

Genetica di *Lepus corsicanus*: evoluzione, speciazione ed assenza di ibridazione interspecifica

Ettore Randi, Chiara Mengoni e Nadia Mucci

Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, Via Cà Fornacetta 9, 40064 Ozzano dell'Emilia (BO), Italia, email:met0217@iperbole.bo.it

Abstract

A suite of molecular markers (mtDNA and microsatellites) are used to reconstruct the phylogenetic relationships, population genetic structure and to assess eventual cases of hybridization in three species of hares in Italy: *L. timidus*, *L. europaeus* e *L. corsicanus*.

Results show that *L. corsicanus* is a genetically (and phenotypically) distinct taxon, which apparently does not hybridise with *L. europaeus*. Both mtDNA and microsatellite markers are being used to assess population structure, genetic variability and implement nationwide conservation plans for *L. corsicanus*.

Introduzione

La distribuzione geografica della biodiversità, così come la conosciamo oggi in Italia ed in Europa, è stata ampiamente condizionata dalle vicende climatiche verificatesi nel corso del Pleistocene, quando ripetuti cicli glaciali ed interglaciali hanno favorito la diversificazione di popolazioni isolate in allopatria, con conseguenti eventi di speciazione o subspeciazione (Hewitt 2000). Le comunità ecologiche e gli ambienti naturali, che si sono ricostituiti e diffusi in Europa a partire dagli inizi dell'Olocene, sono poi stati progressivamente alterati, ed in parte completamente distrutti, dall'espansione e dalle attività delle popolazioni umane. Gli impatti antropici indiretti (trasformazioni degli ambienti naturali) e diretti (eradiazione, prelievo, translocazioni) hanno eroso la diversità e modificato la struttura genetica di specie e popolazioni.

Per elaborare efficaci strategie per conservazione della biodiversità è importante ricostruire i processi storici, in parte naturali, in parte antropogenici, che hanno portato alla attuale distribuzione di specie, sottospecie e popolazioni. La catalogazione delle peculiarità genetiche delle popolazioni naturali costituisce una fonte di informazione ed uno strumento a sostegno degli interventi legislativi, delle azioni di conservazione, gestione ed uso sostenibile delle risorse naturali. Tali azioni richiedono interventi attivi da parte delle amministrazioni competenti, come viene esplicitamente indicato dalle convenzioni internazionali, dalle direttive europee, dalla legislazione nazionale e regionale, e dai piani d'azione per la conservazione degli ambienti e delle specie. La diversità genetica, componente di base della biodiversità, possiede un valore intrinseco, condizionando i processi di selezione naturale ed adattamento delle popolazioni a condizioni ambientali sempre mutevoli. L'addomesticamento ed il rilascio in natura di selvaggina allevata contribuisce, in alcuni casi ed in condizioni ecologiche particolari, alla diffusione di genotipi ibridi e di agenti patogeni, che possono interferire sulla dinamica delle popolazioni, e sono rilevanti anche per la salute umana.

Recenti indagini genetiche hanno mostrato come la zoologia tradizionale abbia talvolta sottovalutato la presenza di preziosi endemismi come *Lepus corsicanus* (Pierpaoli *et al.* 1999) ed il capriolo italiano (Randi *et al.* 2004), *taxa* presenti attualmente con popolazioni frammentate che richiedono specifici interventi attivi di conservazione e gestione. La genetica delle popolazioni ed i recenti sviluppi delle metodologie di analisi del DNA hanno aperto possibilità impreviste per progetti di studio finalizzati alla conservazione ed uso sostenibile della biodiversità. In particolare, i metodi di analisi filogenetica e la sistematica molecolare consentono l'identificazione di specie fino ad ora sfuggite alla zoologia tradizionale (ad es. *Lepus corsicanus*); la filogeografia consente la ricostruzione della storia naturale di sottospecie e popolazioni che hanno caratteristiche genetiche e tassonomiche uniche (ad es., le popolazioni di capriolo italiano *Capreolus c. italicus*); l'analisi molecolare dell'ibridazione consente di identificare con certezza la presenza di ibridi in popolazioni naturali ed allevate (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); infine le tecniche di genetica non-invasiva consentono di realizzare progetti di monitoraggio (censimenti genetici,

analisi della struttura delle popolazioni) in specie particolarmente elusive (ad es., orso bruno, lupo e lontra) che sono difficilmente studiabili usando approcci tradizionali.

