

Davide Palumbo*, Marta Maria Ciucani**, Marco Galaverni***, Patrizia Serventi****, Gloria Ravegnini*****,
Sabrina Angelini*****, Romolo Caniglia*****, Giorgio Gruppioni**, Elisabetta Cilli**

Il lupo che venne dal freddo: i reperti di ex Cava a Filo rivelano l'antica origine del lupo italiano (*Canis lupus italicus*, Altobello 1921) attraverso lo studio del DNA antico

Riassunto

L'origine e l'unicità genetica del lupo italiano (*Canis lupus italicus*) sono state oggetto di diversi studi. Recenti pubblicazioni descrivono la distribuzione spazio-temporale di due ecomorfi, uno dei quali (HG2), associato alla megafauna pleistocenica, era dominante in Eurasia e in America durante l'ultimo massimo glaciale (LGM). In seguito al successivo cambiamento climatico un "nuovo" ecomorfo (HG1) ha sostituito i lupi preesistenti in Nord America, ed è divenuto progressivamente dominante in Eurasia. La popolazione italiana attuale è l'unica sopravvissuta interamente riferibile all'ecomorfo antico, ma le dinamiche che hanno portato a questa situazione non sono ben definite. I reperti di ex Cava a Filo (16 campioni, datati da circa 25000 a circa 17400 anni fa) sono stati analizzati allo scopo di confrontare una regione del DNA mitocondriale con sequenze antiche e moderne di lupi e cani. Dai risultati emergono analogie con lupi antichi dell'Europa settentrionale e della Beringia, lupi moderni e anche cani primitivi e recenti. Alcuni campioni mostrano una notevole similitudine con i lupi italiani contemporanei. I lupi preistorici di ex Cava a Filo, associati a bisonti e megaceri, appartenevano solo alla popolazione riferita a HG2, caratterizzata da una maggiore variabilità e in continuità con la situazione attuale. Presumibilmente l'ondata migratoria dei lupi con HG1 non ha raggiunto l'Italia in numeri significativi, facendo della penisola italiana l'ultimo rifugio di un'antica popolazione di lupo un tempo diffusa nell'intero emisfero nord.

Parole chiave: *Canis lupus*, DNA antico, DNA mitocondriale, ex Cava a Filo, Pleistocene

Abstract

The origin and the genetic uniqueness of the Italian grey wolf (Canis lupus italicus) have been the subject of several studies. Recent works describe the spatial-temporal distribution of 2 ecomorphs, one of which (HG2), associated to Pleistocene megafauna, was dominant in Europe and America during the last glacial maximum (LGM). After the following climate change a "new" ecomorph (HG1) has totally replaced the pre-existing North-American wolf and has become progressively dominant in Eurasia. The contemporary Italian wolf population is the only remnant population entirely referable to the ancient ecomorph, but the dynamics that led to this situation are not well defined. The fossils from ex Cava a Filo (16 samples ranging from about 25000 ya to 17400 ya) were analysed and a region of mitochondrial DNA was compared with ancient and modern sequences of wolves and dogs. The results show similarities with ancient wolves from northern Europe and Beringia, modern wolves and also primitive and contemporary dogs. Some samples appear to be closely related to the contemporary Italian wolves. The prehistoric wolves from Cava a Filo, associated to bison and "Irish elk", belong only to the HG2 wolf population, characterised by a larger variability and in continuity with the present age. Presumably the migratory wave from East of wolf HG1 did not reach Italy in substantial numbers, making the Italian Peninsula the last stronghold of an ancient and once widespread wolf lineage.

Keywords: *Canis lupus*, ancient DNA, mitochondrial DNA, ex Cava a Filo, Pleistocene

* Biosfera Itinerari, Porretta Terme (Bo) - email: palumbodavide.biosfera@gmail.com

** Laboratori di Antropologia Fisica e DNA Antico, Dipartimento di Beni Culturali, Università di Bologna, Campus di Ravenna - email: martamariaciucani@gmail.com; email: giorgio.gruppioni@unibo.it; email: elisabetta.cilli@unibo.it

*** WWF Italia, Conservation Unit, Roma - email: marco.galaverni@isprambiente.it

**** Laboratorio di Antropologia Molecolare, Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali, Università di Bologna, Bologna; Laboratori di Antropologia Fisica e DNA Antico, Dipartimento di Beni Culturali, Università di Bologna, Campus di Ravenna - email: patrizia.serventi2@unibo.it

***** Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (FaBit), Università di Bologna, Bologna - email: gloria.ravegnini2@unibo.it; email: s.angelini@unibo.it

***** Laboratorio di Genetica, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Ozzano dell'Emilia, Bologna - email: romolo.caniglia@isprambiente.it

Canis lupus italicus

La popolazione italiana di lupo è stata descritta scientificamente per la prima volta nel 1921 da Giuseppe Altobello, basandosi sui caratteri morfologici di esemplari osservati prima in campo tra l'Abruzzo e il Molise e successivamente catturati, catalogati e studiati anche confrontandoli con altri esemplari provenienti dal resto d'Europa. Tra i criteri presi in analisi dallo zoologo Altobello vi erano la dimensione e la forma del cranio, la dimensione dei denti, colorazione della pelliccia e taglia corporea.

“Siccome questo nostro lupo differisce dalle altre forme conosciute, credo opportuno distinguere anch'esso con un nome, e siccome abita, oltre che l'Abruzzo e il Molise, tutto l'Appennino centrale e meridionale così possiamo chiamarlo per riconoscerlo dalle altre tre specie europee: *C. lupus italicus*.” (ALTOBELLO 1921).

