

S. Antonio Valfurva, 18 ottobre 2019

**Mazzoni Nicola, Pedrotti Luca, Bragalanti Natalia,  
Corlatti Luca, Mucci Nadia & Davoli Francesca**



# Introduzione

## *Ursus arctos arctos*



Specie elusiva,  
abitudini notturne



Stima  
popolazione:  
60-78 individui



Distribuiti su  
ampie superfici  
in basse densità



Monitoraggio  
genetico non  
invasivo



Attivo dal 2002



Identificazione  
individuo, sesso



# Inquadramento del problema

Genetica non invasiva



Raccolta di campioni organici (peli, feci) attribuibili ad orso e rinvenibili sul territorio



- ✓ Evita la cattura
- ✓ Minimo disturbo



Campioni fecali: più probabilità di identificare anche cuccioli

# Inquadramento del problema

Genetica non invasiva



Raccolta di campioni organici (peli, feci) attribuibili ad orso e rinvenibili sul territorio



- ✓ Evita la cattura
- ✓ Minimo disturbo



Campioni fecali: più probabilità di identificare anche cuccioli

✓ DNA nelle feci scarso, frammentato e/o contaminato

✓ Tecniche di campionamento e metodi di conservazione non efficaci



Estrazione del DNA complicata o non possibile



Rese di genotipizzazione delle feci basse a livello nazionale

# Inquadramento del problema

Genetica non invasiva



Raccolta di campioni organici (peli, feci) attribuibili ad orso e rinvenibili sul territorio



- ✓ Evita la cattura
- ✓ Minimo disturbo



Campioni fecali: più probabilità di identificare anche cuccioli

✓ DNA nelle feci scarso, frammentato e/o contaminato

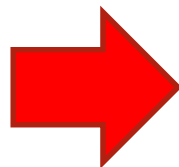
✓ Tecniche di campionamento e metodi di conservazione non efficaci



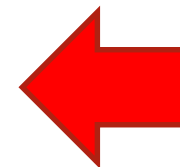
Estrazione del DNA complicata o non possibile



Rese di genotipizzazione delle feci basse a livello nazionale



**Resa media (2003-2016)**  
=  
**17%**



# Scopo

Individuare i principali fattori che influenzano il successo di genotipizzazione delle feci di orso bruno sulle Alpi italiane

➤ Quantità di campione

➤ Metodo di conservazione:



✓ EtOH 96%

✓ Silica gel

✓ DET's buffer

✓ ATL buffer

➤ Tempo di permanenza delle fatte in ambiente naturale:

✓ < 48 ore

✓ 1 settimana

✓ 2 settimane

➤ Tipologia di dieta:



UVA



MELA E ALTRO

➤ Tempo di stoccaggio dei campioni a -20°C per 6 mesi

# Materiali e Metodi

Diversi ambienti:

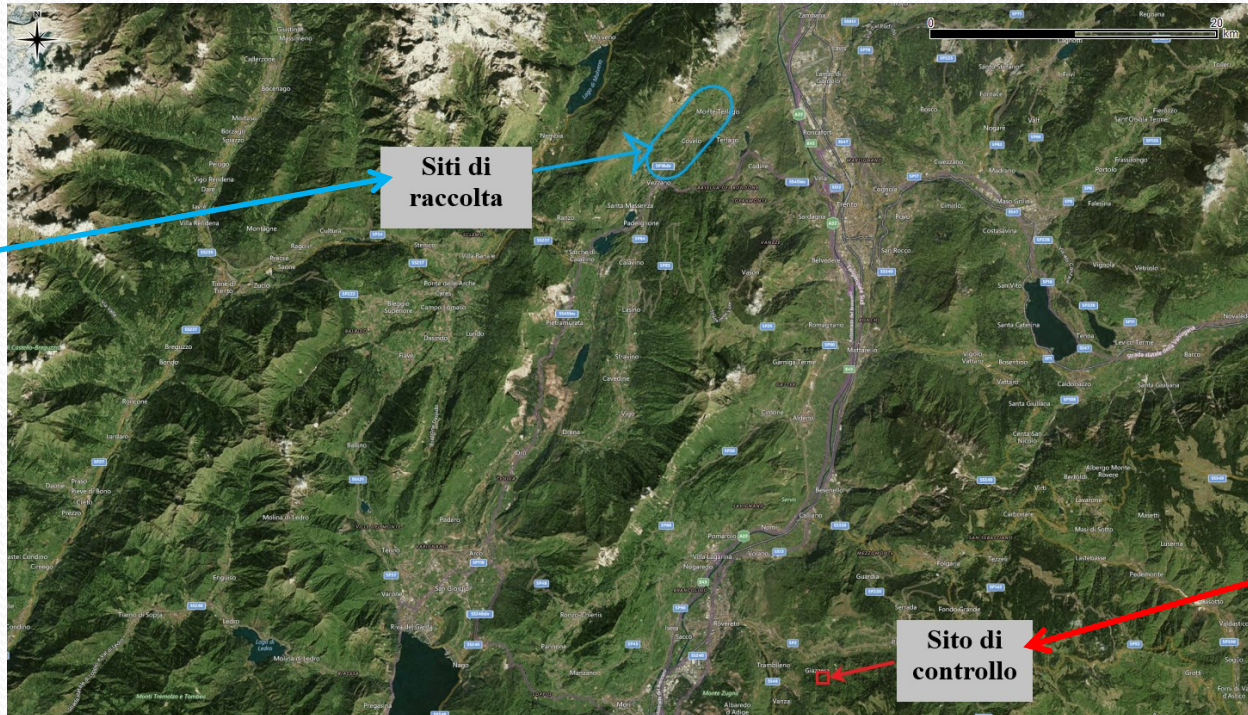
- Boschi misti di latifoglie
- Radure
- Coltivi
- Vigneti
- Meleti
- Ambienti rurali



# Materiali e Metodi

Diversi ambienti:

- Boschi misti di latifoglie
- Radure
- Coltivi
- Vigneti
- Meleti
- Ambienti rurali



Bosco di faggio



# Materiali e Metodi



**1**

**Individuazione della fece fresca (<48h) sul sito di raccolta**



**3**

**Stato dell'escremento trascorsa una settimana dalla deposizione in natura**



**2**

**Prelievo dei campioni su fece fresca (1) e stoccaggio in provette numerate contenenti i 4 diversi conservanti**



**4**

**Prelievo dei campioni su fece di una settimana (3) e stoccaggio in provette numerate contenenti i 4 diversi conservanti**

# Materiali e Metodi



**5**

**Stato dell'escremento trascorse due settimane dalla deposizione in natura**



**6**

**Prelievo dei campioni su feci di due settimane (5) e stoccaggio in provette numerate contenenti i 4 diversi conservanti**

# Materiali e Metodi



**Stato dell'escremento trascorse due settimane dalla deposizione in natura**



**Prelievo dei campioni su fecce di due settimane (5) e stoccaggio in provette numerate contenenti i 4 diversi conservanti**

Campioni inviati ai laboratori dell'Area per la Genetica della Conservazione (BIO-CGE) di ISPRA

Totale fatte raccolte: → 26  
Totale campioni prelevati: → 296

# Analisi genetiche

## Analisi di laboratorio

- Estrazione automatizzata DNA
- Amplificazione di 10 *loci* microsatellite + 1 per il sesso in 2 multiplex
- Approccio multi-tube
- Sequenziamento capillare e analisi dei frammenti



Analisi ripetute dopo 6 mesi per i campioni che da freschi hanno fornito un genotipo affidabile

## Analisi dei dati genetici

- Correzione dati grezzi
- Costruzione genotipo di consenso
- Match con genotipi noti
- Errori di genotipizzazione



*Allelic Drop - Out (ADO)*

*False Allele (FA)*



---

# Analisi statistiche

Fatte analizzare fresche (272 campioni)  
Generalized Linear Mixed Models (GLMMs)  
ID campione → fattore random

