

Giorgio Bertorelle*

Il ruolo e i risultati delle analisi genetiche nella conservazione e nella gestione della testuggine di Hermann

La biologia della conservazione dispone da alcuni anni di uno strumento nuovo: la genetica molecolare. Attraverso la caratterizzazione genetica di un certo numero di individui della specie a cui si è interessati, è possibile acquisire una quantità di informazioni difficili, o impossibili, da ottenere con i metodi classici dell'ecologia e dello studio sul campo. Per esempio, dopo aver analizzato i dati genetici con tecniche statistiche appropriate, è possibile risolvere le ambiguità tassonomiche, identificare la struttura delle popolazioni, stimare i rischi dovuti a eccessiva consanguineità tra gli individui o alla presenza di eventi di ibridazione, o anche selezionare gli individui più adatti alle reintroduzioni o smascherare casi di detenzione o rilascio illegali. Tali indagini sono ormai possibili con costi e tempi relativamente contenuti, e nessun animale deve essere sacrificato poiché poche gocce di sangue, o anche campioni biologici come peli, feci, corna, o altro, sono sufficienti per tipizzare geneticamente un individuo. La genetica della conservazione, questa nuova disciplina che utilizza le tecniche della genetica molecolare e le analisi statistiche della genetica di popolazioni nella conservazione e nella gestione delle specie in pericolo, è in grande espansione in molti paesi, inclusa l'Italia.

In uno studio iniziato 6 anni fa a Ferrara da una collaborazione tra il Dipartimento di Biologia dell'Università e il Museo di Storia Naturale, a cui si sono poi aggiunti il centro Soptom per la conservazione dei Cheloni (Francia) e l'Università

di Salonicco (Grecia), sono stati tipizzati geneticamente 288 individui della testuggine di Hermann (*Testudo hermanni*). Gli animali erano stati campionati in 15 siti naturali o semi-naturali in Italia, Francia, Spagna, Croazia e Grecia (Fig. 1). Ulteriori 9 individui provenivano da un recinto allestito nel centro WWF all'interno del Parco dell'Appia Antica (Roma) con animali confiscati dalle autorità Cites in controlli alle dogane di diversi porti adriatici. Si tratta del primo studio a livello europeo sulla variabilità genetica in questa specie. Dei campioni italiani, un numero consistente di individui (45) provenivano dalla popolazione del Bosco della Mesola, all'interno del Parco Regionale del Delta del Po.

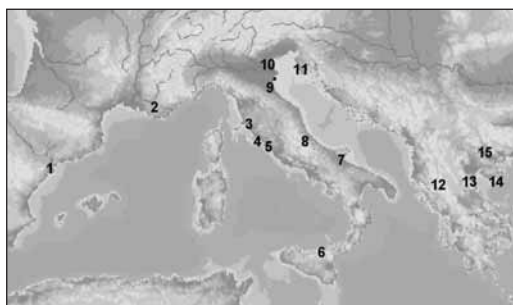


Figura 1. I siti campionati. 1: Delta dell'Ebro, Spagna; 2: Provenza, Francia; 3: Uccellina; 4: Macchia Grande; 5: Castelporziano; 6: Nebrodi; 7: Puglia; 8: Abruzzo; 9: Bosco Mesola; 10: Bosco Nordio; 11: Croazia; 12: Meteore; 13: Aliko; 14: Epanomi; 15: Kerkini.

* Dipartimento di Biologia ed Evoluzione, Università di Ferrara.



Figura 2. Il prelievo di sangue ad un individuo di *T. hermanni*.

Agli animali veniva prelevato da un veterinario un campione di pochi microlitri di sangue (Fig. 2), conservato in eparina fino all'arrivo in laboratorio. Qui, dopo aver estratto il DNA genomico, la tecnica della PCR (reazione a catena della polimerasi) veniva utilizzata per amplificare 400 paia di basi del DNA mitocondriale nella regione del gene che codifica per l'rRNA ribosomiale 12S (rRNA 12S) (Alvarez et al., 2000; Mirimin et al., 2004) e 10 marcatori microsatelliti nucleari (Forlani et al., 2005). Degli 11 loci analizzati, quindi, uno viene trasmesso di generazione in generazione solamente dalle femmine (quello sul DNA mitocondriale), e 10 sono invece a ereditarietà biparentale. Negli studi genetici sulle popolazioni, la ricostruzione della struttura e della demografia di una specie è più precisa quando si dispone di numerosi marcatori (loci), mentre il numero di individui per area geografica da analizzare può anche non essere grandissimo. Inoltre, la tipizzazione anche di marcatori trasmessi solo lungo la linea femminile permette di evidenziare eventuali differenze tra i sessi nei pattern di dispersione.