Da allora questa suddivisione è stata sia oggetto di critica sia di supporto da numerosi studiosi. Pocock nel 1935 rigettò infatti l'ipotesi dell'esistenza di questa sottospecie affermando che i termini *C. l. lupus* e *C. l. italicus* fossero sinonimi e altrettanto fecero Corbet (1978), Sokolov e Rossolimo (1985) e Nowak (1995) senza però riconsiderare le valutazioni presentate da Altobello o promuovere un riesame dei campioni. Ellerman e Morrison-Scott (1966) invece accettarono la validità di questa sottospecie nella loro pubblicazione mentre Nowak e Federoff (2002) presentando uno studio comparativo delle misurazioni prese da 10 crani di lupi di Altobello, 91 di lupi Eurasiatici e 20 di cani domestici, poterono supportare l'ipotesi della separazione della sottospecie *Canis lupus italicus* da quella nominale (NOWAK, FEDEROFF 2002). Tale divisione è appoggiata anche dalle evidenze genetiche espresse in una pubblicazione già a partire dagli anni 90 quando Wayne e colleghi analizzarono la variabilità genetica di lupi provenienti da 26 aree geografiche di America, Europa e Asia riscontrando la presenza di un aplotipo mitocondriale¹ unico nel territorio italiano (WAYNE *et alii* 1992). Nonostante i dati genetici e morfometrici gettino luce sulla netta distinzione della sottopopolazione appenninica, attualmente lo status di sottospecie non risulta essere universalmente riconosciuto da tutti i gruppi di ricerca e da molte organizzazioni.

Poiché le evidenze genetiche mostrano livelli di divergenza tra la popolazione appenninica e le altre sotto-

specie di lupo non spiegabili con un isolamento recente dovuto a cause antropogeniche, abbiamo cercato risposte sull'origine e sull'unicità dei lupi italiani attraverso lo studio del DNA antico di esemplari rinvenuti nel contesto tardo-pleistocenico di ex Cava a Filo.

Contesto faunistico: la megafauna del Pleistocene

Nel corso del Pleistocene le temperature terrestri hanno subito intense e severe variazioni a causa dell'alternanza di fasi glaciali e interglaciali. L'ultima glaciazione, un periodo compreso tra i 125000 e i 14500 anni or sono, vide un “picco” (Last Glacial Maximum, o LGM) intorno ai 26500-24000 anni fa, momento in cui le calotte glaciali raggiunsero la massima estensione. A quel tempo una vasta steppa si estendeva dalla Spagna attraverso l'Eurasia fino all'Alaska e allo Yukon attraverso la Beringia; questo ecosistema, lungi dall'essere desertico, ospitava una vasta comunità di mega-erbivori noti come “megafauna pleistocenica”. Le foreste erano virtualmente assenti, eccettuate “isole” negli ecosistemi montani meridionali (ELIAS *et alii* 1996).

Le steppe eurasiatiche del Tardo Pleistocene (e similmente, ma con un panorama faunistico più complesso, il Nord America) erano attraversate da proboscidi (*Mammuthus* sp.), cervi megaceri (*Megaloceros* sp.), bisonti delle steppe (*Bison priscus*), rinoceronti lanosi, cavalli e buoi muschiati. La comunità dei predatori associati comprendeva tra gli altri leoni (*Panthera leo*), iene, leopardi (*Panthera pardus*) ed ecomorfi specializzati di lupo (*Canis lupus*) (BARNETT *et alii* 2009; GHEZZO, ROOK 2015). In questa fase l'Europa era molto più fredda e arida rispetto ad oggi, caratterizzata da deserto polare al nord e per gran parte coperta da tundra e steppa. Il mondo dei mammut e dei bisonti delle steppe entrò in crisi circa 18-19.000 anni fa, quando una serie di repentine oscillazioni climatiche (con variazioni a livello regionale anche di 16°C) innescarono di fatto il processo che culminò con la fine della glaciazione nell'emisfero settentrionale, circa 14500 anni dal presente. Il livello dei mari si innalzò velocemente, e il collegamento tra America ed Eurasia cessò di esistere circa 11000 anni or sono. Mentre i record fossili non mostrano segni di estinzioni durante il LGM, la maggior parte degli elementi tipici della megafauna pleistocenica iniziò una fase di forte contrazione verso la fine della glaciazione, in molti casi determinando la scomparsa di interi generi e la rapida sostituzione di specie o popolazioni all'interno dei generi sopravvissuti (COOPER *et alii* 2015).

¹ Per aplotipo si intende una combinazione di mutazioni ereditate in blocco lungo la linea parentale. Nel caso del DNA mitocondriale, la porzione di genoma ereditata solo per via materna, viene considerato come aplotipo l'insieme dei siti che risultano differenti rispetto a una sequenza presa per convenzione come riferimento.

Tra le cause viene spesso indicata la caccia operata dal genere *Homo*, ma verosimilmente l'ecosistema alla base della comunità di erbivori che caratterizzava le steppe del Pleistocene Superiore, una vasta prateria periglaciale, di fatto scomparve in un tempo relativamente breve, causando un declino numerico e un impoverimento della diversità genetica sia delle prede che dei predatori (HOFREITER 2007).

Due distinti ecomorfi: strutture criptiche di popolazione nei lupi pleistocenici

In genere è l'aumento della distanza geografica il motore del differenziamento in sottopopolazioni, tuttavia nel caso dei lupi i *pattern* di divergenza risultano peculiari, generando differenti ecomorfi anche in assenza di separazione geografica. Un esempio è quello dei lupi del nord-ovest del Canada, (area del fiume Mackenzie) i quali migrano con la loro preda principale, il caribù (*Rangifer tarandus*), e sono differenziati dalle popolazioni stanziali sia dal punto di vista genetico sia etologico. Un ulteriore studio del 2009 ha preso in analisi i lupi della British Columbia, dove è emersa una forte differenziazione genetica tra popolazioni adiacenti tra la costa e le regioni interne. Si tratta di una zona caratterizzata da una varietà di zone bioclimatiche contigue dove un lupo nel corso della sua vita può incontrare numerosi tipi di habitat. I dati genetici provenienti dalla regione di controllo del DNA mitocondriale (una regione altamente polimorfica che consente di effettuare studi di popolazione) sono stati messi in correlazione con fattori come variazione fenotipica legata alla distanza, habitat e composizione di prede e si è concluso che il maggiore fattore limitante alla dispersione del lupo è la discontinuità ambientale rafforzata anche dai fattori comportamentali. L'ipotesi che va concretizzandosi è che i lupi prediligano habitat e abitudini alimentari simili a quelle che hanno caratterizzato la prima fase del loro sviluppo e che questa differenziazione è mantenuta prevalentemente attraverso meccanismi comportamentali (MUÑOZ-FUENTES *et alii* 2009).

