

La genetica nella gestione del Gallo forcello



Barbara Crestanello
FEM
Genomica della Conservazione



La genetica nella conservazione e gestione della fauna

GENETICA DELLA CONSERVAZIONE

Contribuisce alla gestione e alla salvaguardia delle popolazioni naturali utilizzando gli strumenti e i concetti della **genetica** e della **biologia molecolare**

METODO:

Misura della variabilità presente a livello di DNA  Variabilità genetica

OBIETTIVI:

- Rilevare precocemente potenziali situazioni di rischio
- Fornire informazioni per l'attuazione di programmi di conservazione e gestione

Scopo

preservare le specie come entità dinamiche capaci di far fronte alle variazioni ambientali

Variabilità genetica

Il **genoma**, o **patrimonio genetico**, è l'insieme di tutte le informazioni necessarie a 'costruire' un organismo vivente contenute nei **geni** (~20.000)

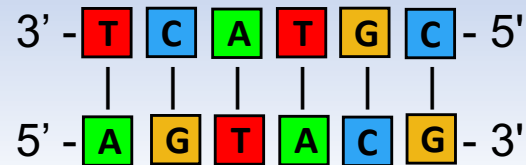
DNA: materiale genetico di gran parte degli organismi viventi



DNA

-  = Adenina
-  = Timina
-  = Citosina
-  = Guanina

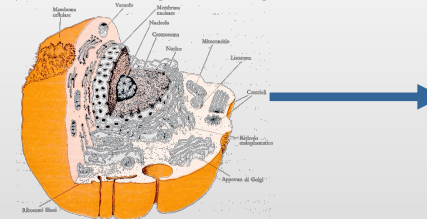
4 unità base dette **nucleotidi** sono le «lettere» che codificano le informazioni



Ogni molecola di DNA è composta da due filamenti complementari e antiparalleli arrotolati fra loro a formare una doppia elica

Sfruttando la sua conformazione il DNA è in grado di duplicarsi creando copie dei geni trasmissibili dai genitori ai figli

5-20 μm (10^{-6} m)



6 miliardi di basi \approx 5 m di DNA

150 m fogli A4



I simili generano propri simili ...



Eredità

la trasmissione dei caratteri da una generazione a quella successiva

Variabilità

Un individuo differisce in qualche modo sia dai genitori che dai fratelli e le sorelle



Diversità genetica

il codice di un gene può variare leggermente fra gli individui

La variabilità genetica è ovunque



- Fra individui
- Fra popolazioni
- Fra specie

Questa variabilità può essere misurata con l'analisi molecolare

I dati genetici forniscono informazioni utili alla gestione e salvaguardia delle popolazioni naturali

INDIVIDUO (monitoraggio)

- Identificazione individuale
- Determinazione del sesso
- Determinazione della specie
- Home range
- Dispersione
- Paternità/maternità
- Successo riproduttivo

POPOLAZIONE

- Livello di variabilità (vulnerabilità genetica)
- Flusso genico (fenomeni di isolamento)
- Ibridazione
- Tassi di migrazione – Potenziale di dispersione
- Dimensione effettiva (N_e)
- Storia demografica (espansione/bottleneck)
- MU (Management Unit) ed ESU (Evolutionary Significant Unit)

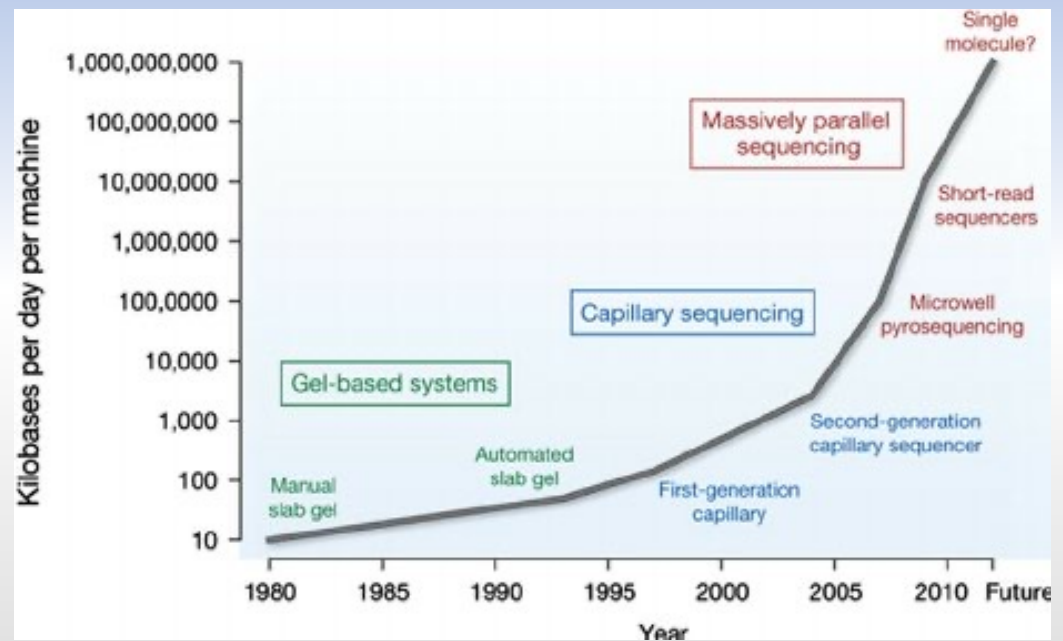
SPECIE

- Identificazione di specie (specie/sottospecie/ibridi)
- Traffico specie protette
- Grado di differenziazione
- Rapporti filogenetici
- Filogeografia

Marcatori genetici

Porzioni di DNA sottoposte ad analisi

- Il DNA non è uniforme
- Le diverse regioni hanno funzioni e tassi di variabilità diversi
- Marcatori genetici diversi risolvono problemi diversi

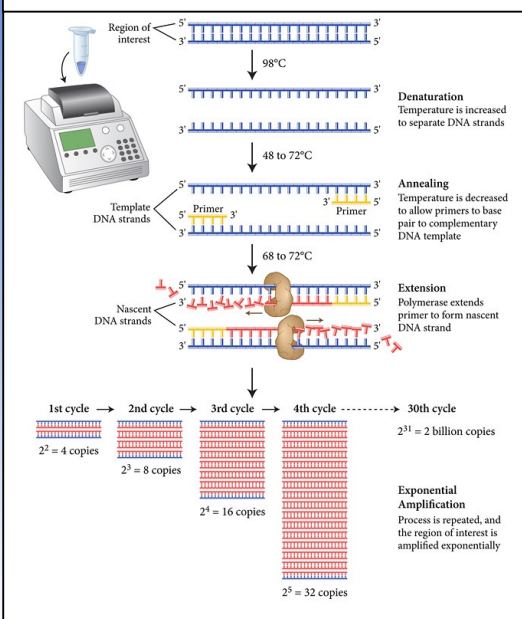


Progressi tecnologici hanno aperto nuovi orizzonti

Importanza:

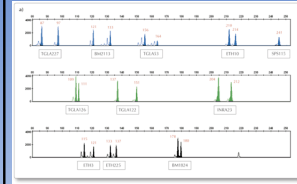
- Maggiore risoluzione sia intra- che inter- popolazioni perché si testano contemporaneamente un numero superiore di marcatori molecolari
- Consente di distinguere tra marcatori neutrali e marcatori sotto selezione, acquisendo informazioni anche sulla variabilità funzionale
- Facilita lo studio dell'espressione genica e del rapporto tra ambiente e geni, e quindi sul fenotipo e sulla fitness

