

RECENTI RISULTATI SULLA GENETICA DEL GENERE *LEPUS*

di Chiara Mengoni, Nadia Mucci, Ettore Randi.

Introduzione

Il susseguirsi delle oscillazioni climatiche durante il corso del Pleistocene ha determinato importanti cambiamenti nella distribuzione delle specie ed ha contribuito alla formazione di aree di elevata biodiversità, in particolar modo nelle regioni dell'Europa meridionale (Penisola iberica, italiana e balcanica), considerate come le principali aree di rifugio durante i periodi di massima estensione dei ghiacci. I ripetuti cicli glaciali ed interglaciali hanno favorito la diversificazione genetica di popolazioni isolate, con conseguenti eventi di speciazione o subspeciazione (Hewitt 2000). Le attività umane hanno ulteriormente prodotto un'alterazione degli ambienti naturali: gli impatti antropici indiretti (trasformazioni degli ambienti naturali) e diretti (eradicazione, prelievo, traslocazioni) hanno eroso la diversità e modificato la struttura genetica di specie e popolazioni. Il sempre maggior interesse per alcune specie cacciabili di mammiferi e uccelli ha portato, fin dai primi anni del secolo scorso, all'immissione in natura di selvaggina allevata in cattività, ed ha avuto spesso conseguenze negative, come la scomparsa di interi pool genici e il diffondersi di malattie nelle popolazioni selvatiche (Randi, 2005; Lavazza e Guberti 2007). Così come è accaduto per altri mammiferi, anche per le specie di lepri (genere *Lepus*) presenti in Europa, e in particolar modo in Italia, la distribuzione e lo status attuale delle popolazioni sono il risultato dell'azione congiunta di eventi naturali e antropogenici.

In Italia sono presenti quattro specie di lepri. La Lepre europea, o Lepre comune (*Lepus europaeus*), è una specie di grande interesse venatorio che è distribuita quasi ovunque nella penisola ed è presente con popolazioni in gran parte non naturali. La specie è stata soggetta negli ultimi decenni a massicci ripopolamenti che hanno portato al rilascio di animali importati dall'estero, oppure, in piccola parte, allevati in Italia. Le popolazioni della sottospecie *L. europaeus meridiei*, originariamente distribuita in tutta l'Italia centro-settentrionale, sono state sostituite da lepri alloctone introdotte e probabilmente appartenenti a sottospecie diverse. Questi rilasci risultano documentati fin dal 1920, ma hanno trovato larga applicazione dopo la

seconda guerra mondiale, interessando, purtroppo, anche le regioni dell'Italia centro-meridionale, ben oltre il limite dell'areale naturale della sottospecie (Toschi 1965). La Lepre alpina, o variabile (*Lepus timidus*), è distribuita nelle Alpi con popolazioni vitali e ben conservate. Eventi di ibridazione storica ed introgressione genetica con *L. europaeus*, recentemente documentati in Scandinavia, penisola iberica e Russia (Thulin *et al.* 1997, Melo-Ferreira *et al.* 2005, Waltari and Cook 2005, Thulin *et al.* 2006, Melo-Ferreira *et al.* 2007), hanno contribuito a rendere più complicata l'identificazione della struttura genetica delle popolazioni. La Lepre sarda, *Lepus capensis mediterraneus*, che è stata introdotta in Sardegna nel 16° secolo (Vigne 1992), origina molto probabilmente dalle popolazioni nord africane o medio orientali di *L. capensis*, che presentano una tassonomia ancora incerta (Suchentrunk *et al.* 1998). Da alcuni autori il *taxon* viene considerato una sottospecie di *L. capensis* (*L. capensis mediterraneus*; Amori *et al.* 1996), mentre da altri viene ritenuto una specie distinta (*L. mediterraneus*; Palacios 1998). La Lepre italiana, o Lepre appenninica (*Lepus corsicanus*), fu descritta nel 1898 dal naturalista inglese W. E. de Winton come specie distinta da *Lepus europaeus* sulla base di alcuni caratteri morfologici osservati su esemplari appartenenti a collezioni museali. La Lepre italiana, che probabilmente era ampiamente distribuita in passato in Italia centro-meridionale e Sicilia, e che venne introdotta in Corsica prima del 16° secolo (Vigne 1992), fu successivamente declassato a sottospecie di *L. europaeus*. A metà del secolo scorso, a causa della pressione venatoria e dei ripopolamenti di Lepre europea, immessa massicciamente anche in Italia centro-meridionale, la sottospecie *corsicanus* venne considerata estinta (Toschi 1965). La descrizione di caratteri morfologici diagnostici (Palacios 1996), ed i risultati di recenti indagini genetiche (Pierpaoli *et al.* 1999), hanno riconfermato lo status di specie e hanno comprovato la presenza di popolazioni residue di Lepre italiana in diverse aree dell'Italia centro meridionale ed in Sicilia. Nella penisola iberica, sono presenti due specie endemiche, la Lepre iberica (*Lepus granatensis*) e la Lepre cantabrica (*Lepus castroviejo*). L'areale di distribuzione della prima comprende il Portogallo, la Spagna, la Francia meridionale e la Corsica (dove è stata introdotta), mentre la seconda è presente solo in un'area limitata della Spagna settentrionale circoscritta ai Monti Cantabrigi (Alves *et al.* 2008).

