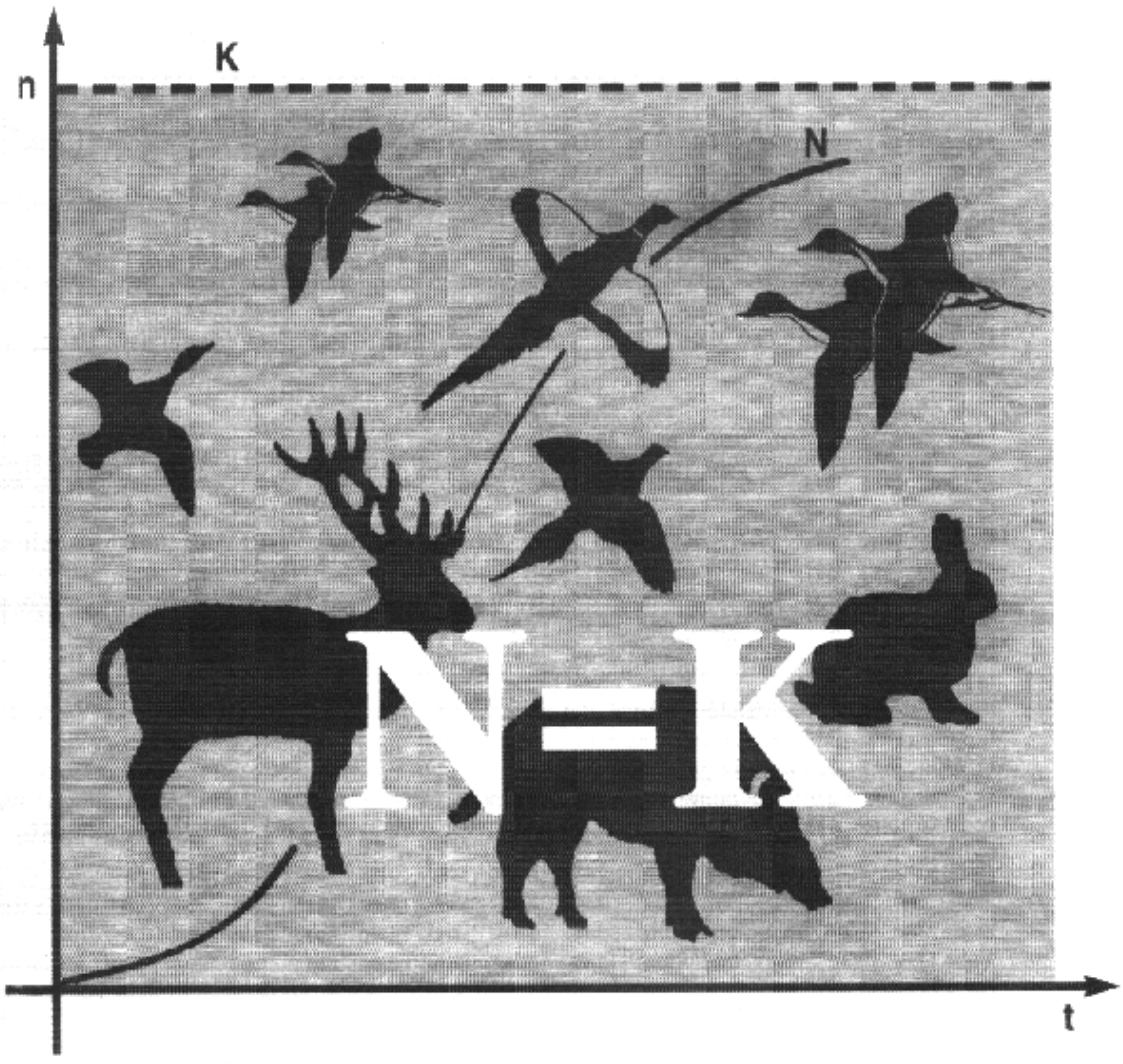
Direttore Scientifico
Alessandro Giorgetti

Direttore Responsabile
Giorgio Pettinà

N=K RICERCHE DI ECOLOGIA VENATORIA



MARCATORI MOLECOLARI RAPD PER LO STUDIO DELLE POPOLAZIONI DI GALLO FORCELLO (*TETRAO TETRIX L.*)

Bagliacca M., Valentini A., Cappuccio I., Gonnelli L.

