UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI AGRARIA
FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE, NATURALI

TESI DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE E IL TERRITORIO
curr. ACAT

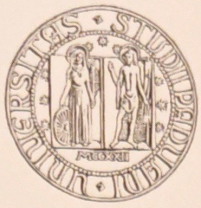
LA PERNICE BIANCA ALPINA *(Lagopus muta helvetica)*: UNA SOTTOSPECIE ENDEMICA IN DECLINO. FILOGEOGRAFIA, VARIABILITÀ GENETICA E ASPETTI BIOLOGICI

Relatore: Prof. Leonardo Congiu
Dip. di Biologia

Correlatore: Dott. Cristiano Vernesi
Centro Ricerca Innovazione
Fondazione Edmund Mach

Laureanda:
Margherita Collini
Matricola n. 602581 - STT

ANNO ACCADEMICO 2010- 2011



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI AGRARIA
FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE, NATURALI

TESI DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE E IL TERRITORIO
curr. ACAT

LA PERNICE BIANCA ALPINA *(Lagopus muta helvetica)*: UNA SOTTOSPECIE ENDEMICA IN DECLINO. FILOGEOGRAFIA, VARIABILITÀ GENETICA E ASPETTI BIOLOGICI

Relatore: Prof. Leonardo Congiu
Dip. di Biologia

Correlatore: Dott. Cristiano Vernesi
Centro Ricerca Innovazione
Fondazione Edmund Mach

Laureanda:
Margherita Collini
Matricola n. 602581 - STT

ANNO ACCADEMICO 2010- 2011

INDICE

RIASSUNTO - ABSTRACT pag. 5

1. INTRODUZIONE

1.1 PREMESSA pag. 7

1.1.1 Il Progetto ACE-SAP pag. 8

1.2 LA GENETICA DELLA CONSERVAZIONE pag. 10

1.2.1 La misura della diversità genetica: marcatori molecolari DNA mitocondriale e microsatelliti pag. 13

1.3 LA SPECIE: *Lagopus muta* (Montin 1776)

1.3.1 Tassonomia e descrizione morfologica pag. 17

1.3.2 Distribuzione e consistenza delle popolazioni pag. 19

1.3.3 Habitat e uso del territorio pag. 21

1.3.4 Fenologia stagionale pag. 22

1.3.5 Minacce per la specie e misure di protezione pag. 23

1.4 SCOPO DELLA TESI pag. 25

2. MATERIALI E METODI

2.1 CAMPIONI pag. 27

2.2 METODI DI LABORATORIO

2.2.1 Estrazione DNA pag. 33

2.2.2 Amplificazione e sequenziamento D-loop pag. 34

2.2.3 Amplificazione STR pag. 37

2.3 ANALISI STATISTICHE

2.3.1 DNA mitocondriale pag. 42

2.3.2 Microsatelliti pag. 45

3. RISULTATI pag. 49

3.1 FILOGEOGRAFIA E STRUTTURA pag. 51

3.2 VARIABILITÀ pag. 59

3.3 STRUTTURA SOCIALE , DISPERSIONE DEI SESSI pag. 61

4. DISCUSSIONE

4.1 FILOGEOGRAFIA ED EVOLUZIONE pag. 63

4.2 STRUTTURA E VARIABILITÀ pag. 67

4.3 STRUTTURA SOCIALE , DISPERSIONE DEI SESSI pag. 69

5. CONCLUSIONI pag. 71

6. RINGRAZIAMENTI pag. 73

7. BIBLIOGRAFIA pag. 75

RIASSUNTO

La pernice bianca alpina (*Lagopus muta helvetica*), sulle Alpi è, evolutivamente parlando, una specie relittuale del periodo glaciale; essa è oggi minacciata dal riscaldamento globale che ne riduce gli habitat favorevoli e dal disturbo umano sempre più frequente anche alle alte quote.

Sui Pirenei è già stata documentata una ridotta diversità genetica; sulle Alpi, in molte località, si è registrato un calo numerico delle popolazioni.

L'analisi della sequenza nucleotidica della D-loop del DNA mitocondriale in 148 individui e di dieci loci microsatelliti nucleari in 152 individui provenienti da diverse località dell'Arco alpino, con l'aggiunta di 38 aplotipi provenienti dall'intero range distributivo della specie, ci ha permesso di indagare la tassonomia, la storia evolutiva, i livelli di diversità e la struttura genetica della pernice alpina.

Le popolazioni di pernice di Alpi, Pirenei e Scandinavia formano un gruppo altamente supportato (100% e 1, bootstrap e probabilità a posteriori, rispettivamente) sia a livello di alberi filogenetici (ML e Bayesiano) che di network (Φ_{ST}=0.85, p<0.05). All'interno di questo gruppo gli aplotipi scandinavi si differenziano da quelli alpini-pirenaici (Φ_{ST}=0.19, p<0.05). I dati suggeriscono che *Lagopus muta*, presente in Europa prima dell'ultimo massimo glaciale (LGM, 23 000-18 000 anni fa), fosse già differenziata per vicarianza dalla progenitrice Nord americana e che l'attuale suddivisione tra aplotipi alpini-pirenaici e scandinavi sia dovuta ai processi di ricolonizzazione postglaciale.

Sulle Alpi, le analisi evidenziano una singola popolazione panmittica di pernice bianca, caratterizzata da alti livelli di variabilità genetica (H=0.79 al mtDNA; H_E=0.76 ai microsatelliti) se confrontati con quelli di altre popolazioni o specie non minacciate. L'assenza di struttura sembra derivare dal flusso genico supportato dalla dispersione del sesso maschile (F_{ST}D-loop>F_{ST}STR; F_{IS}femmine>F_{IS}maschi).

Nonostante non siano stati evidenziati segni di sofferenza genetica, la tutela di *Lagopus muta helvetica* resta comunque una priorità alla luce della sua unicità e dei cambiamenti climatici in atto che ne riducono l'habitat idoneo. Il mantenimento dell'attuale livello di diversità genetica può essere garantito tramite protezione della componente disperdente della popolazione, nel nostro caso i maschi, e attraverso un'attenta pianificazione degli interventi antropici ad alte quote che potrebbero introdurre barriere alla dispersione.

ABSTRACT

The alpine rock ptarmigan (*Lagopus muta helvetica*) is considered in the Alps as a relictual glacial species. It is nowadays threaten by global warming, that reduces suitable habitats, and by human disturbance, increasingly frequent at high altitude.
On the Pyrenees limited genetic variability was already documented; on the Alps a number of populations display a decreasing census size.

We analyzed sequence variation in the mitochondrial DNA D-loop for 148 individuals and ten microsatellite loci for 152 individuals in order to investigate evolutionary history, levels of genetic variability and structure of alpine rock ptarmigan. The samples came from different localities of the Alps.
The rock ptarmigan populations in the Alps, Pyrenees and Scandinavia belong to the same high supported group (100%; 1, bootstrap and posterior probability, respectively), both with phylogenic tree (ML and Bayesian) and network (Φ_{ST}=0.85, $p<0.05$). Within this group, Scandinavia haplotypes diverged from the Alps-Pyrenean ones (Φ_{ST}=0.19, $p<0.05$). *Lagopus muta* inhabits Europe before last glacial maximum (LGM, 23 000-18 000 years before present); our data suggest that it was already differentiated from its North American ancestor due to vicariance processes and that the current subdivision between Alps-Pyrenees and Scandinavia haplotypes might derive from a postglacial recolonization process.

On the Alps, analyses show a single panmictic population of rock ptarmigan, characterized by high level of genetic variability (H=0.79 at mtDNA ; H_E=0.76 at microsatellites) even when compared to not threatened populations or species. Absence of structure probably stems from the gene flow supported by male-biased dispersal (F_{ST}D-loop>F_{ST}STR; F_{IS}females>F_{IS}males).

We have not found sign of genetic depletion, but the protection of *Lagopus muta helvetica* remains a priority because of its peculiarity and because of climate change that decreases its suitable habitats. The maintenance of the current level of genetic diversity should be guaranteed by protection of dispersing male and by a careful planning of anthropic activity at high altitude, that could introduce barriers to dispersal.

1. INTRODUZIONE

1.1 PREMESSA

Le Alpi sono state identificate come la zona in Europa a maggiore vulnerabilità per gli effetti dei cambiamenti climatici. Studi modellistici ed *in situ* hanno già evidenziato variazione composizionale della flora alpina e aumento del pericolo di estinzione per numerose specie, soprattutto endemismi e specie caratterizzate da bassa capacità di dispersione (EEA, 2009); fra queste rientra anche la pernice bianca (*Lagopus muta helvetica*), che per la sua alta specializzazione alla vita in ambienti estremi, non può trovare habitat sostitutivi.

In queste aree è urgente l'identificazione di priorità di conservazione e la definizione di strategie di gestione delle specie, accompagnate da un'approfondita conoscenza delle caratteristiche biologiche, di struttura sociale e di popolazione (Frankham et al., 2006).

Nelle tundre artiche di America ed Eurasia la pernice occupa vasti areali, in zone a basso carico antropico, mentre su Alpi e Pirenei, al limite meridionale del suo areale, vive in habitat frammentati e in ulteriore restrizione. Altre minacce derivano dalla fruizione turistica, sia invernale che estiva degli ambienti di alta quota, che porta disturbo a questo piccolo tetraonide e dall'eccessivo prelievo venatorio in zone a facile accessibilità (Storch, 2007; Spagnesi M., L. Serra, 2004; Caizergues et al., 2003).

La salvaguardia di popolazioni piccole ed isolate diventa difficile perché entrano in gioco, oltre a quelli demografici e stocastici, anche i fattori genetici. La diminuzione della dimensione della popolazione comporta incrocio tra individui consanguinei e quindi riduzione della variabilità genetica, con conseguente diminuzione della capacità di adattamento ai cambiamenti ambientali. La bassa diversità genetica promuove, inoltre, l'espressione di alleli deleteri e conseguente aumento della frequenza di malattie genetiche che si esprime con una generale riduzione della fitness della popolazione (Frankham et al., 2006). La genetica della conservazione permette di rilevare precocemente situazioni di rischio e di attuare programmi che consentano di mantenere un livello di variabilità genetica tale da preservare le specie come entità dinamiche in grado di affrontare i cambiamenti ambientali (Frankham et al., 2006).

In Italia ed in varie Nazioni europee è stata riconosciuta la particolare situazione di fragilità delle piccole popolazioni frammentarie di *Lagopus muta* presenti sulle Alpi tanto da

essere inserita nella categoria "vulnerabili" della Lista Rossa Nazionale delle Specie Minacciate, redatta dalla IUCN (International World Conservation Union).

Partendo da queste considerazioni sono nati i primi importanti studi genetici delle popolazioni di pernice presenti alle basse latitudini europee, in particolar modo sui Pirenei, che hanno evidenziato ridotta variabilità genetica e strutturazione locale delle popolazioni (Caizergues et al., 2003; Bech et al., 2009).

Per le popolazioni alpine le conoscenze, sia biologiche che genetiche, sono ancora sommarie ed in molte regioni italiane è aperto lo scontro tra WWF (World Wide Fund) e altre associazioni ambientaliste (e.g. LIPU, Lega Italiana Protezione Uccelli) e associazioni venatorie sulla chiusura o meno della caccia alla pernice.

Questo studio, inserito nel contesto del Progetto ACE-SAP, vuole partire da qui: quali sono i livelli di diversità genetica di *Lagopus muta helvetica*? Qual è il grado di attenzione da porre nei confronti delle popolazioni di pernice bianca sulle Alpi?

Solo attraverso l'integrazione dei dati genetici e biologici della specie con le teorie evolutive ed i possibili scenari di cambiamenti climatici si potranno dare infine le giuste indicazioni per la conservazione e la gestione della specie.

1.1.2 Il Progetto ACE- SAP

ACE- SAP (*Alpine ecosystem in a Changing Environment: Biodiversity Sensitivity and Adaptive Potential*) è un progetto multidisciplinare, condotto da più istituzioni, incentrato sullo studio della biodiversità del territorio della Provincia di Trento, attivo da ottobre 2008.

Per biodiversità, come definito dalla Convention on Biological Diversity (CBD), s'intende "la variabilità tra gli organismi viventi provenienti da tutti gli ambienti inclusi, fra gli altri, gli ecosistemi terrestri, marini e acquatici in senso lato, e i complessi ecologici di cui essi fanno parte; questo include la diversità dentro una stessa specie, tra specie diverse e la diversità degli ecosistemi". Conservare e valorizzare la biodiversità è di fondamentale importanza: essa mantiene la produttività degli ecosistemi e fornisce risorse per le popolazioni umane che in

essi abitano. La CBD, a questo scopo, aveva avviato l'iniziativa "Countdown 2010" avente lo scopo di "arrestare la perdita di diversità biologica a tutti i livelli entro il 2010".

Il Progetto ACE-SAP, finanziato dalla Provincia Autonoma di Trento, vede la collaborazione di tre istituzioni regionali, Museo Tridentino di Scienze Naturali, Museo Civico di Rovereto, Fondazione Edmund Mach, e di un partner esterno, Università di California Davis.

I principali aspetti che vengono indagati riguardano:

1. lo studio e la conservazione di taxa a rischio/endemici che costituiscono una componente unica e insostituibile della diversità biologica in Trentino;
2. gli impatti diretti che cambiamenti o perdita della biodiversità possono determinare per la popolazione umana che vive su questo territorio;
3. lo studio di particolari meccanismi ecologici e genetici attivati dagli organismi viventi per potersi adattare ai fattori ambientali di stress;
4. la valutazione, con strumenti adeguati allo stato dell'arte, degli attuali livelli di biodiversità e l'identificazione di strumenti innovativi per monitorare, conservare, gestire e sfruttare la biodiversità stessa in modo sostenibile.

Lagopus muta helvetica rientra nell'ambito delle attività previste per il primo punto; in Trentino la popolazione sta subendo una graduale diminuzione, registrata grazie ai costanti censimenti effettuati da Associazione Cacciatori Trentini e dal Servizio Foreste e Fauna della Provincia Autonoma di Trento. Viene classificata come specie "in pericolo" nella lista provinciale IUCN.

1.2 LA GENETICA DELLA CONSERVAZIONE

L'estinzione costituisce una fase naturale del processo evolutivo, in quanto le specie persistono tipicamente per 5-10 milioni di anni; se questa, come sta avvenendo attualmente, non è bilanciata dalla speciazione, si va incontro a riduzione della biodiversità. Oggi siamo di fronte alla cosiddetta "sesta estinzione": un numero molto elevato di specie si è già estinto e, secondo i criteri IUCN, il 21% degli animali vertebrati, il 31% degli invertebrati ed il 68% delle specie vegetali sono "minacciate", cioè con un alto rischio di estinguersi nel breve periodo (IUCN, 2010).

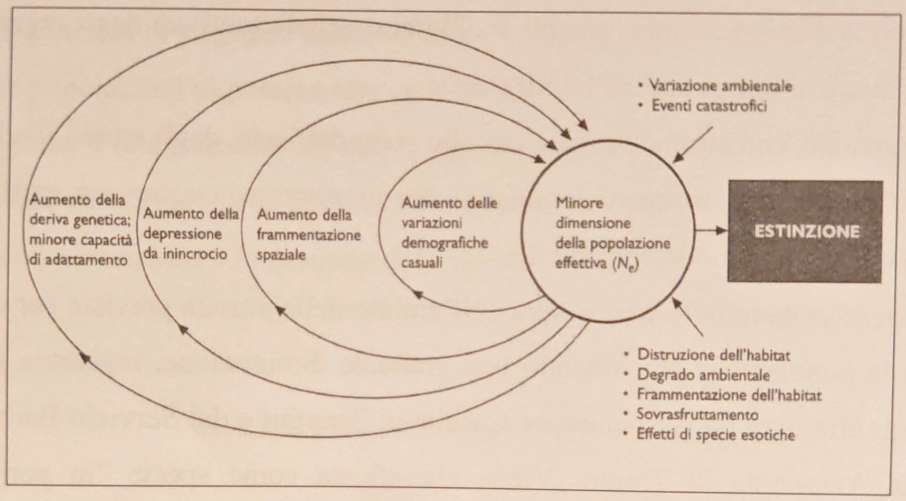


Fig. 1.2.1: Dinamica dei vortici di estinzione. Una volta che una popolazione scende al di sotto di una certa dimensione, essa entra in un vortice in cui i fattori stessi che ne hanno causato l'iniziale riduzione o nuovi fattori tendono a ridurla ulteriormente portandola all'estinzione (da Guerrant, 1992).

Le cause principali di questa allarmante perdita di biodiversità sono legate in maniera diretta o indiretta alle attività antropiche: sovrasfruttamento delle popolazioni naturali (caccia, pesca,…), distruzione e frammentazione dell'habitat, inquinamento, introduzione di specie e malattie esotiche. Causandone la riduzione numerica, questi fattori rendono le popolazioni più suscettibili a variazioni non prevedibili dei fattori ambientali (mancanza di risorse alimentari, catastrofi, ecc.) e demografici. In popolazioni piccole l'accoppiamento tra consanguinei, cioè l'inincrocio, diventa la scelta obbligata per la riproduzione, portando a sua volta ad una riduzione della capacità di sopravvivenza e riproduzione (fitness) degli individui. Infatti, la perdita di variabilità genetica, dovuta al processo della fissazione dei caratteri accelerato in popolazioni ridotte, limita le possibilità di adeguamento ai cambiamenti ambientali ed

aumenta il tasso di mortalità per effetto dell'espressione di mutazioni deleterie (Frankham et al., 2006). Il meccanismo di feedback tra diminuzione della numerosità, perdita di variabilità genetica e inincrocio, che regola il processo di estinzione è definito vortice dell'estinzione di Soulè, rappresentato in Fig. 1.2.1.

Su queste basi la IUCN riconosce la diversità genetica, come uno dei tre livelli fondamentali della biodiversità , insieme alla diversità degli ecosistemi e delle specie, e ne fa una delle tre priorità globali della conservazione.

La *genetica della conservazione* nasce alla fine degli anni '70; derivata dalla genetica evoluzionistica e dalle teorie della genetica quantitativa, alla base della riproduzione controllata di piante ed animali domestici, ora costituisce una disciplina distinta incentrata sulla conservazione della biodiversità. Si tratta di una scienza applicata che si pone come obiettivo la riduzione del rischio di estinzione delle specie minacciate (Frankham, 2006; Frankham, 2010). Attraverso l'integrazione dei dati ottenuti con gli studi genetici e della teoria evolutiva permette di dare indicazioni reali per la gestione delle specie a rischio, stimando l'influenza umana sul processo evolutivo, così da minimizzare gli effetti negativi delle attività antropiche, e mantenere il potenziale adattativo delle popolazioni naturali ai cambiamenti ambientali (Latta, 2008).

Ciò che caratterizza la genetica della conservazione, dal punto di vista metodologico, è la possibilità di ottenere informazioni fondamentali (numerosità, strutturazione,...) per la gestione delle specie in pericolo, senza portare ulteriori stress alle popolazioni o ai singoli individui. Alcune specie, durante la cattura e manipolazione per il prelievo di tessuto o sangue, possono arrivare a livelli di stress tale da comportarne la morte, altre possono essere pericolose o difficilmente avvicinabili (Taberlet e Bouvet, 1991; Taberlet et al., 1999).
Grazie all'avvento della tecnica della PCR (Polymerase Chain Reaction) scoperta da Mullis nel 1985, che permette la replicazione *in vitro* di specifiche sequenze di DNA, anche a partire da quantità molto ridotte di campione biologico, si è potuto mettere a punto il sistema del campionamento non invasivo. Il DNA viene ottenuto da materiale biologico, anche in quantità molto ridotte, che rilasciato naturalmente dall'animale può essere raccolto senza alcun contatto con l'animale stesso, ad esempio: piume, resti di muta, peli, gusci d'uovo, feci, ecc.

I metodi della genetica molecolare permettono alla genetica di conservazione di indagare vari campi. Consentono l'identificazione delle specie in pericolo in primo luogo attraverso la misura dei livelli di variabilità genetica: livelli ridotti di variabilità compromettono la capacità di evoluzione ed adattamento ai cambiamenti ambientali. Poi

tramite l'identificazione di frammentazione fra popolazioni e mancanza di flusso genico, derivanti da cause antropiche (strade, insediamenti industriali,…) o naturali (gruppi montuosi, fiumi,…), che rendono le specie ulteriormente fragili, in quanto maggiormente esposte all'azione della deriva genetica e delle sue conseguenze (e.g. depressione da inincrocio).

La risoluzione di incertezze tassonomiche è fondamentale per evitare di sprecare risorse per la protezione di gruppi non geneticamente distinti da altri, o viceversa di portare alla scomparsa di gruppi geneticamente distinti ma non riconosciuti come tali. La genetica di conservazione ci permette di identificare il soggetto tassonomico che più urgentemente richiede misure di protezione: specie, sottospecie e popolazioni minacciate.

Anche le popolazioni, infatti, possono essere adattate ad ambienti differenti ed essere sufficientemente differenziate da dover essere trattare come unità evolutive separate: ESU (Evolutionary Significant Units).

Ai fini delle reintroduzioni, ultimo rimedio contro l'estinzione, sarà quindi prima necessario indagare la struttura genetica e l'eventuale presenza di popolazioni all'interno della specie. Su queste basi si potranno scegliere le popolazioni sorgente geneticamente più affini a quella in pericolo, evitando il rischio di reintrodurre, in popolazioni fortemente adattate allo specifico habitat, individui geneticamente distanti che porterebbero incapacità di adattamento degli ibridi e quindi ad una ulteriore diminuzione della fitness (depressione da outbreeding).