La sistematica e tassonomia del genere sono ancora in uno stato di relativa confusione, ed anche lo status delle specie di lepri italiane è in parte incerto.

L. timidus è distribuita nelle Alpi con popolazioni vitali e relativamente ben conservate. Tuttavia, la struttura genetica di queste popolazioni è ignota, soprattutto in relazione ai diffusi fenomeni ibridazione storica ed introgressione genetica con *L. europaeus*, che sono stati recentemente documentati in Scandinavia, penisola Iberica, Russia ed altrove (Thulin *et al.* 1997, Melo-Ferreira *et al.* 2005, Waltari e Cook 2005, Thulin *et al.* 2006, Melo-Ferreira *et al.* 2007).

Molte popolazioni di *L. europaeus*, che era originalmente ampiamente distribuita in Italia centro-settentrionale con la sottospecie endemica *meridiei*, sono state presumibilmente totalmente sostituite da lepri alloctone introdotte ed appartenenti a differenti sottospecie. Le traslocazioni di lepri comuni sono iniziate agli inizi del 1900, raggiungendo l'apice dopo la seconda Guerra mondiale, ed includendo vaste regioni dell'Italia centro-meridionale che sono ben oltre la distribuzione naturale della specie (Toschi 1965).

L. capensis mediterraneus, che è stata introdotta in Sardegna nel 16th secolo (Vigne 1992), probabilmente origina da popolazioni nord Africane o Medio Orientali di *L. capensis*, specie ampiamente distribuita in Africa, e con una tassonomia ancora oscura (Suchentrunk *et al.* 1998). Conseguentemente non è chiaro se essa debba essere considerata una sottospecie di *L. capensis* (*L. capensis mediterraneus*; Amori *et al.* 1996), oppure una specie distinta (*L. mediterraneus*; Palacios 1998).

Lepus corsicanus, in passato distribuita in Italia centro-meridionale, Sicilia ed introdotta in Corsica prima del 16° secolo (Vigne 1992), fu descritta nel 1898 dal naturalista inglese W. E. de Winton come specie distinta dalla lepre comune (*Lepus europaeus*) sulla base di alcuni caratteri morfologici esterni osservati su esemplari conservati in collezioni museali. Tuttavia, successivamente e per tutto il secolo scorso, il *taxon* fu declassato a sottospecie di *L. europaeus*, e fu considerato estinto in conseguenza dell'ibridazione con *Lepus europaeus*, immessa massicciamente a fini venatori anche in Italia centro-meridionale (Toschi 1965). Una revisione di reperti museali italiani del genere *Lepus*, raccolti verso la fine del 1800, e la descrizione di nuovi caratteri morfologici diagnostici, ha consentito recentemente di riconfermare lo status di buona specie del *taxon* (Palacios 1996). Questa rivalutazione ha permesso, inoltre, di attribuire a *L. corsicanus* alcuni esemplari raccolti recentemente (1974-1975) in Calabria, e successivamente in Sicilia nel 1994-1996 (Lo Valvo *et al.* 1997). La conferma della presenza di popolazioni di questa specie endemica ha stimolato l'avvio di un nuovo programma di ricerca, avviato dall'INFS nel 1990, finalizzato a documentare le distinzioni tassonomiche ed ecologiche esistenti tra *L. corsicanus* e *L. europaeus*, ed a definire distribuzione geografica e consistenza delle popolazioni di *L. corsicanus* nella penisola ed in Sicilia.

L'INFS ha potuto raccogliere, in Italia centro-meridionale ed in Sicilia, numerosi campioni biologici di lepri che mostrano caratteristiche morfologiche concordanti con la descrizione di *L. corsicanus* (de Winton 1898, Palacios 1996, Riga *et al.* 1998), rendendo possibile l'avvio di approfondite ricerche di genetica molecolare, finalizzate a:

1. descrivere la variabilità genetica esistente nelle popolazioni;
2. ricostruire le relazioni filogenetiche fra *L. corsicanus* ed altre specie italiane e nord africane del genere *Lepus*;
3. delineare un'ipotesi di evoluzione e speciazione del genere *Lepus* in Europa, nell'ambito degli eventi climatici e biogeografici che hanno caratterizzato il Pleistocene;
4. definire marcatori genetici e protocolli di laboratorio che, in associazione ad altri caratteri morfologici e morfometrici, consentano di identificare con precisione esemplari di *L. corsicanus* (anche utilizzando campioni e procedure di genetica non-invasiva) ed eventuali ibridi interspecifici.

