

• Introduzione

Il **Laboratorio di biologia della conservazione** (LBC), fondato nel 1999, è un'unità specializzata del Dipartimento di ecologia ed evoluzione dell'Università di Losanna orientata alle scienze applicate. Il laboratorio è stato fondato dal suo direttore attuale, il dott. Luca Fumagalli, e vi lavorano due tecnici di laboratorio e alcuni laureandi e dottorandi. L'LBC sviluppa e impiega tecniche di genetica molecolare che vengono utilizzate nell'ambito dello studio e della gestione delle popolazioni naturali, in particolare quelle a rischio di estinzione. Le sue prestazioni sono rivolte alle organizzazioni incaricate della gestione e della conservazione della biodiversità, ossia agenzie governative, ONG, istituti universitari, privati o istituzioni giuridiche e doganali (nel caso del bracconaggio di specie protette). L'LBC si è occupato, anche per conto di vari Paesi europei, delle specie più diverse quali mammiferi, uccelli, pesci, rettili e anfibi. Dalla fine degli anni '90, è incaricato dall'Ufficio federale dell'ambiente di sviluppare metodi genetici non invasivi per lo studio della ricolonizzazione delle Alpi svizzere da parte di grandi predatori come il lupo e l'orso.

L'analisi dei campioni raccolti sul campo in maniera non invasiva (saliva, escrementi, peli, urina, ...) è estremamente difficile dal punto di vista tecnico a causa della quantità molto limitata e della scarsa qualità del DNA presente in questo tipo di campioni. Per questo motivo, è necessario definire misure logistiche e protocolli ad hoc. L'analisi di tali campioni richiede un impiego di tempo sensibilmente maggiore rispetto a quello necessario per i campioni convenzionali e vi sono molti casi che non consentono un'interpretazione corretta dei risultati. L'LBC è uno dei pochi laboratori al mondo a proporre questo genere di analisi "à la carte".

La figura 1 illustra a titolo di esempio il numero di analisi e il tipo di campioni che l'LBC ha analizzato dal 1999 al 2009 nell'ambito del mandato sulla ricolonizzazione delle Alpi da parte del lupo (*Canis lupus*).