PCR (Polymerase Chain Reaction – Mullis 1985)

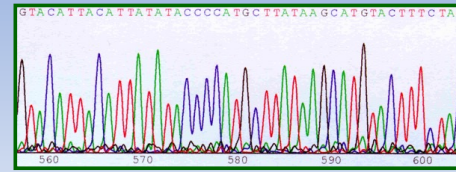


Sequenziatori automatici

Analisi di frammenti (STR)



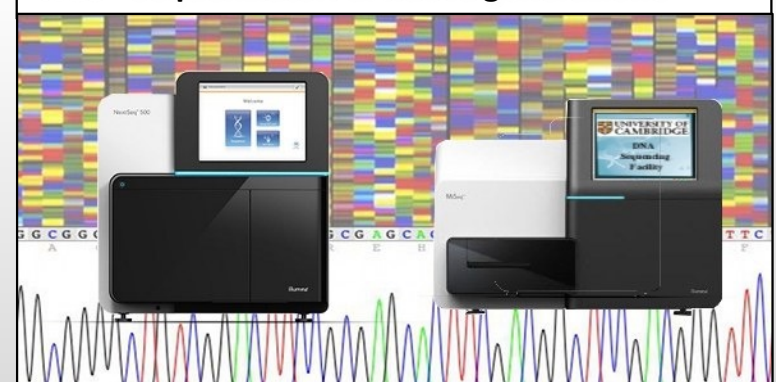
Analisi di sequenza



Aumenta la velocità di analisi – diminuiscono i costi

2003 92% genoma umano 350M€/10 anni - oggi < 5.000€/1giorno

NGS - Sequenziatori di nuova generazione



Situazioni di rischio



- In Europa centro-occidentale è presente in **piccoli nuclei isolati** relitti dei fenomeni glaciali
- a partire dagli anni '70 popolazioni in costante decremento fino ad eventi di estinzione locale

Limitata capacità di dispersione

Ulteriori rischi

- cambiamenti d'uso del suolo
- cambiamenti del clima
- disturbo antropico

Piccole dimensioni e isolamento



Bassa variabilità genetica

Variabilità genetica correlata con la salute delle popolazioni

Bassa variabilità genetica testimone di una situazione generale di sofferenza:

- bassa adattabilità a cambiamenti ambientali
- minore resistenza a patogeni e parassiti
- aumento delle malattie di origine genetica
- diminuzione della sopravvivenza
- diminuzione dei tassi riproduttivi

IL FAGIANO DI MONTE (*Lyrurus tetrrix*) IN AMBIENTE ALPINO ITALIANO: MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO GENOMICO
PER L'ACQUISIZIONE DI DATI FINALIZZATI ALLA GESTIONE

Progetto esplorativo parte del dottorato di ricerca di Alice Fraser (Cofinanziato da FEM e UniFE)

Scopo:

Determinare come i fattori ambientali, comportamentali e antropici influiscono sulla distribuzione geografica e temporale della variabilità genetica e genomica dei galliformi sull'arco alpino dove lo stato di conservazione preoccupa per il continuo decremento numerico

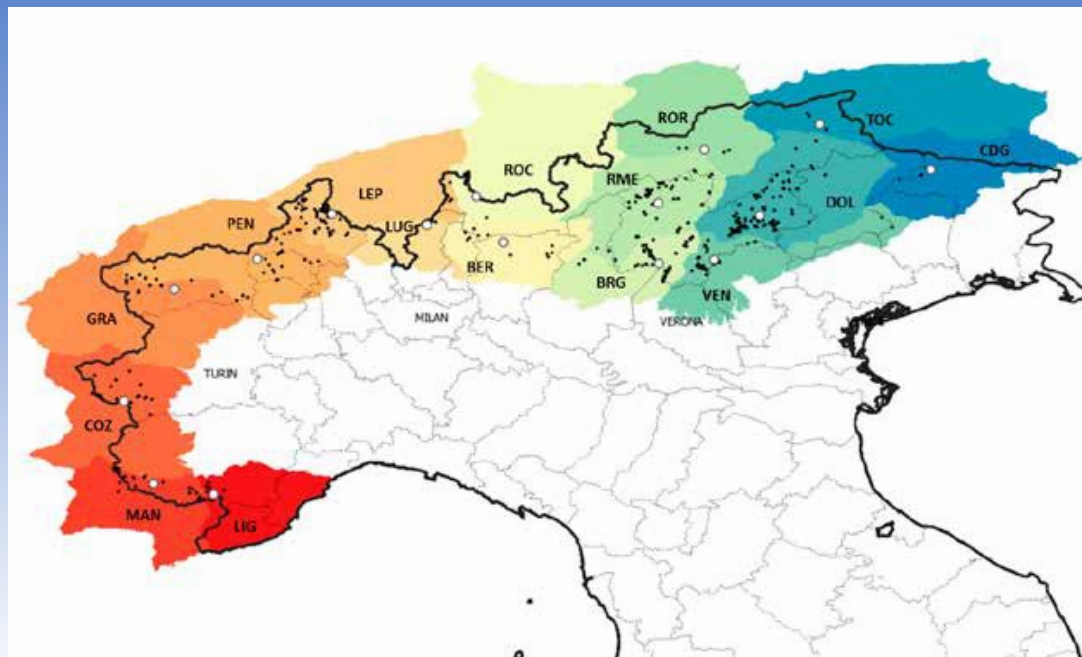
Rendere i dati scientifici raccolti uno strumento determinante nella formulazione degli interventi gestionali

UNCZA ha collaborato sia come ente finanziatore che collaboratore per la raccolta dei campioni

UNCZA-GEN

febbraio 2018-febbraio 2019

Campioni



REGIONE	PROVINCIA	N	N TOT
LIGURIA	IMPERIA	1	1
PIEMONTE	CUNEO	35	152
	OSSOLA	83	
	TORINO	29	
	VERCELLI	5	
VALLE D'AOSTA	AOSTA	30	
LOMBARDIA	BERGAMO	6	35
	BRESCIA	6	
	COMO	10	
	LECCO	3	
TRENTINO ALTO ADIGE	SONDRIO	10	
	BOLZANO	17	397
TRENTO	380		
VENETO	BELLUNO	3	8
	VICENZA	5	
FRIULI VENEZIA GIULIA	PORDENONE	1	5
	UDINE	4	
CAMPIONI TOTALI (UNCZA)			628 (248)

Distribuzione dei campioni sul territorio alpino

I colori rappresentano i principali Gruppi Montuosi secondo il sistema SOIUSA (Suddivisione Orografica Internazionale Unificata del Sistema Alpino)

Utilizzati **628** campioni (448 tessuti, 137 penne, 42 sangue)