In Est Europa si manifesta un pattern simile di differenziazione genetica guidato dalla scelta di prede e dalla variabilità di habitat (LEONARD 2014; PILOT *et alii* 2006; Pilot *et alii* 2010; PILOT *et alii* 2012). Questa differenziazione è stata testata su diversi markers genetici (non solo mitocondriali) confermando la medesima rappresentazione della struttura di popolazione (LEONARD 2014).

Esattamente come nel presente, anche nel Pleistocene è ipotizzabile un pattern simile all'interno della stessa popolazione di lupi eurasiatici adattati alle steppe periglaciali e a prede rappresentate da vertebrati di taglie

diverse, dal caribù fino a mammut, bisonti, megaceri e cavalli, tanto da poter parlare di più ecomorfi distinti di *C. lupus* anche allora (LEONARD 2014; PERRI 2016). Per poter comprendere questi pattern è necessaria la conoscenza della biologia e dell'etologia di questo carnivoro: è noto infatti che i lupi hanno la tendenza a rimanere nel proprio nucleo familiare dalla nascita fino ad almeno 1-2 anni di vita, prima in veste di cuccioli dell'anno e successivamente come *helper* degli individui alfa. Questa iniziale dipendenza e vicinanza implica la trasmissione oltre che delle regole sociali, che regolano le gerarchie nel branco, anche di tutti quei comportamenti che influenzeranno poi il successo nella caccia, la conoscenza del proprio habitat e, quindi, la sopravvivenza.

Le differenze nella genetica dei diversi ecomorfi può essere spiegata introducendo il concetto di aplogruppo, ovvero un insieme di aplotipi (nel nostro caso mitocondriali) che condividono un'origine comune. In altre parole il differenziamento dovuto a fattori ecologici si tramuta in diversità genetiche raggruppate in "gruppi" distinti, gli aplogruppi mitocondriali. Esiste una forte connessione tra aplogruppi mitocondriali ed aree geografiche di origine, ovvero tra linee mitocondriali e migrazioni passate (CAMELLI 2009).

Nel 2010, uno studio comparativo basato sull'analisi del DNA mitocondriale proveniente da 947 lupi europei moderni e 24 antichi ha permesso di gettare luce sulle relazioni filogenetiche e sulla loro distribuzione geografica. Ne risulta che tutti gli aplotipi di individui europei antichi datati tra 44000 e 14000 anni fa ricadono all'interno dello stesso aplogruppo ("HG2") mentre l'aplogruppo 1 ("HG1"), separato dal secondo da 5 step mutazionali, compare in Russia tra 2700 e 1200 anni fa. L'antica predominanza dell'aplogruppo 2 in Europa per oltre 40000 anni, sia prima sia dopo l'ultimo massimo glaciale (LMG), non rispecchia tuttavia l'attuale distribuzione degli aplotipi mitocondriali nella popolazione europea, dove infatti la situazione di predominanza risulta invertita, lasciando maggiore spazio all'aplogruppo 1 che risulta "dominante" con un rapporto di 3:1. Questo sembra indicare infatti che nella fase successiva alla crisi della megafauna pleistocenica vi sia stata una sostituzione dell'aplogruppo 2 da parte dell'aplogruppo 1 (PILOT *et alii* 2010). Secondo lo studio di Leonard (2007), una situazione simile pare sia avvenuta anche nella popolazione di lupo del nord America in cui però l'aplogruppo 2 risulta ad oggi del tutto scomparso. Infatti dall'analisi del DNA mitocondriale di reperti pleistocenici provenienti dalla Beringia emerge come questi possedessero aplotipi condivisi con alcuni individui europei antichi e appartenerti unicamente al secondo aplogruppo.

Tipologia del campione	ID campione (laboratorio)	Provenienza campione	ID campione (scavo)	Datazione dell'unità stratigrafica (BP - cal 2 σ)
ulna	OWW5	US 99	06-027	25005 – 24407 24387- 23844 24309- 23842
metapodio	OWW8	US 99	09-049	
falange	OWW10	US 99	09-072	
metapodio	OWW11	US 99	11-018	
metapodio	OWW13	US 99	11-055	
omero (parte distale)	OWW14	US 99	11-083	
metapodio (parte distale)	OWW15	US 99	11-089	
radio	OWW9	US 99	09-050	25005 – 24407*

Tipologia del campione	ID campione (laboratorio)	Provenienza campione	ID campione (scavo)	Datazione dell'unità stratigrafica (BP - cal 2 σ)
mandibola	OWW1	Recuperi Esagono (cunicolo US 201)	124	20577-20161
mascella	OWW2	Recuperi Esagono (cunicolo US 201)	547	
radio (parte distale)	OWW4	Recuperi Esagono (cunicolo US 201)	557	
canino	OWW3	Scavi Pasini - livello g	556	post 18586 – 17890 (livello f)

Tipologia del campione	ID campione (laboratorio)	Provenienza campione	ID campione (scavo)	Datazione dell'unità stratigrafica (BP - cal 2 σ)
metatarso	OWW6	US 100	07-201	17838- 17437
incisivo	OWW7	US 100	08-057	
metapodio	OWW12	US 100	11-035	
metapodio	OWW16	US 100	11-108	

Tab. 1 – Tabella riassuntiva dei campioni in analisi, contraddistinti dalla tipologia del reperto e dal codice di laboratorio. La tabella è comprensiva delle provenienze e delle sigle identificative assegnate ai reperti, nonché delle datazioni radiocarboniche calibrate 2 σ (cfr. PARONUZZI *et alii* in questo volume) relative alle diverse unità stratigrafiche di riferimento.

* Il campione OWW9 ha fornito direttamente la datazione radiocarbonica indicata.

Le analisi genetiche sono state affiancate da analisi morfometriche e isotopiche che hanno fornito ulteriori dettagli sulla vita di questi individui come, ad esempio, la loro specializzazione a cacciare prede di grandi dimensioni, dato supportato anche dal pattern di usura dei denti (LEONARD *et alii* 2007). Per quanto riguarda l'area geografica presa in esame in questo studio è possibile attestare che anche i lupi del Pleistocene emiliano sono associati a mega-erbivori quali *Bison priscus* e *Megaloceros giganteus*, ritrovati un gran quantità durante gli scavi archeologici. Con molta probabilità la popolazione di lupo pleistocenico delle steppe era un'unica popolazione continua

e panmittica, specializzata nel cacciare megafauna, geneticamente ed ecologicamente distinta dalla maggior parte delle sottospecie contemporanee. L'attuale presenza dell'aplogruppo 2 in Europa potrebbe indicare come questi lupi "arcaici" siano riusciti ad adattarsi più rapidamente alla diversa tipologia e composizione di prede (o semplicemente ne abbiano avuto il tempo) consentendone un maggiore successo evolutivo e la sopravvivenza. L'Italia è la sola area geografica del mondo in cui è avvenuta, e attualmente permane, la fissazione unicamente dell'aplogruppo 2 in tutta la popolazione del territorio nazionale (LEONARD *et alii* 2007; PILOT *et alii* 2010).