L'analisi del DNA permette di sviluppare progetti finalizzati allo studio di specie o popolazioni di particolare interesse conservazionistico. L'analisi filogenetica (Murphy *et al.* 2001; Koepfli *et al.* 2008) ha permesso l'identificazione di *taxa* controversi, o che fino ad ora erano sfuggiti alla

zoologia tradizionale (ad es., *Lepus corsicanus*; Pierpaoli *et al.* 1999). I metodi di studio della filogeografia (Avice 2000) hanno permesso di ricostruire i processi storici che sono alla base della distribuzione attuale di molte specie e, per alcune sottospecie o popolazioni, hanno evidenziato l'esistenza di caratteristiche genetiche e tassonomiche uniche (ad es., le popolazioni di camoscio appenninico *Rupicapra pyrenaica ornata*; Rodriguez *et al.* 2010). L'analisi molecolare dell'ibridazione ha permesso l'identificazione di ibridi in popolazioni naturali o allevate, anche quando l'analisi morfologica non è informativa (ad es., ibridazione in galliformi allevati a scopo di ripopolamento; ibridazione fra animali selvatici e domestici ferali, come nei casi del lupo e del gatto selvatico; Verardi *et al.* 2006; Randi 2008; Oliveira *et al.* 2008). I risultati di recenti studi di filogenesi del genere *Lepus* (Pierpaoli *et al.* 1999) hanno consentito di ipotizzare che *L. corsicanus* e *L. timidus* siano specie relitte (che hanno raggiunto l'Europa durante una prima fase di colonizzazione avvenuta a metà del Pleistocene) originatesi prima della dispersione di *L. europaeus* nell'Europa occidentale (avvenuta all'inizio dell'Olocene durante una seconda fase di colonizzazione dell' Europa centro-occidentale europea da parte dei Leporidi), che si sono poi adattate ad ambienti molto diversi (rispettivamente, habitat mediterranei e alpini).

In questo studio abbiamo analizzato circa 700 campioni biologici prelevati da sei specie di lepre, raccolti dal 1992 fino ad oggi, utilizzando un set di marcatori molecolari ad eredità esclusivamente materna, il DNA mitocondriale (mtDNA), oppure biparentale, loci microsatellite e sostituzioni nucleotidiche (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP). I risultati delle analisi genetiche sono stati elaborati allo scopo di: 1) ricostruire le relazioni filogenetiche tra la Lepre italiana e le altre specie di lepre presenti in Europa; 2) identificare possibili eventi di ibridazione tra Lepre italiana e Lepre europea nelle aree di simpatria presenti in Italia centro-meridionale; 3) descrivere la variabilità genetica delle popolazioni di *Lepus corsicanus* presenti in Italia; e 4) valutare l'utilizzo di nuovi marcatori genetici (SNP) che permettano di identificare con esattezza la specie di appartenenza di campioni individuali (per es., nei casi di genotipizzazione di campioni fecali raccolti nell'ambito di programmi di genetica non-invasiva), e di popolazioni geografiche. Le informazioni derivanti da questo studio sono utilizzabili per lo sviluppo di adeguati programmi di tutela e conservazione della Lepre italiana.