In questo ambito è fondamentale l'apporto dato dalla filogeografia: questa disciplina, come definita dal fondatore Avise (Avise et al., 1987) si occupa dello studio delle relazioni tra linee genealogiche e geografia. Gli alberi filogenetici vengono confrontati con le mappe di distribuzione geografica delle specie, permettendo di individuare le relazioni spaziali esistenti e dedurre così l'origine e la storia evolutiva di popolazioni, sottospecie e specie (Hewitt, 2004).

Il monitoraggio genetico può essere una valida risposta per il controllo di popolazioni in cattività, di popolazioni selvatiche gestite per scopi venatori o che sono state oggetto di reintroduzioni. Possono, inoltre, essere chiariti molti aspetti della biologia di specie difficili da studiare, perché elusive o pericolose, quali sistemi di accoppiamento e strategie riproduttive, rapporto tra i sessi, analisi di paternità, pattern di dispersione, censimenti, ecc.

Infine, grazie alla possibilità di procedere al riconoscimento specifico a partire da tracce di tessuto, anche all'interno di prodotti commerciali trasformati, la genetica di conservazione permette di preservare le specie rare oggetto di contestazioni a carattere legale connesse a fenomeni di bracconaggio e collezionismo illegale.

1.2.1 La misura della diversità genetica: marcatori molecolari DNA mitocondriale e microsatelliti

La diversità genetica è costituita da variazioni tra individui nella sequenza nucleotidica del DNA; le variazioni possono tradursi come differenze nella sequenza amminoacidica delle proteine che codificano, con conseguenze sulla funzionalità della proteina stessa, espressa a livello fenotipico come differenza biochimica, morfologica o comportamentale nell'individuo portante la mutazione. Su queste varianti agiscono poi effetti demografici e selettivi che permettono o meno la trasmissione del carattere alle generazioni successive.

All'interno di una popolazione la diversità genetica è tipicamente descritta con i termini *polimorfismo*, presenza di vari alleli ad un singolo locus, *eterozigosità media*, somma della proporzione degli eterozigoti per tutti i loci rapportata al numero totale di loci indagati, e *diversità allelica*, numero medio di alleli per locus (Frankham et al., 2006).

Le prime misure di diversità genetica si sono ottenute con elettroforesi di allozimi: la variazione della sequenza amminoacidica, conseguenza di mutazioni all'interno di loci codificanti proteine, comporta infatti una diversa migrazione delle proteine in un gradiente di potenziale elettrico, permettendo la discriminazione delle varianti alleliche.
Con l'avvento della PCR venne abbandonata la misura della variabilità allozimica che richiedeva grosse quantità di tessuto, e quindi spesso il sacrificio dell'animale, e che risultò anche sottostimare la diversità genetica, dato che solo il 30% (Frankham et al., 2006) delle mutazioni del DNA sono tradotte in cambiamenti nelle proteine.

Attraverso la PCR si vanno ad amplificare particolari regioni o posizioni della sequenza nucleotidica, *marcatori molecolari*, che sono in grado di fornire informazioni, sulle variazioni tra individui, identificate come polimorfismo. Ai fini della genetica di conservazione si utilizzano tradizionalmente marcatori neutrali, cioè non sottoposti a selezione in quanto regioni non codificanti del DNA, caratterizzati da un'alta variabilità (i principali sono elencati in Tab. 1.2.1). Più di recente è stata introdotta l'analisi di geni codificanti, quindi marcatori selezionati, ritenuti più idonei per identificare particolari fenomeni di adattamento locale delle popolazioni studiate.

Negli ultimi anni si sta inoltre assistendo allo sviluppo delle cosiddette tecnologie "Second generation DNA sequencing", non più basate sulla biochimica di Sanger, ma su "cyclic-array sequencing". I vantaggi che portano sono legati alla possibilità di costruire, *in vitro* ed in tempi contenuti, librerie genomiche complete, con un'estrema riduzione dei costi

(Shendure e Ji, 2008). Con queste tecnologie il dettaglio delle ricostruzioni filogenetiche e popolazionistiche delle specie è sicuramente destinato ad aumentare.

Metodo	Fonte	Campionamento non invasivo	Eredità
Elettroforesi di allozimi	Sangue, reni, fegato, foglie	no	Co-dominante
Microsatelliti	DNA	sì	Co-dominante
DNA Fingerprinting	DNA	no	Dominante
RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	DNA	sì	Dominante
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms)	DNA	sì	Dominante
RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)	DNA	no	Co-dominante
SSCP (Single Strand Conformational Polymorphisms)	DNA	sì	Co-dominante
DNA sequencing	DNA	sì	Co-dominante
SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)	DNA	sì	Co-dominante

Tab. 1.2.1: metodi molecolari per la valutazione della diversità genetica e loro principali caratteristiche. Tutti, a meno di RAPD, sono caratterizzati da un'alta ripetibilità (modificata da Frankham et al., 2002).

In questa tesi si sono scelti come marcatori molecolari la regione di controllo (D-loop) del DNA mitocondriale (mtDNA) e 10 microsatelliti nucleari (STR).

In particolare, il mtDNA è uno strumento analitico molto utile per la stima della divergenza tra specie vicine. Infatti l'elevato tasso di divergenza nucleotidica permette di esaminare gli eventi accaduti negli ultimi pochi milioni di anni, al fine di risolvere ambiguità tassonomiche, definire le unità evolutive e comprendere aspetti della biologia delle specie (Hewitt, 2004; Randi e Lucchini, 1998; Baba et al., 2001; Frankham et al., 2006). Il mtDNA è contenuto all'interno dei mitocondri; da qui derivano la sua abbondanza all'interno delle cellule, la sua eredità per linea materna e la mancanza di ricombinazione (Baba et al., 2001). In 16000- 21000 bp si trovano i geni codificanti 2 RNA ribosomiali, 22 tRNA, 13 enzimi con struttura altamente conservata; la parte più variabile è la D-loop, nei termini di sostituzioni

nucleotidiche e variabilità nel numero di ripetizioni di sequenze in tandem. La D-loop degli Uccelli, a differenza dei Mammiferi, è fiancheggiata dai geni $tRNA^{glu}$ (acido glutammico) e $tRNA^{phe}$ (fenilalanina) (Randi e Lucchini, 1998); Baba et al. (2001) riportano in *Lagopus mutus japonicum* una lunghezza di 1127 bp, concordante con la lunghezza di 1230 ± 7 bp che Randi (Randi e Lucchini (1998) definiscono altamente conservata in Galliformi a Uccelli in generale.

All'interno della D-loop vengono distinti tre domini come mostrato in Fig. 1.2.2, di cui il primo ed il terzo risultano essere i più variabili.

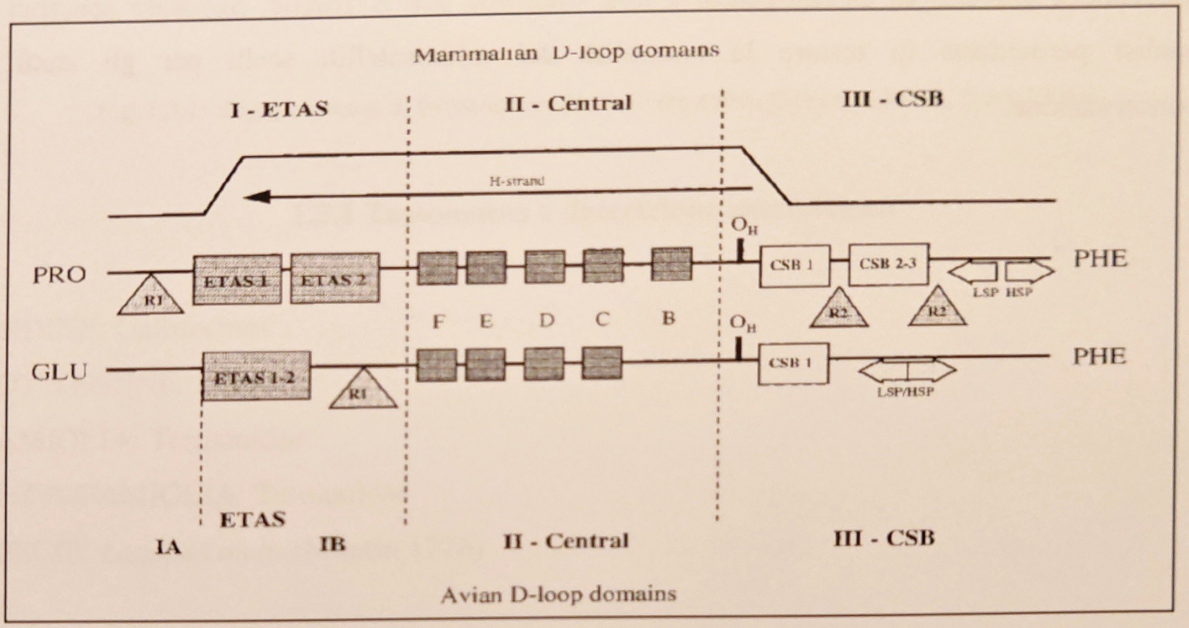


Fig. 1.2.2: comparazione schematica tra l'organizzazione della D-loop mitocondriale di Mammiferi e Galliformi (in particolare *Alectoris*). ETAS: extended termination-associated sequence domain la sequenza consenso di Mammiferi (ETAS1 e ETAS2); R1 e R2: tandem repeats; B, C, D, E, F: blocchi di sequenza conservati nel dominio centrale; O_H: origine della replicazione; CSB1, -2, -3: blocchi di sequenza conservati nel dominio periferico CSB; LSP: promoter di trascrizione del filamento light e HSP promoter di trascrizione del filamento heavy (da Randi e Lucchini, 1998).

I microsatelliti sono marcatori nucleari costituiti da ripetizioni in tandem di corte sequenze, lunghe non più di 1-6 bp, senza interruzioni di altre basi o altri motivi ripetuti. Il polimorfismo che viene rilevato, tramite amplificazione con primer specie e locus- specifici, è di tipo dimensionale: errori di slippage della polimerasi durante la replicazione del DNA o, con minore probabilità, ricombinazioni, provocano variazioni nel numero di ripetizioni presenti nel microsatellite (Hancock, 1999).

Gli alti livelli di polimorfismo che li caratterizzano (eterozigosità media: 0,6-0,8; n° alleli per locus: 5-10; Frankham et al., 2002) li rendono appropriati in genetica della conservazione

nello studio di fenomeni di ibridazione, storia di popolazione, filogeografia, analisi di colli di bottiglia, inincrocio, struttura genetica di popolazioni, ma non in studi filogenetici (Beaumont e Bruford, 1999). Generalmente i microsatelliti sono considerati marcatori neutrali anche se numerosi studi hanno evidenziato che una piccola percentuale di loci è funzionale. Questi codificano per elementi funzionali di proteine e regolano la trascrizione genica; la variazione dimensionale, che può causare differenze nella funzionalità di proteine e nell'attività genica, può essere, quindi, il substrato su cui agisce la selezione naturale (Kashi e Soller, 1999). Ad esempio, nell'uomo, variazioni di lunghezza in loci microsatellite specifici sono state associate a processi di carcinogenesi e alla sindrome dell'X fragile. Software specifici di analisi permettono di testare la neutralità dei microsatelliti scelti per gli studi di conservazione.

1.3 LA SPECIE: *Lagopus muta* (Montin 1776)

Fig. 1.3.1: *Lagopus muta:* a. livrea invernale; b. livrea estiva (Spagnesi M., L. Serra,2004).

1.3.1 Tassonomia e descrizione morfologica

ORDINE: Galliformes
SOTTORDINE: Phasiani
FAMIGLIA: Tetraonidae
SOTTOFAMIGLIA: Tetraoninae
SPECIE: *Lagopus muta* (Montin 1776)

Tutti i Tetraonidi mostrano adattamenti metabolici, morfologici e comportamentali a climi freddi e inverni rigidi. Recenti studi filogenetici hanno messo in luce l'origine Nord americana della Famiglia, differenziatasi da Meleagrininae circa 6.3 Milioni di anni fa (Ma) nel Tardo Miocene. La proliferazione dei Tetraonidi, iniziata con la divergenza del genere *Bonasa* 3.2 Ma, l'attuale radiazione in ben 18 specie e la loro distribuzione possono essere spiegate dalle fluttuazioni climatiche di Pliocene e Pleistocene, con relative glaciazioni, che permisero la dispersione dell'ancestrale tetraonide dalla zona del Golfo di Bering attraverso i "ponti terrestri" creati dall'abbassamento del livello del mare verso l'Europa e nell'entroterra dell'America centro-orientale. La colonizzazione dal Neartico verso l'Eurasia è avvenuta in diversi eventi indipendenti, con l'ancestrale *Bonasa*, con il progenitore dei generi *Dendragapus* e *Falcipennis*, quindi con il progenitore di *Tetrao* e infine con il progenitore di *Lagopus*, ad eccezione di *L. leucurus* che è una specie endemica delle montagne rocciose (Lucchini et al., 2001; Drovetski et al., 2003).

Il genere *Lagopus* è strettamente monofiletico e la posizione basale della pernice dalla coda bianca (*L. leucurus*) conferma l'origine Nord americana del genere (Lucchini et al., 2001).

La pernice bianca, *Lagopus muta,* mostra un'evidente variazione geografica di piumaggio e dimensione, così che numerose sottospecie sono state descritte da diversi autori. Da ventitré a trenta, quattordici descritte da Holder per il solo Nord America, ma la loro validità resta da definire (Storch, 2007). Sull'Arco alpino è presente la sottospecie *Lagopus muta helvetica* Thienemann 1829 (Spagnesi M., L. Serra,2004).

La caratteristica principale della pernice bianca è il mimetismo dei colori della livrea: in estate il piumaggio è superiormente bruno con macchie grigie, singole piume bianche, ali e ventre bianco (Fig. 1.3.1). Con una muta graduale, che inizia a fine estate, arriva all'inverno completamente bianca, ad eccezione della coda nera che resta comunque coperta dalle bianche copritrici caudali quando l'uccello è posato. Il dimorfismo sessuale è evidente, con il maschio normalmente più grosso, con colorazione estiva più scura, caruncola rossa sopraoculare particolarmente sviluppata, rispetto a quella della femmina, e presenza in inverno di una striscia nera che dal becco attraversa l'occhio (redine). Elementi peculiari, derivanti dall'adattamento a climi freddi, sono le narici e i tarsi, così come le dita, ricoperte in inverno da piume, per permettere il galleggiamento sulla neve, e l'intestino con due ciechi molto sviluppati che permettono la digestione, prevalentemente batterica, di rametti legnosi e foglioline coriacee, tipici dell'alimentazione invernale, ricavandone il massimo valore energetico (Abram, 1999; Storch, 2007).

Il corpo è massiccio, circa come un piccione, con testa relativamente piccola e lunghezza di 32.5-41 cm, apertura alare di 54-66 cm (Abram, 1999). Il peso corporeo rilevato nelle Alpi italiane varia tra i 385-520 g per i maschi e i 385-470 per le femmine (Brenot et al., 2005); salendo di latitudine il peso medio si alza. Le variazioni a livello regionale sono da imputarsi alla diversa disponibilità di cibo di alta qualità.

1.3.2 Distribuzione e consistenza delle popolazioni

Lagopus muta è una specie a corologia circumartica boreo-alpina, occupa gli habitat di tundra artica e alpina di tutto l'emisfero Nord (Fig. 1.3.2); è il tetraonide con la più ampia distribuzione latitudinale, andando dalle popolazioni più meridionali di Pirenei (42°N) e Montagne di Altai in Asia centrale (45°N) alle popolazioni della Groenlandia (83°N) (Storch, 2007). Questa distribuzione, tipica anche di lepre bianca (*Lepus timidus*) e picchio tridattilo (*Picoides tridactylus*), dipende direttamente dai fenomeni glaciali che hanno relegato in modo frammentario le popolazioni meridionali.

In Europa si ritrova in Islanda, Scandinavia, Scozia, Penisola di Cola, Alpi e Pirenei. Recentemente è stata segnalata in Bulgaria.

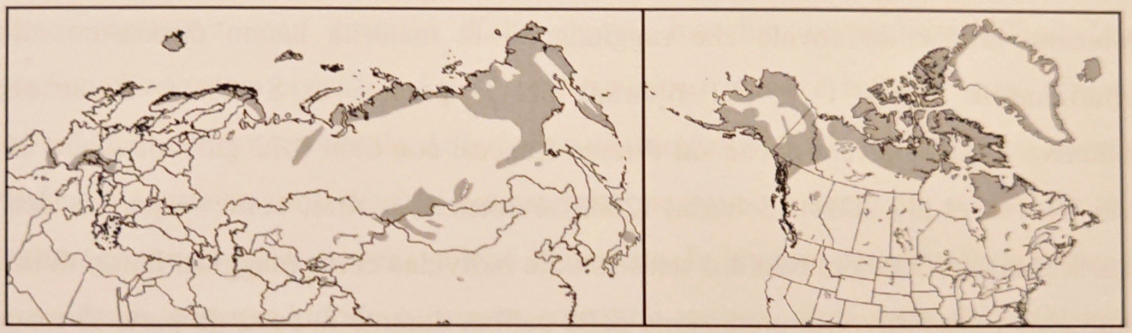


Fig. 1.3.2: areale di distribuzione mondiale di *Lagopus muta* (Montin 1776) (Storch, 2007).

Fig. 1.3.3: areale di nidificazione in Italia di *Lagopus muta helvetica* (Spagnesi M., L. Serra,2004).

La sottospecie *helvetica* è sedentaria su tutto l'arco alpino, dalle Alpi Marittime a sud-ovest alle Alpi Giulie a sud-est, con una distribuzione discontinua negli habitat favorevoli

(Scherini et al., 2003; Favaron et al., 2006; Spagnesi M., L. Serra, 2004) (Fig. 1.3.3). Questa particolare situazione di frammentazione e la scarsità di cibo di alta qualità determinano fluttuazioni di densità di popolazione più ravvicinate, anche se meno marcate, rispetto alle popolazioni nordiche (3-6 anni vs 10; Cattadori e Hudson, 1999) e densità primaverili di 0.35-1.60 coppie/km^2 nelle Alpi centrali (Favaron et al., 2006), 1-4 coppie/km^2 in Valle d'Aosta e Dolomiti di Sesto. Dove le condizioni dell'habitat sono migliori, Alpi svizzere e austriache (Carinzia), sono riportate densità primaverili di 4-6,4 e 5.4 coppie/ km^2 rispettivamente (Zohmann e Wöss, 2008).

In Italia la popolazione totale stimata è di 7000-10000 coppie; in varie regioni si registra un declino costante delle popolazioni (Spagnesi M., L. Serra, 2004).

Il successo riproduttivo di *Lagopus muta* risulta, da uno studio effettuato su popolazioni delle Alpi italiane (Scherini et al., 2003), più basso rispetto a quello delle popolazioni artiche: le covate che raggiungono la maturità hanno dimensioni di 3.5–5 pulcini/femmina contro i 5.5–7.1 riportati per la pernice di Svalbard. Basso successo riproduttivo è stato rilevato anche sui Pirenei francesi con 0.08-0.72 giovani/adulto ad inizio agosto (Novoa et al., 2008). Scherini (2003) evidenzia, inoltre, come la perdita dell'intera covata si abbia nel 50% dei casi. Lo stesso studio individua come maggiori fattori di influenza del successo riproduttivo, la predazione della gallina durante la cova da parte di mammiferi (volpe) e rapaci (falco pellegrino), e le cattive condizioni meteorologiche. In questi frangenti, dovendo la gallina lasciare più spesso il nido per procurarsi il cibo, le uova vengono facilmente predate da marmotta, ermellino, volpe e gracchio alpino. Anche lo scioglimento ritardato delle nevi comporta un ritardo nella deposizione delle uova e una generale riduzione del successo riproduttivo (Novoa et al., 2008).

1.3.3 Habitat e uso del territorio

La pernice bianca abita la tundra e gli habitat alpini con creste o affioramenti rocciosi, a vegetazione sparsa dominata da prati, licheni, muschi e cespugli.

Sulle Alpi è diffusa nei piani subalpino, alpino e nivale; le quote rilevate di nidificazione vanno dai 1500 (Prealpi Giulie) ai 2900 m s.l.m. (Valle d'Aosta). Non scende, se non eccezionalmente, al di sotto del limite superiore della vegetazione arborea, svernando anche a 2500 m s.l.m..

Tipici ambienti utilizzati dalla pernice sono ampie zone prossime al limite delle nevi perenni caratterizzate da un'orografia complessa, in cui si può riscontrare una buona disponibilità e varietà di risorse trofiche e siti di rifugio (Fig. 1.3.4). Durante la stagione riproduttiva sono preferite coste e macereti esposti a sud-ovest, caratterizzati da precoce scioglimento delle nevi e ripresa vegetativa, con praterie d'alta quota, macchie cespugliose (*Rhododendron ferrugineum*, *Vaccinium myrtillus*, *Erica spp.*, *Juniperus nana*) e suffrutici nani (*Empetrum hermaphroditum*, *Dryas octopetala*, *Loiseleuria procumbens*). Seguendo la ripresa vegetativa, la femmina si sposta su suoli detritici con vegetazione sparsa a quote più elevate per trovare nutrimento, germogli e insetti, per i pulcini in crescita. In inverno vengono favorite pendici a media pendenza con una ridotta o assente copertura nevosa, al di sotto dei 2600 m s.l.m. (Scherini et al., 2003; Favaron et al., 2006; Spagnesi M., L. Serra, 2004; Zohmann e Wöss, 2008).