I dati genetici disponibili fino ad ora indicano che popolazioni di *L. corsicanus* persistono in Italia centro-meridionale ed in Sicilia, e sono apparentemente isolate riproduttivamente dalle popolazioni di *L. europaeus* con le quali convivono in sinpatia.

Metodi

Le metodiche di analisi genetica consistono:

1. nell'estrazione e conservazione di campioni di DNA da campioni biologici di vario tipo (tessuti, sangue, peli, escrementi);
2. nell'amplificazione selettiva, mediante reazione di polimerizzazione del DNA (PCR), di specifici geni o tratti di DNA (DNA mitocondriale per l'identificazione della specie o della linea materna; loci microsatellite per l'individuazione dei genotipi individuali; sequenze di DNA legate ai cromosomi sessuali per il sesso molecolare; sequenze di geni nucleari per l'identificazione di specifiche mutazioni a geni funzionali);
3. sequenziamento e tipizzazione molecolare dei marcatori genetici amplificati, utilizzando strumentazioni dedicate all'analisi automatica del DNA.

I campioni biologici vengono usualmente conservati in etanolo al 90%. La conservazione in etanolo è molto efficiente nel preservare il DNA e può essere utilizzato direttamente sul campo, limitando quindi il tempo di degradazione del DNA dal momento della raccolta del campione.

Il DNA viene estratto previo digestione (con proteinasi) o distruzione (con guanidina tiocianato) dei tessuti e recupero del DNA tramite precipitazione alcolica od eluizione. Il DNA, diluito in soluzione tampone sterile e conservato congelato a -20°C, è stabile per molti anni. Identificazione della specie.

Il marcatore molecolare più adatto alla determinazione della specie è il DNA mitocondriale (mtDNA) grazie alle sue caratteristiche di evoluzione molecolare ed alla sua grande abbondanza nelle cellule, che lo rende più facilmente amplificabile del DNA nucleare. Il DNA mitocondriale è una molecola aploide, circolare, a filamento doppio, generalmente composta da 20.000-30.000 nucleotidi; che viene ereditata solo per via materna, tranne alcune eccezioni ben note.

Ogni sequenza di mtDNA, definita un "aplotipo", viene trasmessa intatta nel corso delle generazioni, e quindi può essere utilizzata per ricostruire le genealogie nelle popolazioni e per identificare individui che appartengono a differenti popolazioni, sottospecie e specie.

I geni mitocondriali evolvono più rapidamente, in media, dei geni nucleari, e quindi accumulano rapidamente differenze genetiche fra popolazioni di organismi della stessa specie. L'analisi del mtDNA è molto utile per identificare popolazioni che evolvono indipendentemente, gruppi di popolazioni tassonomicamente distinte, eventi di ibridazione e per quantificare il flusso genico fra popolazioni frammentate connesse da migrazione.

Particolari problemi sono posti dalla identificazione di individui ibridi. L'analisi del mtDNA non consente di conoscere il contributo paterno. La soluzione per identificare gli ibridi è quella di usare come marcatori genetici loci microsatellite che presentano differenze nelle frequenze alleliche tra i due taxa parentali. Preferenzialmente dovrebbero essere utilizzati loci che abbiano alleli diversi fissati nelle due popolazioni. I genotipi ibridi vengono poi identificati mediante analisi statistiche.

La capacità di identificare degli ibridi con i microsatelliti diminuisce progressivamente con il passare delle generazioni di incrocio, per cui bisogna aumentare progressivamente il numero di loci analizzati.

Il genotipo di un campione viene ottenuto mediante l'amplificazione di più loci microsatelliti, ciascuno dei quali può essere omozigote o eterozigote per determinati alleli. La combinazione di tutti gli alleli ai diversi loci definisce il genotipo individuale.