SUPPLEMENTO
A CACCIA TOSCANA
MENSILE DEL CONSIGLIO
REGIONALE TOSCANO
DELLA FEDERCACCIA

CON LA COLLABORAZIONE
DEL DIPLOMA
UNIVERSITARIO
IN PRODUZIONI ANIMALI
ORIENTAMENTO
IN TECNICA FAUNISTICA
FACOLTÀ DI AGRARIA
UNIVERSITÀ DI FIRENZE

LUGLIO
1997 n° 7

MARCATORI MOLECOLARI RAPD PER LO STUDIO DELLE POPOLAZIONI DI GALLO FORCELLO (*TETRAO TETRIX L.*)*

Bagliacca M.[1], Valentini A.[2], Cappuccio I.[3], Gonnelli L[4]

Introduzione

Dopo il "Summit" di Rio del 1992 sulla *Conservazione della diversità biologica*.è aumentato notevolmente l'interesse delle istituzioni internazionali riguardo lo studio scientifico della biodiversità esistente sulla Terra, studio che era iniziato con la stesura della teoria evolutiva elaborata da Darwin nel 1859 circa il processo di evoluzione e di adattamento di tutte le specie della biosfera. L'attenzione è stata posta principalmente sull'esame dell'origine, dell'evoluzione, della conservazione e della perdita della diversità biologica (Bardin et al., 1994). La biodiversità deve essere tutelata, non solo per i vantaggi economici che ne derivano (farmaci, cultivars, prodotti di origine animale, ecc.), ma soprattutto per il dovere morale che ha l'uomo di proteggere le altre specie con cui convive.

L'importanza della biodiversità risiede nella maggiore capacità a far fronte ai cambiamenti dell'ambiente, insita nelle popolazioni con elevata variabilità genetica. La biosfera sta subendo un profondo cambiamento, del quale l'uomo è il maggior responsabile, per cui questa caratteristica genetica assume un valore sempre maggiore per la sopravvivenza di tutte le specie viventi. La selezione naturale favorisce infatti l'uniformità tra gli individui delle popolazioni, consentendo il raggiungimento di una fitness media elevata. Questa, nel caso di variazioni ambientali, diventa però un ostacolo alla capacità di adattamento, influendo negativamente sulle possibilità evolutive (Montalenti, 1979). Con l'impiego delle moderne tecnologie della biologia molecolare, che permettono di indagare la variabilità genetica non solo a livello proteico, ma anche analizzando le sequenze altamente polimorfiche del DNA genomico, è possibile mettere in evidenza anche diversità che non si manifestano fenotipicamente. Le specie maggiormente sottoposte ad indagine con queste moderne tecnologie, oltre all'uomo, sono state finora solo quelle di interesse eminentemente zootecnico e solo negli ultimi tempi l'attenzione si sta rivolgendo verso le specie selvatiche, la cui sopravvivenza è minacciata sempre più dai cambiamenti ambientali.

Lo studio di queste popolazioni selvatiche assume particolare importanza, soprattutto quando esse sono di piccole dimensioni od isolate. In questo caso i ripetuti accoppiamenti tra soggetti imparentati portano ad una drastica riduzione della variabilità genetica, che si manifesta con un decremento della rusticità e della capacità di adattamento alle inevitabili variazioni ambientali. Il calo numerico che ne consegue può essere così grave da poter arrivare a determinare l'estinzione delle isolate popolazioni residenti. Tra gli uccelli si possono osservare specie che compiono movimenti migratori che rendono quasi impossibile il loro isolamento e che permettono loro di colonizzare ambienti corrispondenti in paesi diversi e lontani e specie definite stanziali. Queste ultime non si spostano molto nel corso della loro vita e la loro presenza in territori distanti, anche migliaia di chilometri, è dovuta alla colonizzazione avvenuta quando esisteva una continuità ambientale tra diverse, ed a volte lontane, in termini di spazio, regioni geografiche.

