



Il Gallo forcello in AMBIENTE ALPINO

Messa a punto di un protocollo genomico per l'acquisizione di dati finalizzati alla gestione, in una ricerca UNCZA

INTRODUZIONE

Il gruppo di Genetica della Conservazione della Fondazione Edmund Mach (FEM) è da più anni impegnato nella caratterizzazione genetica di diverse specie di fauna alpina con scopi di conservazione, gestione e/o monitoraggio. Aspetto fondamentale per la buona riuscita di questi progetti è la realizzazione di un campionamento ampio ed esaustivo, che permetta di raccogliere una serie di dati in grado di fornire un quadro il più possibile completo della situazione attuale. Per questo UNCZA, insieme a FEM e ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale), hanno ritenuto di fondamentale

importanza l'attivazione di un accordo di collaborazione per la raccolta di campioni di fauna tipica alpina, idonei all'analisi genetica, secondo un protocollo comune condiviso a livello delle Alpi italiane. Lo scopo è la creazione di una banca dati biologica che sarà base fondamentale per la realizzazione di attività di studio e ricerca in ambito genetico molecolare.

Ed è proprio su parte di questi campioni che si basa la recente collaborazione tra UNCZA e FEM che aveva come obiettivo la messa a punto di un protocollo innovativo, idoneo all'acquisizione di nuovi dati applicabili alla gestione e conservazione del Gallo forcello in territorio alpino italiano. Lo studio della variabilità genetica permette di indagare gli effetti degli eventi passati, valutare le dinamiche future e prevedere gli esiti delle azioni dell'uomo e dei cambiamenti ambientali nelle popolazioni naturali.

La variabilità genetica costituisce il livello strutturale più semplice della biodiversità complessiva di un ecosistema ed è lo strumento necessario alle popolazioni per evolvere ed affrontare i cambiamenti ambientali che negli ultimi decenni avvengono in maniera sempre più rapida.

BARBARA CRESTANELLO
Department of Biodiversity and Molecular Ecology Research and Innovation Centre - Fondazione Edmund Mach

In collaborazione con
ALICE FRASER
dottoranda FEM-UNIFE

Gli effetti negativi dell'impoverimento genetico sulla fitness e sulle capacità di adattamento e sopravvivenza delle popolazioni naturali sono stati ormai ampiamente dimostrati: di conseguenza, le politiche di conservazione, gestione o uso sostenibile delle risorse faunistiche di un territorio, soprattutto quelle soggette a forte sfruttamento (caccia, pesca, traslocazioni, ecc.), non possono più trascurare la salvaguardia o il ripristino della biodiversità a questo livello.

Nel presente lavoro sono stati applicati i metodi di una nuova disciplina, conosciuta con il nome di "genomica di conservazione", che utilizza le informazioni ottenute dallo studio della variabilità presente nell'intero genoma al fine di preservare la vitalità e la biodiversità di una specie. Questo nuovo approccio permetterà di studiare, con un livello di dettaglio mai raggiunto prima, aspetti importanti legati alla storia demografica, all'ecologia e alla biologia di questa specie.

Il Gallo forcello è una specie a corologia euro-sibirica boreoalpina. Il suo areale distributivo, compreso fra le medie e le alte latitudini del continente euroasiatico, è il più vasto fra quelli dei

tetraonidi del Palearctico con una estensione longitudinale totale che supera i 6000 km. La distribuzione di questa specie è abbastanza continua nella parte nord-orientale dell'areale, grazie alla disponibilità di un habitat pressoché ininterrotto costituito dalle foreste boreali, mentre risulta piuttosto frammentata nella porzione sud-occidentale, in particolar modo in Europa centrale, dove è presente in piccoli nuclei isolati, relitti dei fenomeni glaciali.

In Italia il Fagiano di monte è presente sui rilievi alpini e prealpini, a quote comprese tra i 900 ed i 2000 m s.l.m.