I microsatelliti sono sequenze composte da un motivo semplice di 2-8 nucleotidi, che è ripetuto in serie un certo numero di volte; sono presenti nel genoma di tutti gli organismi fino ad ora analizzati e sono distribuiti, in modo più o meno casuale, in tutti i cromosomi. Le sequenze ripetute dei microsatelliti sono fiancheggiate da sequenze a copia singola; che sono utilizzabili per disegnare primer per PCR che consentono di amplificarli.

L'analisi dei genotipi si effettua identificando il peso molecolare degli alleli presenti ad ogni locus tramite elettroforesi. I genotipi individuali sono determinati analizzando separatamente un certo numero di microsatelliti (di solito 6-10).

Per le analisi filogenetiche sono stati utilizzati circa 100 campioni di sette specie di *Lepus* provenienti da diverse località in Europa (Italia, Ungheria, Romania, Serbia), ed east Africa (Etiopia).

Le lepri raccolte in Italia sono state identificate fenotipicamente come *L. europaeus* o *L. corsicanus* 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).

Ulteriori campioni di *L. europaeus* introdotte in Sud America sono stati ottenuti dall'Uruguay. Campioni di *L. capensis mediterraneus* sono stati raccolti in Sardegna, di *L. timidus* nelle Alpi italiane.

Campioni delle specie africane *L. starcki* and *L. habessinicus* provengono dall'Etiopia.

La specie spagnola *L. granatensis* è stata ottenuta da un allevamento locale. E' stata amplificata e sequenziata una parte della regione di controllo del mtDNA. Le sequenze sono state allineate ed analizzate per ricostruire alberi filogenetici.

Per le analisi di genetica delle popolazioni sono stati utilizzati circa 200 campioni di *L. timidus*, *L. europaeus* e *L. corsicanus* provenienti dalle principali aree distributive delle specie in Italia (Alpi, Appennino centro-meridionale, Sicilia). I genotipi individuali sono stati ottenuti tipizzando 13 diversi loci microsatellite originalmente isolati dal genoma di *Lepus* o di coniglio.

La variabilità genetica entro- e tra-specie è stata analizzata e visualizzata mediante metodi di analisi multivariata (Componenti principali).

Risultati

Filogenesi delle specie italiane del genere *Lepus*

Abbiamo sequenziato circa 300 nucleotidi del mtDNA, ottenendo 57 differenti aplotipi (13 in *L. corsicanus*, 22 in *L. europaeus*, 16 in *L. timidus*, 4 in *L. granatensis* e 2 in *L. c. mediterraneus*, più *L. habessinicus* and *L. starcki*), che non sono mai condivisi fra le differenti specie.

In particolare, *L. corsicanus* e *L. europaeus* hanno differenti aplotipi che divergono per una distanza genetica media $D = 0.151$: le distanze genetiche minori sono fra *L. corsicanus* e *L. europaeus* ($D = 0.100$). Le distanze genetiche intraspecifiche in *L. corsicanus*, *L. europaeus* e *L. timidus* sono 50-70% minori delle rispettive distanze genetiche interspecifiche.

L'albero filogenetico mostra una prima e più profonda suddivisione genetica che separa due gruppi: il primo gruppo (clade A) include *L. corsicanus*, *L. timidus* e *L. granatensis*; il secondo gruppo (clade B) include *L. europaeus* e le due specie africane *L. habessinicus* e *L. starcki*, con *L. c. mediterraneus* in posizione basale (fig. 1).

Le sequenze di mtDNA di *L. corsicanus*, *L. timidus* e *L. granatensis* si suddividono in tre distinti gruppi clade monofiletici e concordanti con la classificazione morfologica.

Anche *L. c. mediterraneus*, *L. europaeus*, *L. habessinicus* e *L. starcki* si suddividono in tre distinti gruppi clade monofiletici e concordanti con la classificazione morfologica.

Gli aplotipi mitocondriali individuati nei campioni di *L. corsicanus* si distribuiscono distintamente nell'areale della specie: quelle provenienti dall'Italia centrale presentano tre aplotipi unici (Lco1, Lco-2 e Lco-3), che si raggruppano separatamente da altri aplotipi che sono presenti solo in *L. corsicanus* campionate in Italia meridionale (Lco4 e Lco-5) ed in Sicilia (da Lco6 a Lco-13). Il test AMOVA è significativo ($F_{st} = 0.80$; $p < 0.001$), ed indica una suddivisione genetica ed assenza di flusso genico ($Nm < 0.3$) fra le popolazioni di *L. corsicanus*.