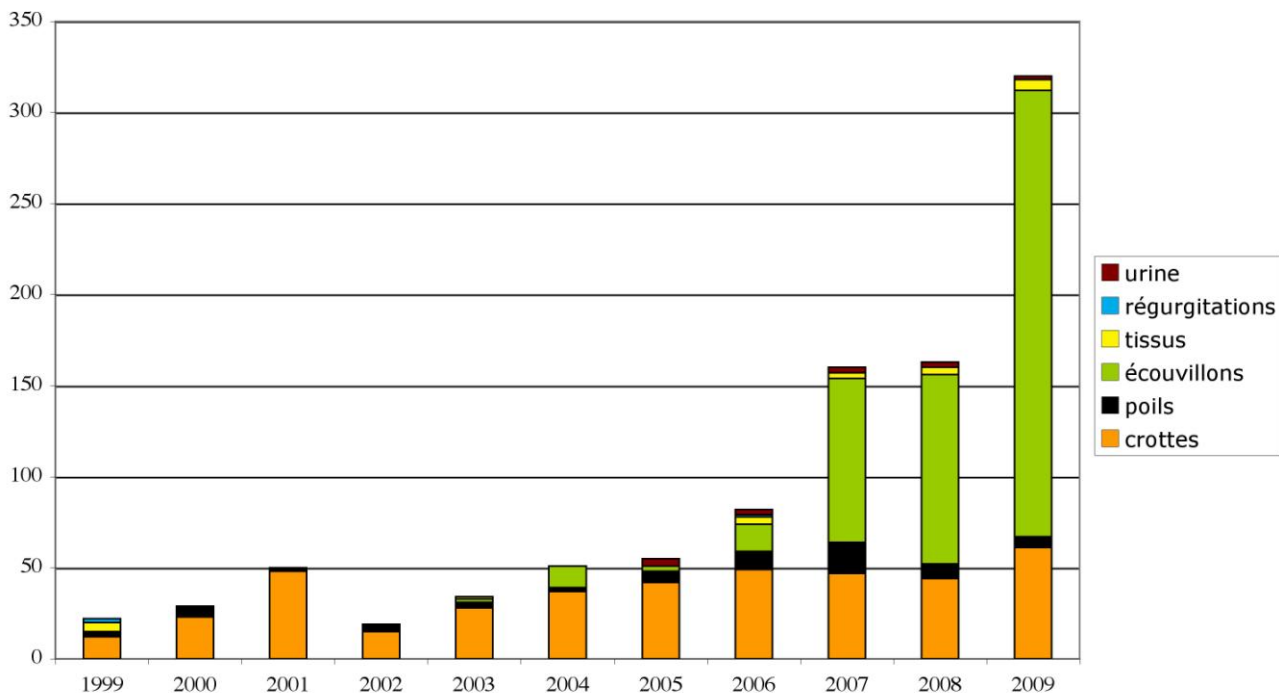


Figure 1: Type d'échantillon analysé au cours des années 1999 à 2009 pour les analyses non invasives concernant le loup (*Canis lupus*).

urine = urine; tissus = tessuti; régurgitations = rigurgiti; écouvillons = bastoncini cotonati; poils = peli; crottes = escrementi

Figura 1: tipo di campioni prelevati dal 1999 al 2009 per effettuare analisi non invasive sul lupo

La figura 2 mostra la proporzione delle diverse specie identificate mediante sequenziamento del DNA negli anni 1999-2009 per il mandato sulla ricolonizzazione delle Alpi da parte del lupo (*Canis lupus*).

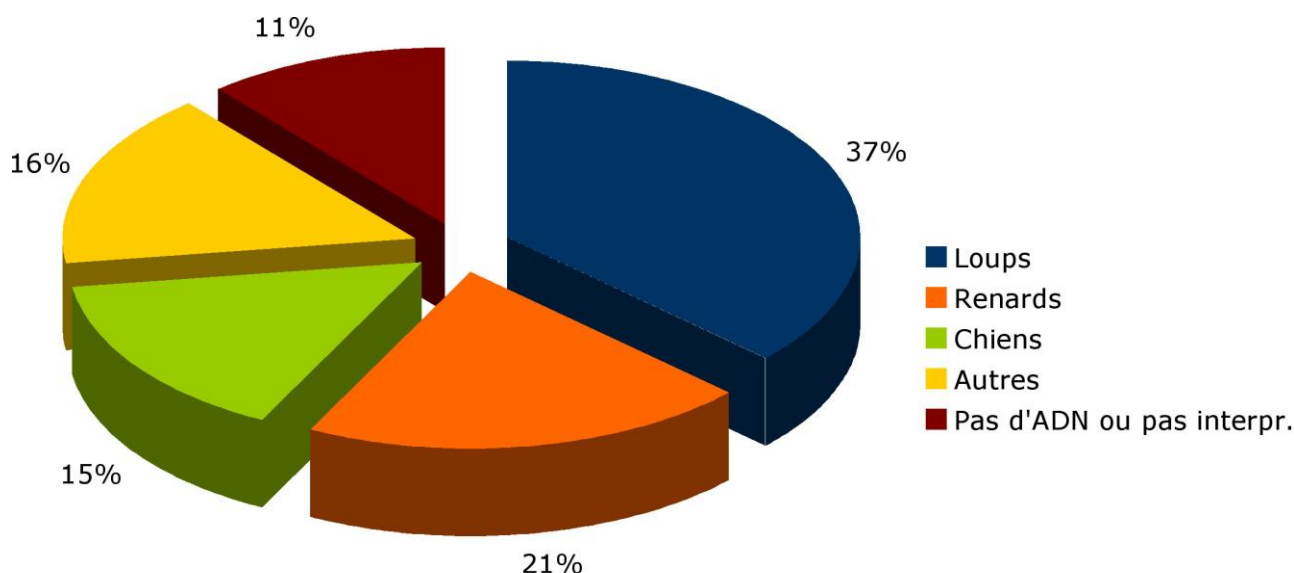


Figure 2: Espèces identifiées au cours des années 1999 à 2009 par séquençage de l'ADN mitochondrial pour les analyses non-invasives concernant le loup (*Canis lupus*).

loups = lupi renards = volpi chiens = cani autres = altri pas d'ADN ou pas interpr. = nessuna traccia di ADN o interpr.