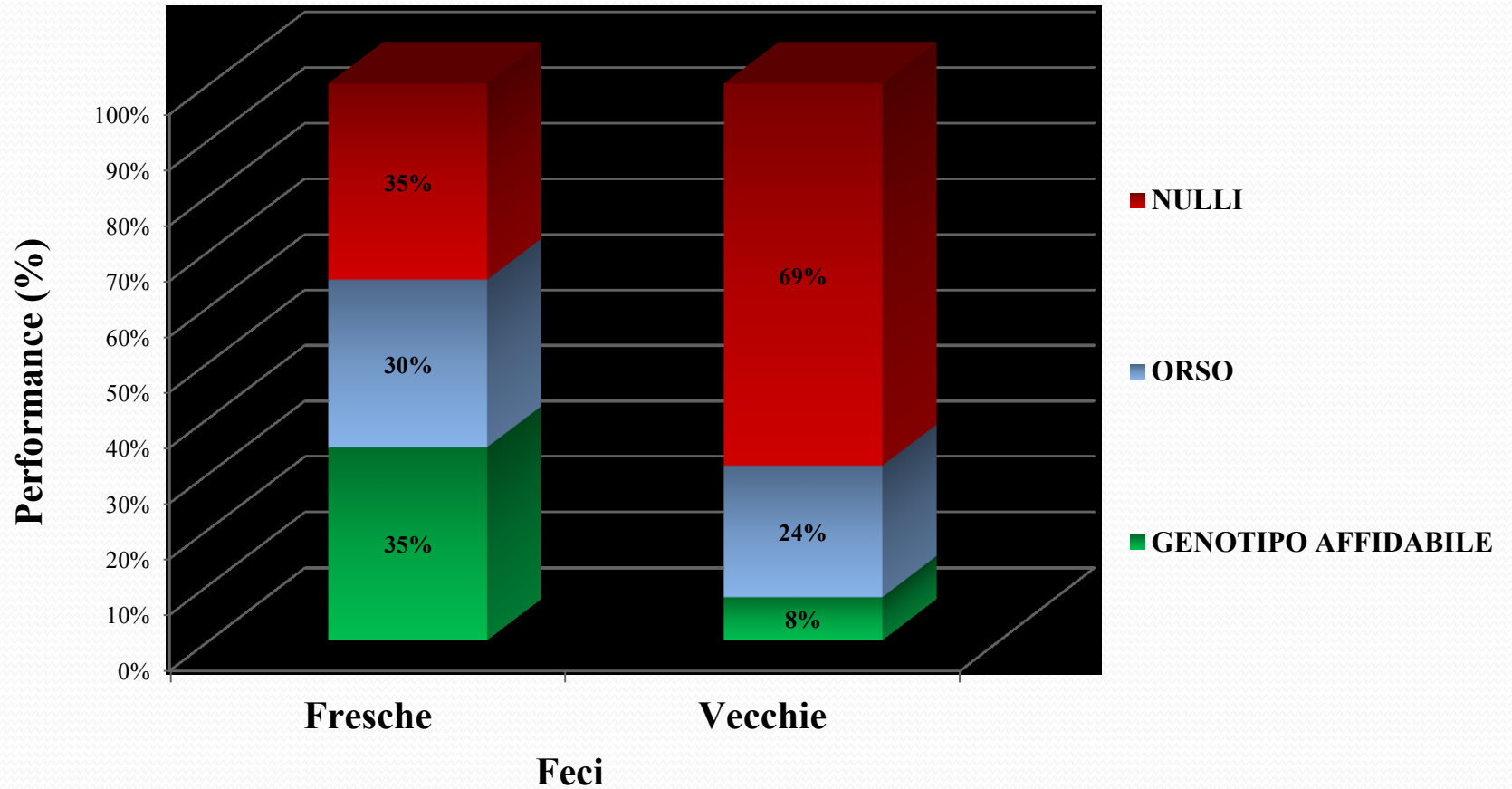


Analisi sull'individuo

Analisi sull'ADO

# Risultati

