp. 777-818
- Montadert M., Léonard P. (2006): "Post-juvenile dispersal of Hazel Grouse *Bonasa bonasia* in an expanding population of the southeastern French Alps". In: *IBIS*, vol. 4, no. 1, pp. 1-13
- Montadert M., Léonard P. (2009): "Age determination in hazel grouse in the South-western limit of its European range". In: *Grouse News*, no. 37, pp. 9-14
- Montadert M., Klaus S. (2011): "Hazel grouse in open landscapes". In: *Grouse News*, no. 41, pp. 13-22
- Moore S. S., Sargeant L. L., King T. J., Mattick J. S., Georges M., Hetzel D. J. S. (1991): "The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primers pairs in closely related species". In: *Genomics*, vol. 10, pp. 654-660
- Moritz C., Dowling T. E., Brown W. M. (1987): "Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics". In: *Annual review of Ecology and Systematics*, vol. 18, pp. 269-292
- Mullis K. B. (1990): "The unusual origin of Polymerase Chain Reaction". In: *Scientific American*, vol. 262, pp.56-65
- Nakamura T., Zhao Y., Yamagata Y., Hua Y., Yang W. (2012): "Watching DNA polymerase η make a phosphodiester bond". In: *Nature*, vol. 487, pp. 196-201
- Nei M. (1987): "Molecular Evolutionary Genetics". Columbia University Press, New York
- Olson S. L. (1985): "The fossil record of birds". In: King J. R., Parker D. C. (ed. ri): *Avian Biology*, vol. 8. *Academic Press*, New York, pp. 79-252
- Orusa, R., Ballardini, M., Peters, W., Crestanello, B., Girardi, M., Robetto, S., Guidetti, C., Rizzoli, A., Hauffe, H., Pindo, M., Cagnacci, F. (2015): "MAZE.ROE project: study of gut microbiota and diet composition of roe deer (*Capreolus capreolus*) in the Italian Alps". In: *IX International Symposium on Wild Fauna*, Košice, Slovakia, September 15-19
- Parco Naturale Paneveggio – Pale di San Martino – Provincia Autonoma di Trento (2016): "Piano del Parco". In: B.U.R. no. 5 del 2/2/2016
- PAB (1994): "Lista Rossa delle specie animali minacciate in Alto Adige". Ripartizione Tutela del paesaggio e della natura
- PAT (2010): "Piano Faunistico Provinciale". Dipartimento Risorse Froestali e Montane – Servizio Foreste e Fauna – Ufficio Faunistico
- Peakall R., Ebert D., Cunningham R., Lindenmayer D. (2006): "Mark-recapture by genetic tagging reveals restricted movements by bush rats (*Rattus fuscipes*) in a fragmented landscape". In: *Journal of Zoology*, vol. 268, no. 2, pp. 207-216
- Peakall R., Smouse P. E. (2012): "GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update". In: *Bioinformatics*, vol. 28, no. 19, pp. 2537-2539
- Pedrini P., Caldonazzi M., Zanghellini S. (a cura di) (2003): "Atlante degli uccelli nidificanti e svernanti in provincia di Trento". Museo Tridentino di Scienze Naturali, Trento. In: *Studi trentini di Scienze Naturali, Acta Biologica*, no. 80, suppl. 2: 692 pp.
