

Analisi del DNA e fauna selvatica: identificazione a scopo forense del muflone sardo attraverso l'uso di marcatori STR e del test di assegnazione bayesiano

Rita Lorenzini^a, Pierangela Cabras^b, Rita Fanelli^a, Giuseppe L. Carboni^c

^a Centro di Referenza Nazionale per la Medicina Forense Veterinaria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Via Tancia 21, 02100 Rieti, Italia.

^b Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Via Aresu 2, 08048 Tortolì, Ogliastra, Italia.

^c Servizio Territoriale Ispettorato Ripartimentale del Corpo Forestale e di V.A. di Lanusei (C.F.V.A. di Lanusei), Via Ilbono 9, 08045 Lanusei, Ogliastra, Italia.

Titolo originale: **Wildlife molecular forensics: identification of the Sardinian mouflon using STR profiling and the Bayesian assignment test**
Rivista: *Forensic Science International: Genetics* 5 (2011), 345-349.

Traduzione di Luisa Garofalo

Riassunto

E' stato messo a punto un test forense basato sull'analisi di marcatori molecolari STR (Short Tandem Repeats o microsatelliti) e sull'utilizzo di un database di popolazione per investigare su un caso di sospetto bracconaggio a carico del muflone sardo. Un presunto bracconiere era stato trovato in possesso di una carcassa, che affermava essere quella di una pecora appartenente al suo gregge e morta accidentalmente. La sua dichiarazione è stata successivamente smentita dai risultati delle analisi molecolari forensi, poiché il DNA e il test di assegnazione bayesiano hanno rivelato che la carcassa era invece di un muflone. Inoltre, il profilo genetico della carcassa coincideva con quello ottenuto da una traccia di sangue raccolta sul luogo dell'uccisione. I risultati genetici hanno consentito di accusare il sospettato di caccia illegale di fauna selvatica protetta.

Le tecniche molecolari, associate all'uso di database di popolazioni di riferimento e ad una appropriata valutazione statistica dei dati, sono fondamentali nei casi forensi riguardanti la fauna selvatica. Questo approccio rende possibile l'ammissibilità del test del DNA in tribunale come prova nei procedimenti contro i reati di bracconaggio e di altri crimini che coinvolgono gli animali selvatici.

1. INTRODUZIONE

Popolazioni mediterranee di muflone (*Ovis aries musimon*) sono confinate a Cipro, in Corsica e Sardegna e in piccole aree della Turchia e del Medio Oriente [1]. Le ulteriori popolazioni di muflone che si ritrovano oggi nella gran parte dell'Europa continentale derivano da introduzioni intraprese intorno alla metà del 1700 [2,3]. A partire dagli anni sessanta il muflone sardo si avvicinò all'estinzione a causa della caccia incontrollata, che determinò la diminuzione della popolazione a circa 400 individui [4]. Nei decenni successivi, e a seguito del miglioramento della legislazione a tutela della fauna selvatica sia a livello nazionale che locale, il numero di mufloni è aumentato attestandosi oggi intorno ai 3000 individui [3]. Sebbene sia protetto dalla Convenzione di Berna e dalla legge italiana come una "specie a protezione speciale" (legge 157-1992), il muflone sardo è classificato come "vulnerabile" secondo la Lista Rossa IUCN (International Union for Conservation of Nature) degli animali a rischio di estinzione [5]. Nonostante questa protezione legislativa ed il suo recente aumento demografico, il muflone in Sardegna resta costantemente minacciato dai cani

randagi, dall'incrocio con la pecora (*Ovis aries aries*) e dal continuo bracconaggio (che rimane ancora la sua principale causa di morte).

Il bracconaggio è una piaga in tutto il mondo. Sia le specie a rischio sia quelle prossime all'estinzione non sfuggono al prelievo illegale persino quando sono mantenute in "rifugi sicuri", che includono aree protette e santuari [6,7]. Tutti gli strumenti investigativi conosciuti devono essere impiegati nella lotta contro il bracconaggio per consentire alle forze dell'ordine di perseguire i colpevoli. Attualmente, si registra un aumento nell'utilizzo delle metodiche molecolari forensi per rafforzare quelle leggi anti-bracconaggio che riguardano la detenzione o il commercio illegale di specie selvatiche protette [6,8,9,10]. Nei laboratori forensi di tutto il mondo vengono oggi condotte regolarmente accurate identificazioni di specie basate sull'analisi del DNA mitocondriale e nucleare a partire da tessuti animali, denti, avorio, squame [11-13] e altre tracce biologiche [7]. Inoltre, le metodologie genetiche vengono impiegate per la determinazione del sesso [14,15], per verificare la paternità e la parentela [16], per risalire alla popolazione di origine di singoli individui [7,13], per riconoscere gli ibridi [17] e gli incroci [18]. L'analisi forense del DNA, utilizzando marcatori molecolari altamente polimorfi detti STR (Short Tandem Repeats), è particolarmente preziosa per confrontare i profili genetici dei singoli individui con le tracce biologiche rinvenute sulla scena del crimine e verificarne la corrispondenza.