## Risultati genetici

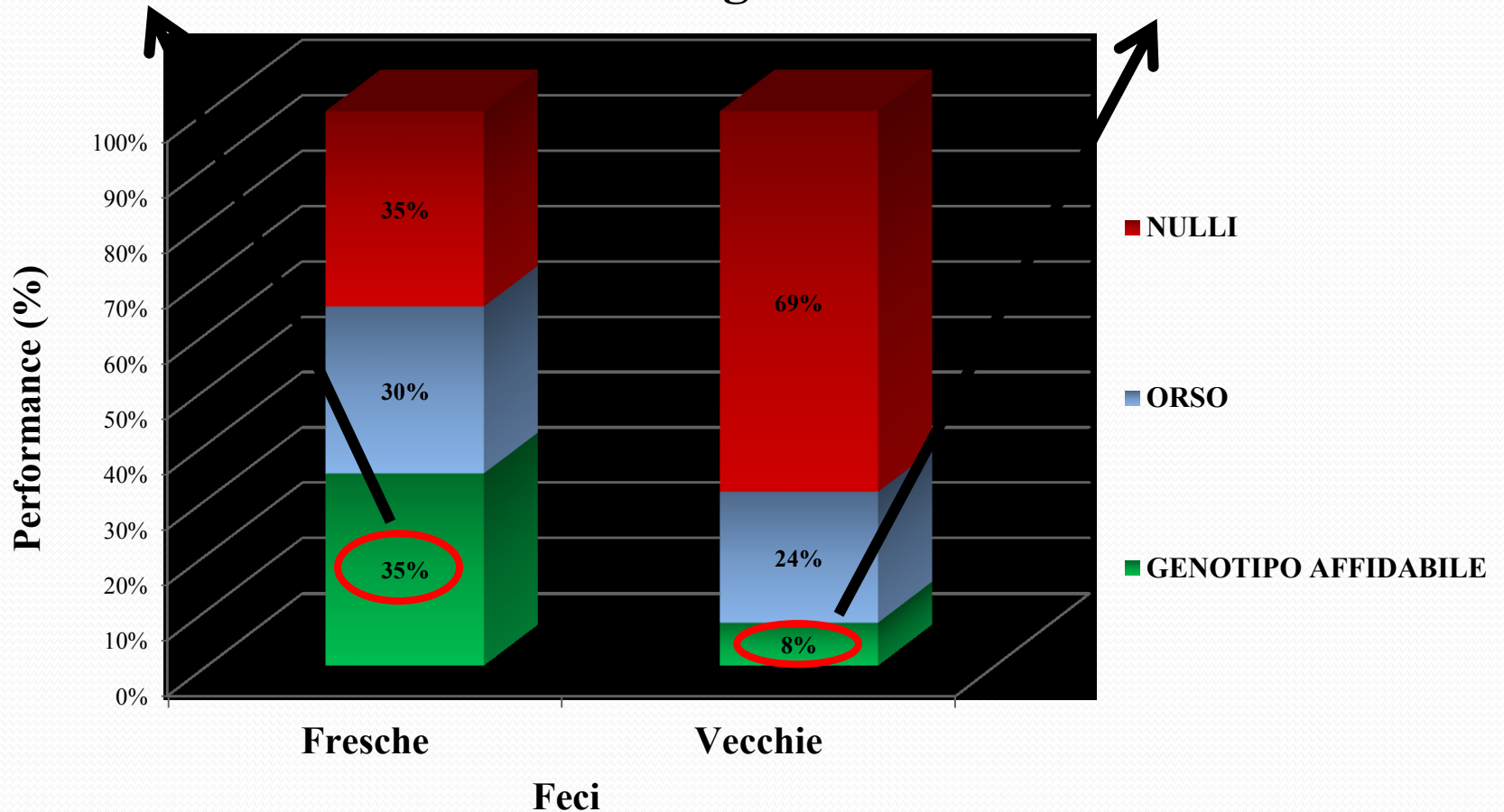


# Risultati

94 genotipi affidabili:  