- Persons N.W., Hosner P. A., Meiklejohn K. A., Braun E. L., Kimball R. T. (2016): "Sorting out relationships among the grouse and ptarmigan using intron, mitochondrial, and ultra-conserved element sequences". In: *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 98, pp. 123-132

- Piertney S. B., Höglund J. (2001): "Polymorphic microsatellite DNA markers in black grouse (*Tetrao tetrix*)". In: *Molecular Ecology Notes*, vol. 1, no. 4, pp. 303-304
- Potapov R. L. (1992): "Systematic position and taxonomic level of grouse in the order Galliformes". In: *Bulletin of British Ornithologists' Club*, Vol. 112, pp. 251-259
- Quinn T. W. (1997): "Molecular evolution of the mitochondrial genome". In Mindell D. P. (Ed., 1997): "Avian molecular evolution and systematics". Academic Press, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495, USA
- Randi E., Lucchini vedi, Armijo-Prewitt T., Kimball R.T., Braun E.L., Ligon J.D. (2000): "Mitochondrial DNA phylogeny and speciation in the tragopans". In: *The Auk*, vol. 117, pp. 1003-101
- Randi E., Lucchini vedi (1998): "Organization and Evolution of the Mitochondrial DNA Control Region in the Avian Genus *Alectoris*". *Journal of Molecular Evolution*, vol. 47, pp. 449-462
- Rhim S. J. (2010): "Spring-season social organization of the Hazel Grouse (*Bonasia bonasia*) in relation to habitat type in temperate forests of South Korea". In: *Ornis Fennica*, no. 87, pp. 160-167
- Riauba G., Butkauskas D. (2012): "Investigation into genetic variability of Hazel Grouse *Bonasa bonasia* (= *Tetrastes bonasia*) population in Lithuania using non-invasive sampling". In: *Zoology and Ecology*, Vol. 22, Nos. 3-4, pp. 150-159
- Royle J. A., Chandler R. B., Sollmann R., Gardner B. (2014): "Spatial Capture-Recapture". Academic Press
- Rózsa J., Strand T., M., Montadert M., Kozma R., Höglund J. (2015): "Effects of a range expansion on adaptive and neutral genetic diversity in dispersal limited Hazel grouse (*Bonasa bonasia*) in the French Alps". In: *Conservation Genetics*, vol. 17, no. 2, pp. 401-412
- Rutkowski R., Keller M., Jagolkowska P. (2012): "Population genetics of the hazel hen *Bonasa bonasia* in Poland assessed with non-invasive samples". In: *Central European Journal of Biology*, vol. 7, No.4, pp. 759-775
- Rutkowski R., Jagolkowska P., Zawadzka D., Bogdanowicz W. (2016): "Impacts of forest fragmentation and post-glacial colonization on the distribution of genetic diversity in the Polish population of the hazel grouse *Tetrastes bonasia*". In: *European Journal of Wildlife Research*, vol. 62, pp. 293-306
- Sahlsten J., Thörmgren H., Höglund J. (2008): "Inference of hazel grouse population structure using multilocus data: a landscape genetics approach". In: *Heredity*, no. 101, pp. 475-482
- Saitou N., Nei M (1987): "The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees". In: *Molecular Biology and Evolution*, vol. 4, no. 4, pp. 406-425
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, vol. 74, No. 12, pp. 5463-5467
- Sawyer L. A., Hennessy J. M., Peixoto A. A., Rosato E., Parkinson H., Costa R., Kyriacou C. P. (1997): "Natural variation in a *Drosophila* clock gene and temperature condensation". In: *Science*, vol. 278, pp. 2117-2120
- Sbisà E., Tanzariello F., Reyes A., Pesole G., Saccone C. (1997): "Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications". In: *Gene*, vol. 205, no. 1-2, pp. 125-140
- Schales C., Schales K (1994): "Galliformes". In Ritchie B. W., Harrison G. J., Harrison L. R. (Ed. ri, 1994): "Avian Medicine: pinciples and application". Winger publishing Inc., Lake Worth, Florida
- Schäublin S., Bollmann K. (2010): "Winter habitat selection and conservation of Hazel Grouse (*Bonasa bonasia*) in mountain forests". In: *Journal of Ornithology*, vol. 152, no. 1, pp. 179-192
- Scherzinger W., Klaus S., Sun Y. H., Fang Y. (2006): "Ethological and acoustical characters of the chinese grouse (*Bonasa sewerzowi*), compared with sibling v Hazel grouse (*B. bonasia*) and ruffed grouse (*B. umbellus*)". In: *Acta Zoologica Sinica*, vol. 52 (supplement), pp. 293-297
- Schlötterer C., Tautz D. (1992): "Slippage synthesis of simple sequence DNA". In: *Nucleic Acids Research*, vol. 20, pp. 211-215

- Segelbacher G., Paxton R.J., Steinbruck G., Trontelj P., Storch I. (2000): "Characterization of microsatellites in capercaillie Tetrao urogallus (AVES)". In: *Molecular Ecology*, vol. 9, no. 11, pp. 1934-1935