Le popolazioni di Gallo forcello sono considerate pressoché stabili in gran parte del loro areale salvo che in Europa centrale ed occidentale, dove i contingenti della specie hanno subito a partire dagli anni '70 una rapida contrazione, che ha portato fino ad eventi di estinzione locale. Nell'Europa centrale, la popolazione più ampia e relativamente stabile è distribuita lungo la catena alpina.

Il pericolo maggiore che la conservazione del Gallo forcello deve fronteggiare a livello glo-

Tabella 1.

Numero di campioni di fauna tipica alpina raccolti, nelle Alpi Italiane e Svizzere, nell'ambito dell'accordo di collaborazione tra UNCZA, FEM ed ISPRA a partire dalla stagione venatoria 2010/2011. I campioni sono stati suddivisi per regione e provincia di campionamento.

Regione/Provincia	Specie					
	Gallo forcello	Coturnice	Cedrone	Pernice	Francolino	Lepre bianca
Friuli-Venezia Giulia	7	-	-	-	-	-
Pordenone	1	-	-	-	-	-
Udine	6	-	-	-	-	-
Liguria	6	-	-	-	-	-
Imperia	6	-	-	-	-	-
Lombardia	336	408	-	52	-	6
Bergamo	37	4	-	-	-	-
Brescia	16	6	-	3	-	-
Como	150	309	-	2	-	-
Lecco	62	71	-	-	-	-
Milano	1	2	-	-	-	-
Sondrio	65	16	-	47	-	6
Varese	5	-	-	-	-	-
Piemonte	163	49	-	21	-	2
Biella	6	-	-	-	-	-
Cuneo	15	3	-	7	-	-
Torino	1	8	-	9	-	-
Verbano-Cusio-Ossola	56	12	-	2	-	2
Vercelli	85	26	-	3	-	-
Trentino alto adige	123	16	90	39	3	11
Bolzano	84	1	71	37	1	7
Trento	39	15	19	2	2	4
Valle D'Aosta	89	28	-	18	-	34
Aosta	89	28	-	18	-	34
Veneto	21	2	7	-	-	-
Belluno	3	1	-	-	-	-
Vicenza	18	1	7	-	-	-
Svizzera	16	-	-	5	-	-
Canton Vallese	16	-	-	5	-	-
Totale complessivo	761	503	97	135	3	53

bale è l'alterazione dell'habitat. Il degrado e la frammentazione degli habitat hanno isolato certe popolazioni, rendendole particolarmente esposte al rischio di estinzione.

METODICA

Grazie alla concreta collaborazione dell'UNCZA e dei suoi soci, nell'ambito dell'accordo di collaborazione UNCZA-FEM-ISPRA, sono stati raccolti più di 1500 campioni (piume, pelo, tessuto) appartenenti alle 6 specie di fauna tipica alpina presenti in territorio italiano (Tabella 1). In particolare, sono stati raccolti 761 campioni di Forcelli, 173 dei quali sono stati utilizzati nel presente lavoro (Figura 1, Tabella 2).

I campioni di tessuto e piume sono stati estratti tramite il sistema automatico di separazione magnetica Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Germany).

La tipizzazione dei campioni è stata effettuata tramite la metodica "Genotyping by sequencing" (GBS – Elshire et al. 2011), che si è dimostrata efficace per l'identificazione di un elevato numero di polimorfismi di singolo nucleotide (SNPs) in specie non modello. Questa tecnologia si basa sul sequenziamento NGS di librerie di DNA genomico, arricchite in sequenze codificanti mediante l'utilizzo di enzimi di restrizione, e permette il sequenziamento simultaneo di numerosi campioni (96 o 384).

RISULTATI E CONCLUSIONI

Dall'analisi dei 173 campioni di Fagiano di monte con il metodo GBS sono stati ottenuti un totale di 2.442 Polimorfismi di Singolo Nucleotide (SNP). Il numero di marcatori ottenuto è buono considerando la qualità dei campioni originali, ma inferiore a quello atteso (normalmente tra i 10.000 e i 30.000 SNPs).