Genetica di popolazione ed assenza di ibridazione fra *L. corsicanus* e *L. europaeus*

L'analisi delle Componenti principali (fig. 2) indica chiaramente che le tre specie sono geneticamente distinte e che nell'insieme dei campioni analizzati, non sono stati trovati individui ibridi (che dovrebbero avere collocazioni intermedie fra le specie). Sono stati anche condotti test di assegnazione che confermano l'assenza di individui ibridi: tutti i campioni identificati morfologicamente e con mtDNA di *L. corsicanus* sono stati assegnati allo stesso gruppo, e nessun individuo è stato assegnato alle altre due specie o è stato identificato come eventuale ibrido.

Figura 1 - Albero filogenetico che descrive le relazioni mitocondriali fra specie del genere *Lepus*.
Le datazioni (esprese in milioni di anni - Myr) indicano l'origine approssimata delle varie linee mitocondriali.

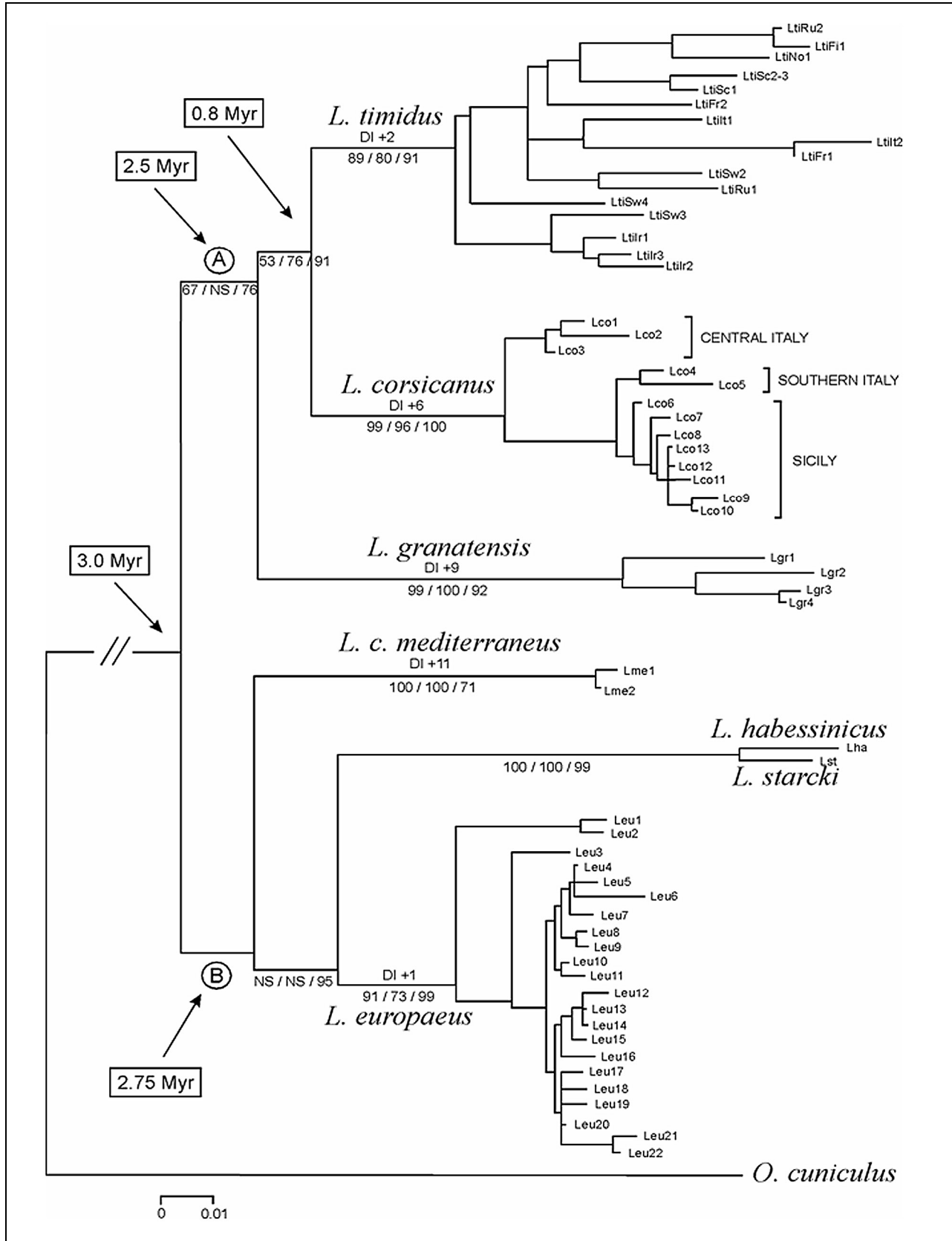
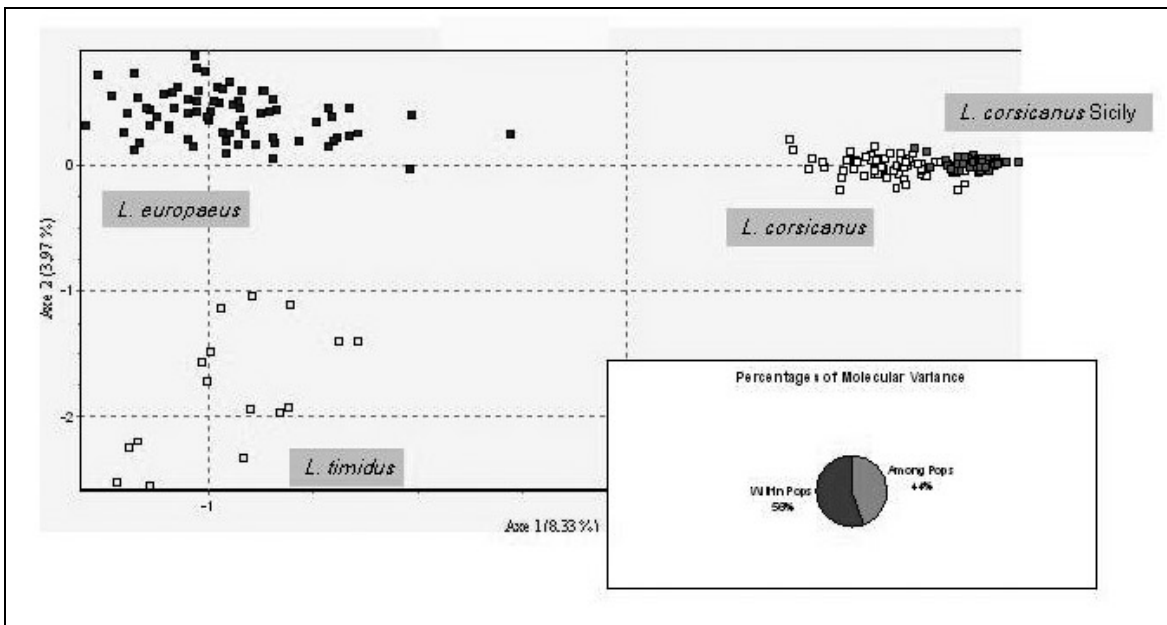