8 orsi identificati

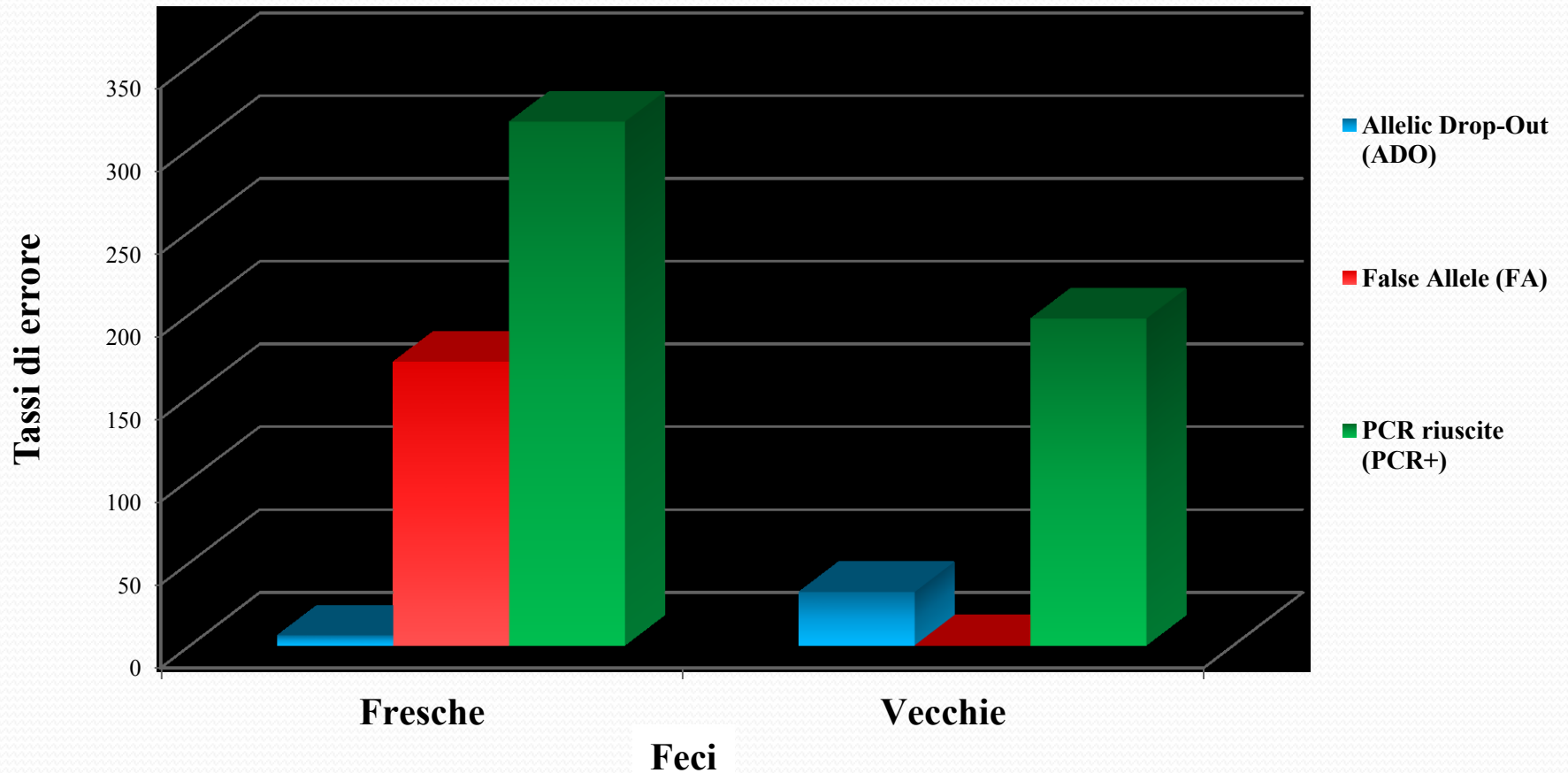
11 genotipi affidabili:  
6 orsi identificati