La tabella 1 mostra la prima data in cui è stata confermata mediante un'analisi genetica la presenza di un lupo nei Cantoni svizzeri nei quali la specie è transitata almeno una volta.

Tableau 1: Première identification (mtDNA et microsattellites) d'un loup dans les cantons suisses où la présence de l'espèce a été attestée au moins une fois, et nombre de loups différents déterminés par génotypage microsattellites de novembre 1998 à décembre 2009 et ayant transité par les cantons en question. Les dates correspondent à l'échantillonnage sur le terrain. Les individus identifiés dans les régions italiennes limitrophes de VS et TI n'ont pas été comptabilisés.

	Première identification de l'espèce par séquençage mtDNA	Premier profil ADN par génotypage de marqueurs microsattellites	Nbre. de loups différents identifiés par génotypage ^(*)
VS	VI.1996, Val d'Entremont	27.11.1998, Reckingen	15
TI	10.01.2001, Monte Carasso	27.01.2004, Osco	2
GR	20.04.2001, Vicosoprano	29.09.2001, Margna	7
BE	23.03.2006, Gsteigwiler	23.03.2006, Gsteigwiler	3
VD	06.08.2007, Anzeindaz	21.06.2008, Ayerne	1
FR	31.10.2007, Jaun	22.12.2007, Estavannens	2
OW	16.10.2008, Teufibach	01.03.2009, Sarnen	1
LU	02.02.2009, Schwarzenberg	22.04.2009, Eigenthal/Unterlauelen	1
SZ	13.04.2009, Unteriberg	-	-

(*) Le total de cette colonne est supérieur au nombre d'individus différents identifiés en Suisse lors de la même période (31), car certains individus ont transité par plusieurs cantons différents.