Le glaciazioni, che sono state determinanti nella distribuzione attuale delle specie in tutto l'emisfero settentrionale a seguito del ritiro dei ghiacci e dei successivi cambiamenti del clima, hanno isolato alcune popolazioni. Questo è il caso del gallo forcello (Tetrao tetrix L.) che nell'areale meridionale di diffusione è rimasto isolato in molte zone. Per quanto riguarda l'Italia, la specie è infatti presente solo in alcune zone dell'Arco Alpino, seppure fosse certamente presente anche in numerosi areali dell'Appennino, almeno al confine con le Alpi Apuane (Couturier M. et A., 1980), dove l'ambiente potrebbe essere tuttora idoneo alla sua sopravvivenza (Mirola et al, 1986). Per quanto riguarda la presenza in epoca storica del fagiano di monte sull'Appennino, ed in particolare nella zona di confine con le Alpi Apuane, esistono numerose segnalazioni di abbattimenti e/o

*ricerca effettuata con contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

[1]Docente di Tecnica di allevamento delle Specie Selvatiche al Diploma universitario in Produzioni Animali - Orientamento in Tecnica Faunistica - Facoltà di Agraria - Università di Firenze.

[2] Docente di Alpicoltura2: Zootecnica nella Regione di Montagna - Istituto di Zootecnia- Università della Tuscia, Viterbo.

[3]Dottoranda di Ricerca - Istituto di Zootecnia- Università della Tuscia, Viterbo.

[4]Laureata in Scienze delle Produzioni Animali - collaboratrice esterna Dipartimento Produzioni Animali - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Pisa.

avvistamenti (Bagliacca et al 1993, Savi 1824, Schembi 1813) ritenute però, da alcuni ricercatori, fenomeni di erratismo dalle vicine Alpi Liguri. Ulteriori ricerche sono necessarie al fine di cercare di meglio definire l'epoca di estinzione della specie sull'Appennino ma la frase "*hic prope pentinum radices Appennini nidificat, patulis qua fe fol obicit agris*" scritta dall'Aldrovandi nell'Ornitologiae (Aldrovandi 1603) in riferimento al crigallus, che lo Schembi nel Vocabolario dei sinonimi classici dell'ornitologia Europea (Schembi 1846) riporta come uno dei nomi "Pre-Linneo" utilizzati per indicare il gallo forcello, sembra promettente. Certo è che negli ultimi 100 anni il numero di questi uccelli, seppure con le caratteristiche fluttuazioni, è molto diminuito in tutto il continente europeo ed in particolare nella maggior parte delle fasce dell'area alpina che ne costituiscono l'ultimo habitat italiano vedi figura n. 1. Le cause di questo declino numerico sono molte, ma la principale è la trasformazione e/o la distruzione dello habitat ottimale per la sopravvivenza dei tetraonidi (Osti 1984; De Franceschi 1978 e 1984), dovuta principalmente all'opera dell'uomo (disboscamenti, rimboschimenti, caccia indiscriminata, impianti per lo sci alpino ecc.). La conoscenza delle caratteristiche genetiche permetterebbe di salvaguardare i riproduttori che sono idonei ad essere traslocati in aree dove si vuole aumentare la consistenza numerica della specie o ad essere introdotti o reintrodotti in zone dove la specie si è estinta in modo da assicurare la "salute" genetica della popolazione italiana. L'aumento degli habitat disponibili riduce inoltre il rischio sanitario e conserva, se non aumenta, la variabilità genetica delle popolazioni, pur consentendo di mantenere alte fitness. L'abbassamento dell'inbreeding medio permette di far fronte ai mutamenti ambientali (includendo anche l'insorgere di nuove patologie) attraverso la selezione (naturale o artificiale) di genotipi resistenti. La conoscenza delle diversità genetiche entro e tra popolazioni è pertanto di fondamentale importanza per la gestione delle popolazioni stesse. A tal fine, l'identificazione nei genotipi di loci polimorfici, tramite amplificazione in vitro mediante il metodo della PCR (Polymerase Chain Reaction), impiegando marcatori molecolari RAPDs (Random Polymorphic DNA), permette di ottenere rapidamente un elevato numero di informazioni con un costo ridotto, pur in mancanza di conoscenze relative al genoma oggetto di studio. La RAPD-PCR è in grado di amplificare quantità ridottissime di DNA, che può essere così ricavato da fonti alternative al sangue, quali le penne che possono essere raccolte nell'areale di diffusione (Cappuccio et al 1994).

In questo studio abbiamo applicato questa metodologia all'indagine della variabilità genetica delle popolazioni italiane di gallo forcello. Il DNA genomico è stato estratto da penne provenienti da varie zone dell'arco alpino, grazie ai campioni che studiosi ed associazioni ci hanno gentilmente inviato.