- Shen Y. Y., Liang L., Sun Y. B., Yue B. S., Yang X. J., Murphy R. W., Zhang Y. P. (2010): "A mitogenic perspective on the ancient rapid radiation in the Galliformes with an emphasis on the Phasianidae". In: *BMC Evolutionary Biology*, vol. 10, no. 132
- Shin-Jae R., Woo-Shin L. (2004): "Home range and habitat selection of hazel grouse Bonasa bonasia in a temperate forest of South Korea". In: *Journal of Ornithology*, vol. 145, No. 1, pp. 31-34
- Short L. L. Jr. (1967): "A review of the genera of grouse (Aves, Tetraoninae)". In: *American Museum Novitates*, No. 2289
- Slatkin M. (1995): "A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies". In: *Genetics*, vol. 139, pp. 457-462
- Smith C. A., Roeszler K. N., Ohnesorg T., Cummins D. M., Farlie P. G., Doran T. J., Sinclair A. H. (2009): "The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken". In: *Nature*, vol. 461, no. 10, pp. 267-271
- Storch I. (2007): "Grouse: status survey and conservation action plan 2006-2010". Gland, Switzerland: IUCN and Fordingbridge, UK: World Pheasant Association
- Sung Y., Fang Y.: (1998): "Spring home range and social behavior of Hazel grouse at Changbai Mountain". In: *Journal of Forestry Research*, vol. 9, No. 3, pp. 199-202
- Swenson J. E. (1992): "Hazel grouse (*Bonasa bonasia*) pairs during the nonbreeding season: mutual benefits of a cooperative alliance". In: *Behavioral Ecology*, vol. 4, No. 1, pp. 14-21
- Swenson J. E., Boag D. A. (1993): "Are hazel grouse *Bonasa bonasia* monogamous?". In: *IBIS*, vol. 135, no. 4, pp. 463-467
- Swenson J. E., Andreew A. vedi, Drovetskii S. vedi (1995): "Factors shaping winter social organization in Hazel Grouse *Bonasa bonasia*: a comparative study in the eastern and western Palearctic". In: *Journal of Avian Biology*, vol. 26, no. 1, pp. 4-12
- Swenson J. E., Olsson B. (1991): "Hazel Grouse night roost site preferences when snow-roosting is not possible in winter". In: *Ornis Scandinavica*, vol. 22, no. 3, pp. 284-286
- Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau vedi, Escaravage N., Waits L. P., Bouvet J., (1996): "Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR". In: *Nucleic Acids Research*, vol. 24, no. 16, pp. 3189-3194
- Taberlet P., Waits L. P., Luikart G. (1999): "Noninvasive genetic sampling: look before you leap". In: *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 14, no. 8, pp. 323-327
- Tajima F. (1993): "Measurement of DNA polymorphism". In: "Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology" Takahata N., Clark (ed), A.G., Tokyo, Sunderland, Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc., pp: 37-59
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011): "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods". In: *Molecular Biology and Evolution*, vol. 28, no. 10, pp. 2731-2739
- Thompson F. R. III, Fritzell E. K. (1988): "Ruffed grouse winter roost site preference and influence on energy demands". In: *The Journal of Wildlife Management*, vol. 52, no. 3, pp. 454-460
- Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. M., Shipley P. (2004): "MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data". In: *Molecular Ecology Notes*, vol. 4, pp. 535-538
- Villesen P (2007): "FaBox: an online toolbox for fasta sequences". In: *Molecular Ecology Notes*, vol. 7, no. 6, pp. 965-968.

- Weber J. L., Wong C. (1993). "Mutation of human short tandem repeats". In: *Human Molecular Genetics*, vol 2, no. 8, pp. 1123-1128
- Wiley R. H. (1974): "Evolution of social organization and life-history patterns among grouse". In: *The Quarterly Review of Biology*, vol. 49, no. 3, pp. 201-227
- Wing L. (1946): "Drumming flight in the blue grouse and courtship characters of the Tetraonidae". In: *Condor*, vol. 48, pp. 154-157
- Wright J. M., Bentzen P. (1994): "Microsatellites: genetic markers for the future". In: *Molecular Genetics in Fisheries*, pp. 117-121
- Yang C., Wang J., Fang Y., Sun Y. H. (2013): "Is sexual ornamentation an honest signal of male quality in the chinese grouse (*Tetrastes sewerzowi*)?". In: *PloS ONE*, vol. 8, no. 12
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. (2000): "A greedy algorithm for aligning DNA sequences". In: *Journal of Computational Biology*, vol. 7, n. 1-2, pp. 203-214

ALLEGATO I – Scheda campioni

ID	ZONA	TRANSETTO	COORDINATE		DATA	LOCALITÀ	TIPO	OP	C.V.		VEGETAZIONE							ESP	C.N.