A differenza delle popolazioni nordiche che compiono importanti migrazioni invernali (500-1000 Km) (Storch, 2007), sulle Alpi la specie è sedentaria. Le distanze medie di dispersione per una popolazione delle Alpi centrali non differiscono da quelle misurate per *Lagopus leucura* nel Nord America: 2.4-4.0 Km per i maschi, 6.8-8.5 Km per le femmine, con distanze massime di 10-23 Km, prevalentemente invernali per la ricerca di condizioni microclimatiche favorevoli (Hoffman e Braun, 1975).

Il territorio occupato dalle coppie durante la stagione riproduttiva è di circa 15-50 ha; la variazione individuale dipende dalla quantità e dalla distribuzione delle macchie di habitat ad alta qualità presente all'interno dell'area stessa (Favaron et al., 2006).

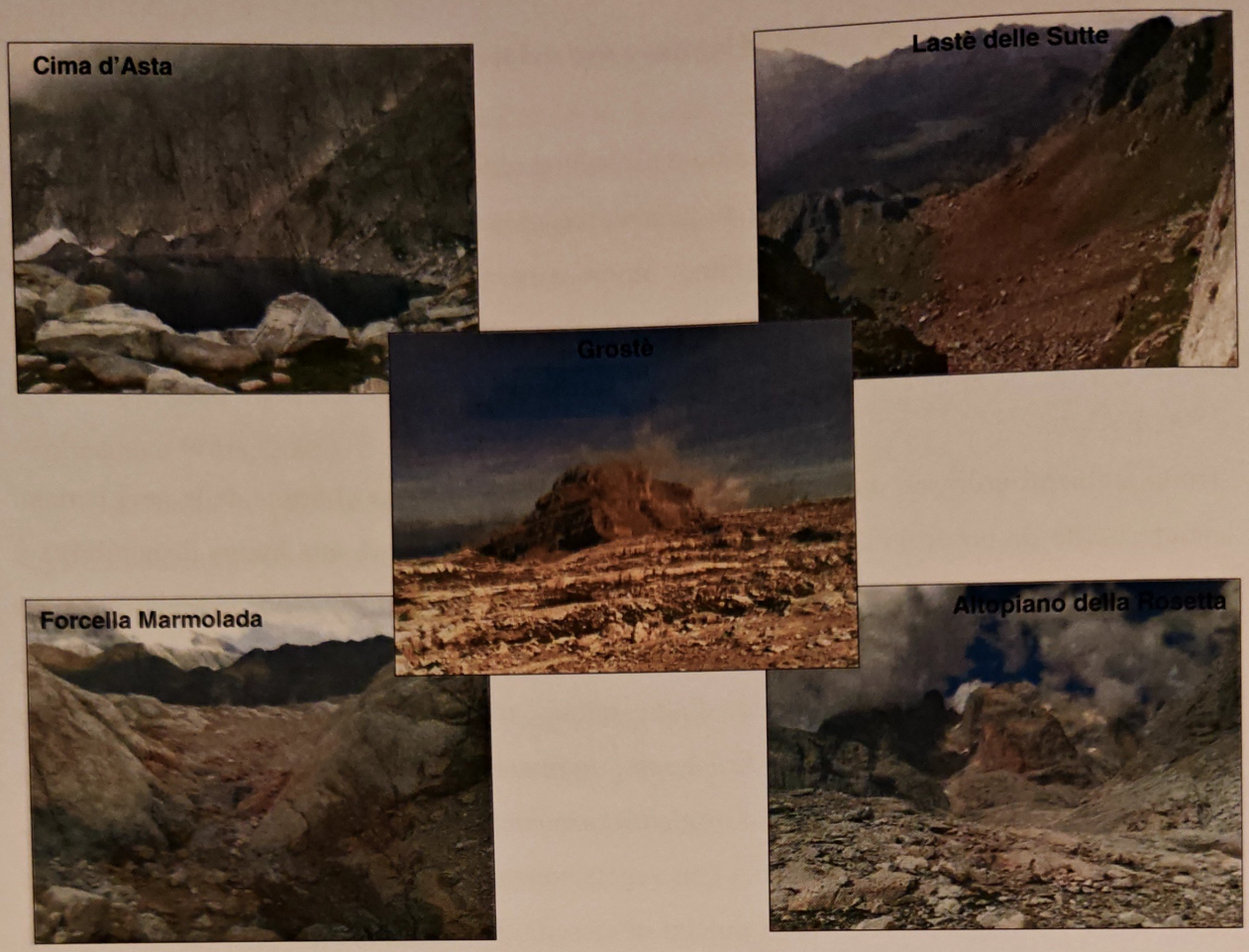


Fig. 1.3.4: habitat tipici di *Lagopus muta helvetica.*

1.3.4 Fenologia stagionale

La fenologia e la modalità di occupazione del territorio rilevate per la pernice alpina non sembrano essere dissimili da quelle descritte per le popolazioni nordiche da Cotter (Cotter et al., 1999) (Scherini et al., 2003).

A partire da ottobre si formano gruppi di 30-50 individui (adulti, immaturi, maschi e femmine), che si divideranno in gruppi più ristretti (10 ind.) da dicembre.

Già con la fine di marzo i maschi cominciano ad occupare e difendere il territorio. Il comportamento territoriale diventa ancora più accentuato fra aprile e maggio quando, con l'arrivo delle femmine si formano le coppie. La *sex ratio* di 1,3-2,0 maschi per ogni femmina (Scherini et al., 2003) misurata sulle Alpi lombarde in primavera è sicuramente una forzante alla monogamia degli individui alpini, rispetto ai cugini artici dove sono stati osservati casi di poligamia.

Nella prima-seconda decade di giugno vengono deposte le uova (media 6.8 uova) in un nido a terra; se la gallina perde la prima nidiata durante i primi giorni di incubazione nella maggior parte dei casi si ha un'altra deposizione a numero ridotto di uova, mediamente 5. Il maschio resta a sorvegliare nido e femmina per circa una settimana (cova: 23 giorni), poi si aggrega ai maschi non accoppiati e alle femmine che hanno perso la nidiata.
Fino alla fine di agosto, gallina e pulcini restano nel territorio di riproduzione, separate dal gruppo, a cui si uniscono solo ad inizio settembre quando i pulcini sono maturi (Scherini et al., 2003; Cotter et al., 1999).

1.3.5 Minacce e misure di protezione

A livello internazionale la specie *Lagopus muta* è riconosciuta dalla IUCN come a "Basso rischio" di estinzione in ragione dell'estensione dell'areale, a basso carico antropico e di difficile accessibilità che caratterizza la specie, soprattutto alle latitudini più elevate (Birdlife International, 2009; Storch, 2007).

Le popolazioni residuali sulle catene montuose più meridionali si trovano, invece, in condizioni di maggiore precarietà, cosicché a livello locale in vari Stati europei, Cina e Giappone, *Lagopus muta* è inserita nelle Liste Rosse Nazionali delle specie in pericolo. *L. m. helvetica* è elencata nell'allegato I della Direttiva Uccelli (72/409/CEE), in cui vengono elencate le specie per il cui habitat sono richieste particolari misure di conservazione al fine di assicurarne la sopravvivenza. È considerata "Vulnerabile" nella Lista Rossa italiana, "Minacciata" in Trentino (Storch, 2007).

La pernice, altamente specializzata alla sopravvivenza in condizioni climatiche estreme, è molto suscettibile ai cambiamenti climatici, non avendo nel breve periodo possibilità di adattamento. In primo luogo l'habitat idoneo, già frammentario in quanto relegato ai gruppi montuosi di maggior altitudine, sta subendo un'ulteriore riduzione a causa dell'innalzamento della temperatura che porta il limite della vegetazione a quote sempre più elevate (Hughes, 2000). Sempre a causa del riscaldamento globale, la variazione dei pattern delle precipitazioni, fattore particolarmente influente sulla sopravvivenza delle nidiate di pernice bianca (Novoa et al., 2008), potrà avere impatto significativo sul successo riproduttivo.

Altro problema emergente per la specie è il crescente afflusso turistico, sia estivo che

invernale, delle zone d'alta quota un tempo indisturbate. Il disturbo umano diretto comporta per l'animale, che sentendosi in pericolo fugge, un maggior consumo energetico, non di secondaria importanza viste le già difficili condizioni ambientali a cui la pernice deve sopravvivere, soprattutto nella stagione invernale (Storch, 2007; Patthey et al., 2008).
Alcuni studi hanno poi evidenziato come in corrispondenza delle stazioni turistiche vi sia un generale aumento di predatori generalisti, ad esempio Corvidi e volpi, che, attirati da rifiuti e residui delle attività antropiche, aumentano la pressione sulle popolazioni di Tetraonidi (Watson e Moss, 2004; Patthey et al., 2008). La presenza delle piste da sci al di sopra del limite vegetazionale comporta ulteriore frammentazione dell'habitat, disturbo sonoro e, in generale, una drastica riduzione della biodiversità, in flora e fauna (Rolando et al., 2007); gli impianti di risalita causano la morte di individui adulti per collisioni contro fili portanti in acciaio (Watson e Moss, 2004) e cabine di trasporto (Storch, 2007).

La pressione venatoria risulta negativa quando non gestita in modo ottimale e soprattutto se effettuata nel periodo riproduttivo primaverile.

1.4 SCOPO DELLA TESI

La carenza di informazioni dettagliate riguardanti biologia, livello di diversità genetica e strutturazione delle popolazioni di *Lagopus muta helvetica* presenti sulle Alpi, rende difficile la definizione di corretti piani di gestione della stessa.

Applicando i metodi della genetica di conservazione si sono scelti un marcatore mitocondriale (D-loop) e dieci loci nucleari microsatelliti (STR) che, analizzati in campioni provenienti da varie località alpine, permetteranno di ottenere una valutazione del livello di variabilità genetica presente nella pernice alpina.

In particolare, con questa tesi, si vuole:

- ✓ Verificare la relazione filogenetica della sottospecie *helvetica* con altre popolazioni, sottospecie, e specie del genere *Lagopus*;
- ✓ Indagare l'origine e l'evoluzione della sottospecie *helvetica;*
- ✓ Valutare la presenza di struttura genetica fra le popolazioni alpine;
- ✓ Determinare la variabilità genetica sull'Arco alpino;
- ✓ Valutare caratteri biologici ed etologici che possono determinare la situazione riscontrata;
- ✓ Evidenziare l'eventuale situazione di rischio per la sottospecie o per singole popolazioni frammentarie diffuse sulle Alpi.

2. MATERIALI E METODI

2.1 CAMPIONI

I campioni utilizzati in questo studio provengono da diverse località dell'Arco alpino e sono stati collezionati in un arco temporale che va dal 1994 al 2009.

In particolare, 37 campioni sono stati ottenuti da visceri di capi abbattuti in Trentino durante i mesi di ottobre, novembre e dicembre degli anni 1994-1999. Gli organi, eviscerati dagli stessi cacciatori, erano stati raccolti per una ricerca del Gruppo di Ecopatologia dell'ex Centro di Ecologia Alpina che aveva come obiettivo quello di studiare la diffusione di agenti patogeni nell'ambito delle popolazioni di galliformi soggetti a prelievo venatorio e di analizzare le possibili conseguenze dell'infezione sulla dinamica di queste specie. Questi campioni sono stati raggruppati in ipotetiche popolazioni secondo l'Area Faunistica di provenienza, come definita nel Piano Faunistico della Provincia Autonoma di Trento e corrispondente ad un gruppo montuoso. Questa suddivisione è basata sull'ipotesi che le popolazioni di pernice si trovino isolate le une dalle altre sui singoli gruppi montuosi, quando tra questi vi siano barriere al loro spostamento, ad esempio fondovalle a bassa quota, antropizzato. Altri sei campioni di tessuto provengono da animali abbattuti durante la stagione venatoria 2009.

113 campioni, anche questi già presenti all'ex Centro di Ecologia Alpina, derivano da animali abbattuti durante le stagioni venatorie del 2001-2003 in provincia di Sondrio. 8 campioni provengono dal Piemonte (province di Torino, Cuneo e Verbania) e sono stati ottenuti grazie alla partecipazione del gruppo di Genetica della Conservazione della Fondazione E. Mach al Progetto Interreg ALCOTRA con l'Università di Milano che prevede lo studio di *Alectoris graeca*, *Tetrao tetrix*, *Lagopus mutus* da un punto di vista genetico e parassitologico. Tutti questi campioni sono stati raggruppati per Comprensori Alpini che costituiscono comprensori territoriali omogenei in riferimento a caratteristiche orografiche e faunistico-vegetazionali.

Dalla Svizzera provengono 8 campioni di tessuto, sempre derivanti da animali abbattuti durante le stagioni venatorie 2001-2003.

Una quantità di circa 1 cm^3 di tessuto è stata prelevata dagli organi eviscerati e conservati in freezer a -80°C, per essere conservata in etanolo 95% in frigo a +4°C o in freezer a -80°C, pronto per l'estrazione del DNA.

Anche 7 campioni di piume sono state inserite nell'analisi; queste sono state raccolte dal personale del gruppo Genetica della Conservazione durante le fasi di censimento delle popolazioni di pernice bianca in Trentino nell'estate 2009, e conservate in bustine di plastica avvolte in carta assorbente, a temperatura ambiente sino al momento dell'estrazione.

Un campione di *Tetrao tetrix*, trentino, e uno di *Lagopus Lagopus*, proveniente dalla Lapponia, sono stati tipizzati per essere poi utilizzati nelle analisi di filogenesi.

Nelle Tabelle 2.1.1 e 2.1.2 è riportato un riepilogo del campionamento e della tipizzazione effettuata, mentre la Figura 2.1.1 mostra una mappa dei siti di campionamento.

Regione	Anno raccolta	Area faunistica	Riserva faunistica	N° campioni	Tipologia campioni	Estrazione	D- loop	STR
Trentino Alto Adige (Provincia di Trento)	1994-97	Sinistra Fassa	Pozza di Fassa	5	cuore- fegato-sangue	5	4	4
		Destra Fassa	Campitello di Fassa	1	sangue	1	1	1
			Canazei	3	sangue-cuore	3	3	3
			Pera di Fassa	3	sangue	3	3	3
		Paneveggio	Moena	1	sangue-cuore	1	1	1
		Latemar	Predazzo	1	sangue-cuore	1	1	1
		Cima d'Asta	Pieve Tesino	2	cuore-fegato	2	2	2
		Lagorai	Castelfiemme	1	cuore	1	1	1
		Redival	Pejo	7	tessuto-sangue-fegato	7	7	6
		Presanella	Pellizzano	2	cuore-fegato	2	2	2
			Vermiglio	6	cuore-sangue	6	5	6
		Rabbi	Rabbi	2	tessuto	2	2	2
		Brenta	Pinzolo	2	sangue	2	2	2
			Alpe Flavona	1	tessuto	1	1	1
	2009	Cima d'Asta	Castello Tesino	6	tessuto-piuma	6	6	6
			Pieve Tesino	3	muscolo	3	3	3
		Lagorai	Tesero	1	piuma	1	1	0
		Brenta	Regole-Spinale	3	piuma	3	2	2

Tab. 2.1.1: Riepilogo dei campioni di pernice bianca raccolti tra il1994 e il 2009 per il Trentino Alto Adige (sfondo scuro: sinistra Adige; sfondo bianco: destra Adige) Indicati tipo di tessuto biologico prelevato e il numero di campioni tipizzati ai diversi marcatori (in figura x sono riportati i campioni per area faunistica con indicate le riserve campionate con il simbolo ★).

Regione	Anno raccolta	Comprensorio Alpino	N° campioni	Tipologia campioni	Estrazione	D- loop	STR
Lombardia (Prov. di Sondrio)	2001-2003	Alta Valle	46	Tessuto	32	29	31
		Chiavenna	1	Tessuto	1	1	1
		Morbegno	8	Tessuto	8	8	8
		Sondrio	40	Tessuto	30	29	30
		Tirano	18	Tessuto	18	18	18
Piemonte	2009	TO1 (Valli Pellice, Chisone, Germanasca)	3	Tessuto	3	3	3
		TO2 (Alta Valle di Susa)	1	Tessuto	1	1	1
		CN4 (Valle Stura di Demonte)	2	Tessuto	2	2	2
		VCO3 (Ossola Sud)	2	tessuto	2	2	2
Altre provenienze	**Anno raccolta**	**Comune**	**N° campioni**	**Tipologia campioni**	**Estrazione**	**D- loop**	**STR**
Val Ridanna (BZ)	2009		1	tessuto	1	1	1
Val Seriana (BG)	2009		1	tessuto	1	1	1
Canton Vallese (CH)		Ayent	4	tessuto	4	4	4
		Grimentz	4	tessuto	4	4	4
TOTALE CAMPIONI			**174**		**157**	**148**	**152**

Tab. 2.1.2: Riepilogo dei campioni di pernice bianca raccolti tra il 1994 e il 2009 per Lombardia, Piemonte e altre località. Indicati anche il tipo di tessuto biologico prelevato e il numero di campioni tipizzati ai diversi marcatori. Totali campioni estratti, D- loop e microsatelliti ottenuti.

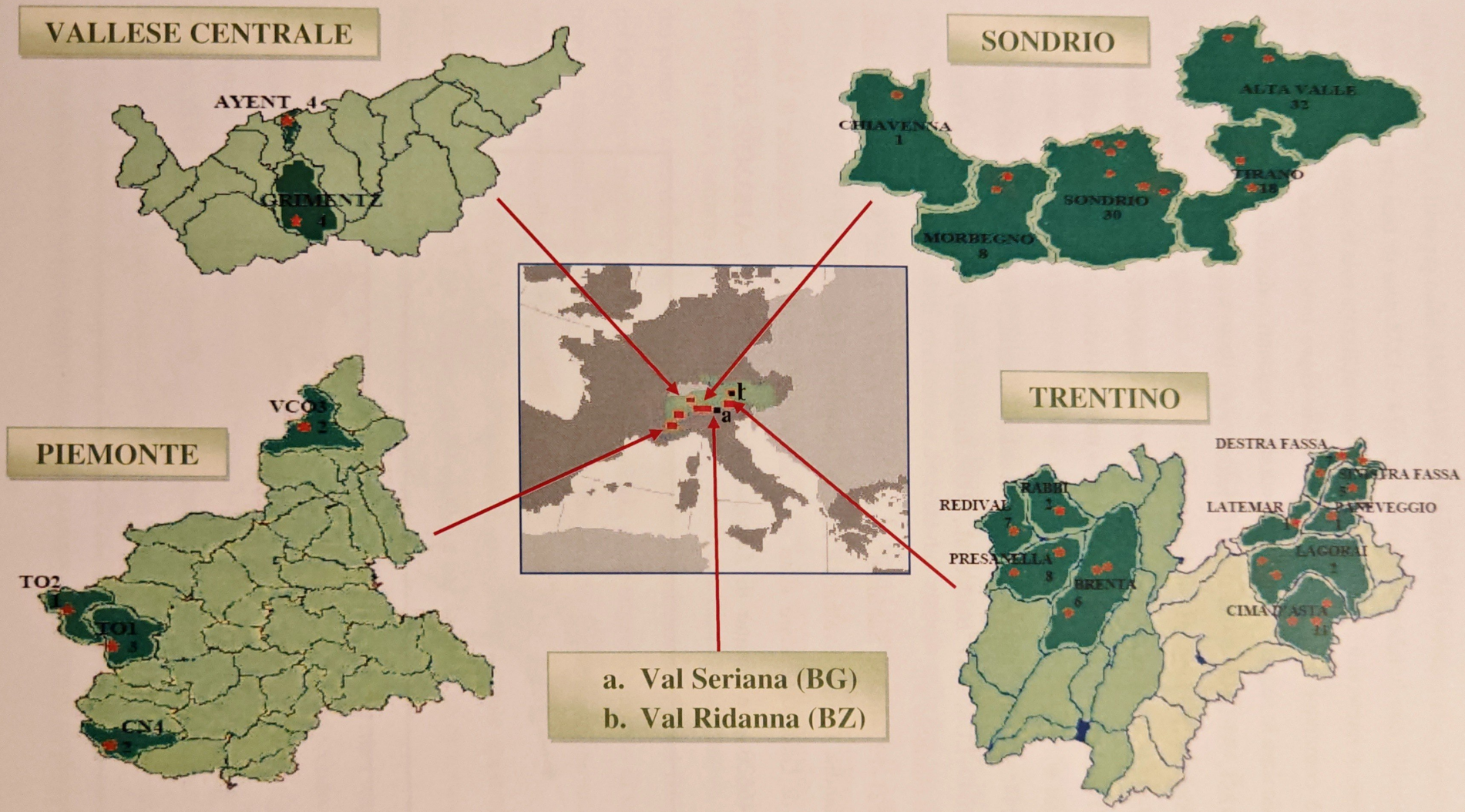


Fig. 2.1.1: localizzazione geografica dei siti di campionamento. In verde scuro aree faunistiche o comprensori alpini campionati; ♠: punto specifico di provenienza.

In GenBank, relativamente alla specie *Lagopus muta*, sono presenti 53 sequenze della regione di controllo con lunghezze comprese tra 674 e 1238 paia di basi (bp). Per avere il massimo numero di nucleotidi in fase di analisi, si sono utilizzate sole le sequenze maggiori di 1000 bp. Si è comunque ottenuto un campione che copre tutto l'areale distributivo della specie. In particolare le sequenze scelte rispondono ai seguenti codici di accesso (Fig. 2.1.2):

- AF184281, AF184294 ÷AF18430 : Holder et al., 1999; Regione del Bering, Alaska e Isole Aleutine; 13 aplotipi (simbolo ♦);
- AB006673: Baba et al.; *Lagopus muta japonica*; Giappone; 1 aplotipo (simbolo ▶);
- AJ297170: Lucchini et al., 2001; Lagopus muta helvetica; Alpi centrali; 1 aplotipo (simbolo ♣);
- AF532445÷532449: Drovetski, 2002; Alaska e Siberia, 5 aplotipi (simbolo ♥);
- EU861049÷EU861051: Bech et al., 2009; *Lagopus muta pyrenaica*; Pirenei francesi; 3 alpotipi (simbolo ■);
- FJ746621÷FJ746635: Sahlman et al., 2009; *Lagopus muta*, Scandinavia, Islanda, Groenlandia, Isole di Svalbard e Taimyr; 15 aplotipi (simbolo ●).

