

IL FRANCOLINO di monte

Individuare un metodo standardizzato di monitoraggio della specie

La ricerca è volta ad aumentare le conoscenze su distribuzione, densità, rapporto tra i sessi e livelli di variabilità genetica del francolino di monte (*Tetrastes bonasia rupestris*) in un'area di studio del Parco Naturale Paneveggio-Pale di San Martino, con l'obiettivo di individuare un metodo di monitoraggio standardizzato per questa specie che permetta di stimarne i trend evolutivi e le dinamiche di popolazione in atto.

Con questo scopo si sono utilizzati gli strumenti della genetica di conservazione, una scienza sviluppata alla fine degli anni '70 che attraverso l'analisi degli acidi nucleici (DNA e RNA) consente di ottenere informazioni utili

per preservare le specie in quanto entità dinamiche in grado di adattarsi alle variazioni ambientali e climatiche, monitorando il livello di diversità genetica all'interno delle popolazioni naturali. Queste, se di scarsa entità numerica, sono esposte ad un processo di rarefazione progressiva che può condurre all'estinzione, quando a deriva genetica ed inincrocio non sia contrapposto un sufficiente flusso genico. L'interpretazione degli effetti che demografia e ambiente inducono sul patrimonio genetico consente di acclarare dinamiche di popolazione la cui valutazione diretta è altrimenti difficile, costosa e spesso onerosa per gli stessi animali (inannellamento, tracciamento radiotelemetrico), fornendo alla ricerca scientifica strumenti unici per lo studio di specie rare, elusive o vulnerabili. Il progresso tecnologico ha reso possibile, fin dagli anni '80, la conduzione di analisi genetiche a partire da materiale biologico rinvenuto in campioni non-invasivi (feci, penne/piume, peli, gusci d'uovo etc.), riducendo ulteriormente lo stress indotto agli animali oggetto di studio. In colla-