Materiali e metodi

I campioni biologici (tessuti e feci) sono stati raccolti e conservati in etanolo 90%. La conservazione in etanolo impedisce la degradazione del DNA dal momento della raccolta del campione e può essere utilizzata direttamente sul campo. Il DNA è stato estratto, previa digestione dei tessuti, tramite precipitazione alcolica od eluizione. Il DNA, diluito in una soluzione di tampone sterile, rimane stabile per molti anni se congelato a - 20°C. Il marcatore molecolare più adatto alla determinazione della specie è il mtDNA, una molecola aploide presente nei mitocondri, che perciò viene ereditata esclusivamente per via materna e che è molto abbondante nelle cellule. I geni mitocondriali evolvono più velocemente di quelli nucleari e trovano un largo utilizzo nelle analisi filogenetiche, nelle analisi per determinazione di specie o sottospecie e nella risoluzione di ambiguità tassonomiche. A causa dell'eredità uniparentale non possono dare un'informazione affidabile nell'identificazione di individui ibridi. I marcatori molecolari utilizzati per l'individuazione di eventi di ibridazione sono i loci microsatellite e gli SNPs. I microsatelliti sono costituiti da ripetizioni di sequenze di 2-8 nucleotidi; sono presenti nel genoma di tutti gli organismi fin'ora analizzati e sono distribuiti in tutti i cromosomi. Le sequenze fiancheggianti i microsatelliti sono sequenze di DNA a copia singola, solitamente conservate, che permettono di disegnare primers specifici utilizzabili per il processo della reazione a catena della polimerasi (PCR). Gli SNPs sono polimorfismi (sostituzioni) dei singoli nucleotidi, cioè variazioni di una singola base nella sequenza nucleotidica. Solitamente presentano solo due possibili varianti alleliche.

Le analisi genetiche hanno interessato circa 700 campioni appartenenti a sei diverse specie del genere *Lepus* (Tab. 1) provenienti da numerose località in Europa (Italia, Corsica, Spagna, Austria, Grecia, Finlandia, Irlanda, Scozia, Svezia, Ungheria, Romania, Serbia), e Uruguay. Le lepri raccolte in Italia sono state identificate fenotipicamente sulla base delle dimensioni esterne del corpo, colore del mantello, caratteri del cranio e dei denti, come descritto da Palacios (1996) e da Riga *et al.* (1998). E' stata amplificata e sequenziata la prima parte della regione di controllo del mtDNA; le sequenze sono state corrette con il software Seqscape (Applied Biosystems). Il programma Mega 4.0 (Tamura *et al.* 2007) è stato utilizzato per la ricostruzione degli alberi filogenetici. I genotipi individuali sono stati ottenuti tipizzando 13 diversi loci microsatellite sparsi nel genoma (Sat12, Ocelamb, Sol30, Sol33, D7utri, Ocls1b, Lsa1, Lsa2, Lsa3, Lsa4, Lsa5, Lsa6 e Lsa8, precedentemente descritti nel coniglio selvatico *Oryctolagus cuniculus*; Mougél *et al.* 1997;

SurrIDGE *et al.* 1997; Hamill *et al.* 2006; Kryger *et al.* 2002), e 9 SNPs presenti all'interno di quattro geni codificanti (Sptbn, Ucp2, Hpx e Ca2; Melo-Ferreira *et al.* 2009). La variabilità genetica entro- e tra-specie è stata analizzata e visualizzata mediante metodi di analisi multivariata (Analisi Fattoriale delle Corrispondenze, AFC) utilizzando il software Genetix 4.05 (Belkir *et al.* 2004). L'analisi bayesiana implementata nel software Structure 2.3 (Pritchard *et al.* 2000; 2003) ha permesso di verificare la presenza di ibridi fra specie attraverso l'utilizzo di test di assegnazione.

Tabella 1 - Origine e numero di campioni analizzati per specie.

Specie	Origine	N° campioni
<i>L. corsicanus</i>	Italia, Corsica	154
<i>L. cap. mediterraneus</i>	Sardegna	92
<i>L. castroviejo</i>	Spagna	4
<i>L. europeus</i>	Italia, Ungheria, Romania, Austria, Bulgaria, Grecia, Uruguay	343
<i>L. granatensis</i>	Spagna	30
<i>L. timidus</i>	Italia, Finlandia, Svezia, Irlanda, Scozia	75

Risultati

Filogenesi del genere Lepus

Dall'allineamento di circa 400 nucleotidi del mtDNA, sono stati ottenuti 248 differenti aplotipi definiti da 204 siti polimorfici e caratterizzati da un'elevata diversità ($Hd = 0.9774 \pm 0.020$). L'albero filogenetico nella Figura 1 mostra l'esistenza di due gruppi principali di aplotipi ben distinti fra loro:

- Clade A: che include *Lepus europaeus* e *Lepus capensis mediterraneus*;
- Clade B: che include *Lepus timidus*, *Lepus granatensis*, *Lepus castroviejo* e *Lepus corsicanus*.