380 Provincia Autonoma di Trento - circa 20 anni - tre periodi temporali 1995-1999, 2009-2010 e 2015-2017

248 UNCZA distribuiti in tutto il territorio alpino – periodo 2012-2017

Tipizzazione

10 LOCI STR (BG10, BG12, BG15, BG16, BG18, BG19, BG20, TUT1, TUT2, TUT3)

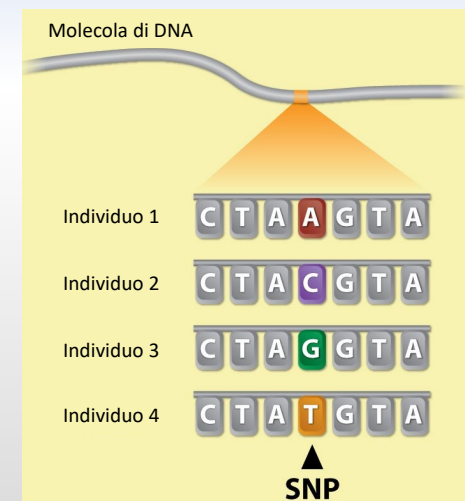
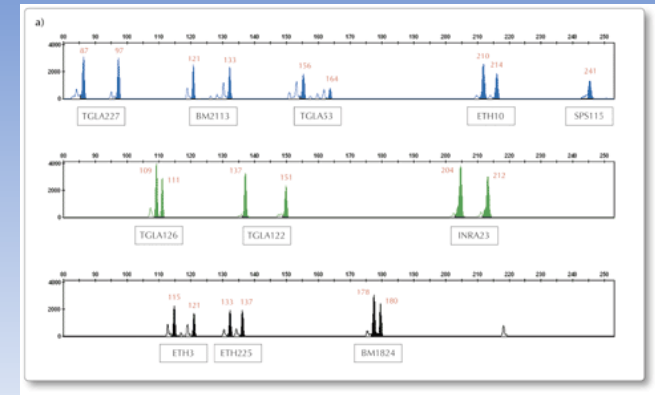
- 507 campioni

SNPs - Genotyping by Sequencing (GBS)

- 400 campioni
selezionati per avere una distribuzione omogenea dei campioni su tutto l'areale studiato
richiesta una qualità e quantità di DNA maggiore che per STR

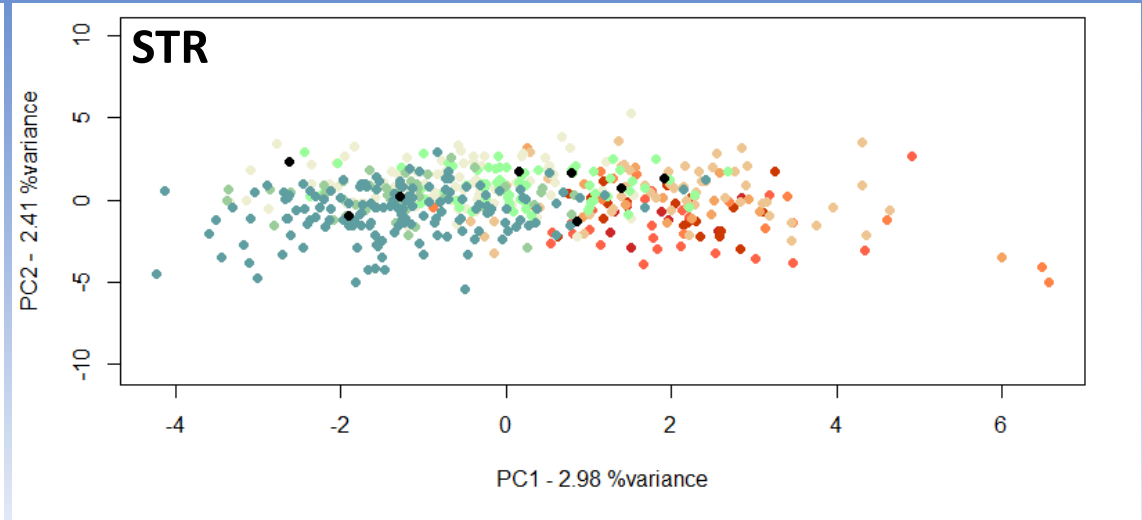
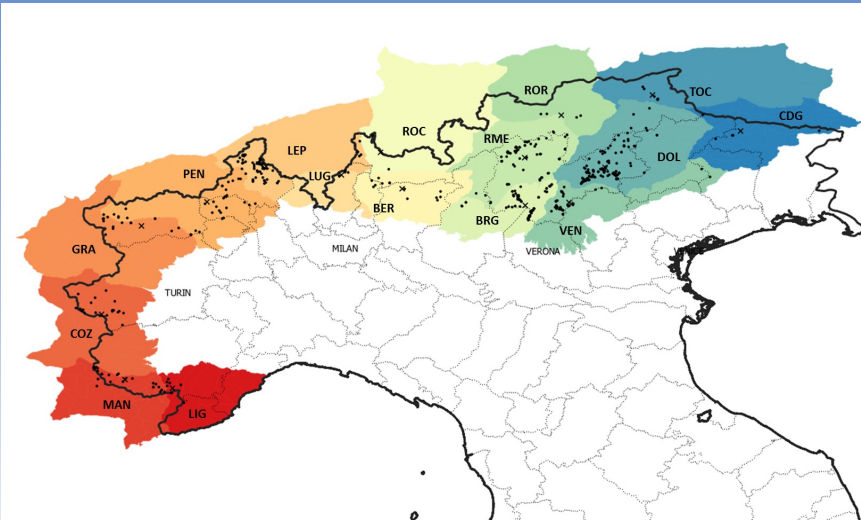
Il dataset finale è composto da **383** individui tipizzati per **28,752** SNPs

1 STR ↔ 10 SNPs



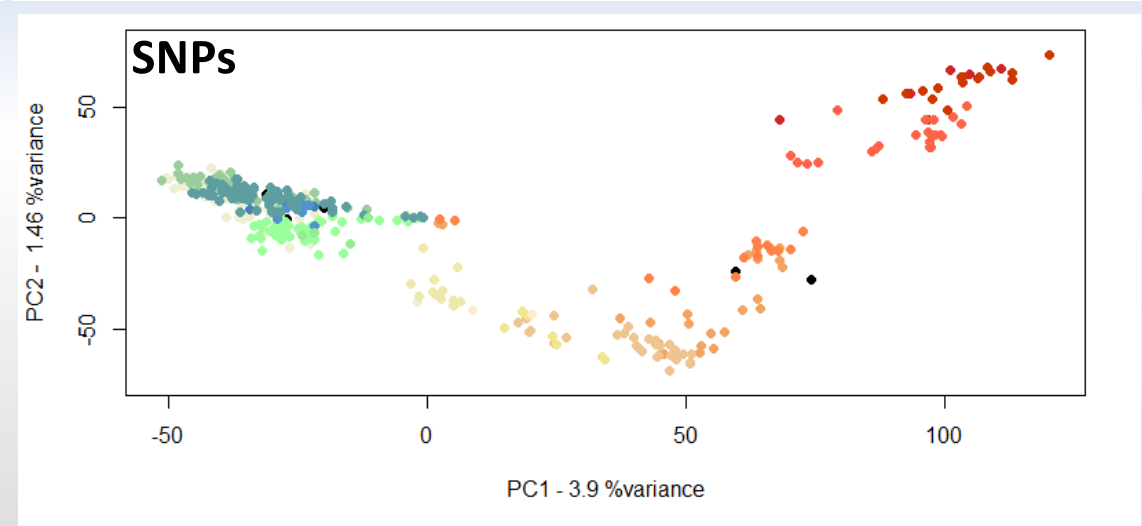
PCA – Analisi delle Componenti Principali