Nella genetica forense umana e animale la validità della prova dal DNA deve essere valutata utilizzando un approccio statistico rigoroso, prima di essere ritenuta accettabile per la presentazione in tribunale. I database di popolazioni di riferimento sono essenziali, poiché forniscono le frequenze alleliche (e altri parametri genetici) necessari per determinare la probabilità di identità, la probabilità di corrispondenza casuale, la paternità e gli indici di parentela [19,20]. Anche se gli argomenti riguardano la fauna selvatica, dovrebbero essere seguite le linee guida utilizzate in campo forense umano [21,22].

La disponibilità di database di popolazione è un requisito indispensabile per effettuare analisi genetiche forensi. Tuttavia, molte delle specie selvatiche oggetto di bracconaggio sono altamente protette, rare o elusive; il che rende difficile l'acquisizione delle informazioni genetiche necessarie per i database. Infatti, la carenza di dati genetici di popolazione è uno dei maggiori ostacoli al lavoro dei genetisti forensi che si occupano di fauna selvatica. Questa è la prima volta che viene fornito ed utilizzato per scopi forensi un database basato sull'analisi degli STR del muflone sardo.

Riportiamo qui un caso che ha riguardato il bracconaggio di un muflone, avvenuto nel 2009 in Sardegna. Utilizzando le tecniche molecolari ed il test di assegnazione bayesiano le nostre analisi sono state mirate a: (1) identificare la specie di origine di una carcassa, che si riteneva fosse quella di un animale cacciato illegalmente, e (2) provare che il profilo genetico della carcassa coincideva con quello ottenuto da alcune tracce di sangue rinvenute sul luogo dell'uccisione, per essere in grado di collegare inequivocabilmente il sospettato in possesso della carcassa alla scena del crimine.

2. IL CASO

Il caso riguarda un allevatore che aveva ucciso illegalmente un muflone nella provincia dell'Ogliastra (Sardegna). Sul luogo stesso dell'uccisione, l'uomo aveva rimosso la pelle, i visceri e tutte le altre parti della carcassa che avrebbero permesso l'identificazione dell'animale (Fig. 1), per poi nascondere la carcassa nel suo furgone e fuggire. Subito dopo, era stato fermato dagli Agenti della Forestale in un posto di blocco stradale durante gli ordinari controlli anti-bracconaggio. Qui gli ufficiali avevano scoperto la carcassa nascosta dietro il sedile del guidatore, ma non avevano trovato armi. Interrogato, l'allevatore aveva sostenuto che la carcassa era quella di una pecora del suo gregge, morta accidentalmente. Dopo aver confiscato la carcassa, i Forestali avevano trattenuto l'uomo ed erano ritornati con lui all'ovile per cercare tracce che confermassero o smentissero le sue affermazioni. Sul luogo avevano trovato piccole macchie di sangue fresco misto a terra rimasto su sassi, foglie e ramoscelli. Successivamente, la carcassa e le macchie di sangue erano state inviate al nostro laboratorio per effettuare la necropsia e le analisi molecolari, al fine di supportare o confutare le dichiarazioni dell'allevatore. La necropsia aveva rivelato la presenza sulla carcassa

di ferite da arma da fuoco; mentre i risultati molecolari avevano rivelato che essa apparteneva ad un muflone. Inoltre, i profili genetici della carcassa erano risultati uguali a quelli ottenuti dalle macchie di sangue raccolte nell'ovile. Le varie prove avevano portato a formulare contro il sospetto l'accusa di uccisione illegale di fauna selvatica protetta. Il caso giudiziario è tuttora in corso.



Fig. 1: La carcassa di muflone sequestrata nel 2009 ad un sospetto bracconiere, Ogliastra (Sardegna). Le ferite da arma da fuoco sono indicate dai bastoncini.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Metodi di laboratorio

Per costruire un database di frequenze alleliche è stato prelevato il sangue intero di 96 pecore provenienti da diversi allevamenti sardi; inoltre nel periodo 2003-2009 sono stati ottenuti 58 campioni (muscolo o sangue) di mufloni morti accidentalmente oppure prelevati da animali vivi durante i controlli sanitari di routine.

Il DNA è stato estratto utilizzando i kit della Qiagen (QIAamp Tissue e QIAamp Blood Mini), seguendo le istruzioni riportate. I reperti erano costituiti da macchie di sangue secco rimosse dalla superficie di foglie, ramoscelli e sassi, e da una porzione di muscolo prelevato dalla carcassa. Il DNA delle tracce (tre macchie ciascuno da un sasso, una foglia e un ramoscello) sono state isolate durante sessioni separate di estrazione, condotte in una stanza apposita (laboratorio di estrazione di DNA da campioni forensi), utilizzando il kit DNA IQTM Casework Sample e l'estrattore automatico Maxwell 16 LEV System (Promega). Due controlli negativi (reagenti senza l'aggiunta di DNA) sono stati inclusi durante ogni tornata di estrazione per controllare l'assenza di contaminazione nel laboratorio.