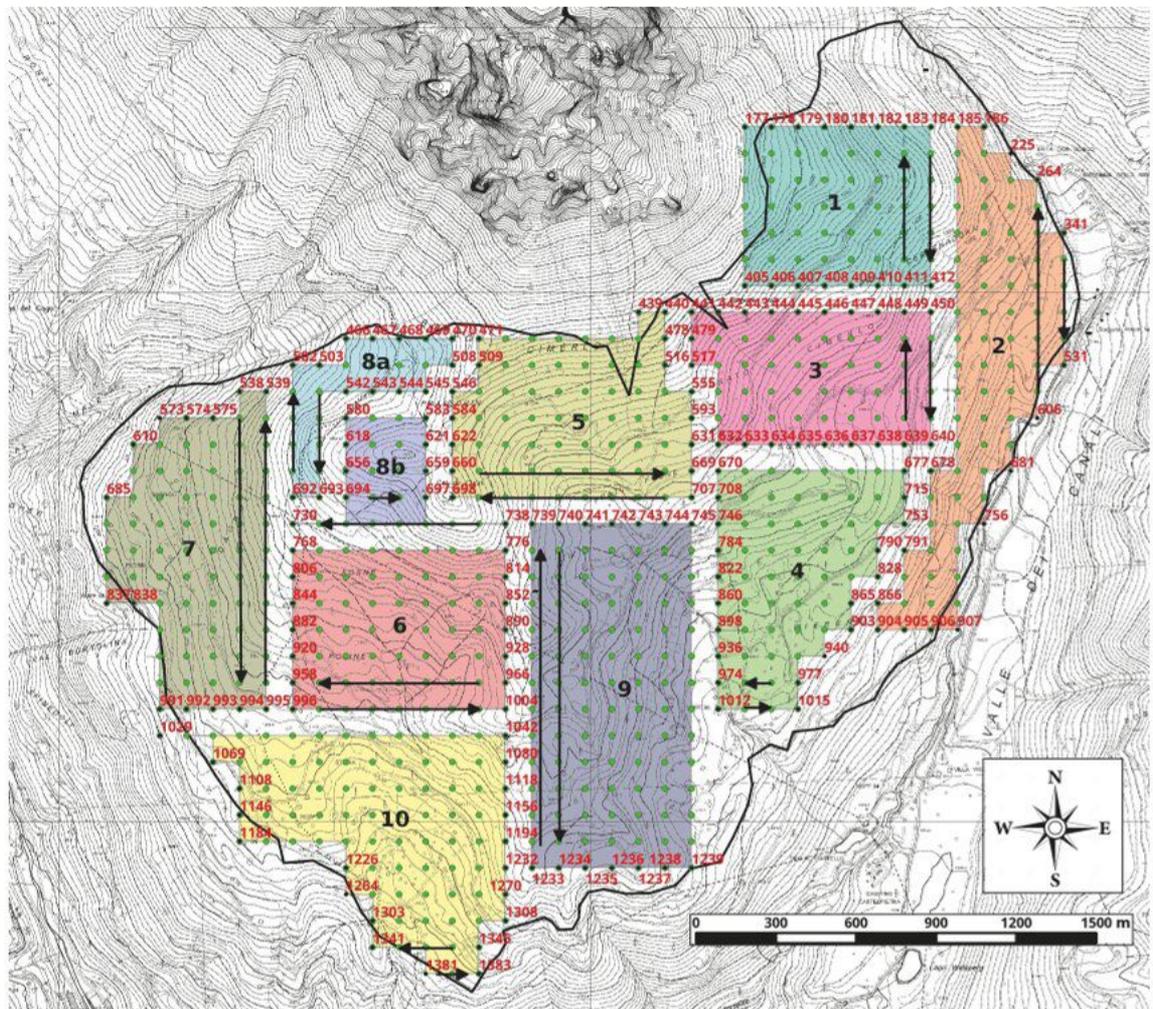
ROBERTO CELVA

borazione fra PNPPSM, Museo delle Scienze di Trento (MUSE) e Fondazione Edmund Mach (FEM) è stato eseguito un campionamento non invasivo di reperti biologici nell'area di studio, estesa per circa 700 ha tra le quote 1100 e 1670 m s.l.m. sul deposito detritico della parte meridionale del gruppo dolomitico (complesso Monte Cimerlo - Sass Maor), compresa fra la val Cimon e la val Canali. Avviato la tipizzazione genetica dei campioni raccolti tramite l'analisi di 3 marcatori molecolari, ossia tratti comuni di sequenza nucleotidica di dimensione relativamente breve rispetto all'intera molecola di DNA, la cui posizione all'interno del genoma è nota e che forniscono adeguati parametri di confronto intra- ed interspecifico.

Campionamento

Per affinare la replicabilità del metodo ed il successo di campionamento alla popolazione presente, includendo le migrazioni temporanee dai territori adiacenti, la raccolta degli indici di presenza ha seguito un protocollo di cattura-ricattura spaziale: sono quindi stati impostati dei transetti a direzione N-S e E-O basati su una griglia di punti georeferenziati equidistanti di 100 m, poi riuniti in 10 zone a direzione omogenea e percorrenza giornaliera, identificate con numerazione progressiva (Fig. 1). L'intera area di studio è stata percorsa 5 volte, così che ognuna delle 10 zone è stata campionata 5 volte ad intervalli approssimativi di 10 giorni. Ad ogni uscita sono stati registrati per tutti i transetti gli orari di inizio

Figura 1:
zone, transetti e direzione
di percorrenza a partire
dal primo punto



e di fine, lo sforzo sostenuto dall'operatore e la copertura nevosa media. Per ogni campione rinvenuto si è proceduto alla marcatura GPS delle coordinate, alla registrazione su scheda cartacea dell'identificatore (ID) campione, dei fattori ambientali nel raggio di circa 10 m, allo stoccaggio in provetta ed etichettatura del reperto. La raccolta ha compreso tutti i frammenti rinvenuti, per evitare di ricampionare lo stesso indice di presenza nelle uscite successive, usando pinzette sterili o guanti monouso al fine di ridurre la contaminazione per contatto.