Tuttavia, un sequenziamento aggiuntivo, attualmente in corso, permetterà di raggiungere i risultati attesi e di approfondire le analisi.

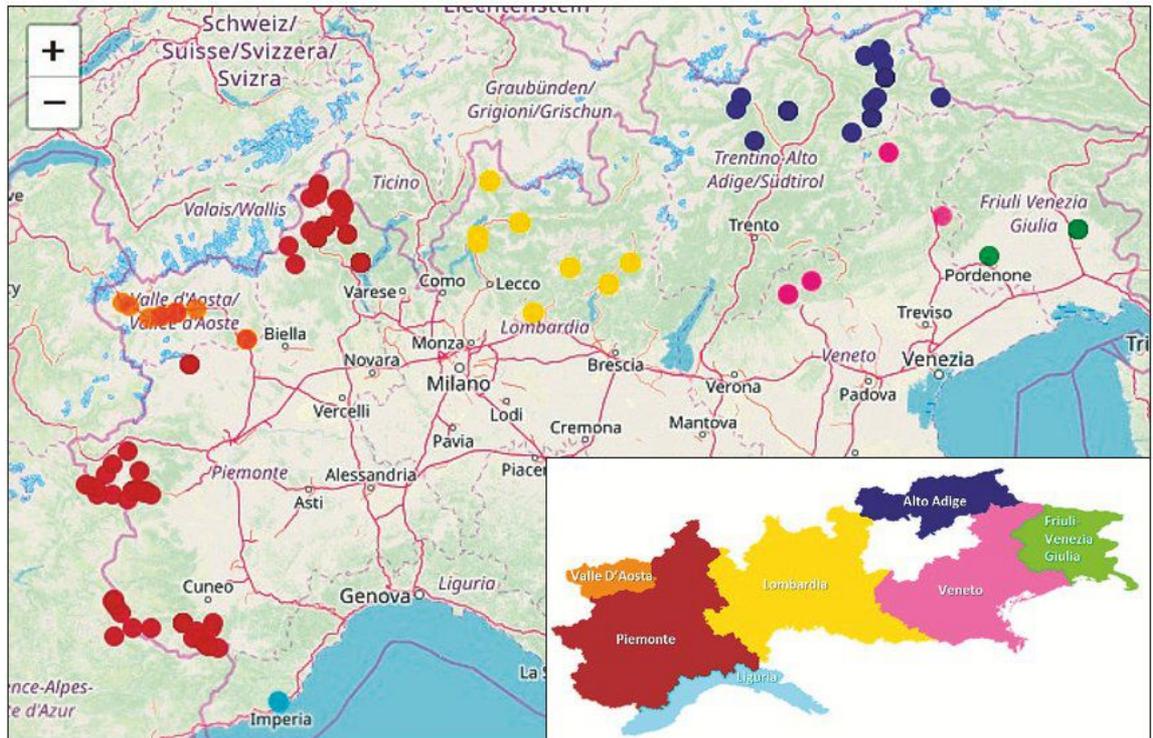
Di seguito riportiamo i risultati di alcune analisi preliminari effettuate con i 2.442 marcatori oggi a disposizione che dimostrano come l'analisi della diversità genetica presente tra gli individui possa essere fonte di informazione per la gestione di questa specie.

I valori di eterozigotità attesi e osservati, calcolati per ciascuna regione, sono compresi nell'intervallo 0,2-0,3. L'eterozigotità è un indice che varia tra 0 e 1 ed indica la quantità di variabilità genetica presente nei dati; più il valore è vicino ad 1 maggiore è la variabilità genetica presente. I livelli di eterozigotità riscontrati in questa analisi evidenziano livelli medio-bassi di variabilità genetica che potrebbero essere un segnale di sofferenza della specie studiata. Le relazioni genetiche esistenti tra i diversi individui e regioni sono rappresentate in modo semplificato nel grafico ottenuto dall'analisi delle componenti principali (PCA; Fig. 2). Il grafico evidenzia la