			Y	X					#20m	%	Pa.	A.a.	L.d.	F.s.	C.a.	ALTRO	% in situ		
00615	-	-	5122704	720628	19/12/15	Fos de l' Ors (V.P.)	E	R.C.	40	5	1	6	6	-	2 P. mugo	E	0		
00715	-	-	5122522	720628	19/12/15	Pian dei Pezi (V.P.)	E	R.C.	70	11	2	3	2	-	-	E	0		
00915	-	-	5122532	720620	19/12/15	Pian dei Pezi (V.P.)	E	R.C.	70	11	2	3	2	-	-	E	0		
01015	-	-	5122529	720625	19/12/15	Pian dei Pezi (V.P.)	E	R.C.	80	5	-	2	3	-	-	E	0		
01215	-	-	5122550	720614	19/12/15	Pian dei Pezi (V.P.)	E	R.C.	60	4	-	2	3	-	-	E	0		
01315	-	-	5122582	720609	19/12/15	Pian dei Pezi (V.P.)	E	R.C.	50	5+1 s	-	-	-	-	-	E	0		
01415	-	-	5122479	720810	19/12/15	Pian dei Pezi (V.P.)	E	R.C.	30	n, r	-	-	-	-	-	E	0		
01515	-	-	5121542	719898	20/12/15	Caora	E	R.C.	80	14	-	2	1	-	-	S	0		
01615	-	-	5121244	719672	20/12/15	Rodena de sot	E	R.C.	90	28	-	-	-	-	-	NNE	0		
01715	-	-	5121231	719720	20/12/15	Rodena de sot	E	R.C.	50	16	-	-	1	-	-	NNE	0		
01815	-	-	5122744	721020	21/12/15	Bosc dei Fontanazi (V.P.)	E	D.S.	20	1, r	-	-	1	-	-	NE	0		
01915	1	407-179	5122514	720765	22/12/15	Pian dei Pezi (V.P.)	E	R.C.	20	9	-	-	-	-	-	sch	E	0	
02015	3	443-633	5121731	720713	24/12/15	Sorapiana	E	R.C.	95	r	7	-	6	-	-	-	SE	0	
02115	3	634-444	5121740	720544	24/12/15	Sorapiana	E	R.C.	30	6, r	-	-	5	-	-	sch	SE	0	
02215	5	631-622	5121386	719659	26/12/15	Rodena de sot	E	R.C.	30	10	-	3	-	-	7, p	-	S	0	
02315	5	631-622	5121370	719579	26/12/15	Rodena de sot	E	R.C.	20	3	-	1	1	-	-	-	E	0	
02415	5	631-622	5121360	719517	26/12/15	Rodena de sot	E	R.C.	80	8	-	3	-	-	-	-	E	0	
02515	5	509-516	5121682	719569	27/12/15	Bosco Cimerlo	E	R.C.	75	8	-	7	-	-	-	-	S	0	
02615	5	509-516	5121694	719593	27/12/15	Bosco Cimerlo	E	R.C.	60	3, r	-	3	-	2	-	-	SE	0	
02715	9	1233-739	5121094	719772	28/12/15	Col dei Cistri, vers. E	E	R.C.	85	10	-	1	-	3	-	-	E	0	
02816	1	182-410	5122593	721086	17/01/16	Costa de Zengio (V.P.)	E	R.C.	20	r	-	-	1	-	-	-	SE	0	
02916	1	409-181	5122203	721003	17/01/16	V.P.	E	R.C.	55	1, r	3	-	4	-	-	-	SE	0	
03016	3	447-637	5121430	720995	18/01/16	Sorapiana	E	R.C.	50	3, r	2, r	-	-	-	-	-	SE	0	
03116	3	636-446	5121466	720877	18/01/16	Sorapiana	E	R.C.	50	4, r	-	1	2	-	-	-	E	0	