Tutti gli individui utilizzati per il database di riferimento sono stati genotipizzati per 16 marcatori microsatellite specifici per gli ungulati, scelti per il loro livello di polimorfismo e per la possibilità di amplificarli in PCR multiplex. Nelle pecore i marcatori microsatellite selezionati si trovano su differenti cromosomi o sullo stesso cromosoma, ma comunque sufficientemente lontani da rendere trascurabile il linkage disequilibrium dovuto all'associazione non-casuale. Per informazioni

dettagliate sui marcatori microsatellite visitare i siti: FAO/ISAG (<http://www.isag.org.uk>) e sheep genome map (<http://www.livestockgenomics.csiro.au>).

Per amplificare più marcatori contemporaneamente sono state ottimizzate delle PCR multiplex: una a 5 marcatori STR (OarCP0049, CRSD0247, INRA0063, HSC e MAF0214), due a 4 marcatori STR (OarFCB0020, D5S2, INRA0023, McM0527 e INRA006, INRA172, ILST0087, INRA0005), una a 3 marcatori STR (McM42, TGLA53 e INRA49). La marcatura della fluorescenza e le condizioni di reazione delle multiplex sono disponibili su richiesta. 1,5 µl di prodotto di PCR diluito sono stati mescolati con 15 µl di formammide HD, riscaldati a 95°C per 2 minuti, tenuti a 4°C per almeno 2 minuti e caricati sul sequenziatore ABI Prism™ 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). L'assegnazione delle dimensioni dei frammenti è stata effettuata utilizzando il software GeneMapper versione 4.0. La morfologia dei frammenti STR è stata esaminata visivamente da due persone. Lo stesso protocollo di PCR è stato utilizzato per genotipizzare sia i campioni di mufloni e pecore per il database di popolazione, sia i campioni forensi in questione. Ogni amplificazione conteneva anche controlli negativi di estrazione e di amplificazione. Per evitare la cross-contaminazione tra campioni, non sono stati utilizzati controlli positivi durante l'amplificazione dei campioni forensi.

3.2 Analisi genetiche di popolazione

I parametri genetici per le popolazioni di riferimento (frequenze alleliche, deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg, HWE, e test per il linkage equilibrium tra coppie di marcatori) sono stati calcolati utilizzando il software Genepop versione 4.0.1 [23] ed il software Genetix versione 4.0.5 [24]. Nel test per rilevare eventuali deviazioni dall'HWE e nel test per il linkage disequilibrium è stata applicata la correzione di Bonferroni per confronti multipli [25, 26]. Sono stati anche stimati i coefficienti F_{IS} e F_{ST} [27] per valutare i livelli di inincrocio e di differenziamento tra le popolazioni di pecora e di muflone.

Per assegnare correttamente la carcassa alla sua popolazione di origine è stato applicato l'algoritmo "model-based clustering", come calcolato dal programma Structure, versione 2.3.2 [28]. Questo metodo bayesiano utilizza i genotipi multilocus per identificare i gruppi di individui geneticamente simili senza assumere un particolare processo di mutazione; il software individua un numero K di popolazioni che sono in HWE e che mostrano un linkage equilibrium tra i marcatori. Se le popolazioni sono geneticamente differenziate, gli individui vi vengono assegnati in assenza di altre informazioni non-genetiche. La probabilità per ogni valore di K è stata calcolata dalla probabilità *a posteriori* stimata dai dati. Se l'intero pool genico contiene popolazioni differenziate, il valore di K prescelto (il più probabile) è quello a cui è associata la probabilità *a posteriori* più alta. L'appartenenza di un genotipo alle K popolazioni individuate viene espressa da un valore medio, q_i . Per l'inclusione degli individui in una delle popolazioni individuate è stata determinata una soglia di $q_i > 0.90$ (vedi Sezione 4). Sono state effettuate 4 corse indipendenti con $K = 1-3$, utilizzando 10^5 repliche ed un periodo di "burn-in" di 10^4 repliche. Sono state scelte le seguenti opzioni disponibili in Structure: (1) il modello "admixture" (mescolamento), che consente di far originare un singolo individuo da più di una popolazione tra quelle individuate, (2) il modello per le frequenze alleliche correlate, il quale assume che per alcune popolazioni derivate dalla popolazione originaria le frequenze alleliche in ogni popolazione siano correlate con quelle della popolazione ancestrale, (3) il modello che non implica alcuna informazione di partenza sulle popolazioni, ovvero che considera tutti gli individui come appartenenti ad un unico pool genico, senza popolazioni definite *a priori*. L'impiego di questa ultima opzione è stata consigliata da Ball et al. [29] per le applicazioni in genetica forense.