Il periodo di campionamento si è protratto dalla messa a punto dei transetti il 22 dicembre 2015 al 29 aprile 2016; in caso di nevicata le uscite venivano rimandate di almeno 3 giorni, per permettere la deposizione degli indici di presenza. Sono così stati raccolti 143 campioni fecali ed un campione di penne/piume.

Il 77% dei campioni è stato rinvenuto in presenza di copertura vegetale maggiore al 50%, il 76% in ambiente caratterizzato dalla presenza di strutturazione forestale fornita dagli stadi giovanili di abete rosso (spessaia, novellame o rinnovamento). Soltanto 1 campione è stato raccolto in assenza di copertura vegetale, a distanza di circa 15 m dal bosco, mentre nessun campione è stato trovato all'interno di spessaie trattate.

La frequenza dei ritrovamenti è stata maggiore nelle aree con popolamenti vegetali eterogenei e con abbondanti ecotoni, mentre nelle zone a pecceta adulta la resa del campionamento è stata inferiore, aumentando con la presenza del faggio.

Analisi genetiche

Tutte le successive fasi di manipolazione dei campioni e di elaborazione dei dati si sono svolte nei laboratori del gruppo di Genetica di Conservazione della FEM. In seguito all'estrazione del DNA, 3 marcatori molecolari sono stati amplificati tramite PCR (reazione a catena della polimerasi: è una tecnica di laboratorio con cui i marcatori molecolari, da reperire all'interno del materiale genetico quantitativamente scarso e frammentato presente nei reperti biologici, vengono replicati in modo esponenziale così da renderli rilevabili dalla strumentazione e "leggibili" all'operatore) ed in seguito analizzati.

Un frammento di 449 paia di basi della D-loop del DNA mitocondriale (PHDL-PH-H521, Fumihito et al., 1995; Randi e Lucchini, 1998), che è una molecola circolare relativamente piccola, compatta e ad organizzazione aploide propria del mitocondrio cellulare e che, essendo trasmessa alle generazioni successive prevalentemente per linea materna, è meno soggetta ai cambi di sequenza che avvengono, nel DNA nucleare, ad ogni ciclo riproduttivo: queste caratteristiche consentono, in analisi, la distinzione della specie di provenienza dei reperti ed un inquadramento filogeografico della popolazione oggetto di studio. Inoltre, sono stati amplificati un locus nucleare per la determinazione del sesso (1237L-1272H, Kahn et al., 1998) e 12 loci microsatellite (TUT1, TUT2 e TUT3, Segelbacher et al., 2000; BG4, BG6, BG15, BG16, BG18, BG20, Piertney e Höglund, 2001; ADL142, ADL184, ADL230, Cheng e Crittenden, 1994): questi ultimi sono tratti di DNA nucleare formati da ripetizioni di un breve motivo nucleotidico (da 1 a 6 nucleotidi), sono co-dominanti, altamente polimorfici con tasso di mutazione di 10^{-5} - 10^{-3} /generazione/locus, i diversi alleli si distinguono per il numero di unità monomeriche ripetute all'interno della sequenza e, in analisi, consentono la distinzione degli individui campionati.

Durante lo svolgimento della ricerca presso la FEM, 93 campioni sono stati tipizzati al marcatore mitocondriale e sono risultati tutti appartenere a *T. bonasia*. 46 campioni hanno dato esito positivo, oltre che alla D-loop, sia al sessaggio che alla tipizzazione di almeno 7 dei 12 loci microsatellite (offrendo una probabilità di distinzione fra individui del 99,99968%), sono risultati appartenere a 31 esemplari diversi (17 maschi e 14 femmine) e sono stati l'oggetto delle successive considerazioni statistiche. I risultati mancanti verranno integrati, con la prosecuzione dello studio, in futuro.