03216	5	707-698	5121262	719857	22/01/16	Fosna del Gaz	E	R.C.	55	2	-	6	1	5	-	-	SSE	0	
03316	5	707-698	5121249	719820	22/01/16	Fosna del Gaz	E	R.C.	60	9, n	-	3	2	1	-	-	SE	0	
03416	5	707-698	5121245	719730	22/01/16	Col dei Cistri	E	R.C.	50	5, 5, n	-	2	2	-	-	-	E	0	
03516	5	707-698	5121239	719687	22/01/16	Col dei Cistri	E	R.C.	80	14, n	-	3	1	-	-	-	E	0	
03616	5	660-669	5121323	720376	22/01/16	-	E	R.C.	50	3	13	-	2	-	-	-	E	0	
03716	5	631-622	5121441	719710	22/01/16	Rodena	E	R.C.	70	8	-	1	-	3	-	-	E	0	
03816	5	631-622	5121432	719678	22/01/16	Rodena	E	R.C.	40	7, n	-	1	-	2, p	-	-	SE	0	
03916	5	555-546	5121630	719742	22/01/16	Bosc de Fosna	E	R.C.	60	7, n, r	-	2	-	-	-	-	S	0	
04016	5	555-546	5121625	719639	22/01/16	La Costa	E	R.C.	60	3, n	-	5	-	-	-	-	S	0	
04116	5	508-516	5121761	719755	22/01/16	Bosc de Fosna	E	R.C.	75	10	-	8	-	-	-	-	S	0	
04216	5	478-471	5121815	720257	22/01/16	Troi de Rodena	E	R.C.	80	16, n	-	-	-	-	-	-	S	0	
04316	8b	469-545	5121836	719380	23/01/16	Prà Sorin	E	R.C.	85	12, n	-	-	-	-	-	-	SE	0	
04416	6	958-966	5120553	719197	24/01/16	Sbanzeghe	E	R.C.	15	7, n	-	-	1	-	-	-	O	0	
04516	6	958-966	5120524	719652	24/01/16	Lac	E	R.C.	45	7, n	-	3+2 s	4+1 s	1	-	-	SO	0	
04616	6	928-920	5120660	719317	24/01/16	Ziconon	E	R.C.	85	n	-	-	-	-	-	-	S	0	
04716	6	928-920	5120622	719052	24/01/16	Ziconon	E	R.C.	80	6, n	-	-	1	4	-	-	S	0	
04816	6	882-890	5120731	718955	24/01/16	Ziconon	E	R.C.	80	20, n	-	1	-	1	-	-	S	0	
04916	6	882-890	5120729	719315	24/01/16	Ziconon	E	R.C.	15	2, r, n	-	-	1	-	-	-	S	0	
05016	6	852-844	5120784	719237	24/01/16	Troi de le Scofe	E	R.C.	85	6, n	-	-	1	-	-	-	S	0	
05116	6	852-844	5120788	719229	24/01/16	Troi de le Scofe	E	R.C.	80	3, n	-	3	-	2	-	-	S	0	
05216	6	852-844	5120829	718994	24/01/16	Ziconon	E	R.C.	75	6, n	-	3	-	2	-	1 A. g.	S	0	
05316	7	538-994	5121096	718720	25/01/16	Dagnoli	E	R.C.	70	1, n	-	10	3	6	-	-	O	0	
05416	9	1233-739	5120331	719763	26/01/16	Lanza	E	R.C.	60	4, n	-	3	1	13	-	-	S	0	
05516	9	1233-739	5121026	719735	26/01/16	Col de Cistri, vers. E	E	R.C.	55	7, r	-	1	1	9	-	-	S	0	
05616	5	1233-739	5121123	719804	26/01/16	Fosna del Mat	E	R.C.	70	4, n	-	1	-	2	-	-	SE	0	