L'attendibilità dell'analisi del DNA è stata testata per mezzo del calcolo della probabilità media di identità (P_{ID}) e della probabilità di coincidenza casuale (Random Match Probability, RMP) [21], utilizzando i software Gimlet versione 1.3.3 [30] e API-CALC versione 1.0 [31]. Le stime di P_{ID} sono state ottenute per determinare la probabilità che due individui presi a caso in una popolazione

mostrino lo stesso genotipo multilocus per il solo effetto del caso. Contemporaneamente, il test ha valutato se il numero dei marcatori scelti producesse un valore di P_{ID} sufficientemente basso per la popolazione di muflone di riferimento, ovvero se fornisse un potere discriminatorio sufficiente per identificare singolarmente gli individui nelle analisi forensi. È stata utilizzata sia l'equazione standard per stimare P_{ID} per marcatori co-dominanti [32] sia le equazioni per stimare P_{ID} che tengano conto della consanguineità, ovvero delle relazioni tra genitori/figli e tra fratelli [33]; quest'ultima equazione restituisce un valore di P_{ID} che rappresenta il limite superiore conservativo per l'identificazione individuale nelle popolazioni selvatiche che hanno subito un drastico calo nella dimensione della popolazione ed in cui, di conseguenza, gli accoppiamenti tra consanguinei sono più frequenti rispetto ad accoppiamenti casuali [34]. Inoltre, la probabilità di identità è stata derivata includendo il coefficiente di inincrocio F_{IS} ottenuto per la popolazione di muflone. Nella genetica forense umana l'accoppiamento tra consanguinei è generalmente basso, gioca quindi un ruolo trascurabile nelle equazioni di probabilità di identità.

Nel sistema riproduttivo delle specie selvatiche al contrario, l'effetto del fondatore e le ridotte dimensioni delle popolazioni possono influenzare significativamente i livelli di inincrocio. Ecco perché le stime di F_{IS} dovrebbero essere incluse nel calcolo dei parametri che valutano l'affidabilità dell'analisi del DNA nei casi forensi.

In ultimo, il RPM è stato calcolato per verificare che il profilo genetico ottenuto dalle macchie di sangue ritrovate nell'ovile del sospettato provenisse dalla carcassa del muflone braconato e non da un altro muflone che, del tutto casualmente, avesse lo stesso genotipo; gli RPM sono stati derivati utilizzando sia l'equazione per individui non imparentati, sia quella per individui imparentati (per le coppie genitori/figli e per le coppie di fratelli) ed infine utilizzando il valore stimato di F_{IS} .

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Identificazione della specie

I profili genetici su 16 marcatori, ottenuti dai campioni di riferimento di pecore e mufloni, sono stati utilizzati per costituire i rispettivi database di popolazione. Questa fase preliminare è stata necessaria perché non erano disponibili per il muflone sardo dati genetici che potessero essere impiegati per risolvere il caso forense qui descritto. Sono stati inoltre genotipizzati tutti i 16 marcatori della carcassa confiscata.

La pecora e il muflone sono geneticamente molto vicini, quest'ultimo è infatti considerato la controparte selvatica della prima. Come detto in precedenza, non è possibile discriminare le due sottospecie utilizzando marcatori mitocondriali o SNP (Single Locus Polymorphism). La sottospecie di appartenenza della carcassa è stata quindi identificata tramite un test di assegnazione bayesiano che si basa sui dati di frequenza allelica. Per prima cosa è stata verificata l'indipendenza dei marcatori e il rispetto dell'HWE, che sono i pre-requisiti per poter applicare i test di assegnazione. Se non si verifica tale indipendenza, le stime della probabilità di appartenenza degli individui ad una popolazione potrebbero risultare falsate. I confronti tra le coppie di marcatori, effettuati per rilevare deviazioni dal linkage equilibrium, sono risultati significativi in 8 casi su 120 (7%), dopo aver applicato la correzione di Bonferroni. Poiché i confronti significativi tra coppie di marcatori erano limitati alla sola popolazione di muflone, è stato scelto di includere nelle analisi successive l'intero set di marcatori.

I test di probabilità utilizzati per evidenziare scostamenti dall'HWE hanno rivelato (dopo aver applicato la correzione di Bonferroni) un significativo deficit di eterozigoti ($p < 0.001$) per tre marcatori nella popolazione di muflone (INRA023, INRA172 e ILST087) e per due nella popolazione di pecore (McM527 e TGLA53). Cornuet et al. [35] hanno dimostrato tramite simulazioni che un leggero deficit di eterozigoti ha uno scarso effetto nei risultati dei test di assegnazione.