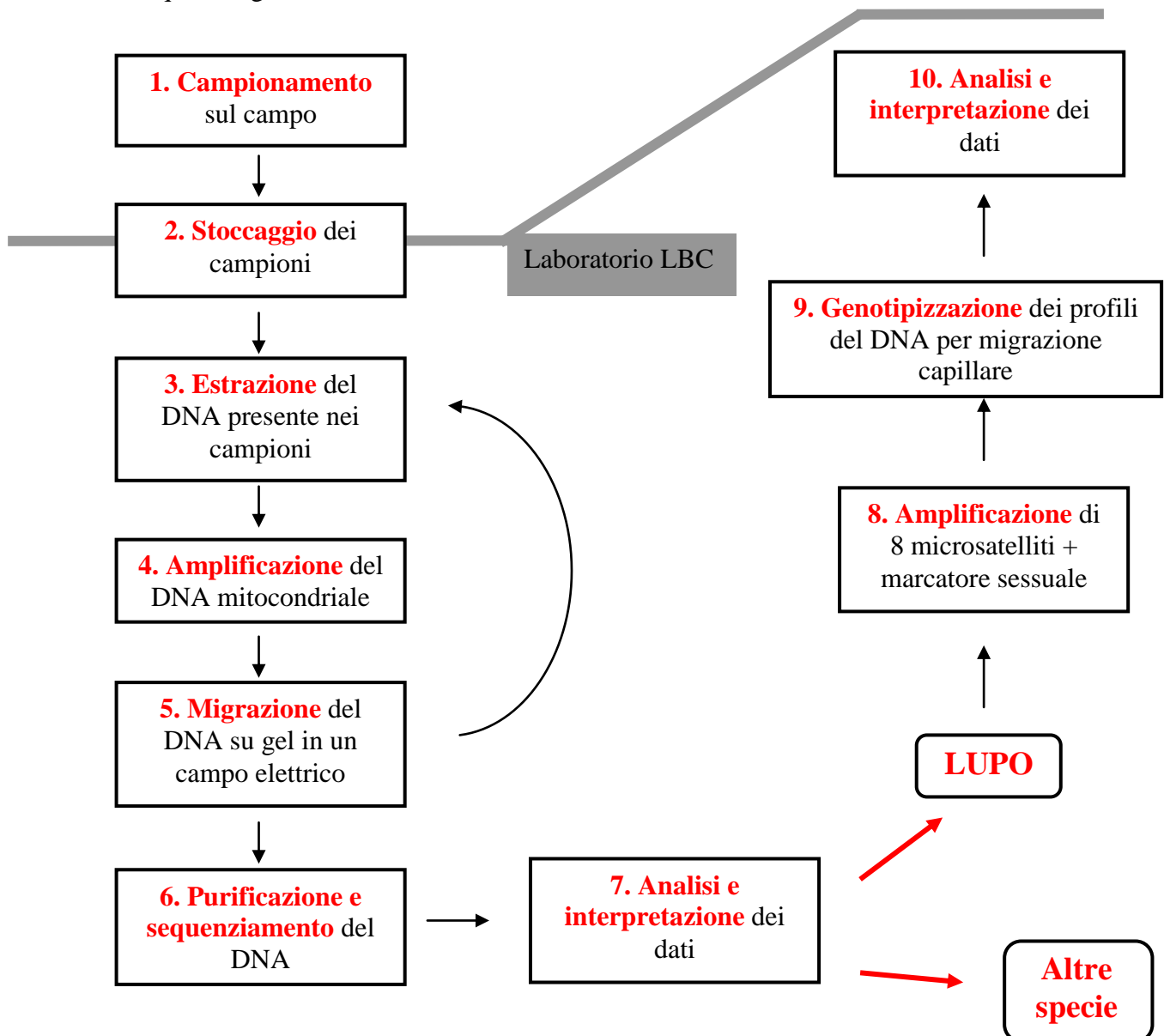
• Metodi

Per le analisi non invasive applicate al lupo, l'LBC utilizza essenzialmente due tecniche:

- *il sequenziamento del DNA mitocondriale* che consente di identificare la specie presente in un campione e la sua origine geografica (lignaggio genetico). La precisione di quest'ultimo aspetto dipende in larga misura dalla specie analizzata e dalla sua evoluzione demografica. Nel caso del lupo, possiamo per esempio affermare con certezza che, dal punto di vista genetico, gli individui identificati nelle Alpi dalla fine degli anni '80 sono originari della penisola italiana, dato che la variante genetica individuata mediante sequenziamento in tutti questi individui è presente unicamente nelle popolazioni selvatiche dell'Italia del sud e centrale e in nessun'altra parte del mondo.

- *la genotipizzazione con microsatelliti* che consente di identificare gli individui stabilendo dei profili di DNA individuali. Rispetto al sequenziamento, questa tecnica è molto più sensibile alla scarsa quantità/qualità del DNA e per questo motivo una parte dei campioni il cui DNA era stato precedentemente sequenziato con successo non potrà essere genotipizzata.

Le diverse fasi dell'analisi genetica per identificare la specie e definire il profilo del DNA sono riassunte qui di seguito:



Osservazioni:

- le fasi 1 e 2 sono estremamente importanti e influenzano le analisi successive;
- nelle analisi non invasive, le quantità di DNA che si tenta di estrarre nella fase 3 sono spesso nell'ordine di alcuni picogrammi (mille miliardesimi di grammo);
- i campioni (a eccezione degli escrementi) sono sottoposti a un trattamento che dura tutta la notte (all'incirca 8 ore) precedente alla fase 3;
- se nella fase 5 i frammenti richiesti non vengono individuati, viene fatto un secondo tentativo a partire dalla fase 3 o 4. Se questo tentativo fallisce, il campione in questione viene inserito nella categoria "DNA non riscontrato";
- durante le fasi da 4 a 7, i bastoncini cotonati richiedono il doppio di analisi rispetto agli altri campioni;
- durante la fase 7, selezioniamo i campioni attribuiti al lupo e continuiamo le analisi solo su questi ultimi;
- nella fase 7, la sovrapposizione di varie sequenze in seguito alla contaminazione dovuta a varie specie non è in generale leggibile e il campione viene inserito in questo caso nella categoria "non interpretabile";
- la fase 8 viene ripetuta 8 volte per ogni campione non invasivo (in totale: 72 genotipizzazioni/campione), al fine di ridurre al minimo il rischio di errore dovuto alla scarsa quantità/qualità del DNA;
- nella fase 9, una percentuale non trascurabile di campioni non fornisce risultati interpretabili a causa della scarsa qualità del DNA nelle analisi non invasive. Questa percentuale è influenzata dal tipo di campione, dalla degradazione che ha subito sul campo, dalla qualità dello stoccaggio, dalla quantità di DNA contenuta ecc. e non può essere dedotta in precedenza;
- durante la fase 10 i profili del DNA vengono confrontati con una banca dati per identificare i nuovi individui o quelli la cui presenza era già stata accertata in precedenza.