05716	9	1235-741	5120184	719974	26/01/16	Tambra de sora	E	R.C.	50	3, r, n	-	3	2	7	-	-	SE	0	
05816	9	1237-743	5120521	720123	26/01/16	Rampon	E	R.C.	40	2, n	-	1	4	5	-	-	NE	0	
05916	9	1237-743	5120538	720138	26/01/16	Rampon	E	R.C.	40	n	-	2+1 s	1	-	-	-	NE	0	
06016	9	744-1238	5121122	720276	26/01/16	Pian dei Pezi (V.P.)	E	R.C.	65	11, n	-	-	1	-	-	-	SE	0	
06116	1	178-406	5122481	720681	02/02/16	Bosc de Fosna	E	R.C.	40	8, n	-	1	4	-	-	-	E	0	
06216	5	509-516	5121707	719834	12/02/16	Poline	E	P.P.	60	2	-	2	-	-	-	-	SE	95	
06316	10	1069-1080	5120221	719218	28/01/16	Olver	E	P.P.	50	4	-	-	-	>20	-	-	S	0	
06416	10	1069-1080	5120220	719342	28/01/16	Scarpel	E	P.P.	50	3, n	-	2	6	-	-	-	SO	0	
06516	10	1069-1080	5120226	719625	28/01/16	Lanza	E	P.P.	20	-	-	3	3	9	-	-	SO	0	
06616	10	1069-1080	5120320	719675	28/01/16	Lanza	E	P.P.	70	2, n	-	2	2	4	-	-	SO	0	
06716	10	1042-1030	5120330	719647	28/01/16	Strine	E	P.P.	70	2, n	-	2	2	4	-	-	SO	0	
06816	10	1270-1264	5119723	719117	29/01/16	Capitel dei Pierinoti	E	P.P.	D.M.	2, r, n	-	-	2	12	-	-	O	0	
06916	10	1226-1232	5119824	719605	29/01/16	Scotoni	E	P.P.	D.M.	-	-	1	-	>20	-	-	O	0	
07016	10	1226-1232	5119849	719102	29/01/16	Tais	E	P.P.	50	2	-	-	-	11	13 C. m.	-	S	0	
07115	10	1303-1308	5119674	719680	27/12/15	Capitel dei Pierinoti	E	P.P.	D.M.	6	-	-	-	-	-	-	SO	0	
07215	10	1226-1232	5119826	719579	27/12/15	Colon	E	P.P.	5	-	-	-	-	>20	-	-	O	0	
07316	10	1194-1184	5119929	719037	08/01/16	Scarpel	E	P.P.	D.M.	-	-	-	-	-	-	-	S	0	
07416	10	1146-1156	5120109	719675	08/01/16	Poline	E	P.P.	70	14	-	1	-	4, p	-	-	SO	0	
07516	10	1069-1080	5120223	719198	28/01/16	Scofa de la vaca	E	R.C.	60	4, n, r	-	-	2	3	-	-	SO	-	
07616	6	996-1004	5120456	719443	22/02/16	Scofa de la vaca	E	R.C.	20	1, n, r	-	3	2	4	-	-	S	-	
07716	6	768-776	5121025	718868	22/02/16	Dagnoli	E	R.C.	85	5, n	-	2	-	2	-	-	SO	-	
07816	6	768-776	5121022	718971	22/02/16	Dagnoli	E	R.C.	60	6, n	-	2	1	1	-	-	O	80	
07916	7	538-994	5121083	718664	23/02/16	Dagnoli	E	R.C.	60	2, n	-	2	-	1	-	-	O	10	
08016	7	538-994	5121066	718664	23/														

ID	ZONA	TRANSETTO	Y	X	DATA	LOCALITÀ	TIPO	OP	C.V. @20m %	VEGETAZIONE						ESP	C.N.	