Gli indici di diversità ai loci microsatellite assumono valori comparabili ad altre aree geografiche: il livello medio del coefficiente F_{IS} di inbreeding praticamente pari a zero (0,03) ed il livello di eterozigotà medio che, seppur non altissimo, non è sicuramente preoccupante in termini di perdita di variabilità genetica attesa entro piccole popolazioni (56%), escludono forti ridu-

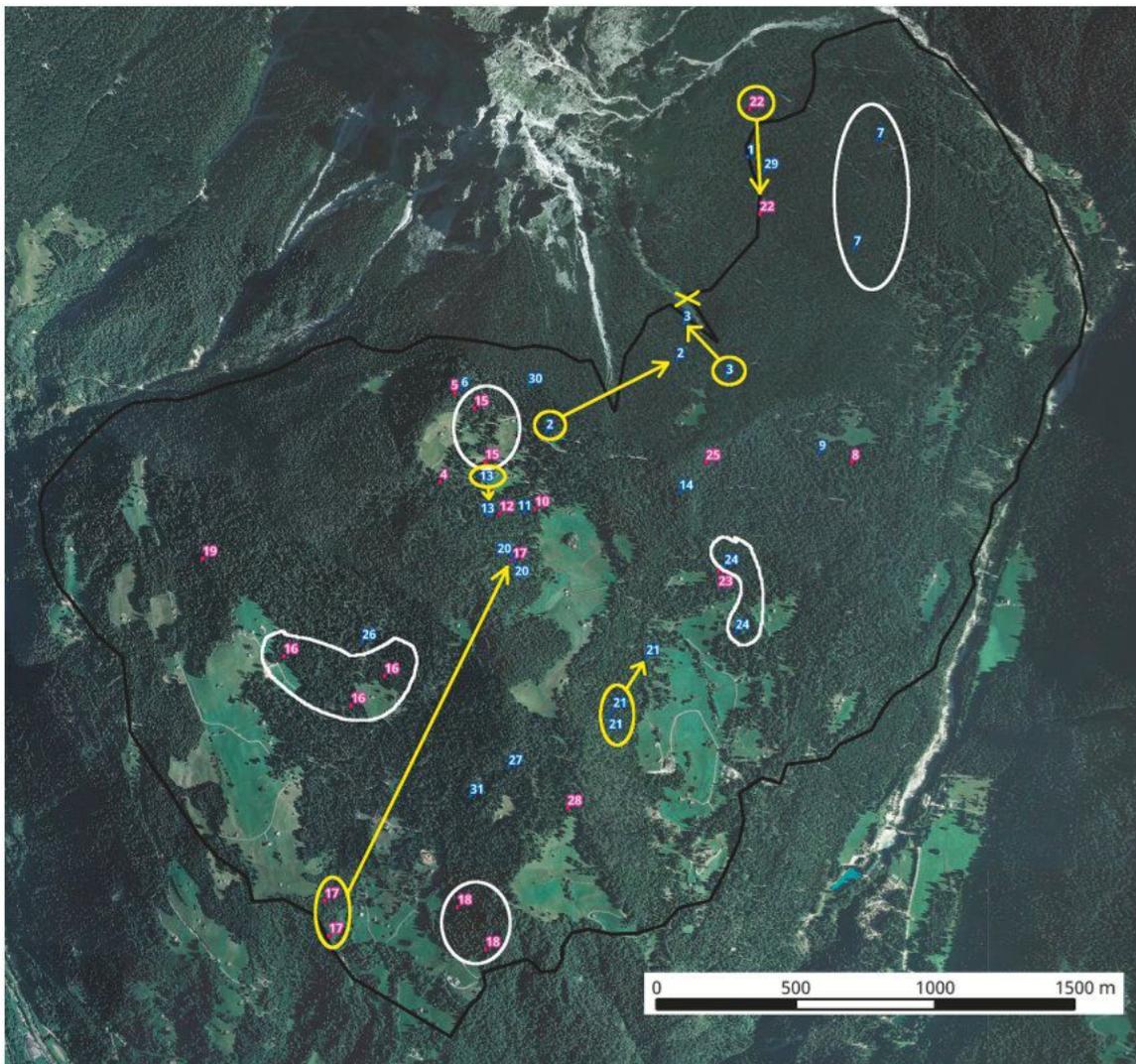


Figura 2:
campioni tipizzati
(numerati con ID blu
i maschi, rosa le femmine).
I campionamenti cerchiati
sono quelli effettuati durante
una singola uscita,
mentre le frecce in giallo
indicano quelli successivi

zioni di variabilità genetica al DNA nucleare tali da far pensare a rischi genetici.

La distinzione degli individui permette di inquadrare, sulla base del luogo di rinvenimento dei campioni, la distribuzione geografica degli esemplari durante l'attività di campo. I ricampionamenti (i.e. campioni differenti appartenenti allo stesso individuo) registrati nella medesima uscita (cerchiati in bianco in figura 2) offrono un'indicazione riguardo alla dimensione dell'areale giornaliero occupato: la distanza media tra questi campioni risulta essere di 200 m circa, mentre l'area descritta dall'unica triangolazione individuale giornaliera disponibile (ID 16) misura 2,36 ha. I ricampionamenti effettuati in uscite differenti (cerchiati in giallo in figura 2), in particolare quelli coincidenti con i periodi critici della biologia della specie (fine periodo invernale-inizio attività riproduttiva), possono riflettere una

selezione stagionale dell'areale: in questa casistica, esclusi un individuo (ID 3) deceduto per probabile predazione (campione di penne e piume) ed uno (ID 13) ricampionato a breve termine, la maggior evidenza di uno spostamento straordinario rispetto a quanto osservato a livello quotidiano è fornito dalla femmina 17, il cui terzo campione viene rinvenuto a fine Marzo a circa 1400 m di distanza dai primi due, all'interno di quello che sembra essere stato almeno da fine Gennaio l'areale del maschio 20.