## Risultati genetici



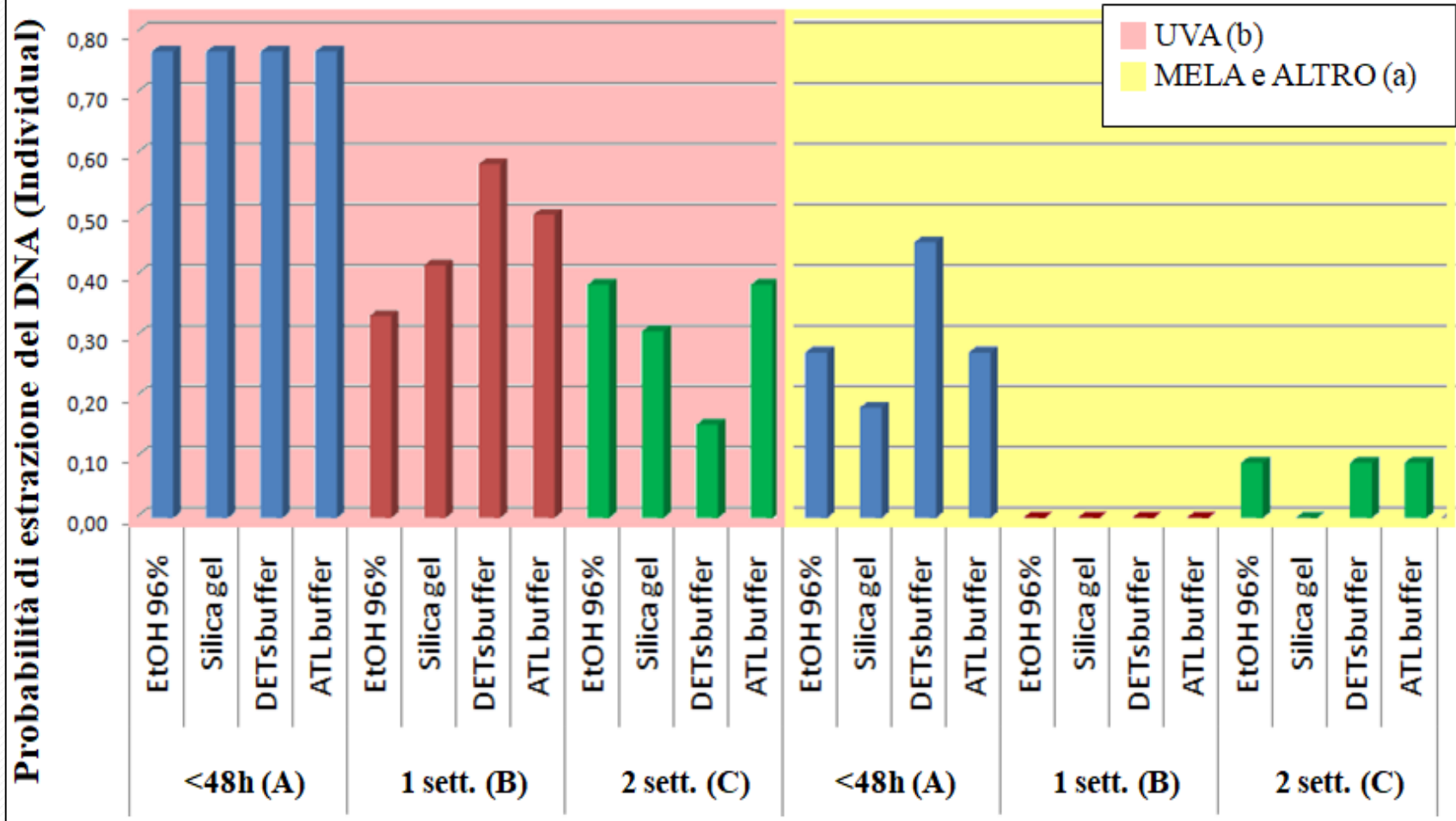
# Risultati

## Errori di genotipizzazione