Regione	Provincia	N	H _E	Regione	Provincia	N	H _E
Alto Adige	Bolzano	17		Valle D'Aosta	Aosta	24	
	Tot	17	0.23		Tot	24	0.23
Lombardia	Bergamo	5		Piemonte	Cuneo	21	
	Brescia	6			Verbaio-Cusio-Ossola	41	
	Como	10			Torino	22	
	Lecco	3			Tot	84	0.23
	Sondrio	10		Tot	34	0.23	
Veneto	Belluno	3		Friuli-Venezia Giulia	Pordenone	1	
	Vicenza	5			Udine	4	
	Tot	8	0.27	Tot	5	0.24	
	CAMPIONI TOTALI			Liguria	Imperia	1	
					Tot	1	0.28
						173	

Tabella 2
Numero di campioni di fagiano di monte analizzati nel presente progetto, suddivisi per regione e provincia. Per ciascuna regione è riportata l'eterozigotità media attesa (H_E), calcolata usando il pacchetto 4P (Benazzo et al., 2015).

Figura 1.
Siti di campionamento degli individui di fagiano di monte utilizzati nel presente progetto. Ogni punto rappresenta un singolo individuo e i colori rappresentano le Regioni di campionamento come da riquadro. Mappa creata in R (R Core Team, 2018) usando il pacchetto leaflet (Graul, 2016).



presenza di una moderata struttura geografica. Le ellissi, che rappresentano le regioni, sono tra loro in parte sovrapposte e molti individui (rappresentati dai punti) si raggruppano nella parte centrale del grafico, indipendentemente dalla regione di campionamento (rappresentata dai colori). Inoltre, piuttosto che il raggruppamento di individui sulla base della provenienza geografica, alcune regioni (Piemonte, Lombardia e Alto-Adige), mostrano un'alta differenziazione al loro interno con individui che si espandono sui grafici lungo entrambi gli assi.

Per identificare la struttura genetica più compatibile con i nostri dati è stato applicato un apposito algoritmo che ha dato come risultato che gli individui analizzati possono essere ricondotti a due gruppi geneticamente distinti.

Nel grafico (Figura 3) gli individui rappresentati da una barra composta da due colori sono individui ibridi tra i due gruppi genetici individuati (POP1 verde, POP2 giallo). La maggior parte degli individui studiati presenta una componente genetica mista. Per valutare meglio la distribuzione geografica dei due gruppi genetici emersi dalle analisi, i risultati, in termini di

proporzione di appartenenza a ciascuno dei due gruppi, sono stati riportati anche sotto forma di grafici a torta sulla mappa del territorio alpino, considerando la composizione complessiva per ciascuna delle regioni. Analogamente ai risultati della PCA, non si riscontrano raggruppamenti su base geografica.

Il differenziamento degli individui in popolazioni può essere il risultato della distanza geografica che li separa ed essere, ad esempio, legato alle capacità di dispersione di una specie. Per testare se la differenziazione genetica osservata nel fagiano di monte sia legata alla distanza geografica è stato utilizzato il metodo di 'isolamento per distanza' (IBD), che studia come cambiano le distanze genetiche al variare delle distanze geografiche. Se i dati seguono un modello di isolamento per distanza, maggiore è la distanza geografica che separa due individui maggiore sarà la loro distanza genetica.

I dati mostrano un isolamento per distanza significativo (0,33, $p=0,0012$).

In generale, i dati genetici attualmente disponibili sono solo moderatamente influenzati dai pattern geografici. Non è stata, infatti,