L'analisi del marcatore mitocondriale riporta che i 31 individui tipizzati sono caratterizzati da due sequenze già depositate in banca dati e rinvenuti nell'area carpatica della Polonia meridionale (aplotipi H10 e H13, Rutkowski et. al., 2012). La diversità aplotipica (h) è pari a 0,45, la diversità nucleotidica (π) a 0,0020 e gli alleli sono presenti alle frequenze di 0,68 (H10) e 0,32

(H13). Essendo l'area campione del PNPPSM di piccole dimensioni, risulta inappropriato utilizzare gli indici di diversità al marcatore mitocondriale (sensibilmente inferiori rispetto ad altre aree europee) per effettuare confronti con altre popolazioni a livello continentale; si è invece proceduto alla ricostruzione di un network di aplotipi, includendo le sequenze analoghe già depositate in banca dati, per visualizzare un inquadramento filogeografico dei campioni rinvenuti. I due aplotipi del PNPPSM sono prossimi a quelli rinvenuti in Polonia meridionale, confermando (seppur a livello preventivo) l'ipotesi di Rutkowski et. al (2016), che suggerisce come le popolazioni di *T. bonasia rupestris* presenti in quell'area siano il frutto di una ricolonizzazione da parte di individui provenienti da un rifugio post-glaciale sito in Europa meridionale.

Conclusioni

La popolazione presente nell'area campione risulta numerosa rispetto alle aspettative, il rapporto fra i sessi è bilanciato (1,21) e non sembra al momento particolarmente minaccia-

ta; va tuttavia considerato che la sua sussistenza in quanto entità geneticamente coesa è vincolata all'interconnessione degli ambienti fruibili, in particolare quelli caratterizzati dalle fonti alimentari di elezione, tramite ecosistemi anche ristretti ("corridoi") purché strutturati soprattutto nella fascia vegetativa inferiore. Gli spostamenti a distanze maggiori di 100 m, sia interni che esterni al territorio stagionale, sono sempre riconducibili ad una porzione continua di superficie boscata.