										P.a.	A.a.	L.d.	F.s.	C.a.	ALTRO			
09616	3	442-632	5121430	720471	06/04/16	Sorapiana	E	R.C.	80	1, r	4, n, r	-	7	-	-	SE	0	
09716	3	517-441	5121799	720367	06/04/16	Troi de Rodena	E	R.C.	10	1, r	1, n	-	3	-	-	SE	0	
09816	3	517-441	5121932	720392	06/04/16	Troi de Rodena	P	R.C.	40	8, n	n	-	3	7	-	E	0	
09916	5	707-698	5121235	719480	07/04/16	Col de Cistri	E	R.C.	75	3, n	-	3	7	-	-	E	0	
10016	5	707-698	5121240	719478	07/04/16	Col de Cistri	E	R.C.	75	3, n	-	2	-	-	-	E	0	
10116	5	660-669	5121341	719604	07/04/16	Rodena de Sot	E	R.C.	40	5	-	-	2	-	-	E	0	
10216	5	660-669	5121325	720385	07/04/16	-	E	R.C.	60	4, sch	7, r, n	-	5	-	-	SE	0	
10316	5	631-622	5121470	719876	07/04/16	Rodena de Mez	E	R.C.	90	7	-	-	1	3	-	SE	0	
10416	5	584-593	5121481	720002	07/04/16	Caora	E	R.C.	70	4, n, r	-	-	3	-	-	SE	0	
10516	5	584-593	5121480	720033	07/04/16	Caora	E	R.C.	60	5, r, n	-	-	1	-	-	S	0	
10616	5	555-546	5121646	719644	07/04/16	La Costa	E	R.C.	40	2, n	-	-	11	1	-	S	0	
10716	5	555-546	5121639	719494	07/04/16	La Costa	E	R.C.	40	4	-	-	2	-	-	S	0	
10816	5	509-516	5121729	719632	07/04/16	Bosc de Fosna	E	R.C.	20	3, n	-	-	1	-	2	S	0	
10916	5	509-516	5121739	719683	07/04/16	Bosc de Fosna	E	R.C.	40	3, n	-	-	1	-	-	S	0	
11016	6	844-852	5120818	719052	08/04/16	Ziconna	E	R.C.	90	7, n	-	-	1	1	1	S	0	
11116	6	844-852	5120832	719092	08/04/16	Ziconna	E	R.C.	60	3, n, r	-	-	1	2	6	SE	0	
11216	6	844-852	5120839	719166	08/04/16	Troi de le Scofe	E	R.C.	75	4, n, r	-	-	-	-	2	SE	0	
11316	6	768-776	5121025	719044	08/04/16	Scofa de la vaca	E	R.C.	50	7, r	-	-	-	4	-	O	0	
11416	7	995-539	5121122	718709	09/04/16	Dagnoli	E	R.C.	50	3, r, n	-	-	3	2	-	O	0	
11516	8 a	694-697	5121207	719379	10/04/16	Scofa Cistri	E	R.C.	30	4	-	-	2 s	-	-	1 sch	O	0
11616	8 b	508-470	5121822	719473	10/04/16	-	E	R.C.	50	4	-	-	3	1	-	NE	0	
11716	9	1237-743	5120583	720197	11/04/16	Rampon	E	R.C.	50	3, n, r	-	-	3	1	-	NE	0	
11816	9	1237-743	5120583	720202	11/04/16	Rampon	E	R.C.	50	3, n, r	-	-	1	-	3	E	0	
11916	9	744-1238	5120558	720200	11/04/16	Rampon	E	R.C.	70	6, n, r	-	-	-	-	-	E	0	
12016	3	444-634	5121582	720661	20/04/16	Sorapiana	E	R.C.	70	1, n, r	1, r	-	-	3	-	SE	0	
12116	5	707-698	5121235	719578	21/04/16	Col de Cistri	E	R.C.	50	2, r	-	-	4	1 (n)	-	E	0	
12216	5	707-698	5121221	719556	21/04/16	Col de Cistri	E	R.C.	60	10, r	-	-	1	1	-	E	0	
12316	5	584-593	5121515	720085	21/04/16	Caora	E	R.C.	80	11, n, r	-	-	-	4	-	S	0	
12416	5	509-516	5121732	719687	21/04/16	Caora	E	R.C.	40	2	-	-	3	-	-	1 sch	S	0
12516	5	509-516	5121737	719691	21/04/16	Rodena	E	R.C.	75	4, n, r	-	-	-	-	1	sch	SO	0
12616	6	890-882	5120720	719173	22/04/16	Ziconon	E	R.C.	65	13, n, r	-	-	-	-	-	-	O	0
12716	6	844-852	5120858	719040	22/04/16	Ziconna	E	R.C.	90	9, n, r	-	-	1	1	-	2 Pt.	S	0