e PCR positive

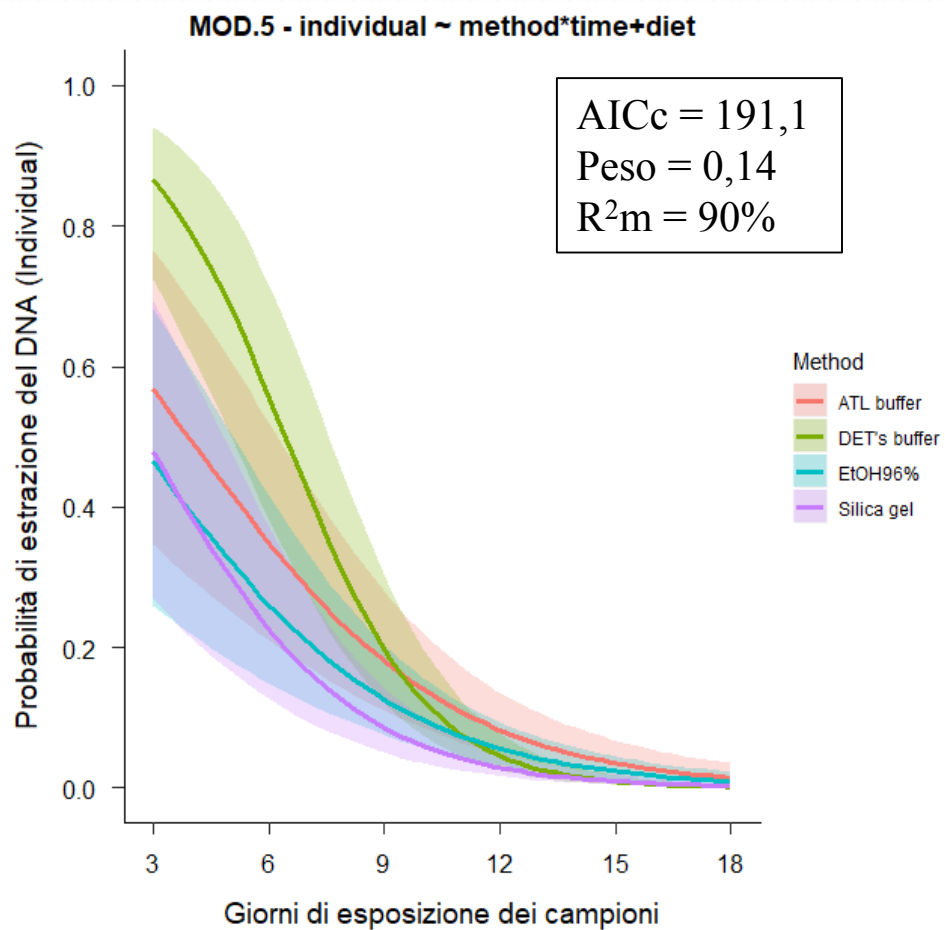
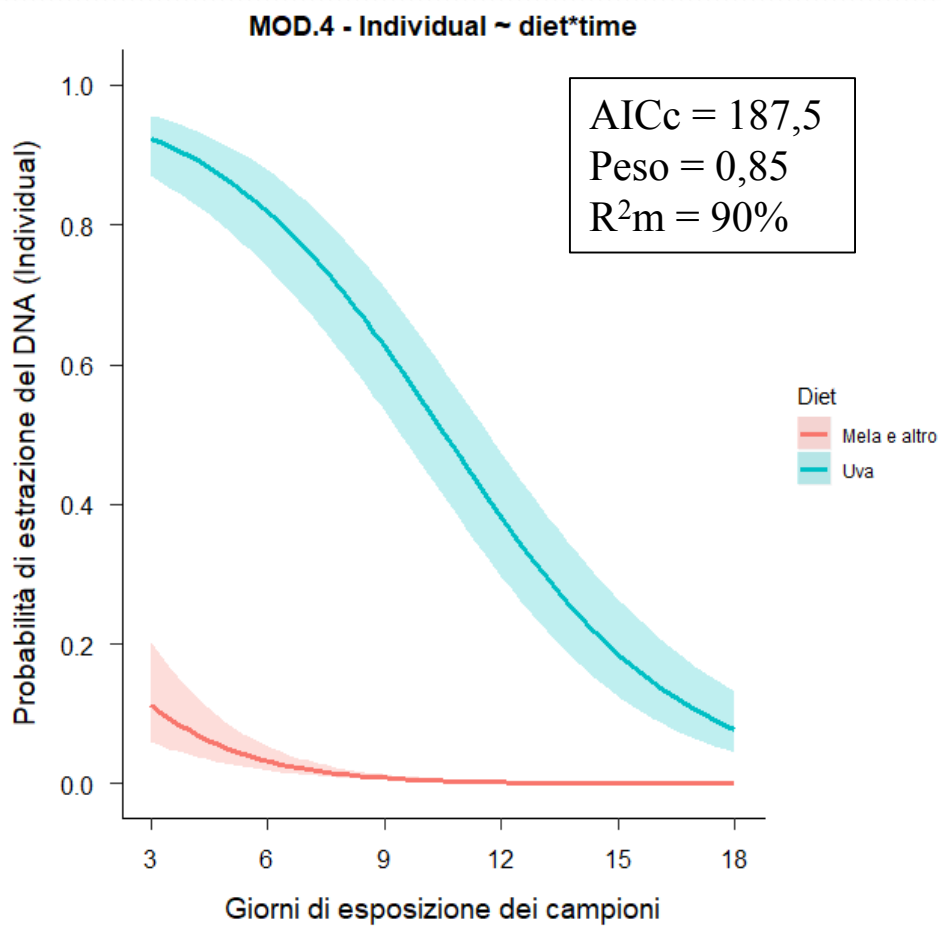