Dal database di GeneBank sono state scaricate anche una ulteriore sequenza di *Lagopus lagopus* (FJ746620.1) e cinque di *Lagopus leucura* (AF532437÷AF532439; AJ297168-AJ297167).

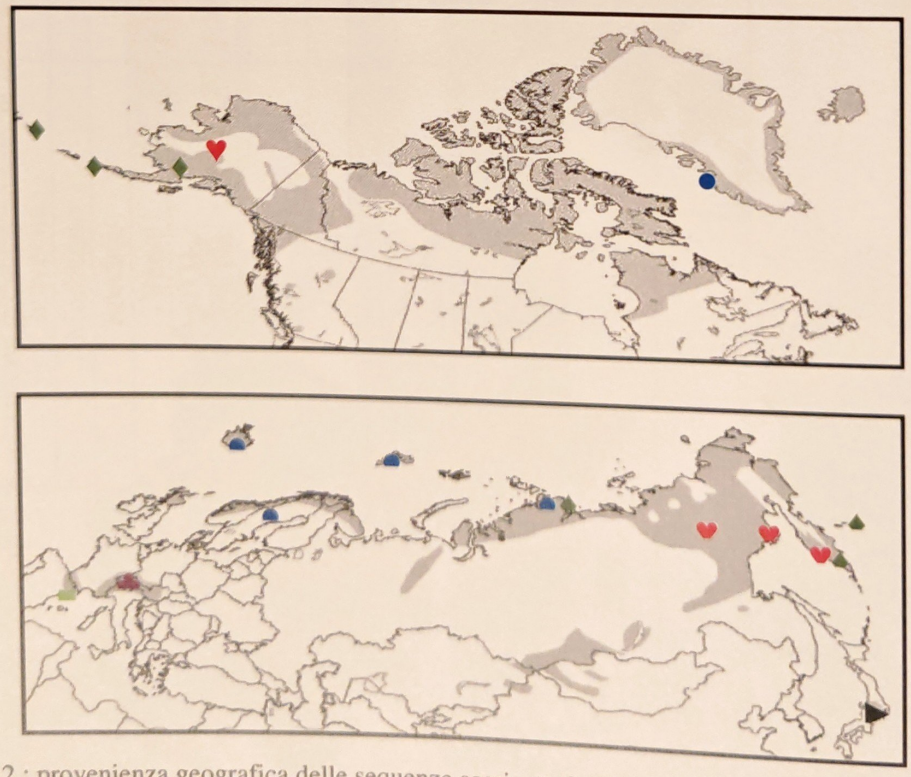


Fig. 2.1.2 : provenienza geografica delle sequenze scaricate da GenBank; simboli come riportato nel testo.

2.2 METODI DI LABORATORIO

2.2.1 Estrazione DNA

Il DNA è stato estratto utilizzando il DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) seguendo il protocollo standard "Purification of Total DNA from Animal Tissues", ad eccezione di alcune migliorie, apportate per adeguarlo al nostro campione.

Per l'estrazione sono stati utilizzati 25 mg, circa 3 mm^2 di tessuto (fegato, cuore, intestini o muscolo). Data la conservazione in etanolo al 95%, prima della procedura di estrazione vera e propria, si è lasciato il tessuto per 30 min in Buffer TE (EDTA 0.5 M, TRIS HCl 1 M, pH 7.4) al fine di eliminare le possibili interferenza derivate dall'etanolo nelle fasi successive.

Per l'eluizione si è utilizzato il Buffer AE del kit Qiagen (10mM TrisCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) che garantisce un ottimale recupero e stabilità del DNA. Si sono effettuate due eluizioni con 200 µL ciascuna, in due provette separate, così da ottenere il massimo rendimento in termini di DNA.

Il DNA estratto da sangue è stato ottenuto in due maniere alternative, ma equivalenti dal punto di vista della resa: seguendo il protocollo "Purification of Total DNA from Blood" del Kit Qiagen, partendo da una quantità di 10 µL, come suggerito in caso di sangue nucleato, oppure, essiccando preventivamente 20 µL di sangue a 56°C per pochi minuti in incubatrice, seguendo il protocollo per l'estrazione da tessuto.

La quantità di DNA ottenuta non è stata quantificata tramite spettrofotometria, ma desunta dal manuale del Kit Qiagen: da 10 a 30 µg per la quantità di tessuto utilizzata, in funzione dello stato di conservazione del campione.

Particolare attenzione è stata posta per l'estrazione da piume vista l'esigua quantità di materiale di partenza, facilmente soggetto a contaminazione. Secondo il protocollo "Purification of Total DNA from Nail Clipping and Hair" di QiaAmp® Investigator Kit è stato prelevato il calamo della piuma, o sua parte, (circa 2-3 mm) e quindi messo a digerire in presenza di DTT 1 M (dithiotheiol), oltre a Buffer AL e proteinasi-K (10 mg/mL) previsti per le estrazioni da tessuto, per denaturare la cheratina. Seguendo le indicazioni del protocollo si è aggiunto al lisato 1 µL di *carrier RNA* (1 µg/µL in Buffer ATE); questo aumenta il legame tra DNA e membrana della colonnina QiaAmp Min Elute, permettendo un maggior recupero in

fase di eluizione. Usando il Buffer ATE del Kit si è eluito il DNA in 20 µL, in due fasi.

Per ogni campione si sono aliquotati circa 30 µL di DNA in provette da 0.2 mL che sono stati conservati in frigo a 4°C; il rimanente è stato conservato a -80°C.

Per rilevare eventuali contaminazioni, in ogni estrazione è stato effettuato un controllo negativo (K-EXT): una provetta contenente i soli reagenti, senza tessuto biologico.

2.2.2 Amplificazione e sequenziamento D-loop

L'intera regione di controllo (D-loop, 1235 bp), del DNA mitocondriale è stata amplificata con PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizzando i primer PHDL (5'-AGG ACT ACG GCT TGA AAA GC-3') e PHDH (5'-CAT CTT GGC ATC TTC AGT GCC-3') già impiegati per *Lagopus mutus* ed altri Tetraonidi in uno studio filogenetico (Randi & Lucchini, 1998).

Per i campioni problematici si sono usati anche due primer interni, PH-L400 5'-ATT TAT TGA TCG TCC ACC TCA CG-3' e PH-H521 5'-TTA TGT GCT TGA CCG AGG AAC CAG-3' (Randi & Lucchini, 1998), che hanno permesso di ottenere due frammenti corti, ma parzialmente sovrapposti, come schematizzato in Fig. 2.2.1.

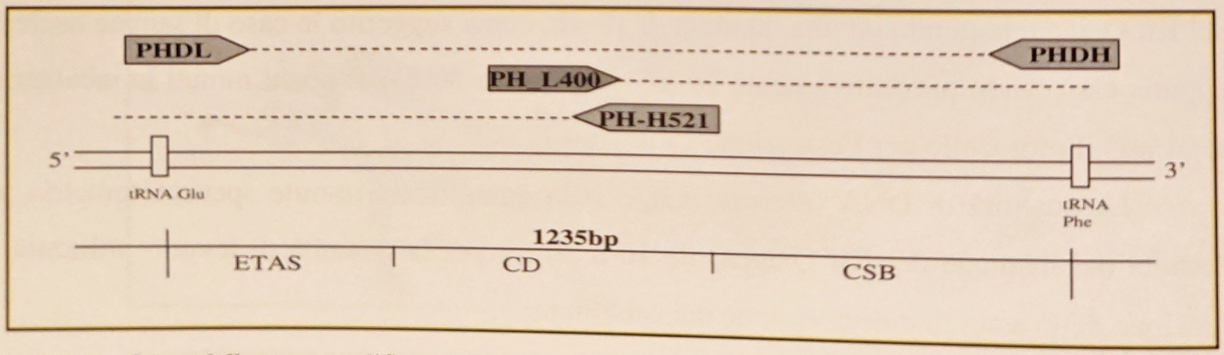


Fig. 2.2.1 : schema delle zone amplificate dai primer utilizzati, in riferimento all'organizzazione strutturale della D- loop degli Uccelli.

Partendo dalle condizioni di amplificazione, mix reagenti e ciclo termico, riportate nel lavoro di Randi e Lucchini (1998) si è proceduto alla messa a punto del protocollo in termociclatori Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Si è scelto di utilizzare Taq Hot Master (5-Prime) a magnesio autoregolante, hot-start, per cui in questa fase iniziale si sono effettuate prove con diverse temperature di annealing su campioni preferibilmente

provenienti da località diverse. Si sono avuti buoni risultati sia a 57°C che a 55°C; quest'ultima è stata scelta come temperatura per il protocollo definitivo riportato in Tab.2.2.1.

Amplificazione D- loop				
Mix di reazione		**Profilo termico**		
Reagenti	**µl per tubino**	**Temperatura**	**Tempo**	**Cicli**
H_2O	12.8			
Buffer 10x	2.0	94°C	2'	1
Primer PHDL (10 ρM/µL)	1.0	94°C	30''	x 30*
Primer PHDH (10 ρM/µL)	1.0	55°C	15''	
dNTP (10 mM)	2.0	65°C	1'30''	
Taq HotMaster (5 U/µl)	0.2	65°C	10'	1
Mix per tubino	19.0	4°C	infinito	
DNA templato	1.0			

Tab. 2.2.1:composizione della miscela di reazione e profilo termico usato nell'amplificazione dell'intera D-loop. * i cicli sono stati aumentati fino a 45 in campioni problematici.

Anche per l'amplificazione dei due frammenti parziali si è utilizzata la miscela di reazione riportata in Tab. 2.2.1, mentre come temperature di annealing per la coppia PHDL/ PH-H521 si è usata quella a 55°C, per la coppia PHDH/ PH-L400 a 57°C.

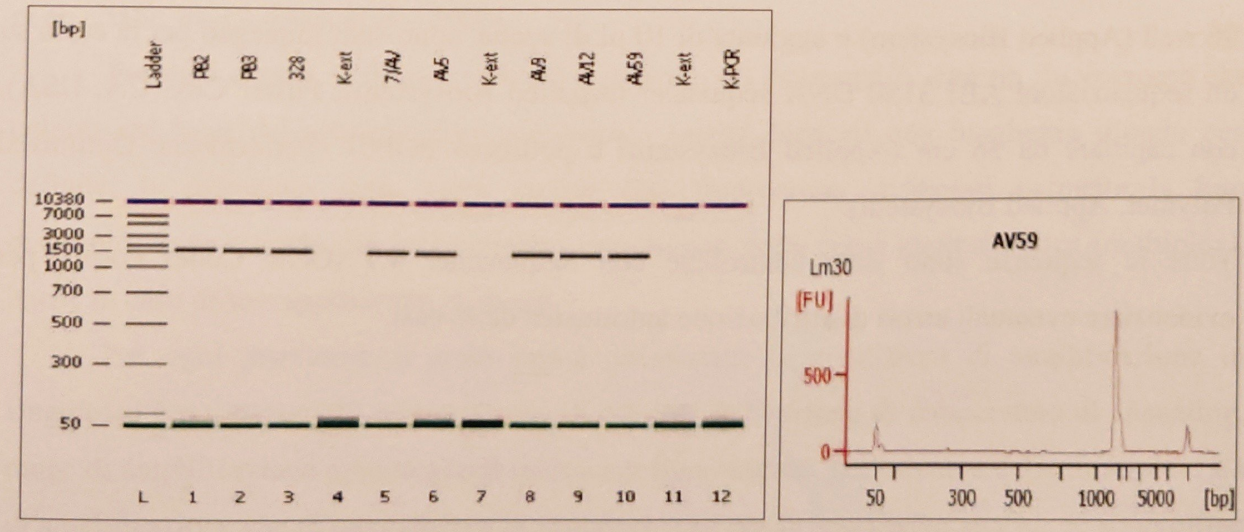


Fig. 2.2.2: esempio di visualizzazione dell'elettroforesi tramite Agilent 2100 Expert; a sinistra visualizzazione tradizionale con bande, a destra visualizzazione dell'elettroferogramma per il singolo campione. (L= ladder; 1-12 campioni).

Il risultato delle amplificazioni è stato controllato tramite Agilent 2100 Expert (Agilent Technologies); con questo strumento, 1 µl di amplificato viene caricato direttamente nei pozzetti di un chip microfluido (1 chip= 12 campioni); all'interno di micro canali avviene la separazione elettroforetica ed i vari componenti sono rilevati grazie alla loro fluorescenza. I dati sono trasmessi ad un software che li visualizza come elettroferogramma e bande, come in un gel tradizionale (vedi esempio Fig.2.2.2). La quantificazione e la determinazione della lunghezza delle bande viene effettuata tramite l'uso di uno standard (Ladder).

Come per l'estrazione, anche per le amplificazioni il controllo di eventuali contaminazioni è stato effettuato mediante l'impiego di un controllo negativo in ogni PCR. L'amplificato è stato purificato con il kit ExoSAP-IT (USB Corporation – USA), che sfrutta l'azione combinata di due enzimi idrolitici: a 5 µL di prodotto di PCR sono aggiunti 0,5 µL di Exo (Esonucleasi I) per l'eliminazione di primer in eccesso e frammenti di DNA estranei, e 1 µL di SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) per la distruzione di dNTPs liberi in soluzione. La mix così ottenuta è incubata in termociclatore a 37 °C per 15 min per il trattamento, quindi a 80 °C per 15 min per l'inattivazione degli enzimi.

Per il sequenziamento sono stati utilizzati i due primer esterni, PHDL e PHDH; a 2 µL di purificato, essiccati a 95 °C per 2 min, si sono aggiunti 10 µL della mix di sequenziamento (Big- Dye Terminator Kit v.3.1; Applied Biosystems, Foster City, CA) (Tab. 2.2.2), quindi si è fatta avvenire la reazione di sequenza secondo il profilo termico riportato in Tab. 2.2.2.

10 µl di prodotto della reazione di sequenza, previa purificazione con Piastre Qiagen 96 well (Applied Biosystem) e aggiunta di 10 µl di acqua, sono stati impiegati per la corsa su un sequenziatore ABI 3130 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), con capillare da 36 cm (Applied Biosystem) e polimero POP07 (Performance Optimized Polymer, Applied Biosystem).

Tutte le sequenze sono state controllate con Sequencher 4.7 (Gene Codes corp.), per evidenziare eventuali errori di attribuzione automatica delle basi.

Reazione di sequenza D-loop				
Mix di reazione		**Profilo termico**		
Reagenti	**µl per tubino**	**Temperatura**	**Tempo**	**Cicli**
H_2O	6.0	96°C	1'	1
BigDye Sequencing Buffer 5x	1.0	96°C	10''	x 25
BigDye Reaction Premix 2.5x vers 3.1	2.0	55°C	5''	
Primer PHDL/PHDH (3.2 ρM/µL)	1.0	60°C	2'	
Mix per tubino	10.0	4°C	infinito	
Purificato ExoSap	2.0 secco			

Tab. 2.2.2: Composizione della miscela di reazione e profilo termico impiegati nelle reazioni di sequenza.

2.2.3. Amplificazione STR

I campioni sono stati genotipizzati a dieci loci microsatellite tetranucleotidici (vedi Tab. 2.2.3), isolati e caratterizzati per altre specie di Tetraonidi ed in gran parte già utilizzati su *Lagopus mutus* (TUT1: Caizergues et al., 2003, Sahlman et al., 2009; TUT2, TUT3: Sahlman et al., 2009; BG15: Bech et al., 2009, Sahlman et al., 2009; BG16, BG18: Sahlman et al., 2009; BG19: Bech et al., 2009).

Per ogni coppia, il primer forward è marcato all'estremità 5' con un fluorocromo che colpito dal laser del sequenziatore automatico emette luce ad una lunghezza d'onda ben definita; la marcatura delle varie coppie con fluorocromi differenti permette la loro discriminazione quando più loci vengono raggruppati nella corsa elettroforetica (multiplex), anche in caso di sovrapposizioni di range.

Per ogni marcatore si sono prima ottimizzate le condizioni di amplificazione in singolo; si è poi passati all'aggregazione di più loci in funzione di temperatura di annealing, range di amplificazione e tipologia di marcatura fluorescente, per ottenere delle multiplex, sia di amplificazione che di caricamento in sequenziatore per la successiva analisi. Si sono infine ottenute due multiplex da cinque marcatori ognuna, come mostrato in figura 2.2.3, denominate rispettivamente Panel 1 e Panel 2.

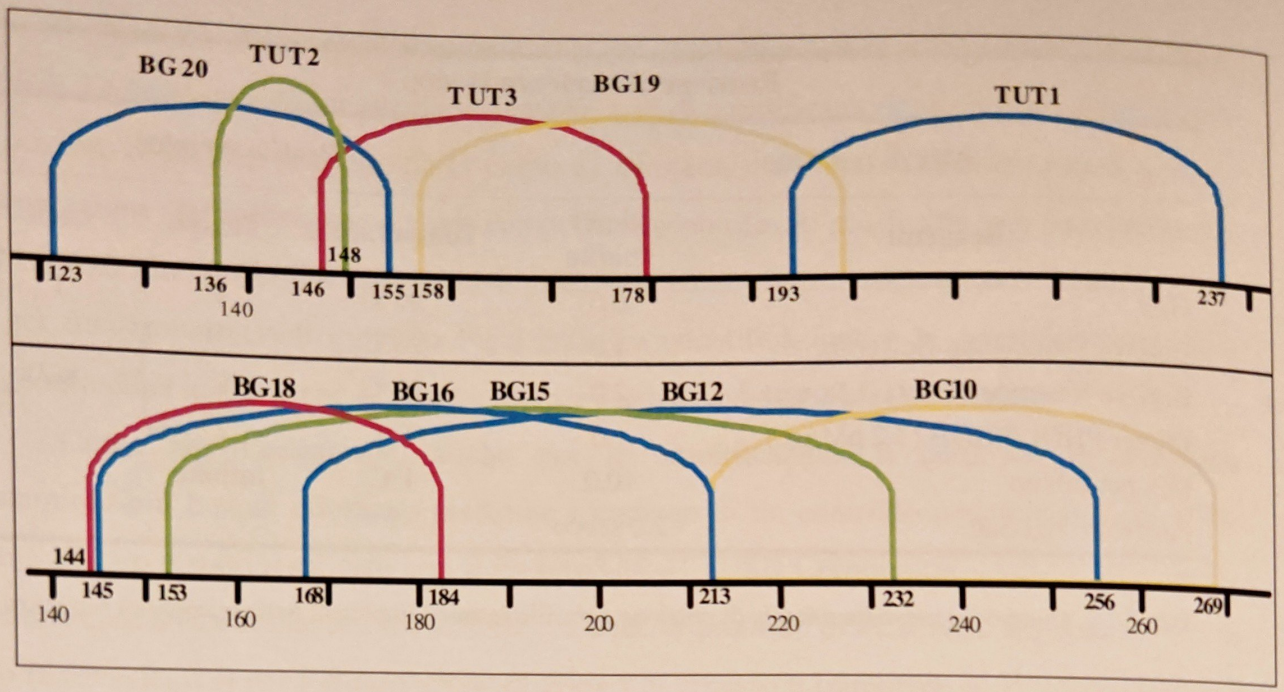


Fig. 2.2.3: schema del range di amplificazione BG19, BG20, TUT1, TUT2, TUT3 aggregati nel Panel 1, sopra; sotto Panel 2 : BG10, BG12, BG15, BG16, BG18.

Denominazione Primer	Sequenza *forward* e marcatura (5'-3')	Sequenza *reverse* (5'-3')	Tipo ripetizione	T_a (°C)
Tt_BG10 (Piertney & Höglund, 2001)	**NED**-ATGTTTCATGTCTTCTGGAATAG	ATTTGGTTAGTAACGCATAAGC	$(GATA)_{17}$	55
Tt_BG12 (Piertney & Höglund, 2001)	**6FAM**-TCTCCTTCTAAACCAGTCATTC	TAGTTTCCACAGAGCACATTG	$(GATA)_{29}$	55
Tt_BG15 (Piertney & Höglund, 2001)	**VIC**-AAATATGTTTGCTAGGGCTTAC	TACATTTTTCATTGTGGACTTC	$(CTAT)_{16}$	54
Tt_BG16 (Piertney & Höglund, 2001)	**6FAM**-GTCATTAGTGCTGTCTGTCTATCT	TGCTAGGTAGGGTAAAAATGG	$(CTAT)_{15}$	54
Tt_BG18 (Piertney & Höglund, 2001)	**PET**-CCATAACTTAACTTGCACTTTC	CTGATACAAAGATGCCTACAA	$(CTAT)_{17}$	53
Tt_BG19 (Piertney & Höglund, 2001)	**NED**-CAAGGCGCAACATTAAGATTC	TGTATTTTGGAAACTCTGTGTGC	$(GATA)_{13}$	59
Tt_BG20 (Piertney & Höglund, 2001)	**6FAM**-AAGCACTTACAATGGTGAGGAC	TATGTTTTCCTTTTCAGTGGTATG	$(GATA)_{17}$	57
Tt_TUT1 (Segelbacher et al., 2002)	**6FAM**-GGTCTACATTTGGCTCTGACC	ATATGGCATCCCAGCTATGG	$(CTAT)_{12}$	60
Tt_TUT2 (Segelbacher et al., 2002)	**VIC**-CCGTGTCAAGTTCTCCAAAC	TTCAAAGCTGTGTTTCATTAGTTG	$(GATA)_{12}$	60
Tt_TUT3 (Segelbacher et al., 2002)	**PET**-CAGGAGGCCTCAACTAATCACC	CGATGCTGGACAGAAGTGAC	$(TACT)_{11}$	60

Tab. 2.2.3: descrizione dei 10 loci microsatellite utilizzati nello studio;T_a: temperatura di annealing.