In conclusione, per questo lavoro è stato svolto un campionamento non invasivo per una specie la cui situazione in termini conservazionistici non è chiara, principalmente a causa dell'elusività che ne caratterizza il comportamento e che ne rende difficile sia il censimento che il monitoraggio degli individui. L'analisi parziale dei campioni raccolti (32% sul totale dei rinvenimenti) ha permesso di ottenere numerose informazioni la cui valutazione risulta altrimenti dispendiosa e causa di disturbo agli animali studiati, mentre per altre (e. g. densità di popolazione, areale di coppia) è opportuno attendere il completamento delle analisi di laboratorio e statistiche. ■

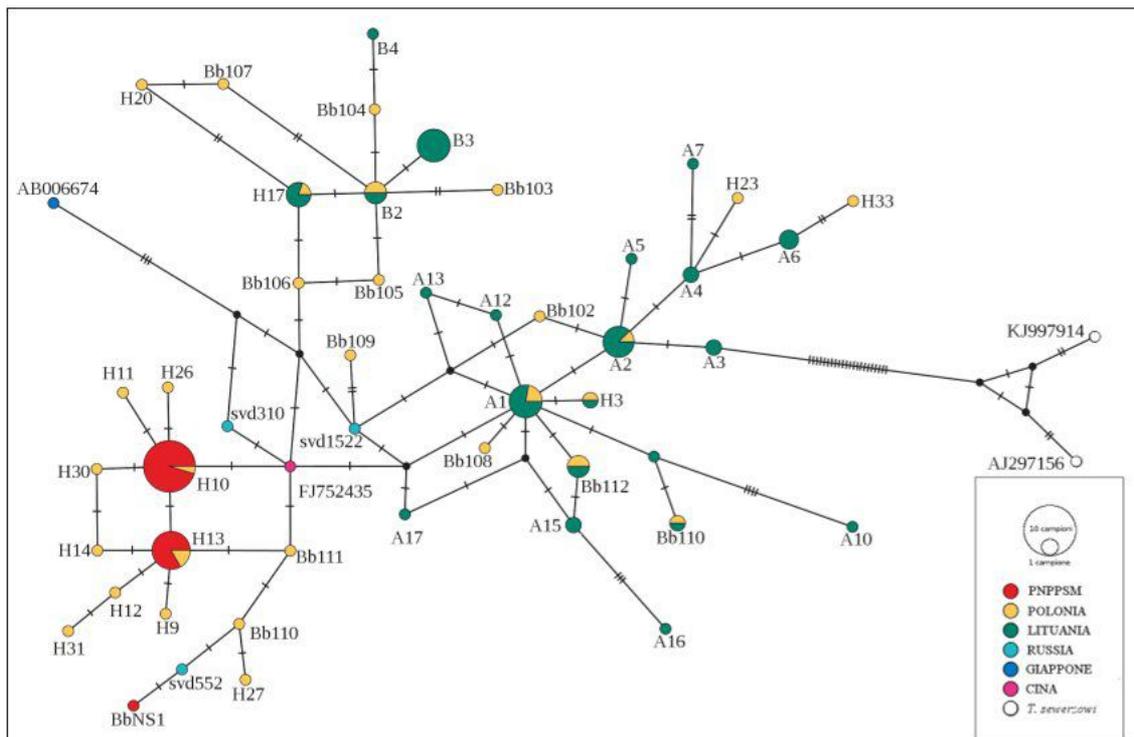


Figura 3: network degli aplotipi. Nel quadrante in basso a sinistra, le sequenze rinvenute nel campione (in rosso).