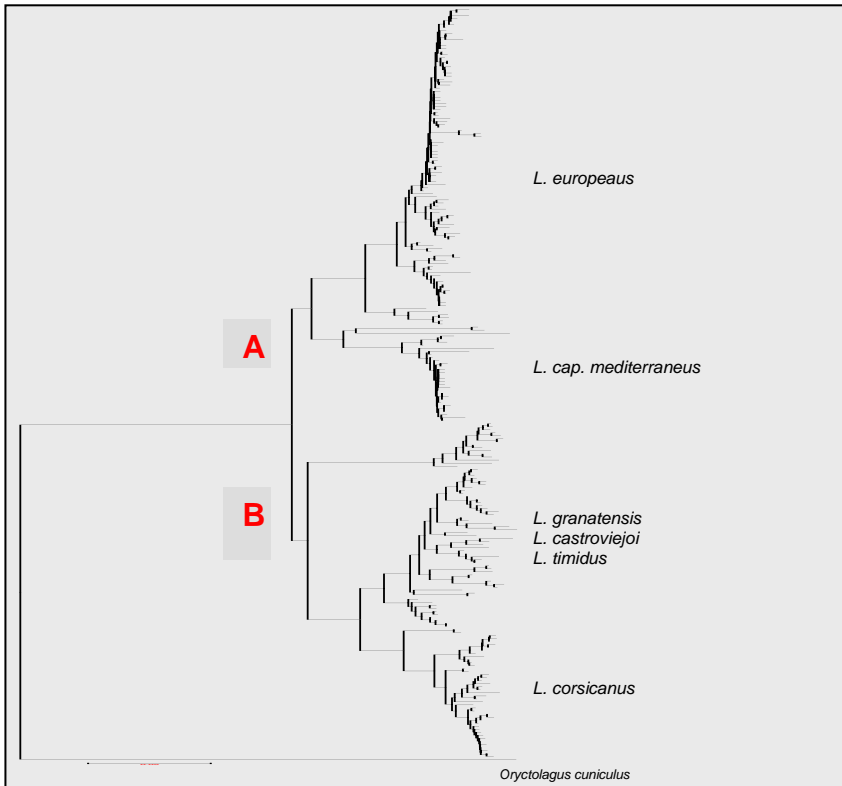


Figura 1 - Albero filogenetico degli aplotipi mitocondriali identificati nelle sei specie del genere *Lepus*. Il clade A include tutti gli aplotipi identificati in *Lepus europaeus* e *Lepus capensis mediterraneus*; il Clade B quelli individuati in *Lepus timidus*, *Lepus granatensis*, *Lepus castroviejoii* e *Lepus corsicanus*.

La struttura dell'albero conferma una chiara distinzione genetica tra *L. corsicanus* e *L. europaeus*, e quindi l'appartenenza di questi due *taxa* a due linee evolutive distinte. Nelle specie iberiche (*L. granatensis* e *L. castroviejoii*) è stata riscontrata un'elevata frequenza di aplotipi mitocondriali di *Lepus timidus*, specie ora estinta in quelle regioni. L'analisi delle sequenze della regione di controllo conferma anche la stretta relazione tra *L. corsicanus* e *L. castroviejoii*: due aplotipi appartenenti ad individui di *L. castroviejoii* risultano infatti associati al clade della Lepre italiana. Anche l'analisi dei genotipi nucleari ottenuti dalla tipizzazione dei tredici loci microsatellite ha evidenziato nei medesimi individui di Lepre cantabrica un pattern di alleli tipico degli individui di Lepre italiana (Fig. 3). L'albero filogenetico presentato in Figura 2 evidenzia l'esistenza di una diversità genetica tra gli aplotipi mitocondriali dei campioni siciliani di *L. corsicanus* rispetto a quelli presenti in Italia centro-meridionale.

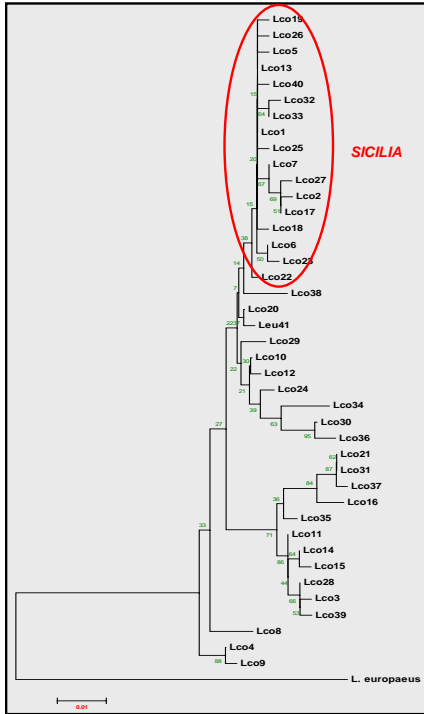


Figura 2 - Albero filogenetico degli aplotipi mitocondriali identificati nelle popolazioni di *Lepus corsicanus* provenienti dall'Italia centro-meridionale e dalla Sicilia.