Il valore stimato di F_{ST} tra pecore e mufloni è risultato 0.25 (0.19-0.31; 95% di probabilità, 1000 repliche di “bootstrap”). Questo valore mostra che le due popolazioni sono sufficientemente differenziate da assicurare un alto livello di confidenza quando il test di assegnazione viene impiegato per identificare la popolazione di origine del campione esaminato. I risultati ottenuti da Manel et al. [36] dalle simulazioni e da dati reali hanno evidenziato che circa 10 marcatori, con una eterozigotità attesa (H) di 0.60 e un valore di F_{ST} di 0.20 per le due popolazioni (30-50 individui per popolazione), producono circa il 100% dell'accuratezza nell'assegnazione. I nostri risultati, nei quali 14 su 16 marcatori avevano $H > 0.60$, sono ampiamente confrontabili con quelli di Manel et al. [36].

Una volta soddisfatti tutti i pre-requisiti, è stato applicato l'approccio bayesiano per distinguere le popolazioni e per assegnare correttamente la carcassa alla sua popolazione di origine. Mediante l'utilizzo di Structure i genotipi multilocus individuali sono stati raggruppati in K gruppi panmittici. Impostando K come non noto *a priori*, la probabilità *a posteriori* più elevata è stata ottenuta con $K=2$; ciò significa che l'insieme dei nostri dati indica la presenza di due popolazioni geneticamente distinte. I valori medi percentuali di appartenenza (q) sono risultati 0.992 per il gruppo delle pecore e 0.930 per quello dei mufloni. Per assegnare un individuo ad una determinata popolazione è stata scelta la soglia di probabilità a $q_i > 0.90$, poiché è la soglia al di sopra della quale tutti i campioni di pecora vengono correttamente assegnati alla loro popolazione. Non ci si attende infatti che le pecore abbiano genotipi misti (pecora x muflone), a differenza del muflone per il quale ci si aspetta che possa incrociarsi con la pecora; possibilità, questa, favorita dalla consuetudine degli allevatori sardi di far pascolare le pecore allo stato brado in zone aperte. A causa di ciò, occasionalmente, individui incrociati entrano a far parte della popolazione di mufloni, con conseguente introggressione di alleli delle pecore; i genotipi misti risultanti possono essere casualmente campionati nelle popolazioni di muflone. Secondo i loro valori individuali q_i (> 0.95) tutte le 96 pecore sono state correttamente assegnate alla loro popolazione di origine; anche per 47 dei 58 mufloni (81%) i valori di $q_i > 0.93$ hanno permesso la corretta assegnazione alla loro popolazione di origine. I rimanenti 11 campioni, inizialmente identificati dalla morfologia come mufloni perché privi di caratteristiche fenotipiche distintive delle pecore, hanno mostrato un'origine mista poiché i loro valori di q_i andavano da 0.29 a 0.43, posizionandoli quindi parzialmente all'interno della popolazione di pecore. La carcassa oggetto di indagine è stata assegnata alla popolazione di muflone ($q_i > 0.99$). Ciò dimostra che l'allevatore sospettato ha mentito nel dichiarare che essa appartenesse ad una pecora del suo gregge. Nonostante la percentuale relativamente alta (19%) di genotipi misti, le popolazioni di pecora e di muflone sono rimaste nettamente separate (Fig. 2). I genotipi misti potrebbero essere incroci di seconda generazione o reintroci e, per questo, potrebbero aver diluito il contributo degli alleli di pecora nel pool genico attuale dei mufloni, permettendo ancora la netta distinzione tra le due popolazioni. Di conseguenza, l'approccio bayesiano è servito per assegnare correttamente gli individui alla loro popolazione di origine, facilitando l'identificazione certa della carcassa di muflone.