Rappresentazione grafica delle relazioni genetiche presenti tra individui e popolazioni



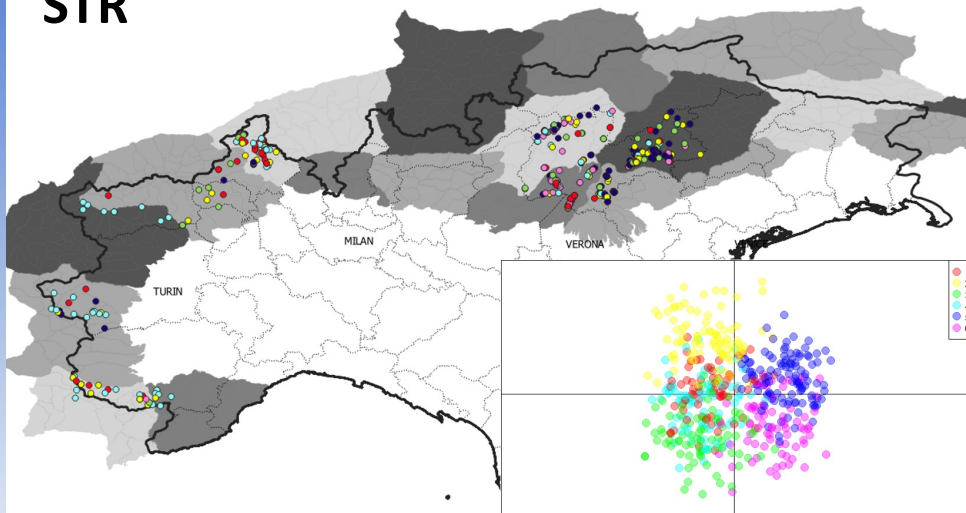
Ogni punto rappresenta un individuo

I colori rappresentano i principali Gruppi Montuosi



DAPC – Analisi Discriminante delle Componenti Principali

STR



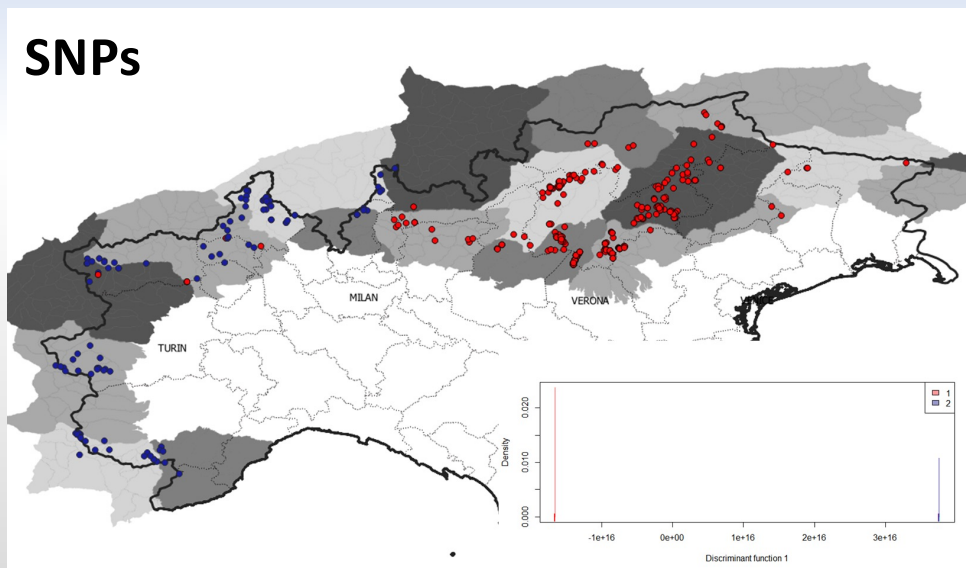
Identifica i gruppi genetici presenti nel territorio

- Ogni punto rappresenta un individuo
- I colori rappresentano i gruppi genetici identificati

STR:

- 6 gruppi geneticamente distinti
- Non presentano una struttura geografica

SNPs



SNPs

- 2 gruppi geneticamente distinti
- Punto di contatto dei due gruppi tra Alpi Lepontine – Prealpi Luganesi e Alpi Bernesi - Alpi Retiche Occidentali

IBD – Isolamento per Distanza

Il differenziamento degli individui può essere effetto della distanza geografica che li separa

- Legato alle caratteristiche biologiche della specie come la capacità di dispersione

IBD significativo: maggiore distanza geografica corrisponde a maggiore distanza genetica ($R=0,82$, $p<0,01$)

media 8 Km – max 29 Km
Caizergues ed Ellison, 2002



media 1.5 Km – max 8.2 Km
Caizergues ed Ellison, 2002



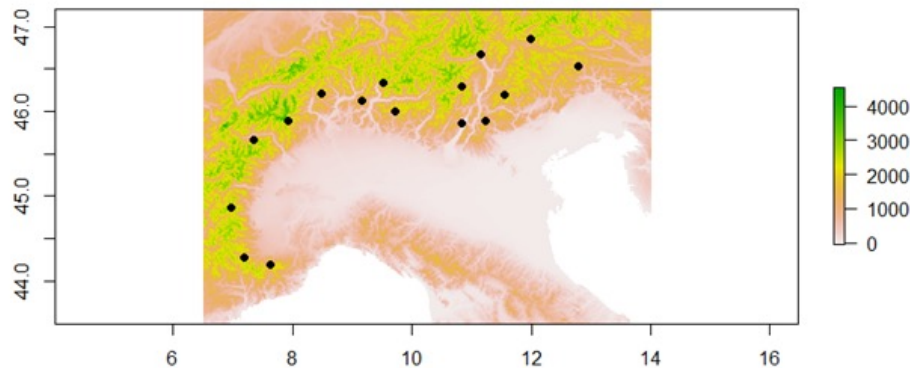
IBR – Isolamento per Resistenza

La capacità di dispersione e il differenziamento degli individui possono essere influenzati da fattori ambientali (barriere geografiche naturali e/o artificiali)

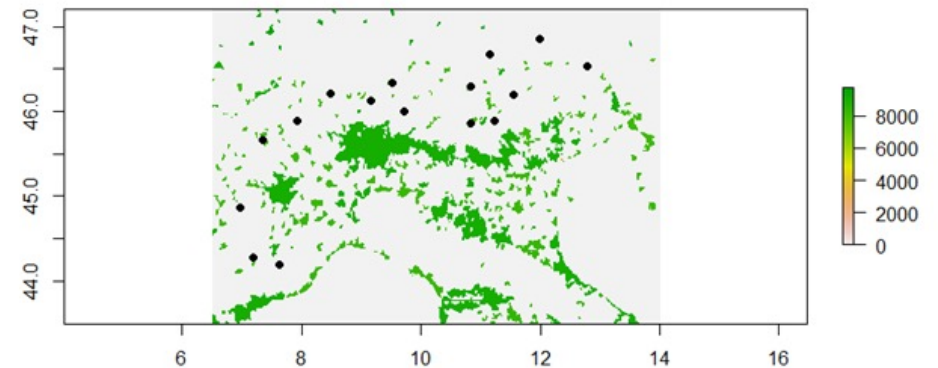
- La distanza geografica tra due individui non è lineare ma si tiene conto dell'ambiente idoneo presente
- Possibili barriere al movimento:
 - Quote fuori dal range altitudinale tipico (900 – 1800m s.l.m.)
 - Insediamenti urbani

IBR significativo: gli insediamenti urbani limitano il movimento così come l'alta quota (>2500m s.l.m.)