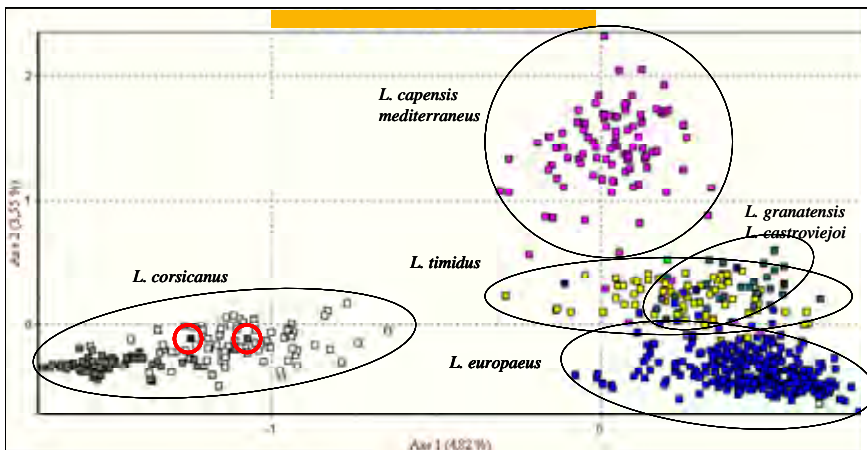


Figura 3 - Analisi multivariata dei genotipi individuali di sei specie del genere *Lepus* ottenuti dalla tipizzazione di 13 loci microsatellite. I due campioni di *L. castroviejoii* (nei cerchi rossi) presentano lo stesso pattern allelico riscontrato nella *Lepus* italiana.

Struttura genetica delle popolazioni ed assenza di ibridazione fra L. corsicanus e L. europaeus

I risultati dell'AFC, effettuata sui genotipi ottenuti sia dai loci microsatellite che dagli SNP, è illustrata nelle Figure 3, 4 e 5. Lepre italiana e Lepre europea risultano geneticamente ben distinte fra loro. L'assenza di genotipi intermedi lascia presupporre la mancanza di individui ibridi. Questo dato viene confermato dai risultati ottenuti dai test di assegnazione (Fig. 6): tutti i campioni identificati morfologicamente e con aplotipo mitocondriale di *L. corsicanus* sono stati assegnati alla specie di appartenenza, nessun individuo è stato assegnato a specie diverse, né totalmente, né parzialmente. Le stesse tipologie di analisi (AFC; analisi bayesiana) sono state effettuate analizzando soltanto gli individui di Lepre italiana. Come per il DNA mitocondriale, è stata riscontrata la presenza di una differenziazione genetica a livello del DNA nucleare tra le popolazioni di Lepre italiana presenti in Sicilia rispetto a quelle presenti nella penisola.

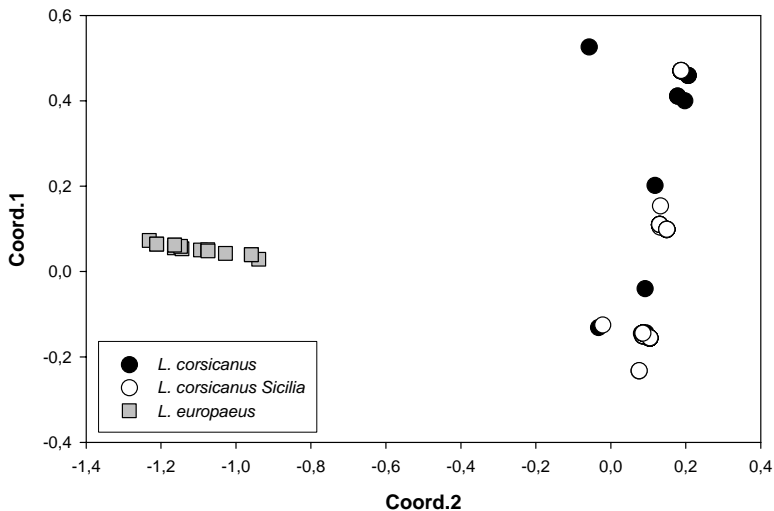


Figura 4 - Analisi multivariata dei genotipi individuali di *L. corsicanus* e *L. europaeus* ottenuti dalla tipizzazione di nove SNPs.