Il DNA antico e i reperti di ex Cava a Filo

I processi evolutivi ed ecologici che hanno portato alla comparsa delle attuali specie o alla sopravvivenza di determinate popolazioni, sono solitamente studiati e inferiti attraverso analisi morfometriche e genetiche di campioni moderni, i quali però possono fornire solo una evidenza indiretta della situazione e delle dinamiche del passato.

L'analisi del DNA antico comporta la possibilità di fare un salto indietro nel tempo e consente quindi di ricostruire dinamiche passate, impossibili da interpretare con i soli dati biometrici. A dispetto di questo potenziale, i reperti delle collezioni museali presentano notevoli difficoltà di analisi per quanto riguarda lo studio genetico a causa dei processi *post-mortem* di degradazione e frammentazione del materiale genetico e della contaminazione da DNA esogeno (DABNEY *et alii* 2013). A causa di tutte le problematiche connesse con l'analisi dei reperti antichi, questi devono essere analizzati esclusivamente in laboratori appositamente riservati e strutturalmente predisposti e suddivisi per le diverse fasi di analisi, secondo precise linee guida. Tali norme prevedono inoltre l'utilizzo di dispositivi di protezione individuali (es. visiere, mascherine, guanti, tute, stivali, *etc.*) atti ad evitare la contaminazione da DNA moderno (COOPER, POINAR, 2000; KNAPP *et alii* 2012, 2015). Le analisi genetiche relative a questo studio sono state svolte presso il Laboratorio del DNA Antico del Dipartimento di Beni Culturali, Università di Bologna, Campus di Ravenna (fig. 1). Nonostante i numerosi sforzi messi in campo in ambito internazionale e nonostante la posizione geneticamente unica del lupo italiano, la situazione in Italia risulta ancora poco definita. L'unico studio attualmente noto che ha preso in analisi reperti antichi

del genere *Canis* risale al 2005 quando Verginelli *et al.* hanno analizzato geneticamente 5 reperti (3 provenienti dal Lazio e 2 dalla Puglia) di età compresa tra 15000 e 3000 anni fa, alcuni dei quali attribuibili alla specie *Canis lupus* mentre in altri casi di attribuzione morfologica incerta.

Ne consegue quindi la necessità di implementare gli sforzi di campionamento di fossili antichi italiani per studiarne la variabilità genetica passata e poterla quindi confrontare con quella attuale, al fine di svelare il tracciato storico di una popolazione rimasta presumibilmente in relativo isolamento sin dal Pleistocene (BOGGIANO *et alii* 2013).

Il DNA mitocondriale (mtDNA) è un genoma extra nucleare, localizzato nel citoplasma della cellula. Questo genoma è ereditato solo per via matrilineare, non subisce ricombinazione genetica ad ogni generazione e le sue variazioni sono principalmente causate dagli effetti delle mutazioni che si manifestano con un tasso maggiore rispetto al genoma nucleare. Le mutazioni neutrali che compaiono in un DNA mitocondriale sono in generale costituite da transizioni, le quali, sono ereditate in blocchi come aplotipi, che a loro volta possono essere ricondotti a specifici aplogruppi, generalmente collegati ad una particolare zona geografica ed utili quindi a distinguere geneticamente le popolazioni (PAKENDORF, STONEKING 2005).

I reperti (n. 16) oggetto del presente studio (tab. 1 e fig. 2) provengono dal sito archeologico di ex Cava a Filo, un sito paleontologico del Pleistocene superiore localizzato sul versante nordorientale del Monte Castello (Parco dei Gessi Bolognesi) nel comune di San Lazzaro di Savena (BO) e sono stati datati, su base stratigrafica e tramite radiocarbonio, ad un arco cronologico compreso tra circa 25000 e circa 17400 anni fa. Al fine di far luce sull'origine e sulla variabilità pas-

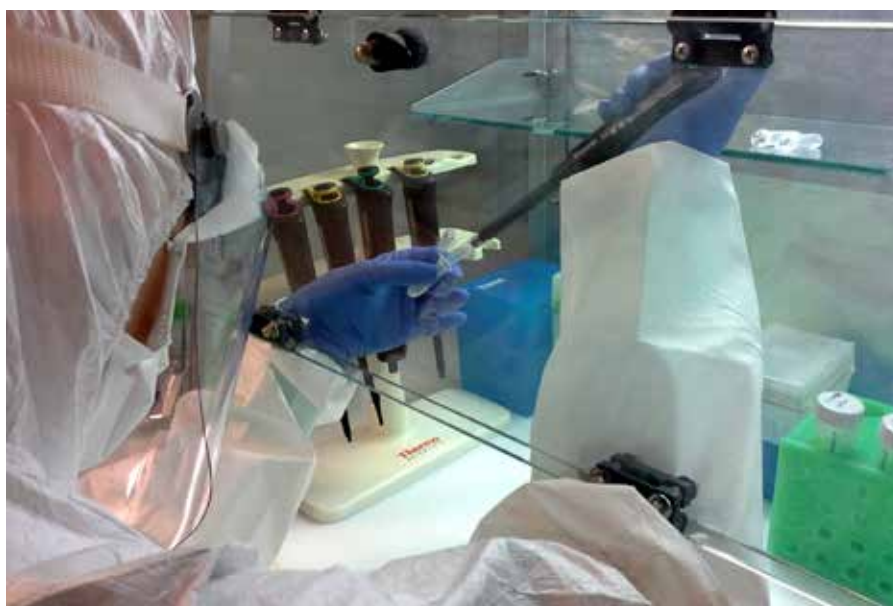


Fig. 1 – Svolgimento delle analisi dei reperti di ex Cava a Filo presso il Laboratorio del DNA antico (Università di Bologna) secondo le stringenti procedure previste dalla più recente letteratura scientifica.