Quota



Insediamenti urbani



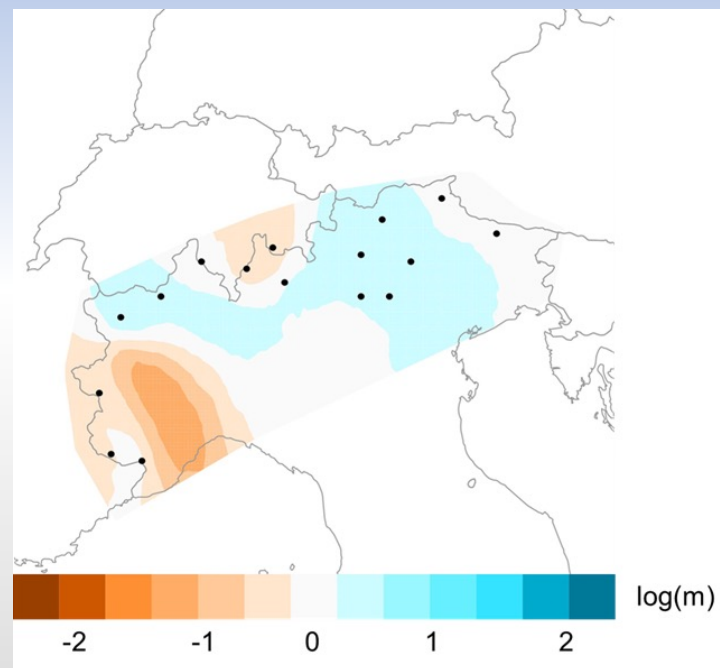
EEMS - Estimated Effective Migration Surfaces

Rappresentazione grafica dei differenti tassi di migrazione nell'areale studiato

Evidenza l'esistenza di possibili barriere al flusso genico tra le popolazioni delle Alpi

Livelli di dispersione inferiori:

- nelle popolazioni sud-occidentali (maggiore antropizzazione)
- tra Alpi Lepontine e Alpi Retiche Occidentali (alti livelli precipitazione primaverile)



Conclusioni preliminari

- Sulla base della struttura territoriale e della capacità di dispersione della specie ci si aspettavano livelli di differenziazione maggiori tra le popolazioni alpine residenti sulle diverse catene montuose
- Le popolazioni sui diversi gruppi montuosi sono solo moderatamente differenziate
- Sono presenti due gruppi genetici principali che entrano in contatto tra loro nella regione lombarda
- Il differenziamento genetico degli individui è influenzato sia da caratteristiche biologiche (capacità di dispersione) che ambientali (alta quota, insediamenti urbani, clima)
- Nessuna popolazione presenta bassi livelli di variabilità genetica
- I livelli di variabilità riscontrati sono comparabili a quelli rilevati per popolazioni del Nord Europa in buono stato di salute con livelli di connettività contigua e continua

Suggerimenti per la gestione

Una gestione attenta ed efficace della specie a livello Alpino dovrà mirare a mantenere nel tempo il livello di variabilità genetica riscontrata

Il mantenimento di un habitat idoneo e di corridoi che facilitino la dispersione degli individui è essenziale per evitare che possano avvenire in futuro fenomeni di isolamento

Le scelte, in termini di abbondanza e distribuzione dei prelievi, dovrebbero essere ridiscusse non solo in funzione dei criteri demografici ma, anche, identificando e preservando le aree principali attraverso le quali hanno luogo la dispersione degli individui ed il flusso genico



RACCOLTA DEI CAMPIONI

è fondamentale e necessita di un particolare sforzo

Accordo di collaborazione UNCZA, FEM ed ISPRA

realizzazione di attività di studio e ricerca sulla fauna tipica alpina

2013

sottoscritto il primo protocollo condiviso per la raccolta di campioni di galliformi alpini e lepre bianca

UNCZA (Unione Nazionale Cacciatori Zona Alpi)

- Raccolta dei campioni

ISPRA (Istituto per la Protezione e la Ricerca Ambientale)

FEM (Fondazione Edmund Mach)

- Progetti di ricerca basati sull'analisi genetica con finalità di migliorare la gestione/conservazione delle specie



Galliformi alpini e Lepre bianca

RACCOLTA di CAMPIONI per INDAGINE GENETICA

(Protocollo di lavoro)

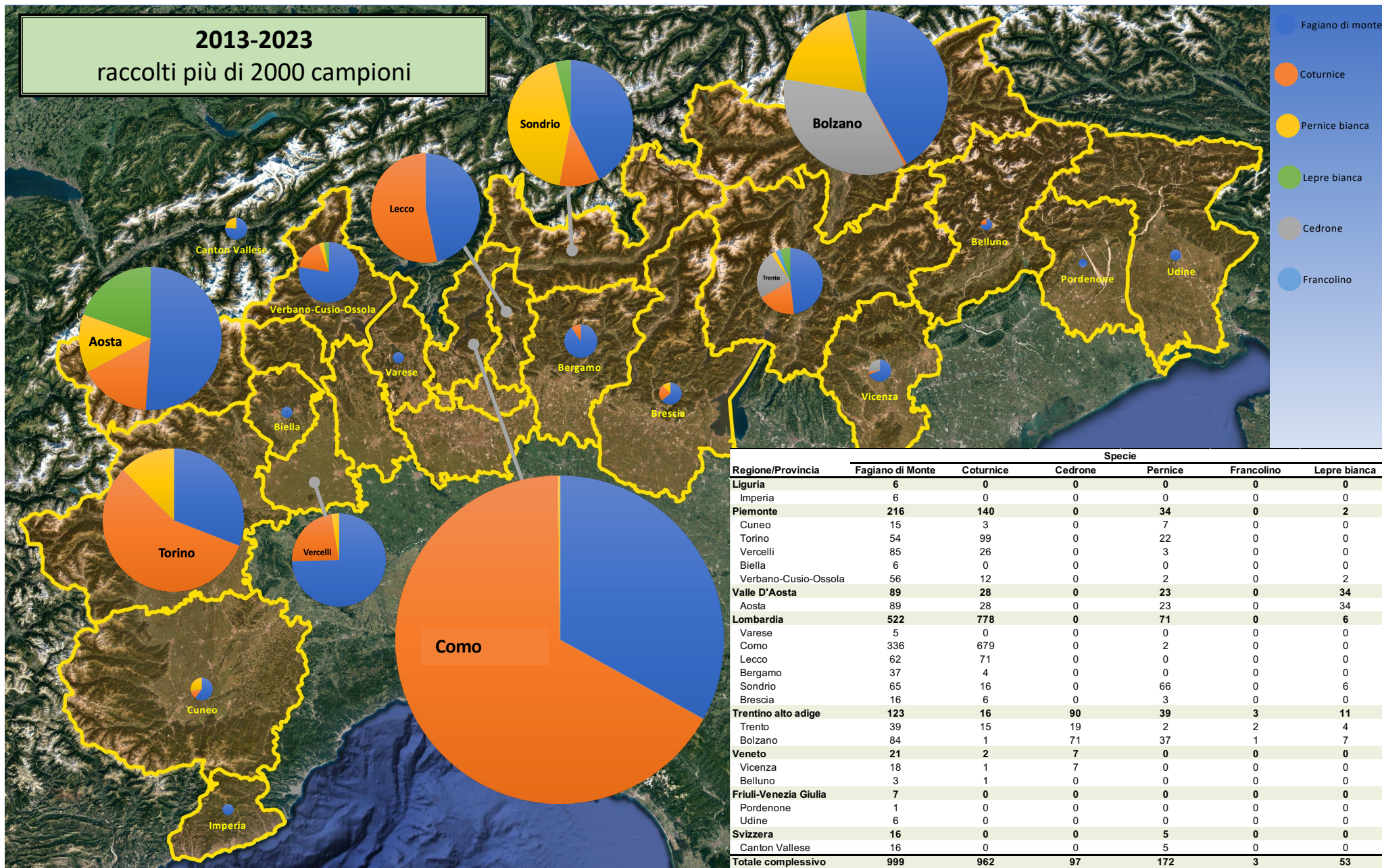
^ **SPECIE:** Gallo forcello – Coturnice – Pernice bianca – Gallo cedrone – Francolino di monte – Lepre bianca