PCA

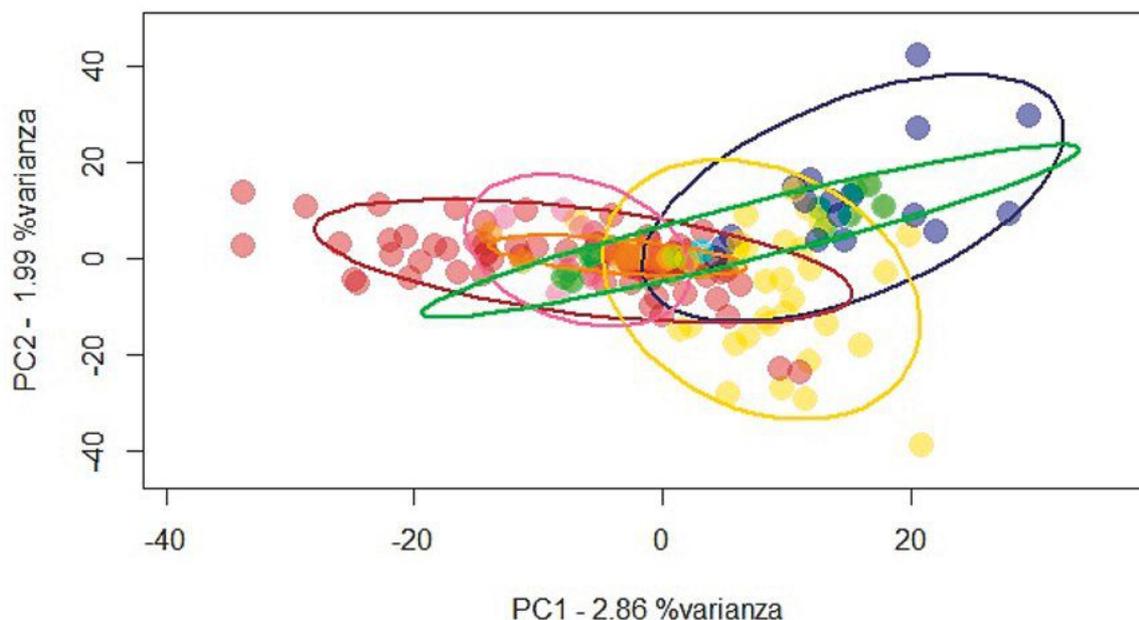


Figura 2.
Analisi delle Componenti Principali (PCA). Ogni punto rappresenta un individuo e le ellissi rappresentano le regioni (90% intervallo di confidenza dal centroide), i colori rappresentano le regioni di campionamento come da Figura 1. Più vicini sono due punti sul grafico più simili geneticamente sono i corrispondenti individui. Analisi effettuata in R (R Core Team, 2018) usando il pacchetto adegenet (Jombart et al., 2008).

evidenziata la presenza di popolazioni genetiche geograficamente distinte, ma solo segnali significativi di isolamento per distanza. Questo sta ad indicare un aumento progressivo della diversità genetica all'aumentare della distanza geografica. Diversamente da quanto atteso, per

una specie adattata all'ambiente di bassa montagna e con distanze di dispersione post-natale limitate, le catene montuose o le ampie valli presenti lungo l'Arco Alpino non sembrano essere delle reali barriere alla dispersione per questa specie.