Le PCR sono state eseguite in volume totale di 10 µL secondo le mix indicate in Tabella 2.3.4 e 2.3.5, con reagenti Hot Master (5-Prime), in termociclatore Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), secondo i cicli termici di Tab. 2.3.6.

Mix di reazione STR-Panel1										
H_2O	Buffer 10x	**BG20** F/R (x2) 10 ρmol/µL	**TUT3** F/R 10 ρmol/µL	**TUT2** F/R 10 ρmol/µL	**BG19** F/R 10 ρmol/µL	**TUT1** F/R 10 ρmol/µL	dNTP 10 mM	Taq HM 5 U/µL	Mix per provetta	DNA templato
5.57	**1**	**0.1**	**0.2**	**0.13**	**0.08**	**0.08**	**1**	**0.25**	**9**	**1**

Tab. 2.3.4: Composizione della miscela di reazione (in µL) impiegata nell'amplificazione del Panel 1.

Mix di reazione STR-Panel2										
H_2O	Buffer 10x	**BG10** F/R (x2) 10 ρmol/µL	**BG12** F/R 10 ρmol/µL	**BG15** F/R 10 ρmol/µL	**BG16** F/R 10 ρmol/µL	**BG18** F/R 10 ρmol/µL	dNTP 10 mM	Taq HM 5 U/µL	Mix per provetta	DNA templato
5.83	**1**	**0.08**	**0.1**	**0.1**	**0.08**	**0.1**	**1**	**0.25**	**9**	**1**

Tab. 2.3.5: Composizione della miscela di reazione (in µL) impiegata nell'amplificazione del Panel 2.

Profilo termico STR		
Temperatura	**Tempo**	**Cicli**
95°C	2'	1
94°C	1'	x 25
56°/60°C	30''	
70°C	30''	
60°C	2'	1
4°C	infinito	

Tab. 2.3.6: Profili termici usati nell'amplificazione PCR di Panel1 e Panel2. La temperatura utilizzata nel Panel 1 è 56°C, nel Panel2 60°C.

Da 1 a 2 µL di amplificato tal quale, in caso di campioni deboli, o diluito (1:10, 1:20, 1:50), per campioni molto buoni, sono stati caricati con 18 µL di formammide (Hi-Ti Applied Biosystem) con standard dimensionale GS500LIZ al 2,1% di (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in sequenziatore ABI 3130 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Per campioni difficoltosi si è ricorso all'amplificazione singola dei loci. Più loci sono stati comunque accorpati per la corsa al sequenziatore, compatibilmente alle eventuali interferenza rilevate nelle corse multilocus.

Tutti i picchi sono stati identificati, marcati e verificati manualmente usando il programma GENEMAPPER versione 3.7 (Applied Biosystems).

2.3 ANALISI STATISTICHE

2.3.1 DNA mitocondriale

I metodi che meglio permettono di rappresentare visivamente la variabilità e le relazioni intercorrenti tra gli individui all'interno della specie, sono la costruzione di alberi filogenetici e di network degli aplotipi.

Tramite l'approccio dell'Aikake Information Criterion (AIC, Aikake, 1974), implementato nel software JModeltest 0.1.1. (Posada, 2008), è stato selezionato il modello di evoluzione delle mutazioni nucleotidiche che meglio rappresenta i nostri data-set, da 1042 bp, 1035 bp e 1128 bp (vedi Risultati per maggiori dettagli). Essendo il rapporto n/K (numero nucleotidi/ numero parametri) inferiore a 40 si è utilizzato l'AIC corretto (AICc).
I metodi di inferenza filogenetica di massima verosimiglianza e Bayesiano richiedono, infatti, un opportuno modello di evoluzione delle sostituzioni nucleotidiche per ottenere ricostruzioni filogenetiche più veritiere.

Gli alberi ricostruiti secondo il metodo della massima parsimonia (MP; Fitch, 1971) per l'allineamento delle nostre sequenze (1128 bp) e per l'allineamento comprendente le sequenze scaricate da GenBank (1042 bp), sono stati creati utilizzando l'algoritmo implementato in PHYLIP 3.69 (Felsenstein, 2009) nell'applicazione DNApars, impostando l'opzione di ricerca *"More thorough search"*, con il salvataggio di 10000 alberi. L'albero consenso, definito con il programma CONSENSE in PHYLIP 3.69, rappresenta la topologia spiegata dal minor numero di mutazioni.

La ricostruzione secondo il principio della massima verosimiglianza o maximum likelihood (ML; Felsenstein, 1981) è stata eseguita con l'algoritmo del programma PhyML (Guindon e Gascuel, 2003), per entrambi gli allineamenti. In questo caso l'albero consenso, di CONSENSE, sarà quello la cui probabilità, calcolata per moltiplicazione delle probabilità di ogni singola ramificazione, è la più grande (Felsenstein, 1981).

La robustezza degli alberi ML e MP è stata testata tramite 100 e 500 repliche di bootstrap (Felsenstein, 1985), rispettivamente. Il dataset multiplo di pseudo-allineamenti è stato creato tramite il programma SeqBoot di PHYLIP (Felsenstein, 1985), il quale assume evoluzione indipendente dei siti.

Il programma utilizzato per la ricostruzione tramite il metodo Bayesiano (Rannala e Yang, 1996) dell'albero derivante dall'allineamento a 1042 bp, è MrBayes ver 3.1.2 (Huelnsenbeck e Ronquist, 2001); si sono impostate 10000000 generazioni delle Catene di Markov Monte Carlo 8mcmc9. L'albero consenso e la probabilità a posteriori sono stati ricavati dai 100000 alberi generati secondo la regola majority-rule 50%, tramite il software PAUP * 4.0 (Swofford, 2000).

Le relazioni tra le sequenze sono state, infine, riassunte in un network degli aplotipi utilizzando l'algoritmo Median-Joining Networks (Bandelt et al., 1999) implementato nel software Network 4.5.1.6. Il network degli aplotipi è stato ricostruito per l'allineamento delle nostre sequenze (1128bp) e per l'allineamento comprendente le sequenze scaricate da GeneBank (1035bp), quest'ultimo radicato con *Lagopus lagopus*, impostando il parametro Epsilon a 0 (E=0). Il network garantisce una maggiore risoluzione della filogenesi intraspecifica, in presenza di bassa variabilità genetica, grazie alla possibilità di rappresentare nodi ancestrali, multiforcazioni e reticolazioni.

I livelli di diversità genetica sono stati indagati per ogni singolo cluster individuato con l'analisi filogenetica (vedi Risultati per i dettagli), eliminando gli aplotipi di cui non si conosceva la frequenza: dal Cluster A gli aplotipi pirenaici e LMU, dal Cluster D l'aplotipo di *japonicum* (Lmjap) e gli aplotipi dab713, dab630, dab107, jmb1041 e svd611.

Tramite Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005) si sono calcolati i seguenti indici di variabilità, con correzione gamma derivata dal modello mutazionale indicato per l'allineamento a 1035 bp: numero di siti polimorfici (S), numero di aplotipi (K), haplotype diversity (H, secondo Nei, 1987), numero medio di differenze a coppie (π, secondo Tajima, 1993) e diversità nucleotidica (π_n secondo Nei, 1987). Si è calcolata inoltre l'allelic richness, che corregge il numero di aplotipi per la dimensione della popolazione di riferimento (El Mousadik A., Petit R., 1996)

La struttura genetica della specie *Lagopus muta* è stata indagata tramite l'analisi della varianza molecolare (AMOVA; Excoffier et al., 1992), definendo come popolazioni i cluster utilizzati nell'analisi della variabilità. Sono stati utilizzati gli indici F_{ST}, F_{IS} e F_{IT}, Wright (Wright, 1951), tramite gli algoritmi proposti da Weir e Cockerham (1984). La significatività è testata tramite 1000 permutazioni di aplotipi fra sottopopolazioni. La stessa analisi è stata condotta anche tenendo in considerazione la distanza molecolare fra gli aplotipi, tramite il

calcolo dell'indice Φ_{ST} partendo dalla costruzione di una matrice di distanze, secondo il modello di evoluzione delle sostituzioni nucleotidiche implementato in Arlequin che ha ottenuto il maggior supporto nell'analisi con JModeltest per l'allineamento a 1035 bp.

Per individuare il grado di differenziazione tra gruppi si è effettuata un'analisi di F_{ST} e Φ_{ST} a coppie, la cui significatività ($p<0.05$) è stata valutata sulla base dei p-value ottenuti impostando 100 permutazioni tra individui delle sottopopolazioni.

Restringendo il campo di ricerca è stata effettuata l'analisi AMOVA sui soli campioni alpini suddivisi in 12 sottopopolazioni, ipotizzando che su un singolo gruppo montuoso si potesse identificare una popolazione, isolata dalle altre, per barriere naturali come vallate a bassa altitudine e con disturbo antropico; si sono eliminate quelle popolazioni che presentavano numerosità ridotta (<4 individui) e non erano accorpabili ad altre per elevata distanza geografica (Chiavenna, VCO3 e CN4) (vedi Risultati per tabella riassuntiva).

Sulle stesse popolazioni si è utilizzato l'approccio SAMOVA (Spatial Analysis of MOlecular VAriance; Dupanloup et al., 2002), implementato in SAMOVA 1.0, che utilizza non solo l'informazione genetica ma anche quella geografica (coordinate in gradi decimali), per rilevare la presenza di gruppi geograficamente omogenei e maggiormente differenziati. In questo modo è possibile evidenziare la presenza di barriere genetiche tra i gruppi. Il metodo si basa su una procedura di appaiamento simulato che mira a massimizzare la percentuale di varianza genetica totale dovuta a differenze tra gruppi di popolazioni. Si sono testati K da 2 a 8, con K= numero di gruppi. Per ogni ciclo sono state effettuate 1023 permutazioni.

La neutralità del polimorfismo nucleotidico osservato nel nostro campione alpino è stata valutata attraverso il test D di Tajima (Tajima, 1989). Sotto l'assunzione di neutralità, questo test può identificare l'effetto degli eventi demografici. La significatività statistica del test è stata valutata simulando campionamenti casuali (1000 repliche) secondo un approccio coalescente (Excoffier et al., 2005). Deviazioni significative, in senso negativo o positivo, sotto l'assunzione di neutralità del locus, comportano il rigetto dell'ipotesi nulla di stabilità della popolazione: valori negativi possono indicare espansioni demografiche, mentre valori positivi possono indicare colli di bottiglia.

2.3.2 Microsatelliti

La prima fase dell'analisi sui loci microsatellite prevede che ne vanga valutata l'idoneità al loro utilizzo come marcatori neutrali e indipendenti, esenti da errori di genotipizzazione che condizionano i risultati delle analisi genetiche seguenti.

Gli errori che più comunemente si incontrano sono legati a: presenza di alleli di grandi dimensioni che possono non essere amplificati efficacemente come quelli a minore dimensione (dropout allelico); stutter, formatesi per slippage durante il processo di amplificazione, che portano errori nella lettura del segnale elettroforetico; mancata amplificazione del locus per mutazioni nella regione di appaiamento del primer, che definisce la presenza di alleli nulli.

L'identificazione di errori di genotipizzazione è stata eseguita attraverso il software MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004), impostando un intervallo di confidenza al 95%, con 1000 permutazioni.

L'indipendenza dei loci microsatellite viene evidenziata da assenza di linkage disequilibrium, derivante da legame fisico tra coppie di loci. Questo è stato testato per ogni coppia di locus utilizzando FSTAT 2.9.3.2 (Goudet et al., 2001) in due set di dati: il primo contenete tutti i loci, il secondo con eliminazione del locus BG10. Il valore di probabilità è stato calcolato sulla base di 450000 e 360000 permutazioni, rispettivamente, p-value al 1% corretti secondo Bonferroni per test multipli.

I loci microsatellite sono stati testati per l'equilibrio di Hardy-Weinberg (Guo e Thompson, 1992) con il software Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005), impostando 100000 passi nella Catena di Markov e 1000 passi di dememorizzazione. Sono stati confrontati i valori di eterozigosità osservata ed attesa sotto le condizioni di equilibrio, valutando la significatività dello scostamento sulla base dei p-value.

Queste prime analisi sono state ripetute dopo l'eliminazione del locus BG10 (vedi Risultati per i dettagli), non più considerato in tutte le indagini successive.

Tramite l'analisi fattoriale delle corrispondenze (AFC; Benzécri, 1973), implementata in GENETIX 4.052.2 (Belkhir et al., 1999), si è ottenuta una rappresentazione grafica chiara della distribuzione delle distanze genetiche tra gli individui. Questi sono rappresentati come una nuvola di punti dispersi in uno spazio determinato dai due (AFC 2D) o tre (AFC 3D) assi fattoriali principali che rappresentano le combinazioni lineari delle misure primarie (distanze genetiche e corrispondenze tra queste) che meglio spiegano la variabilità tra individui.

Gli individui della popolazione alpina globale sono stati suddivisi nelle 12 popolazioni già descritte, ai fini della rappresentazione grafica: alle varie popolazioni sono associati colori diversi, così che eventuali raggruppamenti siano facilmente visualizzabili.

Per individuare la struttura di popolazione più compatibile con i nostri dati si è utilizzato l'algoritmo di raggruppamento bayesiano implementato in STRUCTURE 2.1 (Pritchard et al., 2000). La probabilità a posteriori del numero di popolazioni che meglio si adatta ai dati (K) è stata calcolata utilizzando il modello di mescolamento, che prevede per gli individui la possibilità d'avere antenati comuni, e il modello delle frequenze alleliche correlate (Falush et al., 2003), che prevede che le frequenze alleliche nelle diverse popolazioni possano essere simili, ad esempio a causa della migrazione o di antenati condivisi.

La prima analisi a scopo esplorativo è stata effettuata testando K (numero di popolazioni) da 1 a 10, con 25000 step di burn-in e 100000 iterazioni MCMC, con 5 repliche per ogni K indagato. L'analisi è stata ripetuta per il K risultato più probabile e per i quattro valori circostanti (K-2÷ K+2), aumentando a 250000 step il burn-in, a 1000000 le iterazioni e a 10 le repliche per valore di K. Sarà scelto il numero K di popolazioni che presenta la massima probabilità a posteriori (log P(K|X), X genotipo degli individui) e che introduce una configurazione di strutturazione tale da non comportare violazione dell'equilibrio di Hardy-Weinberg e segnale di linkage disequilibrium nelle popolazioni ottenute.

Considerando la popolazione alpina suddivisa nelle 12 popolazioni è stata eseguita l'analisi della varianza molecolare con Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005). Oltre alla statistiche F_{ST} standard, si è calcolato anche l'indice R_{ST} (Slatking, 1995), che tiene conto della differenziazione data dalla dimensione allelica, oltre che dalla loro frequenza all'interno delle popolazioni.

La mancanza di strutturazione genetica (vedi Risultati per i dettagli) ha indirizzato le analisi seguenti in riferimento ad una singola popolazione panmittica.

In particolare sono stati calcolati per ogni locus e a livello globale di popolazione, numero di alleli (NA), eterozigosità osservata (H_O) ed attesa (H_E), secondo le formule di Nei (1987), implementate in Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005), impostando 1000 permutazioni per i valori di probabilità.

Il F_{IS}, coefficiente di inbreeding, è stato calcolato secondo Weir e Cockerham (1984), con il programma GENETIX, sulla popolazione globale e per singolo locus. Si sono effettuati 1000 bootstrap e impostato l'intervallo di confidenza al 95%.

I dati microsatellite sono stati utilizzati per verificare la presenza di segnali di recenti colli di bottiglia nella popolazione di pernice bianca alpina. Tramite i test implementati nel software BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet e Luikart, 1996) si valuta se l'eterozigosità osservata è più alta o meno dell'attesa sulla base del numero di alleli, partendo dall'ipotesi che un collo di bottiglia comporta riduzione di numero di alleli, ma non di eterozigosità.
Per il nostro data-set, si è utilizzato il modello mutazionale Two Phase Model (TPM), con varianza a 30 e probabilità di mutazione al 70%, ed il test di Wilcoxon, impostando 1000 permutazioni e livello di significatività della probabilità pari a 0.05.

Al fine di indagare la modalità di dispersione della specie si sono suddivisi i campioni alpini in due sottopopolazioni: pernice femmine e pernice maschi, sia per D-loop che microsatelliti (vedi Risultati per dettagli).
Su questi è stato calcolato l'indice F_{ST} globale ed effettuata un'analisi di F_{ST} a coppie tra popolazione femmine e maschi, sia per microsatelliti che per D-loop, in quest'ultimo caso si è utilizzato Φ_{ST}. I loci STR sono stati testati per l'equilibrio di Hardy-Weinberg, e l'indice F_{IS} è stato calcolato per singola popolazione.

Le due popolazioni sono state plottate graficamente tramite Analisi Fattoriale delle Corrispondenze.

L'algoritmo di raggruppamento bayesiano di STRUCTURE 2.1 è stato utilizzato per evidenziare eventuale strutturazione all'interno dei due sessi; si è effettuata una corsa per ogni sottopolazione, testando K da 1 a 10, con burn-in di 25000 step e 100000 iterazioni MCMC e 5 repliche per ogni K indagato.

3. RISULTATI

A partire dai nostri campioni si sono ottenute in totale di 148 sequenze D-loop, di lunghezza pari a 1128 paia di basi (bp) senza ambiguità. Queste sequenze presentano 18 siti polimorfici (15 transizioni + 3 transversioni per un totale di 18 sostituzioni e 0 indel) che individuano 19 diversi aplotipi.

Molte delle sequenze scaricate dal database di GenBank presentano ambiguità (N) sparse in modo casuale all'interno della sequenza; secondo un principio conservativo si è quindi deciso di sostituirle, nei siti non polimorfici, con il nucleotide rilevato in allineamento per tutte le altre sequenze.

Si è ottenuto infine un allineamento a 1035 bp, comprendente 54 aplotipi di *Lagopus muta* definiti da 55 siti polimorfici (35 transizioni + 8 transversioni per un totale di 42 sostituzioni e 15 indel). Avendo considerato, per alcune sequenze, un numero di basi inferiore a quello depositato gli aplotipi originali AK2 e dab630 collassano con BE1 e svd611 con jmb1041. Aggiungendo gli outgroup *Lagopus leucura*, *Tetrao tetrix* e *Lagopus lagopus* il numero di basi passa a 1042 per la presenza di indel (160 di siti polimorfici, 103 transizioni + 60 transversioni per un totale di 163 sostituzioni e 25 indel), per un totale di 62 aplotipi.

Il modello di evoluzione delle sostituzioni nucleotidiche più attinente all'allineamento comprendente gli outgroup è risultato essere GTR+I+G (corrispondente a REV, Tavaré, 1986), avente una proporzione di siti invarianti (p-inv) pari a 0.6040, valore alfa (α) della distribuzione gamma di 0.358 e frequenze variabili dei nucleotidi (f(A) = 0.3335; f(C) = 0.1493; f(G) = 0.2592; f(T) = 0.2581).

Per l'allineamento comprendente solo gli aplotipi di *Lagopus muta* (1035 bp), è stato selezionato il modello TPM3uf+I; il primo modello implementato in Arlequin per il calcolo delle matrice di distanza è TrN+I+G (Tamura e Nei, 1993), partizione 010020, p-inv pari a 0.791 e α 0.072 e quindi frequenze dei nucleotidi e delle sostituzioni, variabili (f(A) = 0.3354; f(C) = 0.1471; f(G) = 0.2611; f(T) = 0.2564) e frequenza delle mutazioni possibili pari [AC], [AT], [CG] e [GT] = 1.0000; [AG] = 19.8347; [CT] = 12.6115.

152 animali sono stati tipizzati ai 10 loci microsatellite.

Nei loci BG10, BG12 e TUT1, è stato rilevato un eccesso di omozigoti significativo ($p<0.001$), rispetto all'atteso. In tutti tre i casi, le cause, indicate dal software, derivano da errore durante l'assegnazione degli alleli per stutter e dalla presenza di alleli nulli. Nel primo

caso il segnale è dato dall'eccesso di eterozigoti osservati per alleli distanti una ripetizione rispetto all'atteso, mentre la presenza di alleli nulli è dedotta dall'eccesso di omozigoti, sempre nel confronto attesi-osservati, per tutti i diversi alleli.
La fase di identificazione dei picchi degli alleli dal segnale elettroforetico è stata ricontrollata attentamente anche con riamplificazione dei casi più dubbi; i dati sono stati tutti confermati ad indicare l'assenza di errore tecnico durante la genotipizzazione.

Linkage disequibrium è stato evidenziato, con probabilità significativa anche dopo correzione di Bonferroni (p-value corretto <0.00111), nelle coppie TUT1xBG10, BG10xBG12.
Si è deciso quindi di eliminare dalle analisi il locus BG10 per i chiari segnali di mancata indipendenza e condizione di non neutralità rilevati.