Materiali e metodi

Questa indagine preliminare è stata condotta utilizzando penne di esemplari di gallo forcello, sia selvatici che allevati. Nel primo caso i campioni sono stati reperiti da cacciatori e provengono da diverse località d'Italia. Nel secondo, invece, sono stati raccolti nell'allevamento sperimentale del M. R. A. A. F. presso il Parco dell'Orecchiella a Corfino (Lucca). Gli individui analizzati sono 11, dei quali 7 provenienti dall'allevamento suddetto, 2 da diverse zone del Trentino e gli ultimi 2 rispettivamente dalle Alpi Marittime e dalla provincia di Cuneo. Ogni animale ha fornito circa 5-6 penne o piume, che sono state conservate in semplici buste di plastica.

L'estrazione del DNA genomico, da noi messa a punto, e già descritta in un precedente lavoro (Cappuccio et al 1994), è stata eseguita utilizzando diverse parti sia di penne che di piume. La digestione dei campioni costituiti dalla parte basale delle piume ha fornito la quantità di DNA genomico più elevata. Il calamo infatti è la porzione più ricca di cellule ed inoltre le piume hanno un minor contenuto di cheratina rispetto alle penne, per cui la proteinasi K esplica su di loro un'attività più incisiva. Mediamente dai campioni si estraeva una quantità di DNA pari a 1. 5 mg per grammo di materiale.

Dopo opportuna diluizione e test di digestione i DNA genomici sono stati sottoposti ad amplificazione su macchina per PCR della M. J. Medical. Il programma prevedeva: 30 sec di Hot Start a 93°C e poi 30 secondi di denaturazione a 93°C, 30 secondi di annealing a 35°C e 2 minuti di extension a 72°C per un totale di 40 cicli. Le reazioni sono state condotte in un volume totale di 30 µl, impiegando in ciascuna reazione 30 ng di DNA genomico, 7. 5 pmol di primer (kit V, W, X, Y, Z Operon Technology), 100 µM rispettivamente di dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 2. 5 mM MgCl2, 3 µl di buffer 10X per PCR, 0. 75 U Amplitaq polimerase Stoffel fragment (la Taq, il buffer ed il MgCl2 forniti da Perkin Elmer). Il DNA amplificato è stato evidenziato su gel di agarosio 2% con colorazione con bromuro di etidio. Le condizioni di amplificazione indicate sono quelle che hanno fornito i risultati migliori rispetto a variazioni di concentrazione di MgCl2 e di temperatura di annealing. Come test per verificare la bontà di amplificazione è stata valutata la ripetibilità tra differenti amplificacazioni e il confronto fra bande evidenziate

nei soggetti allevati con DNA estratto da sangue e DNA estratto da penne degli stessi soggetti. In totale sono stati testati 82 primers. La variabilità genetica presente tra i Galli forcelli è stata stimata calcolando il BSM medio (Band Sharing Coefficient), in base alla formula:

$$D = \frac{2\,N_{AB}}{N_A + N_B}$$

in cui: NAB rappresenta il numero di bande condivise e NA+NB esprime la somma del numero totale delle bande principali rilevate nei due individui (Wetton et al 1991).

Risultati e conclusioni

Sugli 82 primers provati, solo i 14 riportati nella tabella n. 1 hanno dato luogo ad amplificazione o hanno evidenziato lo stesso pattern di bande tra DNA estratto da sangue e da penne negli stessi animali. Di questi primers, solo 7 sono risultati produrre bande polimorfiche nei soggetti del campione. Il numero molto basso di primers che hanno fornito esito positivo, rispetto a quello che si riscontra in altre specie di vertebrati (Valentini et al 1993), può essere dovuto sia ad una particolarità dell'Ordine, in accordo ad esempio con quanto riscontrato da Plotsky et al. (1995) nel pollo, sia al fatto che gli animali allevati, di cui era disponibile il sangue e su cui è stato effettuato lo screening, provenivano dalla stessa zona. Infatti come è possibile vedere nella figura 2. i due esemplari selvatici provenienti da zone diverse della stessa Regione (Trentino) presentano lo stesso profilo di amplificazione, mentre altri due soggetti selvatici, provenienti da altre zone hanno un profilo piuttosto differente. Questo dato suggerisce, se confermato con una maggiore numerosità di soggetti, che in Trentino il gallo forcello ha una bassa variabilità genetica in conseguenza forse di ripetuti accoppiamenti fra parenti. Una certa variabilità è comunque riscontrabile entro la popolazione (vedi figura n. 3, in cui è possibile notare anche la ripetibilità delle amplificazioni). Il band sharing medio nei soggetti allevati è risultato di 0. 76±0. 145 e 070±0. 17 in tutti i soggetti mentre gli animali provenienti dalle Alpi Occidentali (provincia di Cuneo e Alpi Marittime) avevano, nei confronti dei Trentini, un BSM rispettivamente di 0. 48±0. 07 e 035±0. 1 (vedi tabella n. 2).