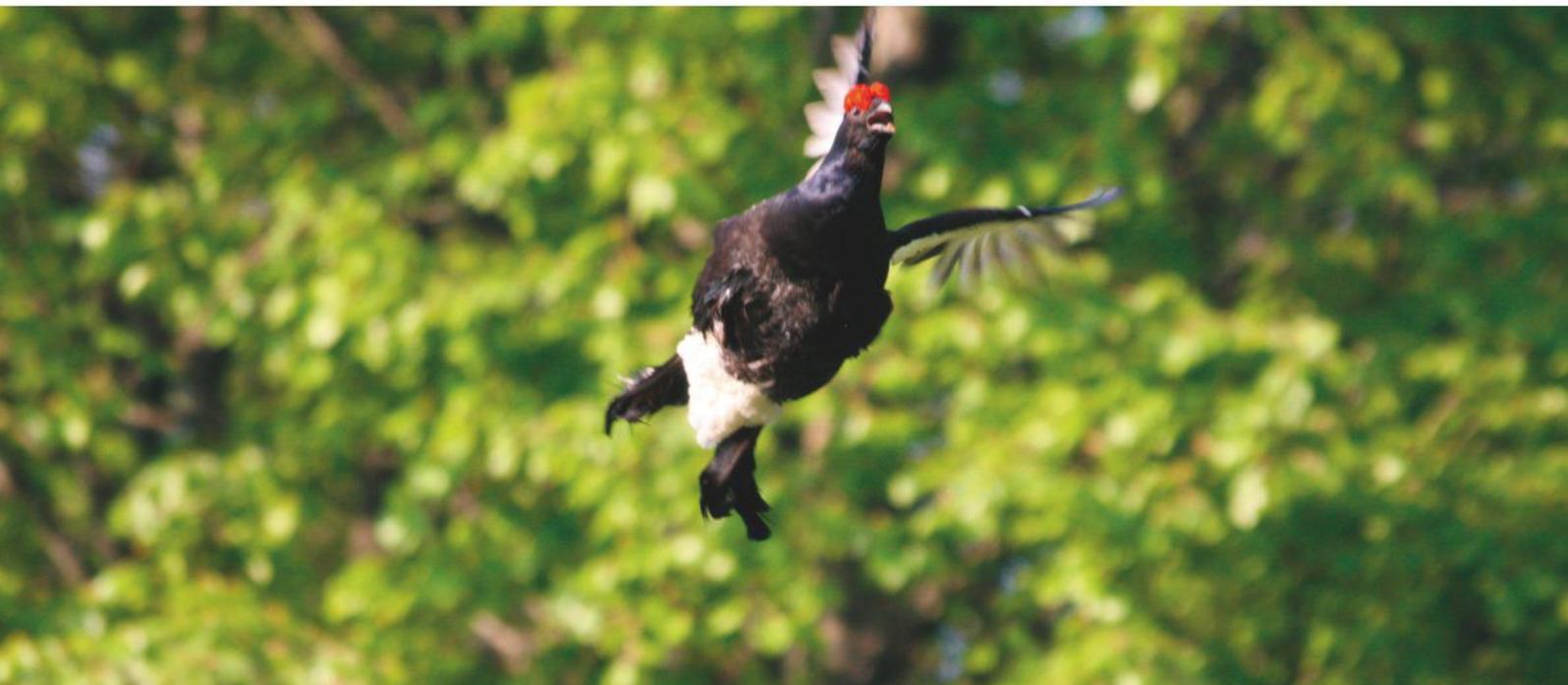
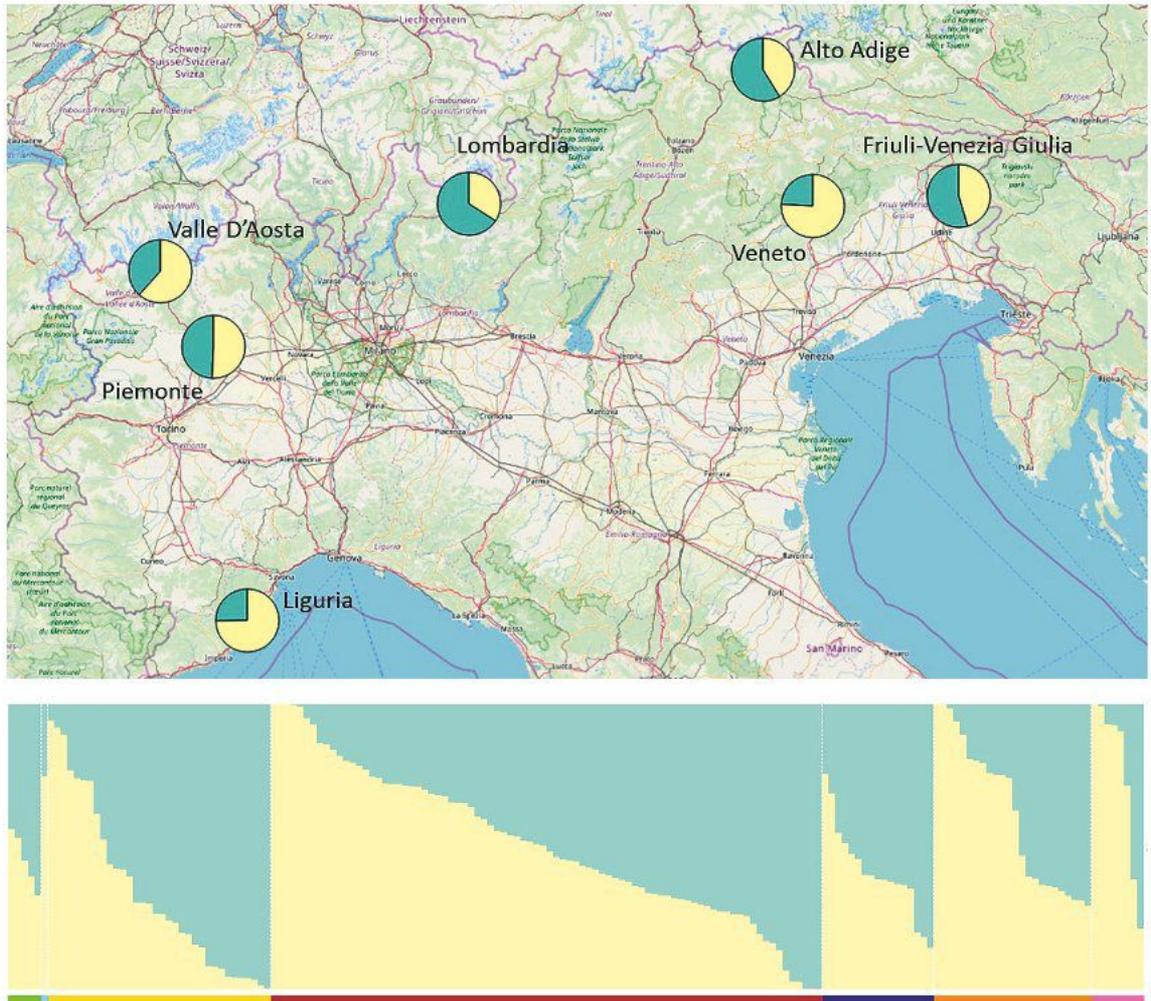