Figura 2 - Analisi multivariata (componenti principali) che descrive la distinzione fra genotipi individuali di *Lepus* identificati tramite la tipizzazione di tredici loci microsatellite.



Discussione e conclusioni

Le sequenze mitocondriali di *L. corsicanus* sono distinte e divergenti dalle sequenze identificate in tutte le altre specie studiate.

Le sequenze identificate in *L. corsicanus* si raggruppano in un clade monofiletico, indicando che l'identificazione genetica è strettamente concordante con le classificazioni morfologiche. Questa concordanza indica inoltre che *L. corsicanus* e *L. europaeus* in aree di simpatria e sintopia (spesso artificialmente create dai ripopolamenti) non condividono alcun genotipo mitocondriale, suggerendo un'assenza di ibridazione e di flusso genico fra le due specie. I risultati delle analisi filogenetiche indicano quindi che *L. corsicanus* e *L. europaeus* hanno una lunga storia di evoluzione indipendente e sembrano essere riproduttivamente isolate in natura. Queste osservazioni: distinti e diagnostici aplotipi mitocondriali; assenza di flusso genico mitocondriale; concordanza fra caratteri molecolari e morfologici (che sono fra di loro indipendenti), indicano che *L. corsicanus* è specie distinta. L'assenza di ibridazione e di flusso genico fra le tre specie di lepri è chiaramente confermata anche dall'analisi dei microsatelliti.