Fig. 2 – Uno dei reperti di ex Cava a Filo (ID.547) da cui è stato estratto e analizzato il DNA antico: mascellare destro di lupo con P3, P4, M1 e M2.

sata della popolazione di lupo nella penisola italiana, è stato analizzato un frammento di 99 paia di basi (bp) della regione ipervariabile del DNA mitocondriale in questi reperti (STILLER *et alii* 2006).

Risultati e discussioni

La collocazione tassonomica del lupo appenninico è stata oggetto di numerose revisioni, le più recenti delle quali tendevano a concentrarsi sullo scenario in cui l'omogeneità genetica fosse spiegabile con un isolamento geografico a cui la popolazione italiana di lupo è stata costretta negli ultimi 250-300 anni principalmente per cause antropiche (RANDI *et alii* 1995; RANDI *et alii* 2000). La divergenza genetica tra la popolazione italiana e le restanti popolazioni di lupi europei, difficilmente spiegabile con la sola deriva genetica, poneva tuttavia importanti interrogativi, difficili da risolvere se non attraverso la ricostruzione della storia antica e recente del lupo appenninico a partire dal Pleistocene.

I dati disponibili a partire da lupi antichi e moderni concorrono a delineare un quadro complesso, con la compresenza di almeno due ecomorfi chiaramente distinti a livello di mtDNA e verosimilmente specializzati nella caccia a prede differenti. Uno scenario simile, con strutture criptiche di popolazione, si ri-

scontra tuttora in diversi ecosistemi americani e non solo, ove coesistono sub-popolazioni separate geneticamente ma non geograficamente, specializzate nella predazione di specie diverse. In particolare le dinamiche di questa specie evidenziano la presenza del solo aplogruppo 2 attestata in Europa almeno fino a circa 1400 anni fa e il successivo ingresso dell'aplogruppo 1 (Pilot *et alii* 2010). In Europa la sostituzione non fu completa, ma gli aplotipi "nuovi" si integrarono - con diversi gradi di admixture - con i lupi dell'ecomorfo dominante, finendo tuttavia per sovrastarli numericamente (75:25) (PILOT *et alii* 2010).

Il lupo appenninico, caratterizzato oggi dagli aplotipi mitocondriali W14 e secondo recenti segnalazioni W16 (sono stati rinvenuti 3 esemplari nel Parco Nazionale di Abruzzo Lazio e Molise), rappresenta l'unica popolazione contemporanea totalmente riferibile all'aplogruppo 2, riconducibile ad un ecomorfo che 24.000 anni fa dominava l'Eurasia fino alla Beringia e all'America del nord e non già ad un isolamento geografico recente a partire da una popolazione panmitica di lupi europei. È singolare come pattern simili ("resistenza" di ecomorfi arcaici in Italia, in discontinuità con aplotipi presenti in Europa continentale e immigrati da est nell'immediato post-glaciale) siano stati descritti per altre specie, ad esempio *Bos primigenius* (MONA *et alii* 2010).

Una situazione simile potrebbe essersi verificata nell'isola giapponese di Honshu, ma *Canis lupus hodophilax*, appartenente all'aplogruppo 2, si è estinto in epoca storica.

I dati provenienti dallo studio dei reperti antichi si sono rivelati indispensabili per la comprensione della catena di eventi all'origine della "unicità" della popolazione appenninica; esistono in letteratura dati ricavati da numerosi reperti in Europa centrale e orientale, ma pochissimi campioni provengono dalla penisola italiana, per di più oggetto di analisi ormai datate e comunque puntiformi. Questo studio rappresenta ad oggi l'indagine più estesa riguardante l'analisi genetica di lupi preistorici dell'Italia settentrionale, ancor più importante considerando l'Appennino settentrionale come area geografica cruciale (lo è tutt'oggi) per gli spostamenti dei carnivori da e verso l'arco alpino e l'Europa continentale.

È stato possibile ottenere DNA antico da 13 campioni (tab. 1) dei 16 analizzati. Inoltre, la fase di amplificazione PCR e sequenziamento Sanger è stata effettuata due volte in maniera tale da confermare e autenticare le sequenze ottenute. Le sequenze autenticate (N = 7) sono riconducibili a 3 diversi aplotipi mitocondriali per i quali è possibile formulare alcune considerazioni:

- tutti gli esemplari preistorici provenienti dal sito di ex Cava a Filo appartengono all'aplogruppo mitocondriale HG2, e risultano geneticamente affini ad alcuni lupi contemporanei dell'Europa occidentale caratterizzati da aplotipi "arcaici" (tutti i lupi italici odierni e circa il 25% dei lupi dei Balcani e dell'Europa centro-orientale), ma nettamente distinti dalla maggior parte dei lupi eurasiatici odierni (HG1);
- uno di questi presenta un aplotipo mitocondriale analogo a reperti antichi provenienti da Repubblica Ceca (STILLER *et alii* 2006) e numerosi esemplari dalla Beringia-Alaska e Russia - (LEONARD *et alii* 2007; THALMANN *et alii* 2013), di età compresa tra 15000 e 45000 anni fa. La presenza di aplotipi mitocondriali associati ai lupi beringici e russi, e quindi ad un ecomorfo specializzato nella predazione della megafauna, consente di fare parallelismi fondamentali riguardanti i lupi presenti in Europa e in Italia, ove analogamente i lupi pleistocenici erano specializzati nella caccia ai megaerbivori ai quali sono regolarmente associati (i reperti di ex Cava a Filo provengono da strati in cui dominano *Bison priscus* e *Megaloceros giganteus*). Questo dato permette di ipotizzare che i lupi del Pleistocene italiano facessero parte di una popolazione eurasiatica unica, continua e panmittica;