^ **TERRITORIO:** tutte le Alpi italiane

^ **PERIODO:** triennio 2013 – 2015

2013-2023

raccolti più di 2000 campioni



Regione/Provincia	Specie					
	Fagiano di Monte	Coturnice	Cedrone	Pernice	Francolino	Lepre bianca
Liguria	6	0	0	0	0	0
Imperia	6	0	0	0	0	0
Piemonte	216	140	0	34	0	2
Cuneo	15	3	0	7	0	0
Torino	54	99	0	22	0	0
Vercelli	85	26	0	3	0	0
Biella	6	0	0	0	0	0
Verbano-Cusio-Ossola	56	12	0	2	0	2
Valle D'Aosta	89	28	0	23	0	34
Aosta	89	28	0	23	0	34
Lombardia	522	778	0	71	0	6
Varese	5	0	0	0	0	0
Como	336	679	0	2	0	0
Lecco	62	71	0	0	0	0
Bergamo	37	4	0	0	0	0
Sondrio	65	16	0	66	0	6
Brescia	16	6	0	3	0	0
Trentino alto adige	123	16	90	39	3	11
Trento	39	15	19	2	2	4
Bolzano	84	1	71	37	1	7
Veneto	21	2	7	0	0	0
Vicenza	18	1	7	0	0	0
Belluno	3	1	0	0	0	0
Friuli-Venezia Giulia	7	0	0	0	0	0
Pordenone	1	0	0	0	0	0
Udine	6	0	0	0	0	0
Svizzera	16	0	0	5	0	0
Canton Vallese	16	0	0	5	0	0
Totale complessivo	999	962	97	172	3	53

**Grazie per la fondamentale collaborazione
che ci avete offerto in questi anni!**

Dieta

Validazione dei protocolli di determinazione genetica della dieta a partire da campioni non-invasivi di feci

La digestione altera in modo significativo la capacità di determinare la dieta dell'individuo?

Dai **pacchetti intestinali** consegnati dai cacciatori prelevato contenuto del **ventriglio** e dell'**intestino retto**

Regione	Comprensorio Alpino	Estratti	Analizzati
Lombardia		11	11
	Alpi Comasche	11	11
Trentino Alto Adige		27	19
	Chiese-Ledro-Giudicarie-Rendena	8	5
	Pergine-Tesino-Alta Bassa Valsugana	19	14
Totale		38	30

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRENTO
Dipartimento di Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata - CIBIO



Determinazione dell'attendibilità di campioni fecali per lo studio della dieta animale, condotta attraverso analisi metabarcoding del regime alimentare del gallo forcello (*Lyrurus tetrix*)