La tecnica messa a punto è risultata in definitiva adeguata ad evidenziare i polimorfismi in modo ripetibile, anche a partire dalle minime quantità di DNA recuperabile dalle penne (nel nostro caso circa 1. 5 mg/g). La bassa quantità e qualità di DNA genomico induce però ad effettuare l'analisi considerando esclusivamente le bande ripetibili e di maggiore intensità, anche se in questo modo si riduce in modo molto drastico il numero di primers utilizzabili. Infatti il numero e l'evidenza delle bande minori sul gel dipendono da moltissimi fattori non tutti facilmente controllabili, i più significativi dei quali comprendono la concentrazione del DNA amplificato, la dinamica di denaturazione del DNA, il contenuto in G+C, l'efficienza della Taq polimerasi, il sistema di rilevazione dell'amplificato, l'eventuale formazione di strutture complesse da parte dei primers, la velocità di salita e discesa della temperatura nel cycler, senza tener conto che è probabile inoltre che accadano alcuni appaiamenti sbagliati tra primer e DNA genomico quando l'annealing viene condotto a bassa stringenza (Skroch e Nienhuis 1995, Valentini et al. 1996, William et al. 1990).

La metodica ha consentito di evidenziare nel gallo forcello alcuni polimorfismi in modo ripetibile, rendendo possibile un metodo per monitorare lo stato genetico delle popolazioni italiane di *Tetrao tetrix*. Il vantaggio più significativo rimane, comunque, la possibilità di applicare tale tecnica allo studio della variabilità genetica di quelle specie selvatiche particolarmente difficili da catturare, o nelle quali il prelievo del sangue non può essere effettuato. Il vantaggio di poter utilizzare le penne come fonte di DNA genomico, risiede proprio nella facilità con cui il campione può essere prelevato e conservato. Non è necessario infatti catturare l'animale, in quanto le penne possono essere raccolte direttamente nell'habitat naturale e non presentano problemi di conservazione, potendo essere inviate senza difficoltà anche a laboratori di altre nazioni.

Qualora fosse confermata la bassa variabilità genetica che sembra presentarsi nella popolazione, sarebbe auspicabile una introgressione di geni aumentando gli areali a disposizione o immettendo negli areali di nidificazione individui provenienti da altre popolazioni o allevati a tale scopo. Il metodo RAPD, eseguito utilizzando DNA genomico estratto da penne, grazie alla sua rapidità di esecuzione e al basso costo, sarebbe quindi utile per stabilire da quali popolazioni prelevare i riproduttori o quali soggetti allevati utilizzare.

Riassunto

MARCATORI MOLECOLARI RAPD PER LO STUDIO DELLE POPOLAZIONI DI GALLO FORCELLO *(TETRAO TETRIX* L.)

Poichè il gallo forcello (*Tetrao tetrix* L..) è in diminuzione in quasi tutte le aree alpine che sono il suo ultimo habitat italiano, è necessaria una migliore

conoscenza della genetica delle popolazioni delle Alpi italiane al fine di un possibile futuro utilizzo di animali allevati per il ripopolamento e/o la introduzione in areali dove la specie è estinta o in forte pericolo di estinzione. A tale scopo, sono stati testati ottantadue primers sul DNA genomico estratto sia dalle penne che dal sangue di undici galli forcelli. I sette primers che hanno permesso l'amplificazione di frammenti polimorfici ripetibili con entrambe le fonti di DNA utilizzate, hanno consentito solo una stima preliminare del polimorfismo genetico presente nella popolazione italiana.

Parole chiave: gallo forcello, RAPD, DNA

Summary

RAPD MOLECULAR MARKERS TO STUDY POPULATIONS OF BLACK GROUSE *(TETRAO TETRIX* L.)

Since black grouse (*Tetrao tetrix* L.) is declining in most of the Alps areas, where it has its own habitat, a better knowledge of the genetic characteristics of the wild Alpine populations and of the reared animals is necessary for a possible future introduction of animals in areas where the black grouse is disappeared or where is endangered.