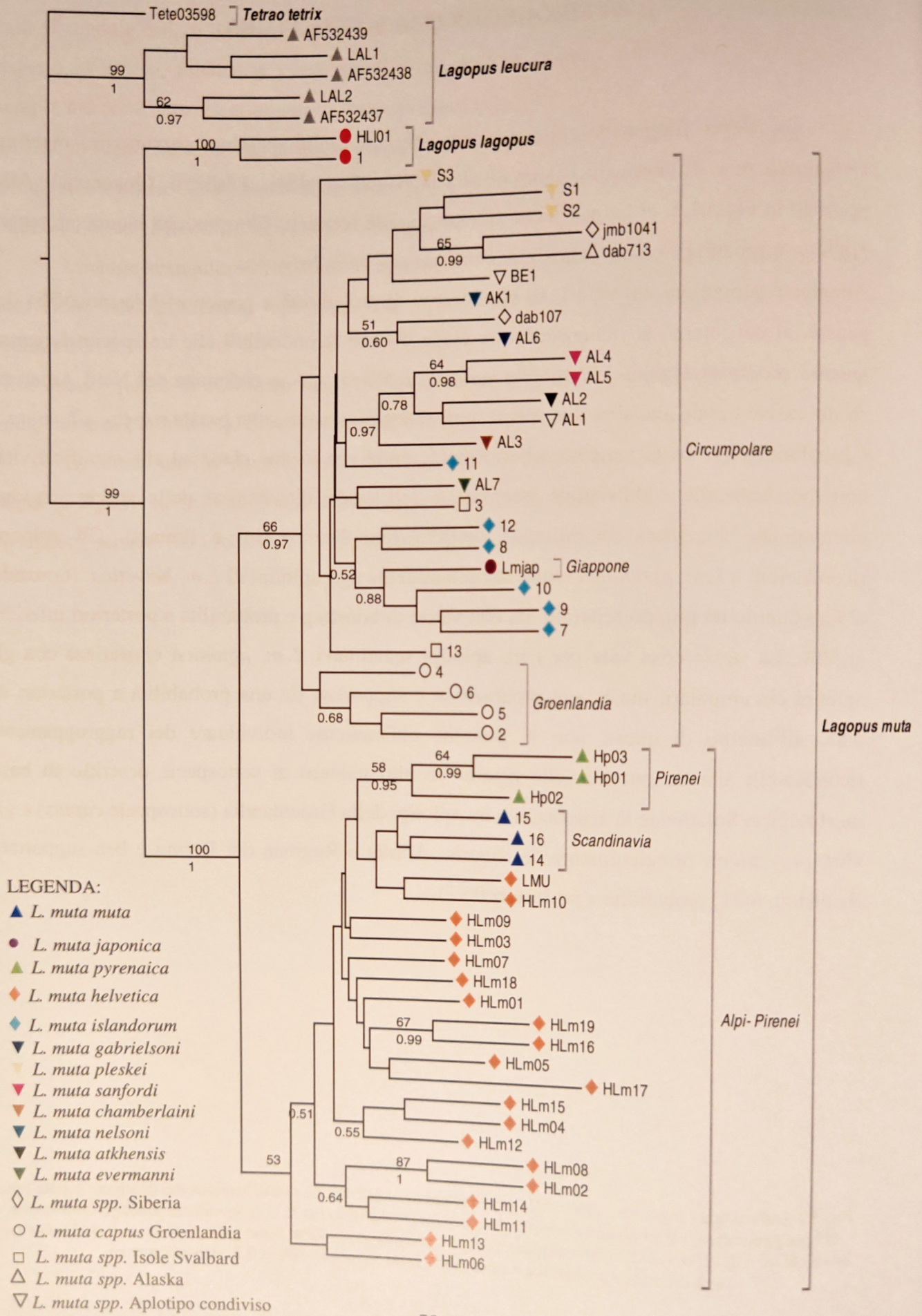
Le stesse analisi ripetute dopo eliminazione di BG10 non hanno riportato ulteriori segni di significativo linkage disequilibrium, mentre la deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg persiste per i loci TUT1 e BG12, ad alto livello di significatività (p=0.00).

3.1 FILOGEOGRAFIA E STRUTTURA

Gli alberi filogenetici ottenuti con i metodi della massima parsimonia, massima verosimiglianza e bayesiano sono concordanti nei risultati. L'albero filogenetico ML, riportato in Fig.3.1.1, ci ha permesso di analizzare le relazioni filogenetiche interne al genere *Lagopus* e specificatamente la posizione di *Lagopus muta helvetica*.

Altamente supportata dai valori di bootstrap e di probabilità a posteriori è la monofilia del genere, al cui interno si riconoscono tre clade distinti riconducibili alle tre specie: *Lagopus leucura*, *Lagopus lagopus* e *Lagopus muta*. *L. leucura*, specie endemica del Nord America, risulta essere basale alle altre due specie, con *L. lagopus* a sua volta basale rispetto a *L. muta*. Gli aplotipi di *L. muta* vengono ulteriormente suddivisi in due clade ad alta significatività, corrispondenti alla suddivisione geografica dell'areale distributivo della specie: regione circumpolare e regione meridionale dell'emisfero Nord (Alpi e Pirenei). Gli aplotipi riconducibili a L.*m. pyrenaica* clusterizzano assieme agli aplotipi di *L.m. helvetica*, formando al loro interno un gruppo separato ma con valori di boostrap e probabilità a posteriori inferiori al 50%. La stessa cosa vale per i tre aplotipi scandinavi. *L.m. japonica* clusterizza con gli aplotipi circumpolari, ma la sua separazione è supportata da una probabilità a posteriori di 0.88; all'interno di questi non si possono chiaramente individuare dei raggruppamenti riconducibili alla tassonomia, che riporta un alto numero di sottospecie descritte su base morfologica. Solamente la separazione tra aplotipi della Groenlandia (sottospecie *captus*) e gli altri, provenienti principalmente da Siberia, Alaska e Regione del Bering è ben supportata (bootstrap 66%; probabilità a posteriori 0.97).

Fig. 3.1.1: (in pagina seguente) albero ML da allineamento 1042 bp. La classificazione dei campioni è stata fatta su base geografica; i simboli sono riportati in legenda; per i casi in cui la corrispondenza aplotipo-sottospecie non è chiara o definita si è data indicazione della provenienza geografica. Sono indicati solo i valori di bootstrap (sopra il ramo) e probabilità a posteriori (sotto il ramo) >50% e 0.5, rispettivamente.


Tete03598
Tetrao tetrix
AF532439
LAL1
AF532438
Lagopus leucura
LAL2
AF532437
HLI01
1
Lagopus lagopus
S3
S1
S2
jmb1041
dab713
BE1
AK1
dab107
AL6
AL4
AL5
AL2
AL1
AL3
11
AL7
3
12
8
Lmjap
Giappone
10
9
7
13
4
6
5
2
Groenlandia
Circumpolare
Hp03
Hp01
Hp02
Pirenei
15
16
14
Scandinavia
LMU
HLm10
HLm09
HLm03
HLm07
HLm18
HLm01
HLm19
HLm16
HLm05
HLm17
HLm15
HLm04
HLm12
HLm08
HLm02
HLm14
HLm11
HLm13
HLm06
Alpi- Pirenei
Lagopus muta
99
1
62
0.97
100
1
99
1
66
0.97
64
0.98
0.78
0.97
51
0.60
65
0.99
0.52
0.88
0.68
58
0.95
64
0.99
100
1
67
0.99
0.51
0.55
53
87
1
0.64
LEGENDA:
L. muta muta
L. muta japonica
L. muta pyrenaica
L. muta helvetica
L. muta islandorum
L. muta gabrielsoni
L. muta pleskei
L. muta sanfordi
L. muta chamberlaini
L. muta nelsoni
L. muta atkhensis
L. muta evermanni
L. muta spp. Siberia
L. muta captus Groenlandia
L. muta spp. Isole Svalbard
L. muta spp. Alaska
L. muta spp. Aplotipo condiviso

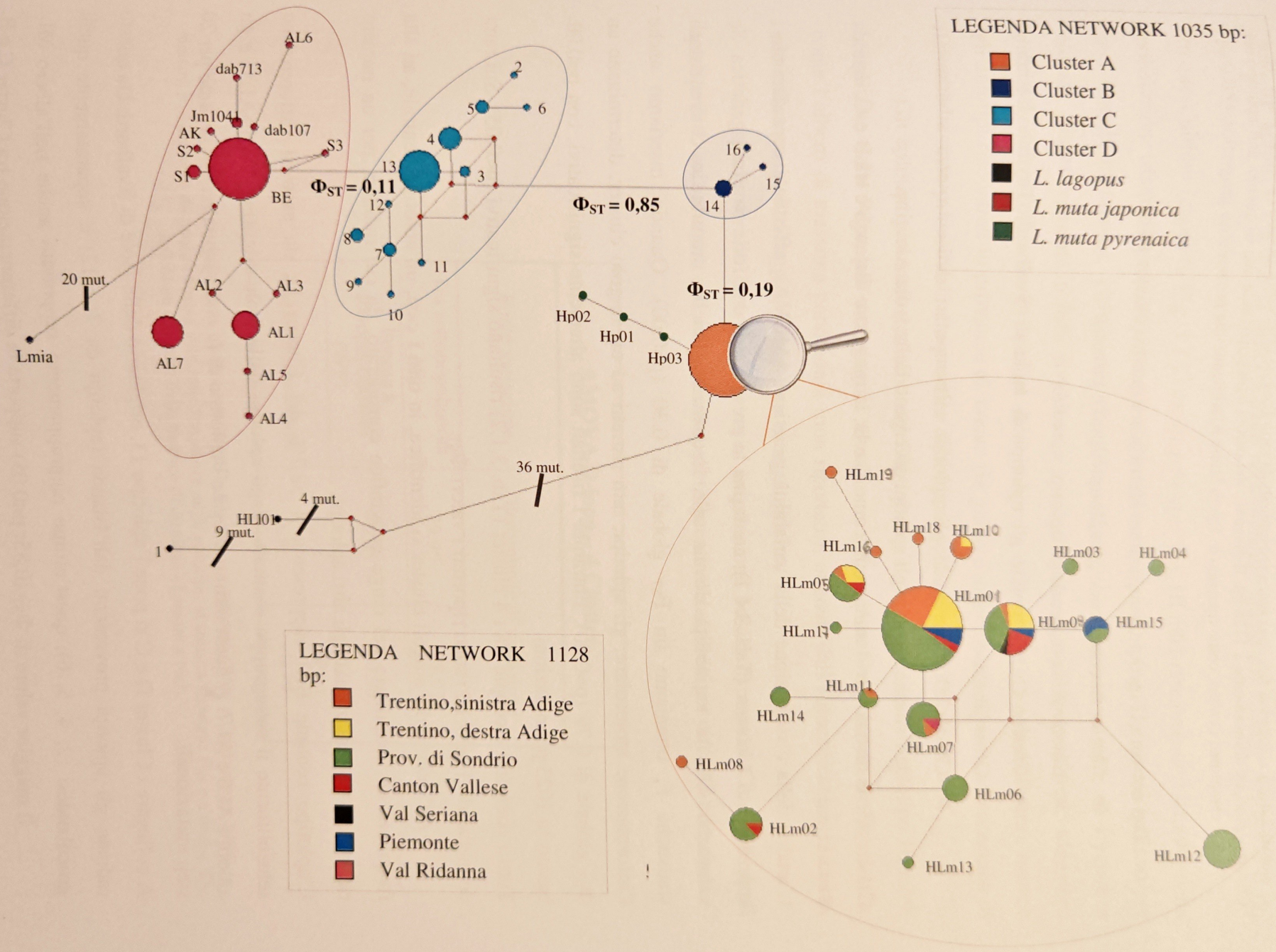

LEGENDA NETWORK 1035 bp:
Cluster A
Cluster B
Cluster C
Cluster D
L. lagopus
L. muta japonica
L. muta pyrenaica
AL6
dab713
Jm1041
AK
dab107
S2
S3
S1
BE
AL2
AL3
AL1
AL7
AL5
AL4
20 mut.
Lmia
ΦST = 0,11
ΦST = 0,85
ΦST = 0,19
Hp02
Hp01
Hp03
36 mut.
4 mut.
9 mut.
HL101
1
LEGENDA NETWORK 1128 bp:
Trentino,sinistra Adige
Trentino, destra Adige
Prov. di Sondrio
Canton Vallese
Val Seriana
Piemonte
Val Ridanna
HLm19
HLm18
HLm10
HLm16
HLm03
HLm04
HLm05
HLm01
HLm17
HLm09
HLm15
HLm11
HLm14
HLm07
HLm08
HLm06
HLm02
HLm13
HLm12

Fig. 3.1.2: (in pagina precedente): Network, ricostruito con il metodo della parsimonia statistica; in alto a sinistra network degli aplotipi di *Lagopus muta* provenienti da tutto l'areale (1035 bp); in basso a destra zoom sul Cluster alpino, da allineamento a 1128 bp. Il diametro dei cerchi è proporzionale alla frequenza dell'aplotipo nel campione; i colori, come riportato in figura fanno riferimento alla provenienza geografica.

Dal network (Fig. 3.1.2) si possono identificare quattro cluster principali:

- *Cluster A*: comprende gli aplotipi alpini e pirenaici;
- *Cluster B*: comprende gli aplotipi scandinavi;
- *Cluster C*: comprende gli aplotipi di Isole di Svalbard, Taymir, Islanda e Groenlandia;
- *Cluster D*: comprende gli aplotipi circumpolari dell'entroterra siberiano e dell'Alaska, nonché gli aplotipi divergenti delle Isole Aleutine.

Cluster A e B distano per 4 mutazioni, come C e D; la maggiore distanza è tra B e C, data da 8 mutazioni.

L'analisi della distribuzione della variabilità genetica (AMOVA), effettuata considerando i sopradescritti 4 cluster (Tab. 3.1.1), conferma la presenza di una forte struttura genetica. Se valutiamo solo la variabilità dovuta alle frequenze alleliche, tramite le convenzionali statistiche F, otteniamo un F_{ST} globale di 0.30 (p=0.00). Quando inseriamo anche l'informazione molecolare, gli aplotipi, tutti ristretti ad un singolo cluster, determinano un Φ_{ST} globale di 0.79 (p=0.00). Entrambi i risultati sono altamente significativi, con p=0.00, basato su 1023 permutazioni.

Tutti i confronti a coppie tra i 4 cluster (Tab. 3.1.2) risultano significativi ($p<0.05$). Sui rami del network (Fig. 3.1.2) sono riportati i valori Φ_{ST}.

All'interno dei singoli cluster si identifica, in tutti i casi, un aplotipo centrale, ad alta frequenza ed ubiquitario nel range geografico considerato, da cui radiano, per un numero ridotto di step mutazionali, gli altri aplotipi.

L'aplotipo centrale BE1 rappresenta il 58,7% del Cluster D; da esso si differenziano sensibilmente il sottogruppo costituito dagli aplotipi delle Isole Aleutine (AL1÷AL5) e gli aplotipi AL6 e AL7. A quest'ultimo è legato l'aplotipo di *L. muta japonica*, divergente per 20 step mutazionali.

A collegare i Cluster D e C si pone l'aplotipo 13, originario delle Isole di Svalbard. Da questo radiano gli aplotipi provenienti dall'Islanda (aplotipi da 7 a 12) e separatamente quelli groenlandesi (2, 4, 5, 6); quest'ultimo raggruppamento supportato anche nell'albero ML.

Il maggior valore di Φ_{ST} (0,85; $p<0.05$) supporta la differenziazione tra Cluster C e B.

All'interno di questo piccolo raggruppamento, localizzato sulla Penisola scandinava, troviamo solo tre aplotipi, ma che si differenziano sensibilmente anche dal Cluster A (Φ_{ST} = 0,19; $p<0.05$).

In quest'ultimo (zoom in Fig. 3.1.2) un singolo aplotipo, HLm01 rappresenta il 41,89% della popolazione ed è diffuso ubiquitariamente lungo tutto l'arco alpino. Da questo radiano per una singola mutazione, gli aplotipi HLm05 e HLm09 caratterizzati sempre da frequenza elevata (rispettivamente 6.76% e 12.84%) e condivisione tra più popolazioni. Maggiore divergenza si riscontra tra gli aplotipi della provincia di Sondrio (in verde in figura), mentre gli aplotipi riscontrati in provincia di Trento (in giallo o arancione in figura), ad eccezione di HLm08, restano più centrali al network e distinti per solo 1-2 mutazioni da HLm01.

Gli aplotipi pirenaici rientrano nel Cluster A e si differenziano dall'aplotipo HLm09, ubiquitario delle Alpi, per una singola mutazione. Anche il network (zoom in Fig. 3.1.2), come l'albero di massima parsimonia (non riportato), ottenuti dall'allineamento a 1128 bp, non indica particolari raggruppamenti su base geografica.

La specie sorella *L. lagopus* si trova in posizione basale rispetto al Cluster A degli aplotipi di *L. m. helvetica* e *L. m. pyrenaica*, distinguendosi da questi per circa 45 mutazioni.

AMOVA D-loop – 4 Cluster		
Fonte variazione	Percentuale di variazione	
Tra sottopopolazioni (AP)	29.95	79.07
Interna a sottopopolazioni (WP)	70.05	20.93
Indice di fissazione	**F_{ST} :** 0.30	**Φ_{ST}:** 0.79

Tab. 3.1.1: AMOVA per i quattro Cluster identificati da filogenesi e network (Weir e Cockerham, 1984); a sinistra F_{ST} derivato da analisi basata solo sulle frequenze degli aplotipi; al sinistra standard F_{ST} e a destra Φ_{ST} calcolato a partire dalla matrice di distanza (Tamura e Nei).

Differenziazione tra cluster (Φ_{ST} e F_{ST} a coppie)				
	A	**B**	**C**	**D**
A	-	0.29	0.25	0.29
B	0.19	-	0.36	0.41
C	0.79	0.85	-	0.35
D	0.82	0.78	0.11	-

Tab. 3.1.2: sopra la diagonale valori di F_{ST} a coppie tra i cluster; sotto la diagonale valori di Φ_{ST} calcolati secondo Tamura e Nei (gamma=0.598). Tutti i valori risultano significativi per $p \leq 0.05$.

La struttura della popolazione alpina, indagata tramite AMOVA, ipotizzando 12 sottopopolazioni, identificate come in Tab. 3.1.4, riporta un indice Φ_{ST} globale pari a 0.046, significativamente diverso da zero (p-value<0.05, Tab. 3.1.3). Il confronto a coppie tra le 12 popolazioni non ha evidenziato valori significativi di differenziazione dopo la correzione dei p-value secondo Bonferroni. Analizzando la struttura tramite il convenzionale F_{ST} questo risulta pari a 0.036 (p<0.05) e si ottengono due confronti significativi (p<0.05) nei confronti a coppie: Redival-Ayent; Redival-Tirano.

AMOVA D-loop – 12 popolazioni alpine		
Fonte variazione	Percentuale di variazione	
Tra sottopopolazioni (AP)	3.63	4.63
Interna a sottopopolazioni (WP)	96.37	95.37
Indice di fissazione	**F_{ST} :** 0.036	**Φ_{ST}:** 0.046

Tab. 3.1.3: risultati dell'analisi AMOVA, per la suddivisione della popolazione alpina in 12 sottopolazioni; F_{ST} convenzionale e Φ_{ST} con matrice di distanze Tamura e Nei.

Nell'analisi SAMOVA sulle 12 ipotetiche popolazioni nessun raggruppamento simulato dal programma ha portato alla massimizzazione dell'indice F_{CT}.

Il test D di Tajima riporta un valore D negativo (-1.011), non significativo (p>0.10).

Popolazioni (numero individui)	Riserve faunistiche-Comprensori Alpini	Coordinata latitudine N	Coordinta longitudine E
Sinistra Fassa (5)	Moena, Pozza di Fassa	46.448943	11.859330
Destra Fassa (8)	Campitello di Fassa, Canazei, Pera di Fassa, Predazzo, Tesero, Castelfiemme	46.478773	11.656837
Cima d'Asta (12)	Pieve Tesino, Castello Tesino	46.166786	11.596719
Brenta (4)	Regole-Spinale, Alpe Flavona, Pinzolo	46.209016	10.905009
Presanella (7)	Pellizzano, Vermiglio	46.234333	10.653889
Redival (9)	Pejo, Rabbi	46.308521	10.614510
TO1 (4)	TO1, TO2	44.882877	7.020264
Alta Valle (29)		46.453832	10.170960
Sondrio (29)		46.281479	9.972153
Morbegno (8)		46.275784	9.631577
Tirano (18)		46.356226	10.139989
Ayent (8)	Ayent, Grimentz	46.345269	7.397747

Tab. 3.1.4: raggruppamento dei campioni delle riserve faunistiche/comprensori alpini secondo le 12 popolazioni utilizzate nelle analisi AMOVA e SAMOVA; riportate anche le coordinate geografiche; non sono stati considerati i campioni di VCO3, CN4, Chiavenna perché poco numerosi (n° individui <4) e perché non raggruppabili geograficamente ad altre popolazioni.

A livello di microsatelliti l'Analisi Fattoriale delle Corrispondenze (AFC, Fig. 3.1.3), impostata sulle 12 ipotetiche popolazioni alpine, mostra una nuvola eterogenea di punti allungata sull'asse orizzontale, senza alcun chiaro pattern di raggruppamento tra individui della stessa popolazione.

Anche l'analisi di clusterizzazione bayesiana dei 152 individui, implementata in STRUCTURE, è compatibile con K=1 popolazioni in equilibrio di HW e LE. Questo significa che gli individui analizzati appartengono tutti ad un'unica popolazione geneticamente omogenea.

L'indice F_{ST} globale (0.019) è basso ma altamente significativo (p=0.00); mentre il corrispettivo R_{ST} non è significativamente diverso da zero (R_{ST}=0.007; p>0.10).

Nei confronti a coppie tra popolazioni risultano significativi solo 4 valori di F_{ST} (Brenta-Morbegno; Destra Fassa-Grymentz; Destra Fassa-Morbegno; Destra Fassa-Tirano) e un solo valore di R_{ST} (Cima d'Asta-Presanella). Questo significa che le popolazioni differiscono più

per la distribuzione delle frequenze alleliche che per dimensioni alleliche.