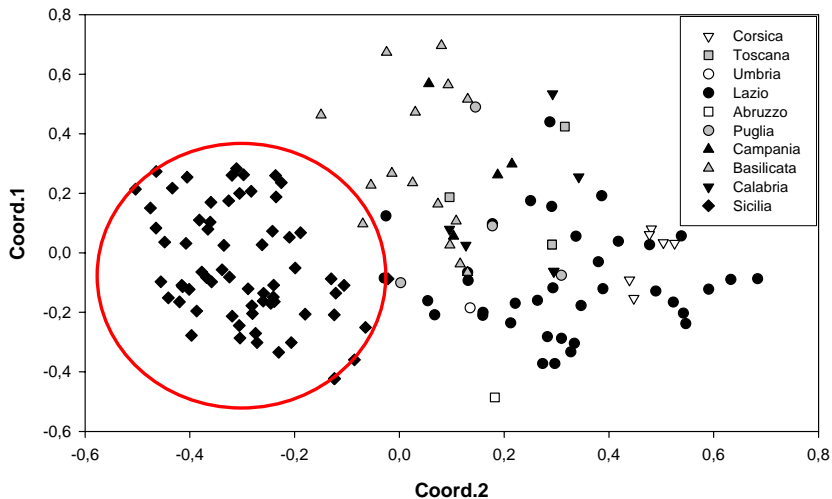


Figura 5 - Analisi multivariata dei genotipi individuali dei campioni appartenenti a *L. corsicanus*, provenienti da diverse aree geografiche ottenuti dalla tipizzazione di 13 loci microsatellite. All'interno del cerchio rosso sono raggruppati gli individui campionati in Sicilia.



Figura 6 - Test di assegnazione effettuato sui campioni di *L. corsicanus*, *L. europaeus*, *L. timidus* raccolti in Italia. I genotipi presentano elevati valori di attribuzione; nessun individuo risulta associato a più di un raggruppamento.

Discussione e conclusioni

I risultati ottenuti dall'analisi del mtDNA e dei loci nucleari (microsatelliti e SNPs) confermano che *L. corsicanus* e *L. europaeus* sono specie ben distinte e divergenti geneticamente da tutte le altre specie studiate. Entrambi i marcatori mostrano inoltre una stretta relazione genetica tra *L. corsicanus* e *L. castroviejoi*, suggerendo l'ipotesi che i due *taxa* siano derivati molto recentemente da antenati comuni. Si può ipotizzare che questi due *taxa* siano attualmente coinvolti in un processo di speciazione conseguente alla frammentazione del loro areale (Alves *et al.* 2008). La presenza di mtDNA di

L. timidus in popolazioni di altre specie di lepri (come nel caso delle lepri iberiche), indica antichi e diffusi episodi di ibridazione ed introgressione genetica. L'ipotesi più accreditata è quella di una massiccia introgressione di DNA mitocondriale a seguito di eventi di ibridazione avvenuta tra queste specie durante la sostituzione competitiva delle specie artiche con le specie temperate alla fine dell'ultima glaciazione (Melo-Ferreira *et al.* 2009).

La Lepre italiana e la Lepre europea, che vivono in aree di simpatria lungo la penisola italiana, spesso create artificialmente in conseguenza dei ripopolamenti, non condividono alcun genotipo mitocondriale o nucleare, suggerendo l'assenza di ibridazione fra le due specie. I risultati delle analisi filogenetiche indicano che *L. corsicanus* e *L. europaeus* hanno una lunga storia di evoluzione indipendente, e sono riproduttivamente isolate in natura. L'adattamento della Lepre italiana ad ecosistemi di tipo mediterraneo può spiegare l'assenza di flusso genico tra le due specie. L'assenza di introgressione anche per i geni nucleari conferma l'isolamento riproduttivo fra le due specie, e la semplice analisi del DNA mitocondriale può essere quindi considerata sufficiente per una corretta identificazione della specie. Sia il DNA mitocondriale che i loci microsatellite e gli SNPs sono amplificabili e tipizzabili utilizzando procedure di genetica non-invasiva; queste ultime consentono di identificare le specie ed i singoli individui presenti nelle aree di studio tramite estrazione di DNA da campioni fecali. Questa possibilità rende attuabile la realizzazione di piani di monitoraggio per descrivere la distribuzione delle due specie soprattutto nelle aree di simpatria in Italia centro-meridionale.