- 5 sequenze "collassano" insieme, definendo lo stesso aplotipo mitocondriale. È anche possibile - ma non probabile - che si tratti di campioni riconducibili a due esemplari, provenendo i campioni da due unità stratigrafiche (US 99 e US 100). I campioni non rientrano in nessuno degli aplotipi di canidi attualmente presenti nel panorama mondiale. Essi corrispondono tuttavia a lupi preistorici presenti in nord Europa 21800 anni fa, esattamente in Belgio (STILLER *et alii* 2006). Di estrema rilevanza l'affinità genetica, a livello mitocondriale, con i lupi italici contemporanei, cui risultano più vicini (uno o due step mutazionali) che a qualsiasi altra sequenza di lupo nota, antica o moderna. Si tratta di un elemento cardine a sostegno dell'ipotesi di una continuità tra i lupi del Pleistocene e la popolazione appenninica contemporanea, a differenza di quanto accaduto per quasi tutte le popolazioni mondiali, che hanno visto una sostituzione più o meno completa con lupi "moderni" appartenenti all'aplogruppo HG1;
- il campione OWW9 (fig. 3) datato 25005 - 24407 cal BP presenta lo stesso aplotipo di due campioni antichi attribuiti a cani (STILLER *et alii* 2006; ZHILIN *et alii* 2014) che è presente anche nelle moderne razze canine, prevalentemente ancestrali (Akita e altri). Inoltre è associato alla stessa sequenza un individuo contemporaneo di *Canis lupus* asiatico. Si tratta del più antico rinvenimento in Italia di un aplotipo mitocondriale che si riscontra oggi nelle forme domestiche. Di estremo interesse il recente ritrovamento di segni di presenza di cacciatori-raccoglitori paleolitici (cut marks su un reperto di *Bison priscus* rinvenuto nella stessa unità stratigrafica, in stretta associazione con il reperto di *Canis* analizzato, vedi PARONUZZI *et alii* in questo volume). Tale evidenza lascia ipotizzare alcuni scenari nel processo di domesticazione, da verificare comunque in futuro con ulteriori dati genomici. La presenza del reperto OWW9 associato ad aplotipi canini e di datazione così antica potrebbe fungere da ulteriore dato a favore dell'ipotesi secondo cui la domesticazione del cane sembra aver avuto origine, secondo Thalmann *et alii* (2013), in Europa. L'ipotesi è presa in considerazione e rivisitata nel lavoro di Frantz *et alii* (2016) in cui l'origine del cane risulterebbe essere correlata a due eventi di domesticazione indipendenti; quindi il reperto potrebbe appartenere alla linea evolutiva che ha portato, per mezzo della selezione artificiale, al *Canis lupus familiaris* in Italia ed Europa.

I dati restituiti dal DNA mitocondriale dei reperti di ex Cava a Filo permettono di comprendere quanto



Fig. 3 – Reperto 09-050 (OWW9) prima del campionamento per l'estrazione del DNA.

fosse estesa, rispetto ad oggi, la variabilità genetica della popolazione pleistocenica di lupo nella regione. Inoltre la maggior parte delle sequenze ottenute non presentano omologia di sequenze con individui moderni e questo sta ad indicare come, nel corso di 25000-20000 anni, in Italia si sia persa molta della variabilità genetica presente anticamente. Deve essere anche tenuto in considerazione il fatto che la lunghezza del frammento analizzato, pur contenendo abbastanza siti polimorfici (30) da renderlo informativo per la distinzione tra i due aplogruppi (GERMONPRÉ *et alii* 2009), risulta essere molto ridotta e non permette di determinare se siano presenti ulteriori mutazioni che potrebbero consentire la descrizione di un numero ancora maggiore di aplotipi nuovi rispetto a quelli identificati. Infatti ben 5 reperti risultano identici a questo livello, ma potrebbero mostrare maggiore variabilità in un tratto più ampio, che è difficile da ottenere proprio a causa dello stato di frammentazione del DNA antico (DABNEY *et alii* 2013). Il trend di diminuzione della variabilità genetica non è esclusivo della popolazione appenninica ma risulta essere associato ad un "collo di bottiglia" geograficamente più esteso che accomuna l'intera popolazione di *Canis lupus* del Pleistocene. A sostegno di ciò uno studio pubblicato recentemente in cui si evidenzia come le traiettorie demografiche di popolazioni di lupo provenienti da numerose aree del globo, tra cui Russia, Tibet, Mongolia, Croazia e Italia, abbiano subito un drastico calo (di circa 20 volte) iniziato circa 30000 anni fa (FAN *et alii* 2016).

Ad oggi sono stati rinvenuti solo 2 aplotipi nel lupo italiano, W14 (RANDI *et alii* 2000) e W16 (BOGGIANO *et alii* 2013; MONTANA *et alii* 2017) ma nessuno

dei lupi di ex Cava a Filo rientra negli aplotipi attuali, bensì in quelli antichi campionati in nord Europa, Russia e Beringia consentendo di avvalorare l'ipotesi secondo cui la popolazione europea di lupo pleistocenico era unica, panmittica e continua fino alla penisola italiana inclusa. Dalle analisi filogenetiche emerge come nelle aree di provenienza dei reperti italiani datati a un periodo compreso tra circa 25000 e 17400 anni fa (ex Cava a Filo) vi era la sola stabile presenza dell'aplogruppo 2.

Questi risultati consentono di fornire una testimonianza importante della situazione della penisola italiana di quel periodo e di dare un contributo nello studio del lupo nel panorama europeo e mondiale. Di notevole rilevanza è la "vicinanza" genetica tra diversi aplotipi riscontrati nei reperti di ex Cava Filo e i due aplotipi caratteristici dei lupi appenninici contemporanei, ai quali risultano più affini rispetto a qualsiasi altra sequenza nota di canidi antichi e moderni.

Lo scenario che quindi sembra confermarsi è che nell'Eurasia del tardo glaciale i lupi erano adattati a cacciare megafauna e intorno a 10000 anni fa, in concomitanza con l'estinzione degli erbivori di grandi dimensioni delle steppe eurasiatiche, sia avvenuto l'ingresso di lupi aplogruppo 1 provenienti dall'America o più probabilmente da alcuni *refugia* in Asia. La transizione all'aplogruppo 1 è stata totale nella popolazione americana mentre la sostituzione è stata solo parziale in Europa dove permangono entrambi gli aplogruppi, mescolati in proporzioni differenti (con netta predominanza dell'aplogruppo immigrante HG1) e con gradi diversi di admixture a livello del genoma nucleare (PILOT *et alii* 2014). In Europa però esistono due rilevanti eccezioni a questo pattern; infatti nella popolazione spagnola si riscontra unicamente la presenza



Fig. 4 - Cacciatore-raccoglitore del Paleolitico superiore accompagnato da un "proto-cane" (Archivio del Museo "L. Donini", illustrazione di Mauro Cutrona).

dell'aplogruppo 1 mentre nella popolazione italiana si registra la "resistenza" del solo aplogruppo 2. Il presente studio ha permesso di apportare un sostanziale contributo alla conoscenza dell'origine filogeografica della popolazione italiana di lupo; si tratta tuttavia solamente del punto di inizio di un progetto che mira ad una completa risoluzione della misteriosa evoluzione di *Canis lupus italicus* e che potrebbe avere ricadute importanti nella conservazione e nella proposizione di nuove misure di tutela di questa sottospecie.