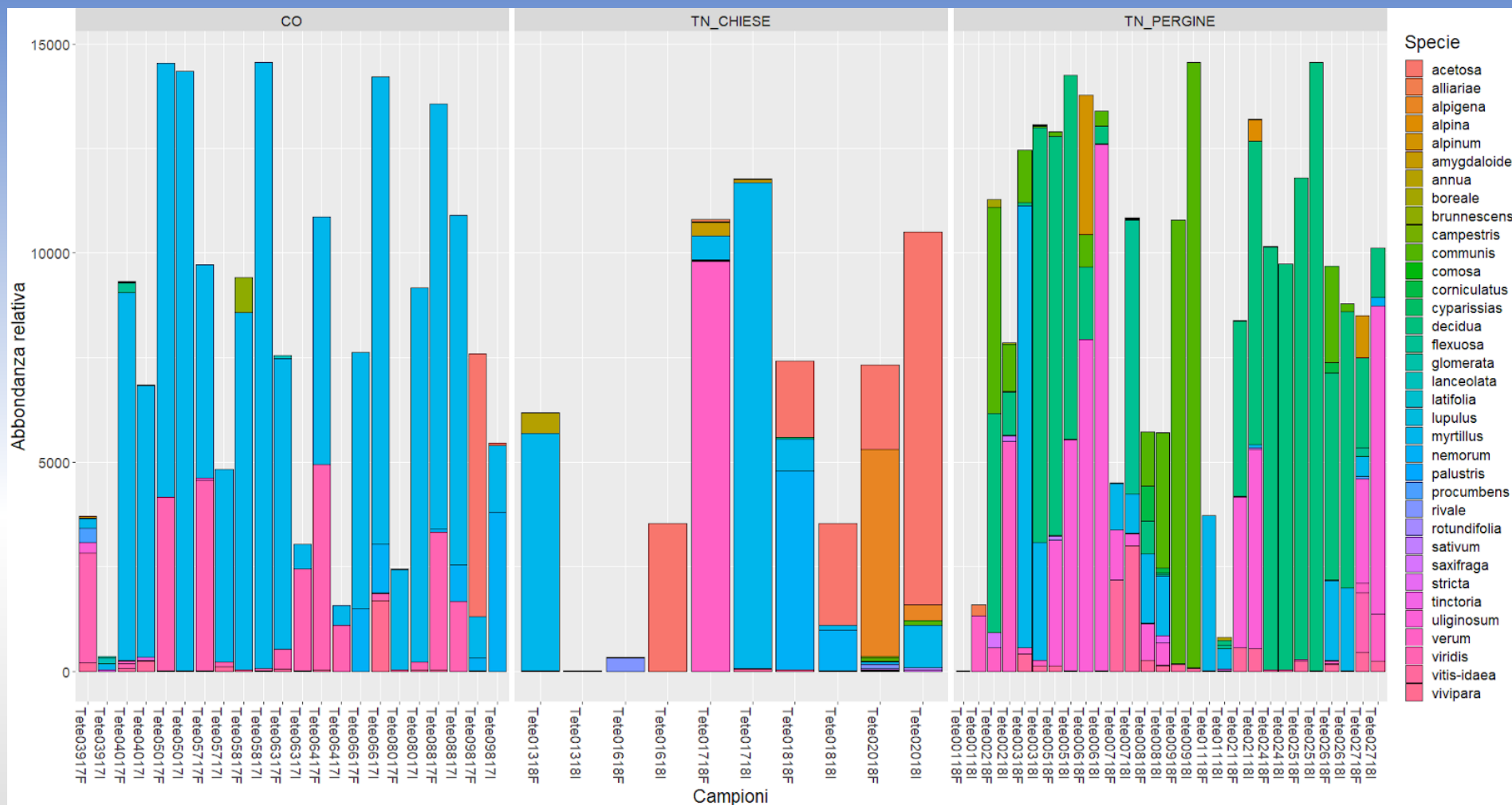
Laureando:
Jacopo Zucal

Supervisore UNITN:
Prof. Erik Dassi

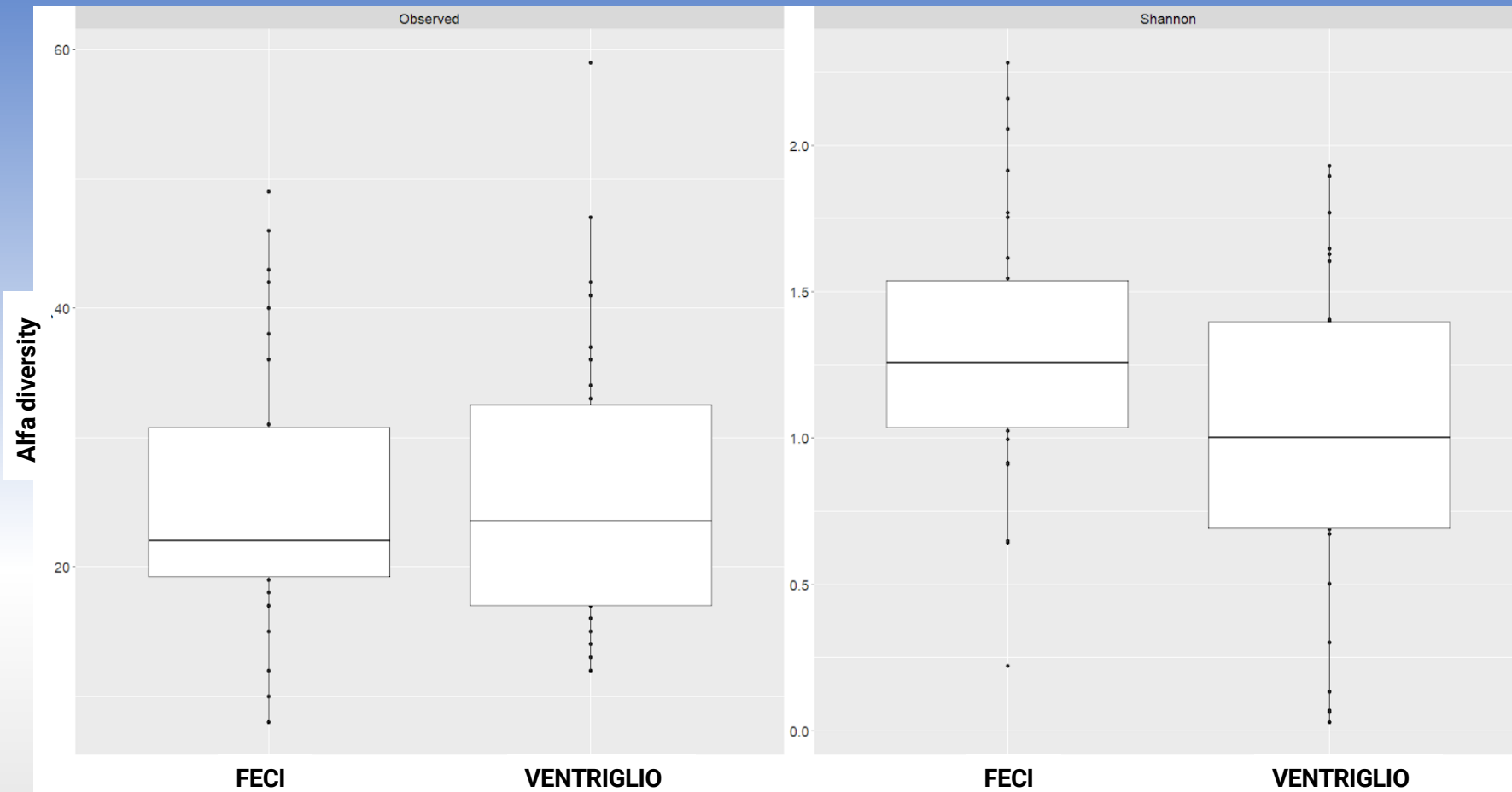
Supervisori FEM:
Dottori: Diego Micheletti, Barbara Crestanello, Heidi Hauffe

Anno Accademico 2021-2022

Abbondanza relativa (specie vegetali)