La popolazione alpina è caratterizzata da un significativo coefficiente di inbreeding (F_{IS}=0.116) con intervallo di confidenza al 95% (0.0843–0.14) significativamente diverso da 0. Lo stesso coefficiente è stato calcolato anche nei singoli locus come riportato in Tab. 3.1.5.

Non abbiamo riscontrato indicazioni di bottleneck nella popolazione.

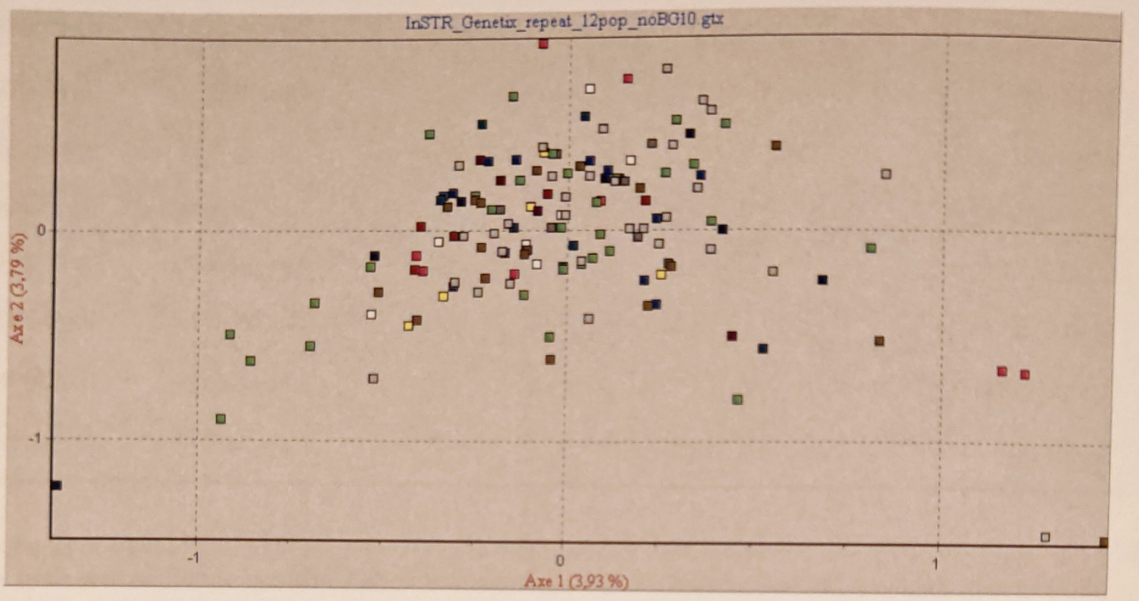


Fig. 3.1.3: Analisi Fattoriale delle Corrispondenze (GENETIX); i punti dello stesso colore individuano una popolazione; non si evidenzia particolare sottostrutturazione della popolazione alpina.

LOCUS	**F_{IS}**
BG19	0.024
BG20	0.030
TUT1	0.483
TUT2	0.058
TUT3	0.037
BG12	0.455
BG15	0.075
BG16	0.042
BG18	0.001
Globale sulla popolazione	**0.116**
IC 95%	0.0843 – 0.144

Tab. 3.1.5: Coefficiente di inbreeding locus specifico e globale sulla popolazione. IC= intervallo di confidenza.

CLUSTER	N° ind	K	S	H (±SD)	Ricchezza Allelica	πn (±SD)	π (±SD)
A	148	19	18	0.79 (±0.03)	4.43	0.002 (±0.001)	2.17 (±1,21)
B	7	33	2	0.52 (±0.21)	3	0.001 (±0.001)	0.59 (±0,53)
C	56	12	9	0.69 (±0.06)	3.72	0.001 (±0.001)	1.42 (±0,88)
D	109	12	14	0.61 (±0.05)	3.13	0.003 (±0.001)	2.65 (±1.42)

Tab. 3.2.1: indici di diversità genetica per gli aplotipi D-loop (Nei, 1987; Tajiama, 1993), stimati per i quattro Cluster; N°ind= numero individui; K= numero aplotipi; S= siti polimorfici; H= haplotype diversity; π_n= nucleotide diversity; π= numero medio di differenze nucleotidiche; SD= deviazione standard.

L'analisi dei livelli di variabilità a livello di DNA mitocondriale è stata eseguita sui quattro cluster già descritti, considerando solo gli aplotipi la cui frequenza era nota, come riportato in Tab.3.2.1; sono quindi stati esclusi dal Cluster A gli aplotipi pirenaici e LMU, dal Cluster D l'aplotipo di *japonica* (Lmjap) e gli aplotipi dab713, dab630, dab107, jmb1041 e svd611.

I maggiori livelli di variabilità genetica (Tab. 3.2.1) si riscontrano nei Cluster A e Cluster C, i cui valori non sono significativamente differenti ($p>0.05$)
In particolare il Cluster A presenta ricchezza allelica (AR=4.43) e haplotype diversity (H=0.79) significativamente maggiore ($p=0.05$) anche del più geograficamente ampio Cluster D (AR=3.13; H=0.61). Il Cluster B, in posizione geografica intermedia tra areale circumpolare e meridionale presenta i più bassi valori di variabilità genetica; bisogna tenere però presente la bassa numerosità del campione, infatti la ricchezza allelica (AR=3) non si discosta molto da quella delle altre popolazioni.

I loci microsatelliti, analizzati solo nella popolazione alpina, riconducibile al Cluster A, presentano in media 8.5 (da 6 a 13) alleli per locus; in ogni locus si hanno variazioni alleliche da 5 a 14 ripetizioni. L'eterozigosità osservata media della popolazione (H_O=0.68) è significativamente ($p<0.05$) diversa dall'eterozigosità attesa (H_E=0.76) come aspettato vista la presenza di due loci non in equilibrio di Hardy-Weinberg (TUT1 e BG12) (rif. Tab. 3.2.2).

Locus	A	H_O	H_E	Range allelico
BG19	6	0.77	0.79	5
BG20	7	0.74	0.76	6
TUT1	7	**0.25**	0.48	8
TUT2	13	0.80	0.85	14
TUT3	8	0.75	0.78	7
BG12	7	**0.42**	0.77	6
BG15	9	0.72	0.78	8
BG16	9	0.81	0.84	8
BG18	11	0.83	0.83	14
Media	8.556	0.68	0.76	8.44
s.d.	2.114	0.19	0.10	3.13

Tab. 3.2.2: indici di diversità genetica per locus per la popolazione alpina di pernice; A= numero di alleli per locus; H_E= eterozigosità attesa; H_O=eterozigosità osservata, in grassetto i valori significativi per Hardy-Weinberg, p=0.00.

3.3 STRUTTURA SOCIALE, DISPERSIONE DEI SESSI

Dalla suddivisione dei campioni nei due sessi si sono ottenute le seguenti sottopopolazioni:

- D-loop: 63 maschi – 72 femmine;
- STR: 63maschi – 76 femmine;

Sono stati eliminati 13 individui il cui sesso non era noto.

L'analisi della distribuzione della variabilità genetica (AMOVA) per la D-loop non evidenzia differenziazione genetica fra maschi e femmine (Φ_{ST}=-0.010; p>0.05).

La stessa analisi effettuata sui dati microsatelliti riporta invece una differenziazione che, anche se piccola, risulta significativa (F_{ST}=0.005; p<0.05).

Le due popolazioni presentano livelli di variabilità comparabili sia alla D-loop (Hmaschi=0.80±0.04; Hfemmine=0.78±0.05) che ai loci microsatellite (H_E-maschi=0.76±0.13; H_E-femmine=0.77±0.09).

Nel grafico dell'analisi AFC a due o tre dimensioni, i punti delle due popolazioni ricadono in un'unica nuvola, senza indicare chiaramente pattern di differenziazione.

Dalla valutazione della condizione di equilibrio di Hardy-Weinberg, riportata in tabella 3.3.1, si è ottenuto che la popolazione femminile presenta un deficit di eterozigoti altamente significativo (p=0.00) per i loci TUT1 e BG12, mentre la popolazione maschile non evidenzia, in alcun locus, condizione di deviazione dall'equilibrio. L'analisi AMOVA evidenzia leggera struttura per le femmine (F_{ST}=0.05, p<0.05), ancora minore per i maschi (F_{ST}=0.03, p<0.05).

Entrambe le popolazioni presentano deficit di eterozigoti. Il coefficiente di inbreeding delle femmine (F_{IS}=0.18) è più alto e significativamente differenziato (p<0.05) da quello della popolazione maschile (F_{IS}=0.05) (Tab. 3.3.2).

L'analisi di clasterizzazione bayesiana è stata utilizzata per evidenziare la presenza di un'eventuale struttura criptica all'interno delle due popolazioni; in entrambe le popolazioni non sono stata evidenziata nessuna struttura (K=1).

Hardy-Weinberg				
Locus	Femmine		Maschi	
	H_O	H_E	H_O	H_E
BG19	0.75	0.78	0.79	0.80
BG20	0.76	0.76	0.71	0.75
TUT1	**0.09**	0.56	0.44	0.41
TUT2	0.83	0.84	0.76	0.85
TUT3	0.70	0.75	0.86	0.81
BG12	**0.18**	0.75	0.68	0.77
BG15	0.70	0.80	0.76	0.77
BG16	0.84	0.85	0.75	0.84
BG18	0.86	0.83	0.76	0.83

Tab. 3.3.1: valori di eterozigosità osservata (H_O) e attesa (H_E) in condizioni di equilibrio di Hardy-Weinberg per i due sessi separati, femmine e maschi. In grassetto i valori significativi (p=0.00), testati con 100000 permutazioni.

Coefficiente di Inbreeding		
Popolazione	F_{IS}	(IC 95%)
Femmine	0.18	0.12 - 0.20
Maschi	0.05	0.01 - 0.08

Tab. 3.3.2: valori del coefficiente di inbreeding relativo alle due popolazioni. IC= intervallo di confidenza.

4. DISCUSSIONE

4.1 FILOGEOGRAFIA ED EVOLUZIONE

L'analisi filogenetica e filogeografica di *Lagopus muta* ci permette di rispondere ai primi obiettivi che si erano posti per questa ricerca, relativamente alla caratterizzazione della popolazione presente sulle Alpi, considerata dalla tassonomia una sottospecie (*L. muta helvetica*). Definire la tassonomia tramite gli alberi filogenetici consente di individuare correttamente le unità richiedenti particolare attenzione nella loro gestione, così come la filogeografia aiuta nel capire le relazioni e l'evoluzione delle popolazioni che occupano territori distinti, evidenziando anche le peculiarità ambientali (barrierie montuose, fiumi, città, ...) che possono aver portato alla differenziazione delle sottospecie o popolazioni.

Gli alberi filogenetici (Fig. 3.1.1) ottenuti per gli aplotipi del genere *Lagopus*, usando come outgroup *Tetrao tetrix,* confermano la monofilia del genere *Lagopus*, definita da Lucchini prima (Lucchini et al., 2001) e da Drovetski (2003) poi. Le tre specie *L. leucura, L. lagopus* e *L. muta* formano un clade altamente differenziato, all'interno del quale *L. muta* risulta maggiormente legata a *L. lagopus*, distribuita lungo il circolo polare artico alle alte latitudini; *L. leucura* che è una specie endemica delle Montagne Rocciose, si trova invece in posizione basale, a confermare l'origine Nord americana del clade (Lucchini et al., 2001), datata 3.2-1.9 MA (Drovetski, 2003).

Gli stessi alberi evidenziano in modo chiaro la particolare situazione della pernice bianca alpina: tutti gli aplotipi riconducibili a *L. muta helvetica* ricadono, insieme agli aplotipi pirenaici (*L. m. pyrenaica*) e agli aplotipi scandinavi (*L .m. muta*), all'interno di un clade altamente differenziato da quello degli aplotipi nordici. La stessa profonda suddivisione tra individui europei e quelli da altre località era stata riscontrata in precedenza da Sahlman (2009) per lo stesso marcatore, e da Àrnason (1972) tramite uno dei primi studi di elettroforesi allozimica.

Questa ripartizione viene confermata dal network (Fig. 3.1.2); all'interno della specie *L. muta* si distinguono quattro cluster di aplotipi ben differenziati che sono strettamente riconducibili alle regioni geografiche di distribuzione della specie e la cui validità è supportata dall'analisi della varianza molecolare che riporta un Φ_{ST} tra i Cluster di 0.79 (p=0.00). Il

Cluster D, a cui è legato anche l'aplotipo altamente differenziato (20 mutazioni) di *L. m. japonica,* rappresenta gli aplotipi provenienti da Regione del Bering, Alaska e Siberia; esso è separato da un Φ_{ST} di 0.11 ($p<0.05$) dal Cluster C che rappresenta l'areale occupato sulle maggiori isole circumpolari (Groenlandia, Islanda, Isola di Svalbard e Penisola di Taymir). Da questi si distanziano per ben 8 mutazioni gli aplotipi di origine europea ($\Phi_{ST}=0.85$, $p<0.05$). Gli aplotipi scandinavi (Cluster B) restano separati dagli alpini e pirenaici (Cluster A; $\Phi_{ST}=0.19$, $p<0.05$), rappresentanti i relitti glaciali al limite meridionale dell'areale distributivo della specie isolati dalle popolazioni nordiche, come la sottospecie *japonica.*

Simili pattern di strutturazione genetica, sono stati rilevati per altre specie a distribuzione oloartica. Ad esempio per il picchio tridattilo (*Picoides trydactilus;* Zink et al., 2002) Zink riporta una distinzione tra aplotipi euroasiatici e Nord americani supportata da un Φ_{ST} di 0.97 ($p<0.001$). Per *Calidris alpina* (Wenink et al., 1993) le suddivisioni tra Alaska, Costa occidentale americana, Taymir, Europa occidentale e Costa del Golfo Nord americano, sono supportate da un G_{ST} di 0.66 ($p<0.05$) per la sola parte ad alta variabilità della D-loop.

Weider e Hobaek (2000) riportano che popolazioni geograficamente separate presentano un alto livello di struttura genetica quando queste si sono evolute da rifugi glaciali multipli. Bisogna però ricordare che specie adattate a climi freddi hanno subito restrizione di areale durante i periodi interglaciali e non durante le ere glaciali, come le specie temperate (Muster e Berendonk, 2006). Per questo i nostri dati sembrano confermare l'ipotesi di Drovetski (2003) secondo cui il processo di speciazione dei Tetraonidi, e quindi anche di *Lagopus muta*, è spinto dal processo di speciazione allopatrica peripatrica, il quale prevede che piccole popolazioni si siano isolate da un progenitore ampiamente diffuso e quindi differenziate.

In particolare, per gli aplotipi circumpolari, ricadenti nel Cluster C e D del network, raggruppati in un unico clade ben supportato dagli alberi filogenetici, si suppone un'origine per effetto di isolamento in rifugi glaciali multipli. L'aplotipo centrale BE1, tuttora ampiamente diffuso, potrebbe rappresentare l'antenato da cui, tra 135 000 e 11 000 anni fa, si sono evoluti gli aplotipi attuali (Holder at al., 1999; Holder at al., 2000).

A livello di popolazione europea, invece, nell'albero filogenetico aplotipi pirenaici e scandinavi ricadono all'interno degli aplotipi alpini, mentre il network riconosce l'indipendenza degli scandinavi rispetto agli altri (Cluster B).

Il basso valore di variabilità genetica della popolazione scandinava (H=0.52), intermedio a quello riportato da Bech (Bech et al., 2009) per la popolazione pirenaica (H=0.43) e a quello

più alto della popolazione alpina (H=0.79), ci fa ipotizzare un effetto fondatore conseguente alla colonizzazione post-glaciale. Come per altre specie (*Trollius europaeus*, Despres et al., 2002; *Microtus oeconomus*; Brunhoff et al., 2003; *Reingifer tarandus*, Røed, 2003; *Pardosia saltuaria*, Muster et al., 2006; *Veronica alpina*, Albach et al., 2006) non è da escludere, infatti, la possibilità che la Scandinavia, durante il LGM (Last Glacial Maximum LGM; 23 000-18 000 anni fa) completamente ricoperta dai ghiacci, sia stata ricolonizzata posteriormente a partire da rifugi meridionali o orientali. Per la piccola popolazione pirenaica, al limite meridionale del range distributivo (Caizergues et al., 2003; Despres et al., 2002), possiamo invece supporre un effetto di deriva genetica.

Questo, e la constatazione che per molte specie le zone di rifugio meridionali presentano un alto livello di diversità genetica (Hewitt, 2004), può supportare la tesi secondo cui la specie *L. muta,* già presente in Nord America ed in Europa con due gruppi differenziati per effetto della vicarianza prima dell'ultima importante glaciazione, avrebbe subito durante il LGM uno spostamento verso le latitudini più meridionali, occupando le pianure di tundra e steppa dell'Eurasia centrale vicino ai margini glaciali nordici (Hewitt, 2004b) o più meridionali fino al limite di Alpi e Pirenei. Con il ritiro dei ghiacci (15 000-10 000 anni fa) la specie avrebbe ricominciato la sua risalita verso Nord, colonizzando la Penisola scandinava, ma lasciando delle popolazioni relitte su Alpi e Pirenei. L'aplotipo ad alta frequenza ed ubiquitario (HLm01=41,89%) sull'Arco alpino potrebbe rappresentare l'antenato comune di queste popolazioni considerate sottospecie (*helvetica, muta* e *pyrenaica*).

Il fatto che le sottospecie non siano generalmente differenziate a livello di analisi filogenetica, mette in dubbio la validità della corrente classificazione tassonomica, basata su morfologia e areale distributivo. In particolare, sembra poco supportata la divergenza genetica tra sottospecie distribuite lungo un gradiente Est-Ovest, probabilmente per la permanenza di flusso genico permesso dalla continuità di habitat. Risulta, invece, evidente la differenza tra il gruppo circumpolare e la pernice pirenaico-alpina, la cui connessione è stata interrotta a partire come minimo dallo scioglimento dei ghiacci dopo l'ultima glaciazione (15000-10000 anni fa).

In questo ambito, in uno studio sulla renna a livello globale Røed (2003) suggerisce che le differenze morfologiche rilevate tra le sottospecie, non supportate dall'analisi filogenetica, non siano evolute in rifugi glaciali separati, ma che più verosimilmente possano essere conseguenza della risposta adattativa ai cambiamenti postglaciali; le due sottospecie *helvetica* e *pyrenaica* sembrano rispondere a questa ipotesi. Alla luce dei cambiamenti climatici in atto,

che introdurranno ulteriori barriere al flusso genico, sembrano destinate ad un'evoluzione distinta, andando ad aumentare la struttura genetica della specie *Lagopus muta*.

4.2 STRUTTURA E VARIABILITÀ GENETICA

Altro nostro principale obiettivo è valutare lo stato di salute della pernice bianca sulle Alpi, quindi sui nostri campioni si sono analizzate, in modo approfondito, la struttura genetica, per evidenziare fenomeni di isolamento o di adattamento a specifiche condizioni ambientali, e la variabilità genetica, indice della capacità di adattamento ed evoluzione della popolazione.

Dai dati emerge che sulle Alpi non è presente alcun chiaro pattern di differenziazione in sottopopolazioni. La suddivisione in 12 popolazioni riconducibili alle principali catene montuose del territorio studiato, riporta valori globali significativi ma molto piccoli per entrambi i marcatori analizzati: D-loop e microsatelliti (Φ_{ST}=0.046, $p<0.05$ e F_{ST}=0.019, p=0.00 rispettivamente). Anche l'analisi SAMOVA, condotta sulle sequenze mitocondriali, tenendo in considerazione anche le informazioni geografiche relative alle 12 popolazioni, non evidenzia segni di struttura, così come nessuna struttura criptica di popolazione è stata individuata tramite STRUCTURE sui dati microsatellite.

Diversamente dai Pirenei, per cui Bech (2009) riporta bassi valori di F_{ST} (0.05), ma forte struttura popolazionistica, dai nostri dati STR emergono solo quattro confronti significativi ($p<0.05$ dopo correzione di Bonferroni per test multipli) nell'analisi delle distanze a coppie che corrispondono ad un pattern di differenziazione Est-Ovest lungo l'Arco alpino: Brenta risulta differenziata da Morbegno; Destra Fassa da Grymentz, Morbegno e Tirano. Questa mancanza di struttura era già stata riscontrata, nelle sole Alpi Sud-occidentali, da Caizergues (2003), che riporta invece un effetto di isolamento per distanza.

Anche se la scarsa numerosità di campioni in alcune zone potrebbe avere reso meno potenti alcuni test statistici, i nostri risultati confermano l'esistenza di un sostanziale flusso genico tra le diverse località nelle Alpi (Caizergues et al., 2003) che renderebbe la popolazione alpina di pernice bianca una singola popolazione panmittica. Inoltre, il calo numerico delle popolazioni registrato in alcune località alpine non trova riscontro a livello genetico (Test Tajima D sul mtDNA, non significativo; nessun segno di bottleneck ai microsatelliti).

I valori di variabilità genetica della popolazione di pernice alpina, sono comparabili a quelli riportati per la stessa specie in areali non minacciati o per specie simili considerate non a rischio e maggiori di quelli riscontrati in popolazioni piccole e isolate.