• Termine

Quando si lavora con campioni non invasivi è difficile fissare dei termini precisi. Durante le analisi entrano, infatti, in gioco vari fattori imprevedibili, in particolare problemi tecnici legati alla scarsa qualità dei campioni. Certe apparecchiature onerose sono inoltre gestite in comune con altri gruppi di ricerca dell'Università. L'accesso a tali apparecchiature è quindi condizionato dal fatto che vengono utilizzate da decine di altre persone e ciò può causare dei ritardi.

In linea generale, dall'entrata dei campioni in laboratorio bisogna considerare fino a due settimane per i risultati riguardanti il sequenziamento del DNA mitocondriale e fino a tre settimane supplementari per la genotipizzazione con microsatelliti.

In caso di problemi tecnici inattesi (per es. guasto di un apparecchio) informiamo su eventuali ulteriori ritardi.

• Campionamento sul campo e stoccaggio

La raccolta di campioni destinati a un'analisi genetica può essere effettuata da persone prive di una formazione particolare. Il campionamento è tuttavia una fase fondamentale, che può limitare e talvolta persino impedire le analisi genetiche future. Per evitare contaminazioni dei campioni con DNA umano, è, in generale, importante avere le mani pulite, utilizzare materiale pulito (per es. guanto, bisturi pulito, monouso o sterilizzato alla fiamma e privo di tracce appartenenti a un altro individuo) e depositare i singoli campioni in contenitori o sacchetti etichettati. Per evitare la degradazione dei campioni, si deve procedere quanto prima allo stoccaggio.

Per quanto riguarda in particolare i carnivori, si consigliano le tecniche seguenti:

- *escrementi*: depositarne una piccola quantità in un contenitore coprendoli completamente di alcol puro al 100 % e chiudere bene il tappo per evitare fughe. Questo campione è destinato alle analisi genetiche. La quantità rimanente degli escrementi viene depositata in un sacchetto e viene utilizzata per le analisi del regime alimentare (KORA). I due campioni devono essere etichettati e inviati a: KORA, Thunstrasse 31, 3074 Muri. Deve essere utilizzato unicamente alcol puro (etanolo o alcol etilico), non alcol denaturato. La soluzione ideale consiste nel preparare dei contenitori in cui è già stato versato l'alcol prima di procedere ai prelievi sul campo. Si consigliano i seguenti contenitori:

flaconi di conteggio Roth, tipo Vial in LDPE, 20 ml che possono essere ordinati all'indirizzo www.carlroth.ch (articolo n. 0794.1).

- *bastoncini cotonati*: sfregare il bastoncino intorno alle ferite delle prede scegliendo delle ferite pulite (con poco sangue o prive di sangue della preda) per raccogliere l'eventuale saliva del predatore. Utilizzare un bastoncino per ferita. Per ridurre il rischio di contaminazione è indispensabile utilizzare tamponi sterili venduti singolarmente!

In scatole di cartone:

<http://www.forensix.ch/products/product-overview/buccal-swab/buccal-swab-collection-kit-cardboard/#c1400>

In tubi di plastica (ad esempio, Copan CO-155C):

http://www.milian.com/Milian_Suisse/fr/Catalogue/Bacteriologie/ECouvillons/ECouvillons_steriles_dans_un_tube

Se i tubi di plastica sono utilizzati, è indispensabile per essiccare i tamponi prima di richiudere il coperchio (in un ambiente pulito e senza contattare gli altri tamponi).

- *peli*: verificare che i peli presentino il bulbo, un pelo tagliato privo di bulbo non contiene DNA. Depositare i peli in una busta di carta in un luogo asciutto e a temperatura ambiente.

- *urina nella neve*: prelevare la parte di neve con l'urina, depositarla in un contenitore con coperchio e conservarla in congelatore.

- *tessuti*: depositare alcuni cm³ di tessuto in un contenitore e ricoprirli di alcol puro al 70-100 %. Conservare a temperatura ambiente o in frigorifero.