12816	6	844-852	5120865	719057	22/04/16	Ziconna	E	R.C.	85	11, n, r	-	-	1	-	-	sch	S	0
12916	6	844-852	5120827	719706	22/04/16	Rodenaza	E	R.C.	90	10, n	-	-	3	-	-	-	S	0
13016	8 a	738-730	5121131	719618	24/04/16	Col de Cistri	E	R.C.	40	4, n, r	-	-	3	1	1	-	E	0
13116	8 a	738-730	5121138	719400	24/04/16	Col de Cistri	E	R.C.	30	5, n	-	-	1	2	-	-	SO	0
13216	8 a	659-656	5121322	719371	24/04/16	Scofa Cistri	E	R.C.	70	7	-	-	1	2	3	3 O.c.	SO	0
13316	8 b	579-693	5121355	719005	24/04/16	Scofa Monegara	E	R.C.	40	11, n	-	-	1	-	-	-	O	0
13416	8 b	692-502	5121230	718853	24/04/16	Scofa de la vaca	E	R.C.	90	9, n	-	-	3	2	-	-	O	0
13516	8 b	508-470	5121705	719474	24/04/16	Col de Cistri	E	R.C.	70	6, n	-	-	-	-	-	-	O	0
13616	8 b	508-470	5121823	719483	24/04/16	Col de Cistri	E	R.C.	70	6, n, r	-	-	-	-	-	sch	O	0
13716	9	1237-743	5120598	720198	25/04/16	Rampon	E	R.C.	50	6, n, r	-	-	5	2	-	sch	E	0
13816	9	1237-743	5120596	720197	25/04/16	Rampon	E	R.C.	50	6, n, r	-	-	5	2	-	sch	E	0
13916	10	1194-1184	5119928	719626	06/04/16	Capitel dei pierenoti	E	PP.	70	4, n, r	-	-	2	3	3	-	O	0
14016	10	1118-1108	5120095	719678	03/04/16	Tambra	E	PP.	60	5, n, r	-	-	-	1	4	-	SO	0
14116	10	1118-1108	5120010	719679	03/04/16	Tambra	E	PP.	50	6, n, r	-	-	6	7	6	-	SO	0
14216	10	1146-1156	5120042	719666	08/04/16	Tambra	E	PP.	85	11, n, r	-	-	-	-	1	-	O	0
14316	10	1118-1108	5120095	719679	08/04/16	Scarpel	E	PP.	60	5, n, r	-	-	-	1	4	-	SO	0
14416	10	1118-1108	5120120	719528	08/04/16	Le valesane	E	PP.	85	16, n	-	-	2	2	1	-	O	0
14516	10	1118-1108	5120128	719528	08/04/16	Le valesane	E	PP.	85	19, n	-	-	-	-	-	-	O	0
14616	10	1069-1080	5120228	719145	08/04/16	Poline	E	PP.	50	5	-	-	-	-	12	1 S.a.	SO	0
14716	10	1069-1080	5120228	719214	05/02/16	Strina dei gabanoti	E	PP.	70	13, n	-	-	-	-	10	1 S.a.	S	D.M.
14816	10	1069-1080	5120227	719212	05/02/16	Strina dei gabanoti	E	PP.	70	13, n	-	-	-	-	10	1 S.a.	S	D.M.
14916	10	1069-1080	5120229	719205	05/02/16	Strina dei gabanoti	E	PP.	80	11	-	-	-	-	4	-	S	D.M.
15016	10	1069-1080	5120221	719161	05/02/16	Poline	E	PP.	70	14	-	-	-	-	3	-	S	D.M.
15116	10	1069-1080	5120228	719119	05/02/16	Poline	E	PP.	50	4	-	-	-	-	>20	1 P.t.	S	D.M.
15216	10	1270-1264	5119723	719112	22/02/16	Zaut	E	PP.	80	3	-	-	-	-	>20	-	O	D.M.

ID=identificatore campione; X, Y=coordinate (WGS84 UTM zone 32N; TIPO: E=escrementi, P=penne e piume; OP=operatore: RC=Roberto Celta, PP=Piergiorgio Partel, DS=Davide Scridel; VEGETAZIONE: P.a.=Picea abies, A.a.=Abies alba, L.d.=Laryx devidua, F.s.=Fagus sylvatica; C.a.=Corylus avellana, A.g.=Alnus glutinosa, C.m.=Crataegus monogyna, Pt.=Populus tremula, O.c.=Ostrya carpinifolia, S.a.=Sorbus aucuparia, n=novellame, r=rinnovamento, s=secco/i, sch=schianti