In particolare la ricchezza allelica per la D-loop della nostra popolazione, non solo è comparabile a quella dell'ampio areale comprendente Alaska, Siberia e Bering, ma addirittura maggiore (4.43 vs 3.13). L'haplotype diversity (H=0.79) è significativamente maggiore ($p<0.05$) di quella trovata per la popolazione pirenaica nel suo complesso (H=0.43; Bech et al., 2009), o per la popolazione residente sull'Isola di Svalbard (H=0.14; Sahlman et al., 2009) distante dall'entroterra e da altre isole. Altro estremo caso di ridotta variabilità è dato da *L. m. japonica* per cui, su ventidue individui campionati si sono ottenuti solo due aplotipi, di cui uno rappresentante il 95% della popolazione (Baba et al., 2001). Pirenei e Giappone rappresentano l'estremo confine meridionale della popolazione di pernice, dove questa maggiormente subisce gli effetti di frammentazione e riduzione dell'habitat.

Allo stesso modo la variabilità ottenuta dai nove loci micro satellite (H_E=0.76) è superiore a quanto rilevato in Groenlandia (H_E=0.67), Islanda (H_E=0.52), Isola di Svalbard (H_E=0.47) e Scandinavia (H_E=0.66) da Sahlman (2009). Spostandoci sui Pirenei, dove un numero di loci inferiore è stato analizzato, Caizergues (2003) evidenzia comunque variabilità ridotta di circa un terzo (H_E=0.63) rispetto a quanto trovato su Alpi e Norvegia (H_E=0.84-0.88), mentre Bech (2009), utilizzando loci diversi, riporta un'eterozigosità media sulle popolazioni pirenaiche di 0.72.

Variabilità più alta (H_E=0.94) è registrata per la sottospecie non in pericolo di estinzione *Lagopus lagopus scotica* (Piertney et al., 1998), mentre valori simili sono riportati per popolazioni europee di gallo forcello non isolate (H_E=0.63-0.74), leggermente più bassi per popolazioni isolate (H_E=0.52-0.72) (Höglund et al., 2007).

4.3 STRUTTURA SOCIALE, DISPERSIONE DEI SESSI

Il difetto di omozigoti rilevato nella popolazione alpina (F_{IS}=0.116, p<0.05) è risultato non derivare da errori di genotipizzazione, né da presenza di sottostrutturazione geografica delle popolazioni (SAMOVA-STRUCTURE-AFC: negativi), per questo la nostra attenzione si è spostata sui fattori sociali e di dispersione dei sessi che potrebbero influenzare questo parametro.

Gli spostamenti effettuati dalla pernice bianca sono limitati (Scherini et al., 2003) con i maschi che mostrano un comportamento altamente filopatrico e le femmine un'alta fedeltà al sito riproduttivo (riportato in Bech et al., 2009). Nelle Alpi centrali, anche qualora i maschi non riescano ad occupare un territorio e quindi non si accoppino, si raggruppano e stanno a quote più elevate rispetto alle aree di riproduzione, senza disperdere (Scherini et al., 2003). Per la pernice bianca, così come per altri Tetraonidi, ci sono evidenze che la dispersione sia a carico della componente femminile della popolazione (Caizergues et al., 2003; Piertney et al., 1998; Caizergues e Ellison, 2002).

A livello genetico traccia della dispersione differenziale fra i due sessi può essere rilevata tramite marcatori sia ad eredità materna che biparentale e dai loro confronti.
Per quanto riguarda la D-loop, bisogna ricordare che essa presenta un'eredità solo per via materna: quindi, ci si aspetta che questa evidenzi minore struttura quando il sesso disperdente sia quello femminile, rispetto a quanto riportato dai microsatelliti, nell'analisi della popolazione nel suo complesso. A livello di microsatelliti è possibile confrontare i livelli di deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (F_{IS}) fra i due sessi, sotto l'assunzione che struttura criptica, e quindi deviazione dall'equilibrio, sarà rilevata per il sesso filopatrico (Prugnolle e de Meeus, 2002; Piertney et al., 1998; Piertney et al., 2000).

Nella pernice alpina si riscontra una maggiore struttura a livello di D-loop (F_{ST}=0.036, p<0.05), rispetto a quanto ottenuto dai microsatelliti (F_{ST}=0.019, p<0.05). Inoltre la popolazione femminile evidenzia maggiori valori di inbreeding (F_{IS}femmine=0.18, p<0.05; F_{IS}maschi=0.05, p<0.05), di struttura (F_{ST}femmine=0.05, p<0.05; F_{ST}maschi=0.03, p<0.05) e due loci non in equilibrio rispetto a quella maschile.
Tutti questi dati, diversamente da quanto ipotizzato sulla base del maggiore spostamento sul territorio delle femmine rispetto ai maschi, suggeriscono che nella pernice alpina il sesso maggiormente filopatrico sia quello femminile con i maschi che promuovono il flusso genico.

La dispersione dei maschi riduce sicuramente l'effetto di strutturazione dato dalla filopatria femminile visto il valore ridotto di F_{ST} dei microsatelliti, ma la bassa struttura anche a livello mitocondriale e la non capacità di algoritmi, come quello della clusterizzazione bayesiana o di analisi fattoriale delle corrispondenze, di individuare sottostruttura sia a livello globale che nei due sessi separatamente suggerisce che la dispersione sia per la specie un elemento comune in entrambi i sessi.

Questa nostra conclusione deve però essere considerata come un'indicazione generale, da confermarsi tramite uno studio popolazione specifico con un alto numero di individui campionati strettamente nel periodo post-dispersione della specie.

5. CONCLUSIONI

Questo studio ha permesso di ottenere numerose informazioni sulla popolazione di pernice bianca che troviamo sulle Alpi.

La filogenesi ha messo in risalto l'unicità della sottospecie *helvetica,* distinguendola nettamente dalle sue conspecifiche che abitano le ampie tundre circumpolari. Essa rappresenta quindi un elemento caratteristico della biodiversità alpina e la sua tutela deve restare un elemento prioritario nei piani di gestione faunistica.

Non deve, infatti, trarre in inganno l'alto livello di diversità genetica rilevato: la specie occupa habitat che subiscono riduzione e frammentazione per l'innalzamento del limite della vegetazione, conseguente ai cambiamenti climatici, e che sono oggetto di sfruttamento antropico per fini turistici. L'attuale livello di diversità deve essere mantenuto per consentire alla specie una maggiore capacità di adattamento ai vari stress a cui è sottoposta. Ciò può avvenire solo se è garantito il flusso genetico tra le popolazioni che abbiamo ipotizzato essere a carico dei maschi della popolazione. Conseguentemente, particolare attenzione deve essere posta nei loro confronti e nella pianificazione di quegli interventi ad alta quota che potrebbero introdurre barriere alla dispersione degli animali.

6. RINGRAZIAMENTI

La tesi è il traguardo di anni di studio e il coronamento di un sogno, di conoscenze acquisite e di interessi appagati.
Svolgere quest'ultima parte del percorso di studi presso il Centro di Ricerca ed Innovazione della Fondazione Edmund Mach, presso la sede delle Viote del Monte Bondone è stata un'esperienza ricca di soddisfazioni sia dal punto di vista scientifico che umano. Le persone che mi hanno seguito, con la loro grande conoscenza hanno permesso di avvicinarmi ad un settore di ricerca che all'inizio mi sembrava distante, benché pieno di stimoli.
Devo quindi ringraziare la gentilezza e la pazienza che Barbara, Matteo, Cristiano e Luca hanno mostrato nel seguirmi e motivarmi in questo percorso; Alexis e Alessio per le chiacchiere e le risate che in laboratorio alleggerivano le giornate e aiutavano nei momenti difficili.

Se queste persone sono state fondamentali per portare a termine gli studi, tutta la mia famiglia, in particolare Gigliola, Adamello, Alessio ed Emanuele, è stata indispensabile sempre. Con il loro sostegno e la loro spinta a cercare sempre il meglio, senza arrendersi alle prime difficoltà, hanno fatto sì che arrivassi a questo traguardo con un bagaglio ricco di soddisfazioni. Ringrazio anche Ilario che con la sua comprensione mi ha aiutato nei momenti difficili, e mi ha reso felice con i suoi complimenti per i risultati ottenuti.

Spero che questo lavoro vi renda tutti orgogliosi, perché ognuno ha avuto una piccola parte nella sua riuscita! Grazie!

7. BIBLIOGRAFIA

Abram S., (1999), Fauna delle Alpi- Uccelli, Nitida Immagine Editrice, Cles (Tn)

Akaike H., (1974), A new look at the statistical model identification- *IEE Trans. Automatic control* 19: 716-723

Albach D. C., Schönswetter P., Tribsch A., (2006), Comparative phylogeography of the *Veronica alpina* complex in Europe and North America, *Mol. Ecol.* 15: 3269-3286

Archibald J. K., Mort M. E., Crawford D. J., (2003), Bayesian inference of phylogeny: a non technical primer, *TAXON* 52: 187-191

Àrnason A., (1972), Some electrophoretic studies of proteins in the rock ptarmigan, Ibis 114: 580

Avise J. C., Arnold J., Ball R. M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J. E., Reeb C. A., Saunders N. C., (1987), Intraspecific phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics, *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522

Baba Y., Fujimaki Y., Yoshii R., Koike H., (2001), Genetic variability in the mitochondrial control region of the japans rock ptarmigan Lagopus mutus japonicus, *Jpn. J Ornithol.* 50: 53- 64

Bandelt H-J., Firster P., Röhl A., (1999), Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies, Mol. Biol. Evol. 16: 37-48

Beaumont M. A., Bruford M. W., (1999), Microsatellites in conservation genetics. In: Goldstein D. B., Schlötterer (Ed), Microsatellites- Evolution and application, *Oxford University Press,* pp 165-182

Bech N., Boissier J., Drovetski S., Novoa C., (2009), Population genetic structure of rock ptarmigan in the 'sky islands' of French Pyrenees: implications for conservation, *Animal Conservation* 12: 138–146

Belkhir K., Borsa P., Goudet J., Chikhi L, Bonhomme F., (1999), GENETIX, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France)

Benzécri J.P., 1973. L'Analyse des Données: T. 2, I' Analyse des correspondances. Paris: Dunod.

BirdLife International, (2009). Lagopus muta. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 14 September 2010

Brenot J-F., Ellison L., Rotelli L., Novoa C., Calenge C., Leonard P., Menoni E., (2005), geographic variation in body mass of rock ptarmigan *Lagopus mutus* in the Alps and the Pyrenees, *Wildl. Biol.* 11: 281-285

Brunhoff C., Galbreath K. E., Fedorov V. B., Cook J. A., Jaarola M., (2003), Holartic phylogeography of the root vole (Microtus oeconomus): implications forlate Quaternary biogeography of high latitudes, *Mol. Ecol.* 12: 957-968

Caizergues A., Bernard-Laurent A., Brenot J-F., Ellison L., Rasplus JY. (2003), Population genetic structure of rock ptarmigan *Lagopus mutus* in Northern and Western Europe. *Mol Ecol* 12: 2267-2274

Caizergues A., Ellison L. N., (2002), Natal dispersal and its consequence in Black Grouse *Tetrao tetrix*, *Ibis* 144: 478-487

Cattadori I., M., Hudson P., J., (1999), Temporal dynamics of grouse populations at the southern edge of their distribution, *Ecography* 22: 374-383

Cornuet J. M., Luikart G., (1996), Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data, *Genetics* 144: 2001-2014

Cotter R. C., (1999), The reproductive biology of Rock Ptarmigan *(Lagopus mutus)* in the central Canadian Arctic. *Arctic* 52: 23-32

Despres L., Loirot S., Gaudeul M., (2002), Geographic patter of genetic variation in the European globeflowers *Trollius europaeus* L. (Ranuncolaceae) inferred from amplified fragment length polymorphism, *Mol. Ecol.* 11: 2337-2347

Drovetski S. V., (2003), Plio-Pleistocene climatic oscilations, Holarctic biogeography and speciation in an avian subfamily, *Journal of Biogeography* 30: 1173–1181

Drovetski S., (2002), Molecular phylogeny of Grouse: Individual and Combined Performance of W-linked, Autosomal, and Mitochondrial loci, *Syst. Biol.* 51 (6): 930-945

Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L., (2002), A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations, *Mol. Ecol.* 11: 2571-2581

EEA (2009), Regional climate change and adaption- The Alps facing the challenge of changing water resources, EEA report No 8/2009, European Environment Agency, Copenhagen. (http://www.eea.europa.eu/publications/alps-climate-change-and-adaptation-2009)

El Mousadik A., Petit R., (1996), High levels of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* Skeels) endemic to Marocco. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 832-839

Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M., (1992), Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplogroups: applications to human mitochondrial DNA restriction data, *Genetics* 131: 479-491.

Excoffier, Laval L. G., Schneider S., (2005), Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

Falush D., Stephens M., Pritchard J.K., (2003), Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies, *Genetics*164: 1567-87

Favaron M., Scherini G.C., Preatoni D., Tosi G., Wauters L.a. (2006), Spacing behaviour and habitat use of rock ptarmigan (*Lagopus mutus)* at low density in the Italian Alps. *J Ornithol* 146: 618-628

Felsenstein J., (1981), Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach, *J. Mol. Evol.* 17: 386-376

Felsenstein J., (1985), Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution* 39(4): 783-791

Felsenstein J., (2009), PHYLIP (Phyilogeny Inference Package) version 3.69, Department of Genetics, University of Washington, Seattle

Fitch W., (1971), Toward the Course of Evolution: Minimum Change for a Specific Tree Topology, *Systematic Zoology*, 20(4): 406-416

Frankham R., (2010), Where are we in conservation genetics and where do we need to go? *Conserv Genet* 11:661–663

Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A., (2002), Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A., (2006), Fondamenti di genetica della conservazione, Zanichelli ed.

Glaubitz J. C., (2004), CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages, *Molecular Ecology Notes* 4: 309-310

Goudet J., (2001), FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html. Updated from Goudet (1995)

Guerrant E. O., (1992), Conservation biology: The theory and practice of nature conservation, preservation and management, New York, *Chapman & Hall*

Guindon S., Gascuel O., (2003), A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood, *Syst. Biol.* 52(5): 696–704

Guo S. W., Thompson E. A., (1992), Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles, *Biometrics* 48: 361-372

Hancock J. M., (1999), Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein D. B., Schlötterer (Ed), Microsatellites- Evolution and application, Oxford University Press, pp 1-9

Hewitt G. M., (2004), The structure of biodiversity – insights from molecular phylogeography, *Frontiers in Zoology* 1:4

Hewitt G. M., (2004b), Genetic consequences of climatic oscillation in the Quaternary, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B 359: 183-195

Hoffman R. W., Braun C. E., (1975), Migration of a wintering population of white-tailed ptarmigan in Colorado, *J Wildl Manage* 39: 485–490

Hoffman R. W., Braun C. E., (1975), Migration of wintering population of white-tailed ptarmigan in Colorado. *J. Wildl. Manage* 38: 485-490

Höglund J., Larsson J. K., Jansman H. A. H., Segelbacher G., (2007), Genetic variability in European black grouse (*Tetrao tetrix*), *Conserv. Genet.* 8: 239-243

Holder K., Montgomerie R., Friesen V. L., (1999), A Test of the Glacial Refugium Hypothesis using Patterns of Mitochondrial and Nuclear DNA Sequence Variation in Rock Ptarmigan (Lagopus mutus), *Evolution* 53 (6): 1936-1950

Holder K., Montgomerie R., Friesen V. L., (2000), Glacial vicariance and historical biogeography of rock ptarmigan (*Lagopus mutus*) in the Bering region, *Mol. Ecol.* 9: 1265–1278

Holder K., Montgomerie R., Friesen V. L., (2004), Genetic diversity and management of Nearctic rock ptarmigan (Lagopus mutus), *Can. J. Zool.* 82: 564-575.

Huelsenbeck J. P., Ronquist F., (2001), MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees, *Bioinformatics Application Note* 17: 754-755

IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3. Table 1 <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 14 September 2010.

Kashi Y., Soller M. (1999), Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: Goldstein D. B., Schlötterer (Ed), Microsatellites- Evolution and application, *Oxford University Press*, pp 10- 23

Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins, D.G., (2007), Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics*, 23:2947-2948

Latta G. R., (2008), Conservation genetics as applied evolution: from genetic pattern to evolutionary process, *Evolutionary Applications* 1: 84-94

Librado P., Rozas J., (2009), DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data, *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Lucchini V., Höglund J., Klaus S., Swenson J., Randi E., (2001), Historical Biogeography and a Mitochondrial DNA Phylogeny of Grouse and Ptarmigan, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20 (1): 149–162

Muster C., Berendonk T. U., (2006), Divergence and diversity: lessons from an artic-alpine distribution (*Pardosa saltuaria* group, Lycosidae), *Molec. Ecol.* 15: 2921-2933

Nei M., (1987), Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York

Novoa C., Besnard A., Brenot J. F., Ellison L. N., (2008), Effect of weather on the reproductive rate of Rock Ptarmigan *Lagopus muta* in the eastern Pyrenees, *Ibis* 150: 270–278

Patthey P., Wirthner S., Signorell N., Arlettaz R., (2008), Impact of outdoor winter sports in the aboundance of a key indicator species of alpine ecosystems, *Journal of Applied Ecology* 45: 1704- 1711

Piertney S. B., Höglund J., (2001), Polymorphic microsatellite DNA markers in black grouse (*Tetrao tetrix), Molecular Ecology Notes,* 1: 303-304

Piertney S. B., MacColl A. D. C., Bacon P. J., (1998), Local genetic structure in red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*): evidence from microsatellite DNA markers, *Mol. Ecol.* 7: 1645-1654

Piertney S. B., MacColl A. D. C., Bacon P. J., Racey P. A., Lambin X., Dallas J. F., (2000), Matrilineal genetic structure and female-mediated gene flow in red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*): an analysis using mitochondrial DNA, *Evolution* 54 (1): 279-289

Posada D. (2008), JModelTest: Phylogenetic Model Averaging, *Mol. Biol. Evol.* 25(7): 1253-1256

Prugnolle F., de Meeus T., (2002), Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review, *Heredity* 88: 161-165

Randi E., Lucchini V., (1998), Organization and Evolution of the Mitochondrial DNA Control Region in the Avian Genus *Alectoris, J Mol Evol* 47: 449–462

Røed K. H., (2003), Refugial origin and postglacial colonization of holartic reideer and caribou, *Rangifer* 25 (1): 19-30

Rolando A., Caprio E., Rinaldi E., Ellena I., (2007), The impact of high-altitude ski-runs on alpine grassland bird communities, *Journal of Applied Ecology* 44: 210–219

Sahlman T., Segelbacher G., Höglund J., (2009), Islands in the ice: colonization routes for rock ptarmigan to the Svalbard archipelago, *Ecography* 32: 840-848

Scherini G.C., Tosi G., Wauters L.A. (2003), Social behaviour, reproductive biology and breeding succes of Alpine Rock Ptarmigan *Lagopus mutus helveticus* in northern Italy. *Ardea* 91(1): 11-23

Segelbacher G., Paxton R . J ., Steinbrück G., Trontelj P., Storch I., (2000), Characterization of microsatellites in capercaillie *Tetrao urogallus* (AVES), *Molecular Ecology* 9: 1919–1952

Shendure J., Ji H., (2008), Next generation DNA sequencing, *Nature Biotechnology* 26 (10): 1135:1145

Slatking M., (1995), A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies, *Genetics* 139: 457-462

Spagnesi M., L. Serra (a cura di), (2004), Uccelli d'Italia. Quad. Cons. Natura, 21, Min. Ambiente – Ist. Naz. Fauna Selvatica

Storch I., (2007). *Grouse: Status Survey and Conservation Action Plan 2006–2010.* Gland, Switzerland: IUCN and Fordingbridge, UK: World Pheasant Association. 114pp

Swofford D., (2000), PAUP*. Phylogenetics Analysis using Parsimony (*and other methods). Version 4.0b8. *Sinauer, Sunderland*, MA.

Taberlet P., Bouvet J., (1991), A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies, *Auk* 108: 959 - 960

Taberlet P., Waits L. P., Luikart G., (1999), Noninvasive genetic sampling: look before you leap, *Tree* 14: 323- 327

Tajima F., (1989), Statistical Method for testing the Neutral Mutation Hypotesis by DNA Polymorphism, *Genetics* 123: 585-595

Tajima F., (1993), Measurement of DNA polymorphism. In: Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology, Takahata, N. and Clark (ed), A.G., Tokyo, Sunderland, *Japan Scientific Societies Press*, Sinauer Associates, Inc., pp: 37-59

Tamura K., Nei M., (1993), Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees, *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526

Tavaré S., (1986) Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. Pp. 57-86 *in* R. M. Miura, ed. Some mathematical questions in biology - DNA sequence analysis, *Amer. Math. Soc., Providence, RI*

Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. M., Shipley P., (2004), MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data, *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538

Watson A., Moss R., (2004), Impacts of ski-development on ptarmigan *(Lagopus mutus)* at Cairn Gorm, Scotland, *Biological Conservation* 116: 267- 275

Weider L. J., Hobaek A., (2000), Phylogeography and artic biodiversity: a review, *Ann. Zool. Fennici* 37: 217-231

Weir B. S., Cockerham C., (1984), Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure, Evolution 38 (6): 1358-1370

Wenink P. W., Baker A. J., Tilanus M. J., (1993), Hypervariable-control-region sequences reveal global population structuring in a long-distance migrant shorebird, the Dunlin (*Calidris alpina*), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 94-98

Wright S., (1951), The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 1: 323-334.

Zink R. M., Rohwer S., Drovetski S., Blackwell-Rago R., Farrel S. L., (2002), Holartic phylogeography and species limits of three-toed woodpeckers, *The Condor* 104: 167:170

Zohmann M., Wöss M., (2008), Spring density and summer habitat use of alpine rock ptarmigan *Lagopus mutus helvetica* in the southeastern Alps. *Eur J Wildl Res* 54:379-383