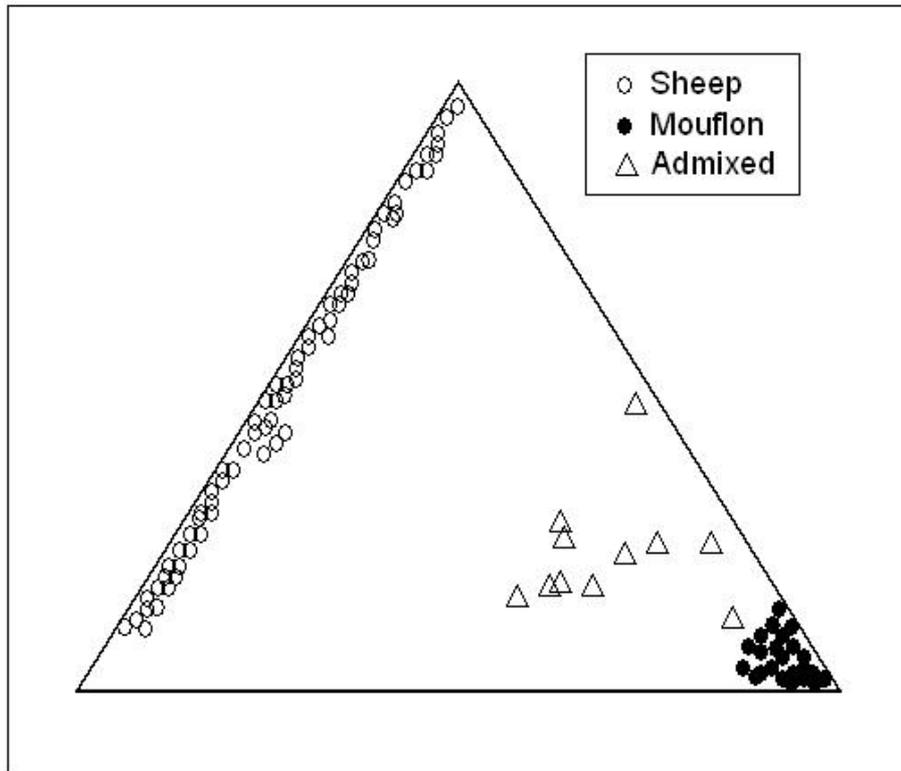


Fig. 2. Rappresentazione grafica a triangolo dei risultati ottenuti con Structure. Si può osservare la netta separazione dei mufloni (cerchi pieni) dalle pecore (cerchi vuoti); gli individui misti sono indicati dai triangoli vuoti.

4.2 Il confronto con i campioni ritrovati sul luogo dell'uccisione

Il DNA è stato estratto con successo da tutte le nove macchie di sangue che sono state raccolte nell'ovile dell'allevatore sospettato. I genotipi completi su 16 marcatori sono stati ottenuti da tutti i campioni eccetto uno. Questi profili genetici sono risultati perfettamente coincidenti con quello ottenuto dalla carcassa. Le probabilità di identità nella popolazione di muflone sono state calcolate utilizzando le frequenze alleliche del database, ottenute includendo nel loro calcolo anche i genotipi misti, proprio perché morfologicamente indistinguibili dai mufloni puri. I valori di P_{ID} sono stati stimati per differenti livelli di parentela. La probabilità stimata che due mufloni qualsiasi non imparentati condividessero lo stesso genotipo multilocus per il solo effetto del caso è risultata di circa 1 su 22 milioni (Tabella 1). Diminuisce solo leggermente (1 su 20 milioni) una volta incluso il valore stimato di F_{IS} (0.19), come ci si aspetta nel caso di marcatori multiallelici con una eterozigotità moderatamente alta [31]. In pratica, solo valori che riflettono parentele molto strette varieranno significativamente dai valori ottenuti per individui non imparentati, differendone da uno a quattro ordini di grandezza [34]. Come atteso, i valori di P_{ID} per le coppie di genitori/figli diminuiscono fortemente (1 su 23 000) in confronto agli stessi valori per individui non imparentati, scendendo a 1 su 2 300 per i fratelli. La popolazione sarda di muflone è costituita attualmente da circa 3 000 capi; ciò rende altamente improbabile che due individui qualsiasi presi a caso da questa popolazione mostrino lo stesso profilo genetico su 16 marcatori, anche nel caso in cui essi siano strettamente imparentati.

Le probabilità di corrispondenza (RMP) per il profilo analizzato in questo caso (Tabella 1) sono risultate di 1 su 33 miliardi per individui non imparentati e di 1 su 80 milioni una volta incluso nel calcolo il valore attuale di F_{IS} . Se supponiamo per ipotesi che tutta la popolazione sia costituita da fratelli, il RMP ottenuto risulta essere di 1 su 5 600. Quindi, anche considerando questa situazione limite, le prove rendono 5 600 volte più probabile che le macchie di sangue provengano dalla carcassa confiscata all'allevatore piuttosto che da un altro muflone qualsiasi preso a caso dalla popolazione. Di conseguenza, la tesi dell'allevatore, in base alla quale la carcassa trovata nel suo furgone apparteneva a una pecora del suo gregge, ovviamente non era più sostenibile. Pertanto, l'uomo è stato successivamente incriminato per bracconaggio di fauna selvatica protetta.

I risultati del nostro lavoro indicano che il sistema da noi utilizzato per ottenere un profilo genetico su 16 marcatori è sufficientemente sensibile per l'identificazione e il confronto individuale del muflone sardo per scopi forensi.

5. CONCLUSIONI

I database di frequenze alleliche sono essenziali quando vi è la necessità di identificare tramite metodi molecolari la popolazione di origine di individui a partire da campioni biologici. In ogni caso, affinché un test di assegnazione sia efficace, le popolazioni in esame devono essere geneticamente differenziate. Tali database di popolazione sono molto utili nei casi forensi che riguardano la fauna selvatica, specialmente quando l'assegnazione di campioni forensi coinvolge specie geneticamente simili e quando non sono disponibili altri marcatori specie-specifici. Questo studio ha dimostrato che un pannello adeguato di marcatori STR (Short Tandem Repeats) facilita l'identificazione attendibile di una specie anche quando sono a disposizione solo piccole tracce biologiche come prove. In particolare, nel nostro caso nove macchie di sangue sono state ricondotte alla carcassa di muflone sardo cacciato illegalmente.