For these reason DNA was extracted both from blood and from feathers of eleven black grouses and eighty-two 10-base primers were tested by PCR on the two DNA sources.

Seven primers showed a repeatable amplification profile between DNA sources and they were polymorphic within the population. The selected primers, used to amplify DNA extracted from wild black grouse feathers found in the different alpine areas, allowed only a preliminary estimation of the genetic polymorphism of the Italian population.

Keywords: black grouse, RAPD, DNA.

Ringraziamenti

Si ringrazia per la collaborazione: l'Ufficio di Lucca del Ministero delle Risorse Agricole Alimentari e Forestali, l'Unione Nazionale Cacciatori Zona Alpi, il dott. Ivano Artuso, il sig. Secondo Artuso, il sig. Ludwig Blaas, il sig. Antonino Cipriano, il sig. Carlo Cipriano, il sig. Paolo Cipriano, la dott. ssa. Andrée Couturier, il dott. Giuseppe De Franceschi, il sig. Paolo Mazzalai, il dott. Fabio Osti, il sig. Sergio Peirano, il sig. Emilio Rudari, il sig. Schenk ed il dott. Bruno Lauro Vigna.

Bibliografia

Aldrovandi U. (1603) Ornitologiae Tomus Alter Ad Illustrissimum Principem Alexandrum Peretium Sre. Card. Montaltum Vicecancellarum Bonobiae Legatum. Cum Indice Copiosissimo. Varium Linguorum Tomo secundo. Bononiae ApudJoan (c/o Biblioteca Nazionale).

Artuso A. (1994) Progetto Alpe: distribuzione sulle Alpi Italiana di Tetraonidi, della coturnice e della lepre bianca. Ed. FIDC-UNCZA Collana Tecnico Scientifica (Roma)

Bagliacca M., Marzoni M. e Calzolari G. (1993) Allevamento in cattività del Gallo Forcello. Riv. di Avicultura, 62 (12), 37-44.

Bardin M. G., Bandi C. e Damiani G. (1994) Stima della struttura genetica di alcune popolazioni bovine mediante l'analisi di campioni costituiti dall'unione di DNA individuali. Atti della 2ª Conf. Naz. su Stato dell'Arte delle Ricerche italiane nel settore delle Biotecnologie Applicate alle Scienze Veterinarie e Zootecniche, 243-249.

Cappuccio I., Valentini A. e Bagliacca M. (1994) Fonti alternative di DNA per evidenziare polimorfismi RAPD in specie di interesse zootecnico. Atti della 2ª conf. naz., Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche, 195-202.

Couturier M., Couturier A. (1980) Les Coqs de bruyere. Boulogne F. Dubusc Editeur.

De Franceschi P. (1978) Indagine sull'alimentazione del Fagiano di monte (Lyrurus tetrix, L.) nelle Alpi Carniche. Boll. Mus. civ. St. Nat. Verona 5, 15-72.

De Franceschi P. (1984) Tetraonidi: caccia e conservazione. Le fluttuazioni delle popolazioni di Tetraonidi in una zona delle Alpi Orientali. Unione Nazionale Cacciatori Zona Alpi.

Mirola G., Poggi U., Calzolari G. (1986) Il Parco Naturale dell'Orecchiella in Garfagnana. Manfrini Editori (Trento).

Montalenti G. (1979) Introduzione alla genetica. Utet, Torino.

Osti F. (1984) Indagine sull'alimentazione del Fagiano di monte (Lyrurus tetrix L.) nel Trentino occidentale (Aves: Tetraonidae). Studi Trent. Sci. Nat., Acta Biol. 61, 301-320.

Plotsky Y. et al.: Animal Genetics (1995) 26, 163-170.

Savi P. (1829) Ornitologia Toscana ossia Descrizione e Storia degli Uccelli che Trovansi in Toscana. Ed. Nistri (Pl) (c/o Biblioteca Universitaria Pisa).

Schembi A. (1813) Quadro geografico-ornitologico ossia quadro comparativo delle ornitologie di Malta, Sicilia, Roma, Toscana, Liguria Nizza e della provincia di Garda. Ed. Sassi BO (c/o Biblioteca Universitaria Pisa).

Schembi A. (1846) Vocabolario dei Sinonimi Classici dell'Ornitologia Europea. Ed. Sassi delle Spadere BO (c/o Biblioteca Universitaria Pisa).