I risultati ottenuti da entrambi i marcatori (DNA mitocondriale e nucleare) mostrano una divergenza genetica tra gli individui di Lepre italiana campionati in Sicilia rispetto a quelli campionati in Italia centro meridionale, divergenza originatasi a causa della separazione della Sicilia dalla fine dell'ultima glaciazione. Per questo motivo le popolazioni siciliane dovrebbero essere oggetto di speciale tutela; in particolar modo tutte le traslocazioni da e per l'isola dovrebbero essere assolutamente vietate.

L'attuazione del Piano d'Azione per *Lepus corsicanus* ha lo scopo di raccogliere le conoscenze sullo status e sulla biologia della specie per promuovere al meglio la sua conservazione. La genetica ha fornito e può continuare a fornire importanti informazioni per la conservazione della specie. L'analisi genetica di campioni non invasivi raccolti nell'Italia centro-meridionale è un valido strumento per l'identificazione delle aree di presenza della specie. L'individuazione di tali ambiti, attraverso l'associazione dei dati genetici ed

ambientali, potrebbe consentire l'identificazione su piccola scala di habitat esclusivi o preferenziali per la Lepre italiana. Ciò permetterebbe la tutela della specie attraverso la riduzione della pressione venatoria in questi territori, il ripristino di corridoi fra areali frammentati fra loro disgiunti, ed il miglioramento quantitativo e qualitativo degli habitat. Lo studio della dinamica di popolazione attraverso la tipizzazione di campioni non invasivi offrirebbe inoltre l'opportunità di valutare lo status delle singole comunità locali e di valutare in maniera concreta la necessità di interventi mirati a prevenire il rischio di estinzione delle singole popolazioni di Lepre italiana.

Bibliografia

- Alves P.C., Melo-Ferreira J., Branco M., Suchentrunk F., Ferrand N., Harris D.J., 2008. Evidence for genetic similarity of two allopatric European hares (*Lepus corsicanus* and *L. castroviejo*) inferred from nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 1191–1197.
- Amori G., Angelici F.M., Prigioni C., Vigna Taglianti A. 1996. The mammal fauna of Italy: A review. *Hystrix* 8: 3-7.
- Avice J.C. 2000. Phylogeography : the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA. Pp. 447.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. 2004. Genetix 4.05, Logiciel sous Windows pour la Genetique des Populations. Laboratoire Genome, Populations, Interactions, CNRS UMR. 5171, Universite de Montpellier II, Montpellier, France.
- De Winton W.E. 1898. On the hares of Western Europe and North Africa. *Annual Magazine of Natural History*, London 1: 149-158.
- Hamill R.M., Doyle D., Dike E.J. 2006. Spatial patterns of genetic diversity across European subspecies of the mountain hare, *Lepus timidus* L. *Heredity* 97: 355-365.
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Koepfli K.P., Deere K., Slater G., Begg C., Begg K., Grassman L., Lucherini M, Veron G., Wayne R.K. 2008. Multigene phylogeny of the Mustelidae: Resolving relationships, tempo and biogeographic history of a mammalian adaptive radiation. *BMC Biology* 6: 10.
- Kryger U., Robinson T.J., Bloomer P. 2002. Isolation and characterization of six polymorphic microsatellite loci in South African hares (*Lepus saxatilis* F. Cuvier, 1823 and *Lepus capensis* Linnaeus, 1758). *Molecular Ecology Notes* 2: 422-424.
- Lavazza A., Guberti V. 2007. Malattie in *Lepus corsicanus* e programmi di monitoraggio e di gestione sanitaria. Atti del Convegno "Conservazione di *Lepus corsicanus* De Winter, 1898 e stato delle conoscenze, de Filippo *et al.* (a cura di), 2007, IGF publ.
- Lo Valvo M., Barera A., Seminara S. 1997. Biometria e status della Lepre appenninica (*Lepus corsicanus*, de Winton 1898) in Sicilia. *Naturalista Siciliano* 21: 67-74.