Negli ultimi due decenni la genetica forense è stata impiegata sempre più nella risoluzione di numerosi crimini ambientali, che includono anche la caccia illegale di specie selvatiche protette. Finora, molti di questi crimini sono stati difficili da risolvere, con la conseguenza che i colpevoli non sono mai stati condannati.

Tabella 1. Valori della probabilità media di identità (P_{ID}) per la popolazione di muflone e la probabilità di corrispondenza casuale (RMP: Random Match Probability) per il caso di studio, calcolata per individui non imparentati, per coppie genitori/figli, per fratelli ed utilizzando il coefficiente stimato di F_{IS} (0.19). I rapporti di verosimiglianza sono mostrati in parentesi.

		P_{ID}	RMP
Individui imparentati	non	4.6×10^{-8} (1 su 22 milioni)	3.0×10^{-11} (1 su 33 miliardi)
F_{IS}		5.0×10^{-8} (1 su 20 milioni)	1.2×10^{-8} (1 su 80 milioni)
Genitori/figli		4.3×10^{-5} (1 su 23 000)	1.9×10^{-6} (1 su 526 000)
Fratelli		4.4×10^{-4} (1 su 2 300)	1.8×10^{-4} (1 su 5 600)

Bibliografia

- [1] D.E. Wilson, D.M. Reeder (Eds), *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*, third ed., Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA, 2005.
- [2] M. Spagnesi, A.M. De Marinis (Eds.), *Mammiferi d'Italia*, Quad. Cons. Natura, 14, Min. Ambiente, Ist. Naz. Fauna Selvatica, 2002 (in Italian).
- [3] Boitani, S. Lovari, A.Vigna Taglianti (Eds), *Fauna d'Italia Mammalia III Carnivora-Artiodactyla*, Calderini, Bologna, 2003 (in Italian).
- [4] F. Cassola, Management and conservation of the Sardinian mouflon. An outline, in: S. Lovari (Ed.), *Biology and Management of Mountain Ungulates*, Croom-Helm, London, UK, 1985, pp. 197-203.
- [5] International Union for Conservation of Nature, IUCN Red List of Threatened Animals, <http://www.iucnredlist.org>, accessed on 2010.
- [6] S.K. Wasser, W.J. Clark, O. Drori, E.S. Kisamo, C. Mainland, B. Mutayoba, M. Stephens, Combating the illegal trade in african elephant ivory with DNA forensics, *Conserv. Biol.* 22 (2008) 1065-1071.
- [7] R. Lorenzini, DNA forensics and the poaching of wildlife in Italy: a case study. *Forensic Sci. Int.* 153 (2005) 218-221.
- [8] R. Ogden, N. Dawnay, R. McEwing, Wildlife forensics – bridging the gap between conservation genetics and law enforcement, *Endang. Species Res.* 9 (2009) 179-195.
- [9] J.C. Marín, C.E. Saucedo, P. Corti, B.A. Gonzáles, Application of DNA forensic techniques for identifying poached guanacos, *J. Forensic Sci.* 54 (2009) 1073-1076.
- [10] R.M. Jobin, D. Patterson, Y. Zhang, DNA typing in populations of mule deer for forensic use in the Province of Alberta, *Forensic Sci. Int. Genet.* 2 (2008) 190-197.
- [11] C. Mainland, S.K. Wasser, Isolation of DNA from small amounts of elephant ivory, *Nat. Protocols* 9 (2007) 2228-2232.
- [12] H. Hsieh, J.C. Lee, J. Wu, C. Chen, Y. Chen, G. Wang, S. Chin, L. Wang, A. Linacre, L. Tsai, Establishing the pangolin mitochondrial D-loop sequences from the confiscated scales, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2010), doi:10.1016/j.fsigen.2010.06.003.
- [13] R. Caniglia, E. Fabbri, C. Greco, M. Galaverni, E. Randi, Forensic DNA against wildlife poaching: Identification of a serial wolf killing in Italy, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (2010) 334-338.
- [14] B. van Asch, C. Alves, L. Santos, R. Pinheiro, F. Pereira, L. Gusmão, A. Amorim, Genetic profiles and sex identification of found-dead wolves determined by use of an 11-marcatori PCR multiplex, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (2010) 68-72.
- [15] S.K. Gupta, K. Thangaraj, L. Singh, A simple and inexpensive molecular method for sexing and identification of the forensic samples of elephant origin, *J. Forensic Sci.* 51 (2006) 805–807.