Bibliografia

- G. ALTOBELLO 1921, *Fauna dell'Abruzzo e del Molise - Mammiferi - Carnivori*, Campobasso.
- R. BARNETT, B. SHAPIRO, I. BARNES, S.Y. W. HO, J. BURGER, N. YAMAGUCHI, T.F. G. HIGHAM, H. T. WHEELER, W. ROSENDAHL, A.V. SHER, M. SOTNIKOVA, T. KUZNETSOVA, G.F. BARYSHNIKOV, L.D. MARTIN, C.R. HARRINGTON, J.A. BURNS, A. COOPER 2009, *Phylogeography of lions (Panthera leo ssp.) reveals three distinct taxa and a late Pleistocene reduction in genetic diversity*, "Molecular Ecology", 18 (8), pp. 1668-1677.
- F. BOGGIANO, C. CIOFI, L. BOITANI, A. FORMIA, L. GROTTOLI, C. NATALI, P. CIUCCI 2013, *Detection of an East European wolf haplotype puzzles mitochondrial DNA monomorphism of the Italian wolf population*, "Mammalian Biology", 78 (5), pp. 374-378.
- D. CARAMELLI 2009, *Antropologia molecolare: manuale di base*, Firenze.
- A. COOPER, C. TURNEY, K.A. HUGHEN, B.W. BROOK, H.G. McDONALD, C.J.A. BRADSHAW 2015, *Abrupt warming events drove Late Pleistocene Holarctic megafaunal turnover*, "Science", 349 (6248), pp. 602-606.
- A. COOPER, H.N. POINAR 2000, *Ancient DNA: do it right or not at all*, "Science", 289, pp. 1139.
- J. DABNEY, M. MEYER, S. PAABO 2013, *Ancient DNA Damage*, "Cold Spring Harbor Perspectives in Biology", 5 (7), a012567-a012567.
- S.A. ELIAS, S.K. SHORT, C.H. NELSON, H.H. BIRKS 1996, *Life and times of the Bering land bridge*, "Nature", 382 (6586), pp. 60-63.
- Z. FAN, P. SILVA, I. GRONAU, S. WANG, A.S. ARMERRO, R.M. SCHWEIZER, O. RAMIREZ, J. POLLINGER, M. GALAVERNI, D.O. DEL-VECCHYO, L. DU, W. ZHANG, Z. ZHANG, J. XING, C. VILÀ, T. MARQUES-BONET, R. GODINHO, B. YUE, R.K. WAYNE 2016, *Worldwide patterns of genomic variation and admixture in gray wolves*, "Genome Research", 26 (2), pp.163-173.
- L.A.F. FRANTZ V.E. MULLIN, M. PIONNIER-CAPITAN, O. LEBRASSEUR, M. OLLIVIER, A. PERRI, A. LINDERHOLM, V. MATTIANGELI, M.D. TEASDALE, E.A. DIMOPOULOS, A. TRESSET, M. DUFFRAISSE, F. MCCORMICK, L. BARTOSIEWICZ, E. GAL, E. A. NYERGES, M. V. SABLIN, S. BREHARD, M. MASHKOUR, A. BLESU, B. GILLET, S. HUGHES, O. CHASSAING, C. HITTE, J.D. VIGNE, K. DOBNEY, C. HANNI, D. G. BRADLEY, G. LARSON 2016, *Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs*, "Science", 352 (6290), pp. 1228-1231.
- M. GERMONPRÉ, M.V. SABLIN, R.E. STEVENS, R.E.M. HEDGES, M. HOFREITER, M. STILLER, V.R. DESPRÉS 2009, *Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes*, "Journal of Archaeological Science", 36 (2), pp. 473-490.
- E. GHEZZO, L. ROOK 2015, *The remarkable Panthera pardus (Felidae, Mammalia) record from Equi (Massa, Italy): taphonomy, morphology, and paleoecology*, "Quaternary Science Reviews", 110, pp. 131-151.
- M. HOFREITER 2007, *Pleistocene Extinctions: Haunting the Survivors*, "Current Biology", 17 (15), R609-R611.
- M. KNAPP, A.C. CLARKE, K.A. HORSBURGH, E.A. MATISOO-SMITH 2012, *Setting the stage? Building and working in an ancient DNA laboratory*, "Ann. Anat. - Anat. Anzeiger", 194, pp. 3-6.
- M. KNAPP, C. LALUEZA-FOX, M. HOFREITER 2015, *Re-inventing ancient human DNA*, "Investigative Genetics", 6, pp. 4.
- J.A. LEONARD, C. VILÀ, K. FOX-DOBBS, P.L. KOCH, R.K. WAYNE, B. VAN VALKENBURGH 2007, *Megafaunal Extinctions and the Disappearance of a Specialized Wolf Ecomorph*, "Current Biology", 17 (13), pp. 1146-1150.
- J.A. LEONARD 2014, *Ecology drives evolution in grey wolves*, "Evolutionary Ecology Research", 16 (6), pp. 461-473.
- S. MONA, G. CATALANO, M. LARI, G. LARSON, P. BOSCATO, A. CASOLI, L. SINEO, C. DI PATTI, E. PECCHIOLI, D. CARAMELLI, G. BERTORELLE 2010, *Population dynamic of the extinct European aurochs: genetic evidence of a north-south differentiation pattern and no evidence of post-glacial expansion*, "BMC Evolutionary Biology", 10 (1), 83.
- L. MONTANA, R. CANIGLIA, M. GALAVERNI, E. FABBRI, A. AHMED, B.Č. BOLFIKOVÁ, S.D. CZARNOMSKA,