# Risultati

## Probabilità di estrazione del DNA



# Risultati

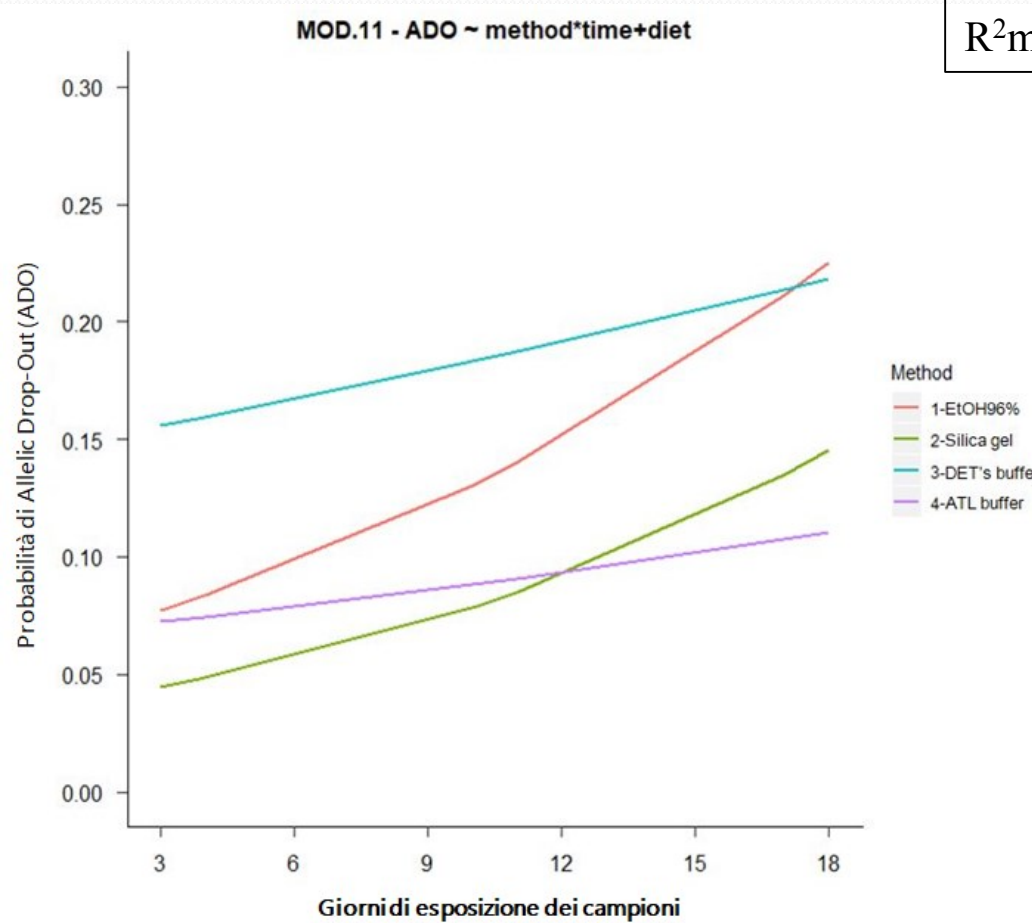


# Risultati

$AIC_c = -125,2$

Peso = 0,59

$R^2_m = 65\%$



# Conclusioni

➤ Tempo (campionamento e stoccaggio) e quantità di campione prelevato influenzano significativamente il successo di genotipizzazione

➤ Piccole quantità di campione da feci fresche, entro due giorni dalla deposizione

➤ Estrazione del DNA il prima possibile

➤ Conservante ATL buffer  miglior rapporto qualità/costi/tempi



Già presente nel kit di estrazione per le analisi

Meno passaggi in fase di estrazione

Meno errori di genotipizzazione (ADO)



➤ Fatte composte da uva consentono di ottenere una resa di genotipizzazione maggiore

➤ Studi futuri per indagare il motivo di questa diversa efficienza tra le diete:

- Analisi mirate (es. microbiota)
- Più tipologie di dieta

➤ Variabili di tipo ambientale (umidità, temperatura, ...)



**Grazie per  
l'attenzione**