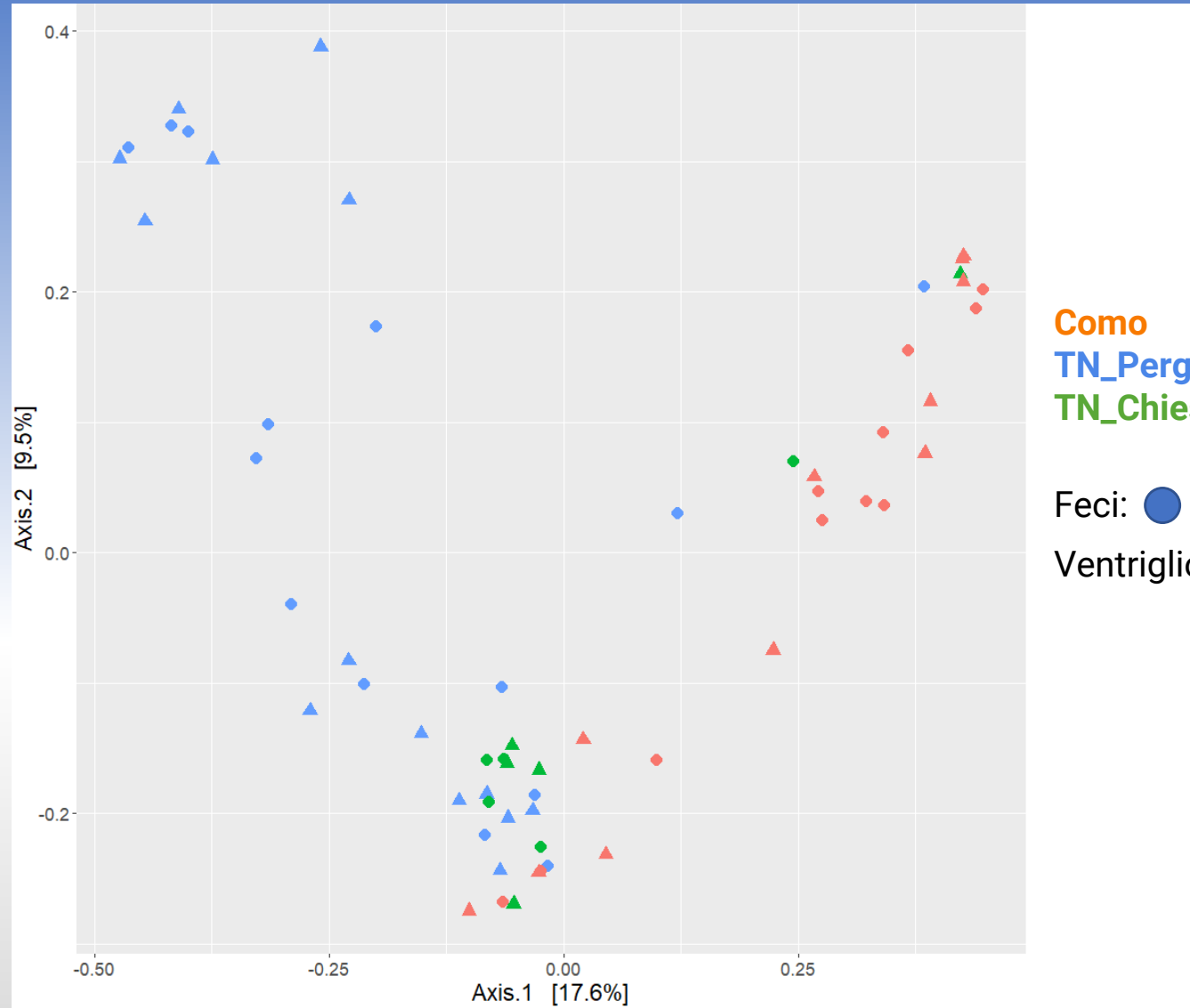


alfa diversity: variabilità del campione (feci vs ventriglio)



Feci e ventriglio non sono significativamente diversi per **ricchezza di specie** mentre lo sono per **abbondanza**

PCoA: provenienza geografica

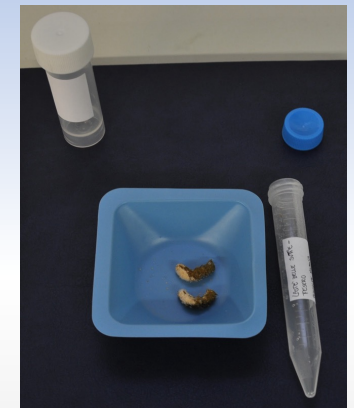


Como
TN_Pergine
TN_Chiese

Feci: ●
Ventriglio: ▲

Conclusioni

- la digestione ha un effetto sull'abbondanza dei taxa ma non sulla composizione
il metabarcoding è in grado di rilevare le specie presenti nella dieta
- diversità geografica effetto dell'ambiente sull'alimentazione dei soggetti
il metabarcoding è in grado di distinguere diete diverse



Vaccinium uliginosum



Vaccinium myrtillus



Rumex acetosa



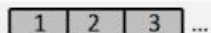
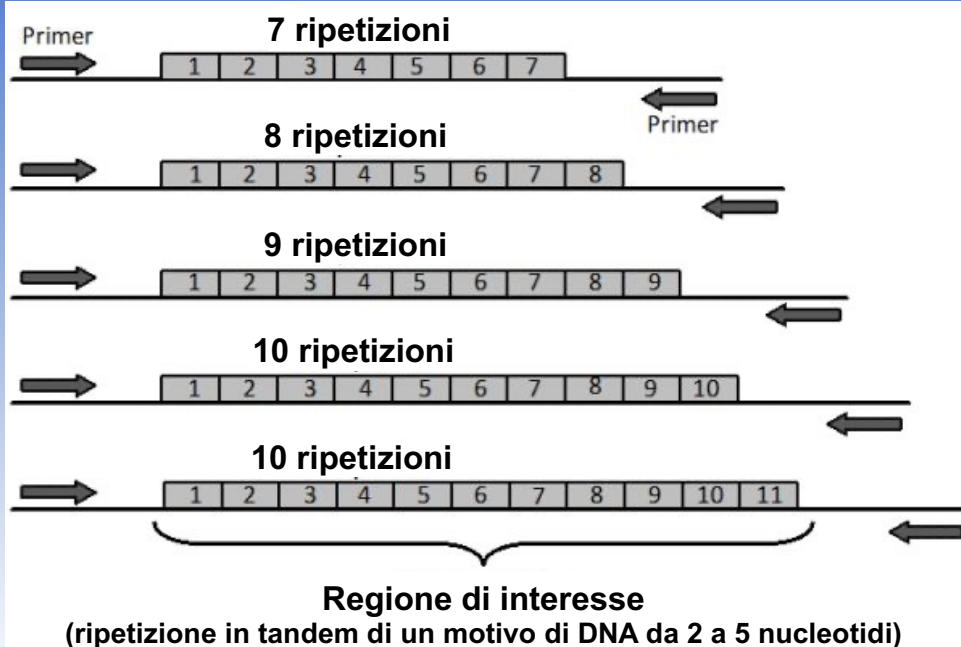
Larix decidua

CAMPIONI UNCZA utilizzati per:

- la messa a punto dei **PROTOCOLLI NON INVASIVI** per progetti di monitoraggio del cedrone – circa 20 campioni di cedrone della provincia di Bolzano;
- la messa a punto di un nuovo protocollo per l'analisi **GENOMICA** di tre specie di galliformi alpini - circa 250 campioni di fagiano di monte da varie regioni e province (Accordo UNCZA);
- un progetto esplorativo sull'analisi della **DIETA** tramite metodiche molecolari - utilizzati 11 campioni di fagiano di monte (intestini) provenienti dalle Alpi Comasche.

Microsatelliti

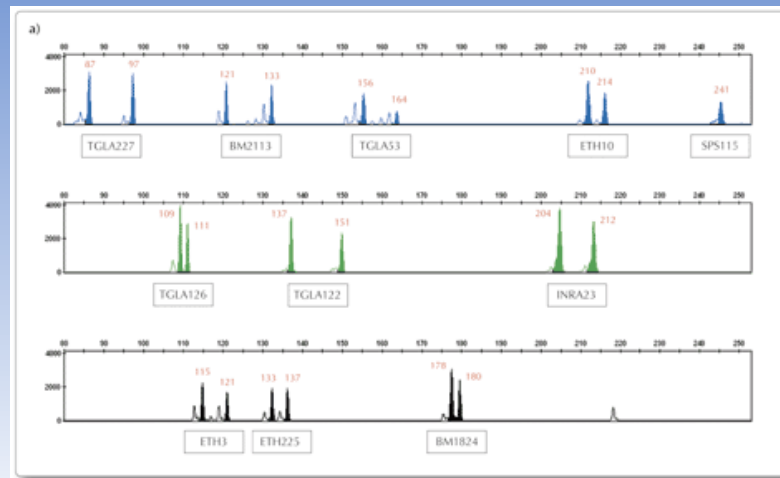
Marcatori genetici



- Unità ripetuta 2 nucleotidi : (CA)(CA)(CA)....
- Unità ripetuta 3 nucleotidi : (GCC)(GCC)(GCC)....
- Unità ripetuta 4 nucleotidi : (AATG)(AATG)(AATG)....
- Unità ripetuta 5 nucleotidi : (AGAAT)(AGAAT)(AGAAT)....

Loci tetranucleotidici riducono l'incidenza di errori nella tipizzazione

Un numero diverso di ripetizioni produce frammenti di differente lunghezza



Caratteristiche principali:

- alta variabilità
- dimensioni ridotte (<300bp)

Utilità:

- Variabilità su scala microgeografica
- Riconoscimento individuale

SNPs (Polimorfismo di Singolo Nucleotide)

Variazione della sequenza di DNA dovuta alla sostituzione di singoli nucleotidi

GBS (Genotyping by Sequencing)