- Melo-Ferreira J., Boursot P., Suchentrunk F., Ferrand N., Alves P.C. 2005. Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in Northern Iberia. *Molecular Ecology* 14: 2459-2464.
- Melo-Ferreira J., Boursot P., Randi E., Kryukov A., Suchentrunk F., Ferrand N., Alves P.C. 2007. The rise and fall of the mountain hare (*Lepus timidus*) during Pleistocene glaciations: expansion and retreat with hybridization in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology* 16: 605-618.
- Melo-Ferreira J., Alves P.C., Freitas H., Ferrand N., Boursot P. 2009. The genomic legacy from the extinct *Lepus timidus* to the three hare species of Iberia: contrast between mtDNA, sex chromosomes and autosomes. *Molecular Ecology* 18: 2643-2658.
- Mougel F., Mounolou J.C., Monnerot M. 1997. Nine polymorphic microsatellite loci in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics* 28: 58-71.
- Mucci N., Randi E., Gentile L., Mari F., Locati M. 2008. Mitochondrial cytochrome B sequence divergence among Spanish, Alpine and Abruzzo Chamois (Genus *Rupicapra*). *Hystrix* 10 (2): 29-36.
- Oliveira R., Godinho R., Randi E., Ferrand N., Alves P. 2008. Molecular analysis of hybridisation between wild and domestic cats (*Felis silvestris*) in Portugal: implications for conservation. *Conservation Genetics* 9: 1-11.
- Murphy W.J., Eizirik E., Johnson W.E., Zhang Y.P., Ryder O.A., O'Brien S.J. 2001. Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature* 409: 614-618.
- Palacios F. 1996. Systematics of the indigenous hares of Italy traditionally identified as *Lepus europaeus* Pallas, 1778 (Mammalia: Leporidae). *Bonner zoologische Beitrage* 56: 59-91.
- Palacios F. 1998. Diversity of hares in Europe. Euro-American Mammal Congress, Abstracts, (Reig S. ed.), Universidad de Santiago de Compostela, Spagna, July 19-24, 1998, p. 85.
- Pierpaoli M., Riga F., Trocchi V., Randi E. 1999. Species distinction and evolutionary relationships of the Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Ecology* 8: 1805-1817.
- Pritchard J.K., Stephens M., Peter D. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Pritchard J.K., Wen W. 2003. Documentation for Structure software version 2. Website <http://pritch.bsd.uchicago.edu>
- Randi E. 2005. Management of wild ungulate populations in Italy: Captive-breeding, hybridisation and genetic consequences of translocations. *Veterinary Research Communications* 29 (Suppl. 2): 71-75
- Randi E. 2008. Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Molecular Ecology* 17: 285-293.
- Riga F., Trocchi V., Randi E., Toso S. 1998. What, if anything, is the Italian hare? Euro-American Mammal Congress, Abstracts, (Reig S. ed.), Universidad de Santiago de Compostela, Spagna, July 19-24, 1998, p. 97.
- Rodriguez F., Pérez P., Hammer S.E., Albornoz J, Dominguez A. 2010. Integrating phylogeographic patterns of microsatellite and mtDNA divergence to infer the evolutionary history of chamois (genus *Rupicapra*). *BMC Evolutionary Biology* 10: 222.

- Suchentrunk F., Nadlinger K., Alkon P.U., Haiden A. 1998. Allozyme and mtDNA RFLP data pertinent to the evolution of the brown and Cape hares (*Lepus europaeus* and *L. capensis*). Euro-American Mammal Congress, Abstracts, (Reig S. ed.), Universidad de Santiago de Compostela, Spagna, July 19-24, 1998, p. 98.
- Surridge A.K., Bell D.J., Rico C., Hewitt G.M. 1997. Polymorphic microsatellite loci in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) are also amplified in other lagomorph species. *Animal Genetics* 28: 302-305.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kuma S. 2007. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596.
- Thulin C.G., Fang M., Averianov A. O. 2006. Introgression from *Lepus europaeus* to *L. timidus* in Russia revealed by mitochondrial single nucleotide polymorphism and nuclear microsatellites. *Hereditas* 143: 68-76.
- Thulin C.G., Jaarola M., Tegelström H. 1997. The occurrence of mountain hare mitochondrial DNA in wild brown hares. *Molecular Ecology* 6: 463-467.
- Toschi A. 1965. Fauna d'Italia. VII. Mammalia (Lagomorpha-Rodentia-Carnivora-Artiodactyla-Cetacea). Calderini, Bologna.
- Verardi A., Lucchini V., Randi E. 2006. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Molecular Ecology* 15: 2845-2855.
- Vigne J.D. 1992. Zooarchaeology and the biogeographical history of the mammals of Corsica and Sardinia since the last ice age. *Mammal Review* 2: 87-89.
- Waltari E., Cook J.A. 2005. Hares on ice: phylogeography and historical demographics of *Lepus arcticus*, *L. othus*, and *L. timidus* (Mammalia: Lagomorpha). *Molecular Ecology* 14: 3005-3016.