Skroch P., Nienhuis J (1995). Theor. Appl. Genet. 91, 1086-1091.

Valentini A., Porceddu A. e Dadati E. (1993) IMPIEGO DI RAPD PER LO STUDIO DELLA VARIABILITÀ GENETICA IN BOVINI DI RAZZA FRISONA ITALIANA. Atti I° Conf. su: Stato dell'Arte delle Ricerche Italiane nel settore delle Biotecnologie applicate alle Scienze Veterinarie e Zootecniche, 157-161.

Valentini A., Timperio A. M., Cappuccio I, ZollaL (1996)RAPD INTERPRETATION REQUIRES A SENSITIVE METHOD FOR THE DETECTION OF AMPLIFIED DNA. Electrophoresis (in stampa)

Wetton J. H., Parkin D. T. and Carter R. E. (1992) THE USE OF GENETIC MARKERS FOR PARENTAGE ANALYSIS IN PASSER DOMESTICUS (HOUSE SPARROWS). Heredity 69, 243-254.

Williams J., Kubelik A., Livak K., Rafalski J. and Tingey S. (1990) DNA POLYMORPHISM AMPLIFIED BY ARBITRARY PRIMERS ARE USEFUL AS GENETIC MARKERS. Nucleic Acids Research Vol. 18, 6531-6535.

Tabella 1: Primers che hanno dato amplificazione: contenuto in guanina+citosina (G+C) e peso molecolare

	Primer	% GC	PM
OPV01	TGACGCATGG	60	3059
OPV07 *	GAAGCCAGCC	70	3013
OPW10	TCGCATCCCT	60	2930
OPW19	CAAAGCGCTC	60	2988
OPX01	CTGGGCACGA	70	3044
OPXO2*	TTCCGCCACC	70	2915
OPY05	GGCTGCGACA	70	3044
OPY11*	AGACGATGGG	60	3108
OPY15	AGTCGCCCTT	60	2970
OPY17	GACGTGGTGA	60	3099
OPZ01	TCTGTGCCAC	60	2970
OPZ09	CACCCCAGTC	70	2924
OPZ19	GTGCGAGCAA	60	3068
OPZ20	ACTTTGGCGG	60	3050

Nota: i 7 primers utilizzati per il pattern del fingerprinting sono indicati con un asterisco.

Tabella 2: Band sharing medio (BSM) rilevato tra le popolazioni di Gallo forcello prese in esame

Popolazioni di appartenenza degli esemplari testati	BSM
Trentino-allevamento dell'Orecchiella	0.76 ± 0.145
Cuneo-Trentino	0.48 ± 0.07
Alpi Marittime-Trentino	0.35 ± 0.1

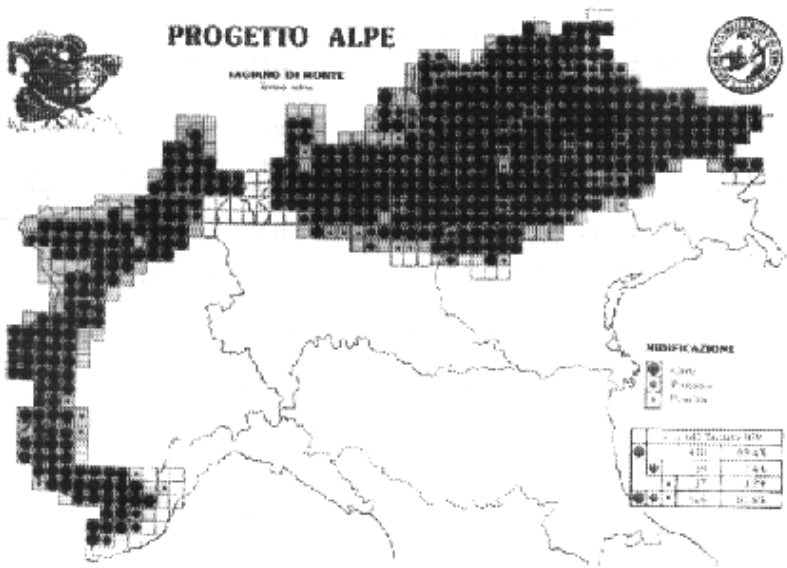


Figura n. 1
Area di Nidificazione del Fagiano di Monte sulle Alpi italiane: 1988-1992 (da Artuso 1994)