- [16] S.K. Gupta, J. Bhagavatula, K. Thangaraj, L. Singh, Establishing the identity of the massacred tigress in a case of wildlife crime, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2010), doi:10.1016/j.fsigen.2010.05.004.
- [17] L. Congiu, I. Dupanloup, T. Patarnello, F. Fontana, R. Rossi, G. Arlati, L. Zane, Identification of interspecific hybrids by amplified fragment length polymorphism: the case of the sturgeon, *Mol. Ecol.* 10 (2001) 2355-2359.
- [18] A. Verardi, V. Lucchini, E. Randi, Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis, *Mol. Ecol.* 15 (2006) 2845-2855.
- [19] N. Dawnay, R. Ogden, R.S. Thorpe, L. Pope, D.A. Dawson, R. McEwing, A forensic STR profiling system for the Eurasian badger: a framework for developing profiling systems for wildlife species, *Forensic Sci. Int. Genet.* 2 (2008) 47-53.
- [20] N. Dawnay, R. Ogden, J.H. Wetton, R.S. Thorpe, R. McEwing, Genetic data from 28 STR markers for forensic individual identification and parentage analyses in 6 bird of prey species, *Forensic Sci. Int. Genet.* 3 (2009) e63-e69.
- [21] I.W. Evett, B.S. Weir, *Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists*, Sinauer Associates, Sunderland MA USA, 1998.
- [22] D.J. Balding, *Weight of Evidence for DNA Profiles*, John Wiley & Sons Inc., Great Britain, 2005.
- [23] F. Rousset, GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux, *Mol. Ecol. Resour.* 8 (2008) 103-106.
- [24] K. Belkhir, P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste and F. Bonhomme, GENETIX 4.05, population genetic software in Windows TM, Genome Laboratory, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, University of Montpellier II, Montpellier, France (1996–2004) (in French).
- [25] W.R. Rice, Analyzing tables of statistical tests, *Evolution* 43 (1989) 223-225.
- [26] S.W. Guo, E.A. Thompson, Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48 (1992), 361–372.
- [27] B.S. Weir, C.C. Cockerham, Estimating F-statistics for the analysis of population structure, *Evolution* 38 (1984), 1358–1370.
- [28] D. Falush, M. Stephens, J.K. Pritchard, Inference of population structure using multilocus genotype data: linked markers and correlated allele frequencies, *Genetics* 164 (2003) 1567–1587.
- [29] M.C. Ball, L.A. Finnegan, T. Nette, H.G. Broders, P.J. Wilson, Wildlife forensics: “supervised” assignment testing can complicate the association of suspect cases to source populations, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2010), doi:10.1016/j.fsigen.2010.02.002.
- [30] N. Valière, Gimlet: a computer program for analyzing genetic individual identification data, *Mol. Ecol. Notes* 2 (2002) 377–379.

- [31] K.L. Ayres, A.D.J. Overall, API-CALC 1.0: a computer program for calculating the average probability of identity allowing for substructure, inbreeding and the presence of close relatives, *Mol. Ecol. Notes* 4 (2004) 315–318.
- [32] D. Paetkau, C. Strobeck, Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Mol. Ecol.* 3 (1994) 489–495.
- [33] P. Taberlet, G. Luikart, Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biol. J. Linn. Society* 68 (1999) 41–55.
- [34] L.P. Waits, G. Luikart, P. Taberlet, Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines, *Mol. Ecol.* 10 (2001) 249–256.
- [35] J.M. Cornuet, S. Piry, G. Luikart, A. Estoup, M. Solignac, New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals, *Genetics* 153 (1999) 1989–2000.
- [36] S. Manel, P. Berthier, G. Luikart, Detecting wildlife poaching: identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes, *Conserv. Biol.* 16 (2001) 650–659.

Ringraziamenti

Gli Autori ringraziano la Dr.ssa Franca Congiu, Dirigente del Servizio Territoriale Ispettorato Ripartimentale Del Corpo Forestale e di V.A. di Lanusei, per aver condiviso l'idea di ricorrere alle analisi genetiche per contrastare il fenomeno del bracconaggio del muflone sardo. Si ringraziano inoltre: il Responsabile e gli Agenti del Nucleo Investigativo di Polizia Ambientale e Forestale di Lanusei per avere, nell'ambito dell'attività istituzionale, assicurato e fornito il materiale genetico utile alla ricostruzione dei fatti, il personale del Corpo Forestale e di V.A. delle Stazioni Forestali di Baunei, Lanusei, Seui, Tortolì, Ulassai e Villagrande Strisaili, il Dr. Dino Garau, Direttore del Servizio Veterinario della ASL di Lanusei e il Dr. Marco Muzzeddu, responsabile per l'Ente Foreste della Sardegna del centro recupero fauna selvatica di Bonassai (SS) per aver fornito campioni di muflone sardo. Grazie al Dr. Rosario Fico per aver effettuato la necropsia del muflone bracconato. Siamo grati a Rudy Meiswinkel per l'aiuto fornito alla versione inglese del manoscritto e al Prof. Sandro Lovari per i suoi utili commenti.