L. europaeus e le altre lepri Eurasiatiche sembrano derivare da differenti linee evolutive. Le analisi del mtDNA indicano che *L. corsicanus* e *L. timidus* sono filogeneticamente vicine. Le attuali distribuzioni indicano che esse sono specie relitte, che ebbero origini anteriori alla dispersione in Europa centro-occidentale di *L. europaeus*, e che occuparono rispettivamente ambienti di tipo Mediterraneo o Alpino.

Applicando una stima dell'orologio molecolare, basata sulla calibrazione standard del mtDNA, che diverge ad un tasso del 2-4% per ogni milione di anni (Myr), la suddivisione fra clade A e clade B avviene circa 6-3 Myr fa. La stima inferiore, 3 Myr, è maggiormente concordante con le datazioni dei reperti fossili che datano le prime evidenze di *Lepus* nel Villafranchiano (ca. 2.5 Myr). La divergenza media fra le specie di *Lepus* è del 10-13%. Perciò queste specie potrebbero essere originate circa 3 Myr fa, cioè durante il passaggio fra Pliocene e Pleistocene, passaggio che fu segnato da importanti cambiamenti climatici e paleogeografici, culminati con l'inizio dei principali cicli glaciali circa 2.5 Myr fa. E' possibile che i cambiamenti climatici Plio/Pleistocenici abbiano determinato l'isolamento allopatrico di popolazioni in aree di rifugio glaciale nel sud delle penisole Iberica, Italiana e Balcanica, favorendo l'origine di nuove specie tramite cicli ripetuti di contrazione ed espansione demografica in Europe and Africa.

La presenza di mtDNA di *L. timidus* in popolazioni di altre specie di lepri, indica antichi e diffusi episodi di ibridazione ed introgressione genetica, ed induce a formulare una ipotesi alternativa. Il mtDNA attualmente presente nelle popolazioni di *L. corsicanus* potrebbe originare da antichi eventi di ibridazione ed introgressione.

Pertanto, la datazione molecolare sopra descritta potrebbe essere relativa esclusivamente alla divergenza fra i genomi mitocondriali dopo l'introggressione di *L. timidus* in *L. corsicanus*. Da questo punto di vista, l'origine delle due specie *L. timidus* e *L. corsicanus* potrebbe essere più antica. L'assenza di introggressione anche a geni nucleari indica isolamento riproduttivo fra le due specie. In questo caso, quindi la semplice analisi del mtDNA consente di identificare con precisione la specie. Sia il mtDNA che i loci microsatellite sono amplificabili e tipizzabili utilizzando procedure di genetica non-invasiva, che consentono di identificare le specie ed i distinti individui presenti nelle aree di studio tramite estrazione di DNA da campioni fecali.

Bibliografia

- Amori G., Angelici F. M., Prigioni C. e Vigna Taglianti A. 1996. The mammal fauna of Italy: A review. *Hystrix* 8: 3-7.
- De Winton W. E. 1898. On the hares of Western Europe and North Africa. *Annual Magazine of Natural History*, London 1: 149-158.
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Lo Valvo M., Barera A. e 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. e Alves P. C. 2005. Invasion from the cold past: extensive introggression 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. e Alves PC 2007. The rise and fall of the mountain hare (*Lepus timidus*) during Pleistocene glaciations: expansion and retreat with ibridization in the Iberian Peninsula *Molecular Ecology* 16: 605-618.
- Palacios F. 1996. Systematics of the indigenous hares of Italy traditionally identified as *Lepus europaeus* Pallas, 1778 (Mammalia: Leporidae). *Bonner zoologische Beitragen* 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. e 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.
- Randi E., Alves P.C., Carranza J., Milošević-Zlatanović S., Sfougaris A. e Mucci N. 2004. Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: the effect of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics. *Molecular Ecology* 23: 3071-3083.
- Riga F., Trocchi V., Randi E. 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.
- Suchentrunk F., Nadlinger K., Alkon P. U. e 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.
- Thulin C. G., Fang M. e Averianov A. O. 2006. Introggression 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.
- 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. 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.