Figura 3. Contributo genetico delle 2 popolazioni inferite (POP1 verde, POP2 giallo) nelle Regioni e nei genotipi individuali. Nella mappa ogni cerchio rappresenta una regione, nel grafico ogni barra rappresenta un individuo e gli individui sono raggruppati per regione di provenienza (colori come da Figura 1). Mappa creata con QGIS (QGIS Development Team, 2019).



Rimane da approfondire la presenza, sull'Arco Alpino, di due gruppi geneticamente distinti, seppure omogeneamente distribuiti. La distribuzione omogenea sul territorio di individui con componente genetica mista, ma anche di individui 'puri' con componente genetica unica (completamente gialli o verdi nel grafico), fa pensare a fenomeni recenti di mescolamento tra gruppi precedentemente isolati, dei quali sarebbe importante identificare la provenienza.

In conclusione, una gestione attenta ed efficace della specie a livello alpino, dovrà tenere presente il livello medio-basso di variabilità genetica riscontrata. 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. Infatti, sebbene i dati non abbiano evidenziato fenomeni di isolamento genetico, la frammentazione delle aree idonee per la specie e la suddivisione in un gran numero di sottopopolazioni, tra loro diversamente connesse e, soprattutto, con densità demografiche molto variabili, rimangono tra le principali minacce alla conservazione del Gallo forcello.

Le analisi attualmente in corso, che prevedono oltre al sequenziamento aggiuntivo, l'analisi di nuove popolazioni distribuite sull'arco alpino italiano, attraverso una maggiore informazione genetica e una più ampia copertura geografica, consentiranno di valutare più in dettaglio, su scala più fine, quanto finora riscontrato per fornire così specifici suggerimenti gestionali. ■