- A. GALOV, R. GODINHO, M. HINDRIKSON, P. HULVA, B. JEĐRZEJEWSKA, M. JELENČIČ, M. KUTAL, U. SAARMA, T. SKRBINŠEK, E. RANDI 2017, *Combining phylogenetic and demographic inferences to assess the origin of the genetic diversity in an isolated wolf population*, "PLoS One", 12 (5): e0176560.
- V. MUÑOZ-FUENTES, C.T. DARIMONT, R.K. WAYNE, P.C. PAQUET, J.A. LEONARD 2009, *Ecological factors drive differentiation in wolves from British Columbia*, "Journal of Biogeography", 36 (8), pp. 1516-1531.
- R.M. NOWAK, N.E. FEDEROFF 2002, *The systematic status of the Italian wolf *Canis lupus**, "Acta Theriologica", 47 (3), pp. 333-338.
- B. PAKENDORF, M. STONEKING 2005, *Mitochondrial DNA and human evolution*, "Annual review of genomics and human genetics", 6, pp. 165-83.
- A. PERRI 2016, *A wolf in dog's clothing: Initial dog domestication and Pleistocene wolf variation*, "Journal of Archaeological Science", 68, pp. 1-4.
- M. PILOT, W. JEĐRZEJEWSKI, W. BRANICKI, V.E. SIDOROVICH, B. JEĐRZEJEWSKA, K. STACHURA, S.M. FUNK 2006, *Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves*, "Molecular Ecology", 15 (14), pp. 4533-4553.
- M. PILOT, W. BRANICKI, W. JEĐRZEJEWSKI, J. GOSZCZYNSKI, B. JEĐRZEJEWSKA, I. DYKYY, M. SHKVYRYA, E. TSINGARSKA 2010, *Phylogeographic history of grey wolves in Europe*, "BMC evolutionary biology", 10 (1), 104.
- M. PILOT, W. JEĐRZEJEWSKI, V.E. SIDOROVICH, W. MEIER-AUGENSTEIN, A.R. HOELZEL 2012, *Dietary differentiation and the evolution of population genetic structure in a highly mobile carnivore*, "PloS One", 7 (6).
- M. PILOT 2014, *Genome-wide signatures of population bottlenecks and diversifying selection in European wolves*. "Heredity", 112 (4), pp. 428-42.
- E. RANDI, F. FRANCISCI, V. LUCCHINI 1995, *Mitochondrial DNA restriction-fragment-length monomorphism in the Italian wolf (*Canis lupus*) population*, "Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research", 33 (3), pp. 97-100.
- E. RANDI, V. LUCCHINI, M.F. CHRISTENSEN, N. MUCCI, S.M. FUNK, G. DOLE, V. LOESCHCKE 2000, *Mitochondrial DNA variability in Italian and east European wolves: Detecting the consequences of small population size and hybridization*, "Conservation Biology", 14 (2), pp. 464-473.
- M. STILLER, R. GREEN, M. RONAN, J. SIMMONS, L. DU, W. HE, M. EGHOLM, J. ROTHBERG, S. KEATES, N. OVODOV, E. ANTIPINA, G. BARYSHNIKOV, Y. KUZMIN, J. VASILEVSKI, G. WUENSCHALL, J. TERMINI, M. HOFREITER, V. JAENICKE-DESPRÉS, S. PÄÄBO 2006, *Patterns of nucleotide misincorporations during enzymatic amplification and direct large scale sequencing of ancient DNA*, "Proceedings of the National Academy of Sciences", 103 (37), pp. 13578-13584.
- O. THALMANN, B. SHAPIRO, P. CUI, V.J. SCHUENEMANN, S.K. SAWYER, D.L. GREENFIELD, M.B. GERMONPRÉ, M.V. SABLIN, F. LÓPEZ-GIRÁLDEZ, X. DOMINGO-ROURA, H. NAPIERALA, H.-P. UERPMANN, D.M. LOPONTE, A.A. ACOSTA, L. GIEMSCH, R.W. SCHMITZ, B. WORTHINGTON, J.E. BUIKSTRA, A.S. DRUZHKOVA, A.S. GRAPHODATSKY, N.D. OVODOV, N. WAHLBER, A.H. FREEDMAN, R.M. SCHWEIZER, K.P. KOEPFLI, J.A. LEONARD, M. MEYER, J. KRAUSE, S. PÄÄBO, R.E. GREEN, R.K. WAYNE 2013, *Complete Mitochondrial Genomes of Ancient Canids Suggest a European Origin of Domestic Dogs*, "Science", 342 (6160), pp. 871-874.
- F. VERGINELLI, C. CAPELLI, V. COIA, M. MUSIANI, M. FALCHETTI, L. OTTINI, R. PALMIROTTA, A. TAGLIACCOZZO, I. DE GROSSI MAZZORIN, R. MARIANI-COSTANTINI 2005, *Mitochondrial DNA from prehistoric canids highlights relationships between dogs and South-East European wolves*, "Molecular Biology and Evolution", 22 (12), pp. 2541-2551.
- R.K. WAYNE, N. LEHMAN, M.W. ALLARD, R.L. HONEYCUTT 1992, *Mitochondrial DNA Variability of the Gray Wolf: Genetic Consequences of Population Decline and Habitat Fragmentation*, "Conservation Biology", 6 (4), pp. 559-569.
- M.G. ZHILIN, S.N. SAVCHENKO, E.A. NIKULINA, U. SCHMÖLCKE, S. HARTZ, T. TERBERGER 2014, *Eleven bone arrowheads and a dog coprolite - the Mesolithic site of Beregovaya 2, Urals region (Russia)*, "Quartär", 61, pp. 165-187.

Ringraziamenti. Gli autori sono grati al Dr. Gabriele Nenzioni del Museo della Preistoria "Luigi Donini" (San Lazzaro di Savena, BO) per aver messo a disposizione i campioni oggetto di questo studio. Vogliono inoltre ringraziare l'Ente di Gestione per i Parchi e la Biodiversità Emilia Orientale e il Dr. David Bianco per l'aiuto nella ricerca dei campioni. Infine sentiti ringraziamenti vanno al Dr. Paolo Reggiani per la disponibilità e la condivisione delle informazioni sui reperti.