Il primo risultato interessante proviene dalla distribuzione geografica della variabilità genetica al gene mitocondriale. In questo tratto di DNA si riscontrano 27 diverse sequenze, suddivise chiaramente in 2 gruppi principali (chiamati *H* e *B*, e separati da almeno 3 mutazioni) con una netta localizzazione geografica (Fig. 3). Infatti, il 97.5 % degli animali provenienti da Spagna, Francia e Centro-Sud Italia possiedono sequenze del gruppo *H*, mentre il 96.0% degli animali campionati nell'Italia Nord-Occidentale, in Croazia e in Grecia hanno sequenze del gruppo *B*. La chiara suddivisione delle sequenze in due gruppi è interamente compatibile con la presenza di due sottospecie, una occidentale, *hermanni*, e

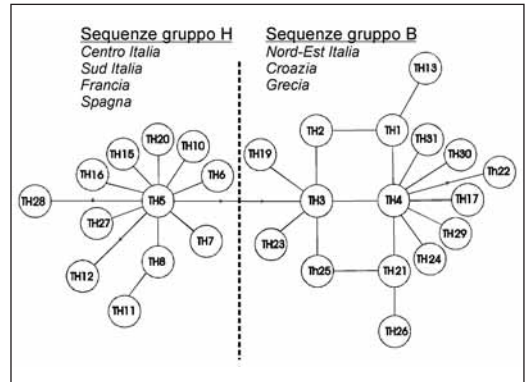


Figura 3. Rappresentazione a network delle diverse sequenze mitocondriali. I due gruppi principali, H e B, sono localizzati quasi esclusivamente nelle aree geografiche indicate, e corrispondono alle due sottospecie *T. h. hermanni* e *T. h. boettgeri*.

una orientale, *boettgeri*, identificate in passato su base morfologica. Il numero di mutazioni che separano i due gruppi genetici *H* e *B* non è sufficiente, se confrontato per esempio con la divergenza tra specie nei Testudinini (van der Kuyl et al., 2005), a identificare due specie diverse. Quindi, l'ipotesi sostenuta da qualche autore che esistano in realtà due specie distinte (Bour, 2004), non sembra avere supporto dal nostro studio, come anche suggerito recentemente studiando un altro gene mitocondriale (Fritz et al., 2006). I dati genetici indicano poi che la popolazione del Bosco della Mesola appartiene alla sottospecie orientale (44 individui su 45 hanno una sequenza di tipo *B*), e che la zona di sutura tra le sottospecie è quindi localizzata sul versante Adriatico dell'Italia, a sud di questa popolazione. In realtà, la presenza tra i 6 individui provenienti dal Bosco Nordio di 4 sequenze tipiche di *T. h. hermanni* potrebbe far pensare ad una localizzazione più settentrionale della zona di contatto tra le due sottospecie, ma analisi successive con i marcatori nucleari indicano invece che tali animali sono probabilmente il frutto di reintroduzioni effettuate dall'uomo. Infine, 8 dei 9 animali sequestrati da parte delle autorità Cites sono risultati appartenere al gruppo *B*, risultato compatibile con la loro probabile origine balcanica.

Lo studio dei 10 loci nucleari ci permette di ricostruire con maggior dettaglio la struttura genetica, ovvero le differenze genetiche tra popolazioni anche all'interno delle due sottospecie, e studiare anche i singoli individui per capire se è possibile utilizzare il loro genotipo per ricostruire la loro origine geografica e identificare eventuali individui ibridi. Queste informazioni sono

particolarmente rilevanti nei progetti di reintroduzione. La prima considerazione da fare riguarda i livelli di divergenza genetica tra le popolazioni analizzate. Anche all'interno delle due sottospecie, gli indici di distanza genetica tra popolazioni sono sempre elevati. Per esempio, il valore di F_{st} (che può assumere valori nell'intervallo tra 0 e 1, con i due estremi dell'intervallo che indicano divergenza nulla o massima, rispettivamente) è pari a 0.25, un valore generalmente considerato molto grande nell'analisi dei loci nucleari (Conner & Hartl, 2005). Questo risultato, compatibile con quanto ottenuto con le sequenze di DNA mitocondriale utilizzando lo stesso indice, suggerisce che la dispersione naturale, o le recenti immissioni operate dall'uomo, siano state ridotte (almeno nelle aree da noi analizzate), e che non solo le due sottospecie, ma anche diverse popolazioni in aree geografiche distinte, dovrebbero essere trattate in maniera indipendente da un punto di vista gestionale. Ulteriori informazioni si possono ottenere ricostruendo con un cladogramma le relazioni tra le diverse popolazioni (Fig. 4). Risulta ancora una volta evidente che esistono due gruppi principali, quello delle popolazioni occidentali e quello delle popolazioni orientali. Tra le prime, si nota soprattutto la somiglianza tra i siti del Centro-Italia, e la divergenza tra queste e francesi, spagnoli, e siciliani. Per quanto riguarda il gruppo orientale, tutte le popolazioni appaiono tra loro maggiormente differenziate di quanto osservato nel gruppo occidentale. L'analisi dei loci nucleari indica ancora che la popolazione italiana del Bosco Mesola si colloca nel gruppo orientale ma con un pool genico comunque ben distinto dal gruppo balcanico da noi tipizzato. Questo risultato è stato confermato utilizzando anche tecniche statistiche Bayesiane più sofisticate (non riportate qui) applicate ai genotipi dei singoli individui. La posizione di Bosco Mesola nell'albero filogenetico indica inoltre questa popolazione potrebbe essere veramente una popolazione di *T.h. boettgeri* "di confine" con il gruppo occidentale. Infine, la popolazione analizzata con solo 6 individui del Bosco Nordio ricade nel gruppo occidentale, ma l'analisi Bayesiana sui genotipi individuali indica una loro probabile origine alloctona o ibrida. Questa stessa analisi ci ha permesso anche di identificare, solo nelle popolazioni occidentali e solo in pochissimi individui, possibile eventi di ibridazione tra le due sottospecie.

Un ultimo importante aspetto evidenziato dalle indagini genetiche che vogliamo sottolineare riguarda i livelli di variabilità genetica os-

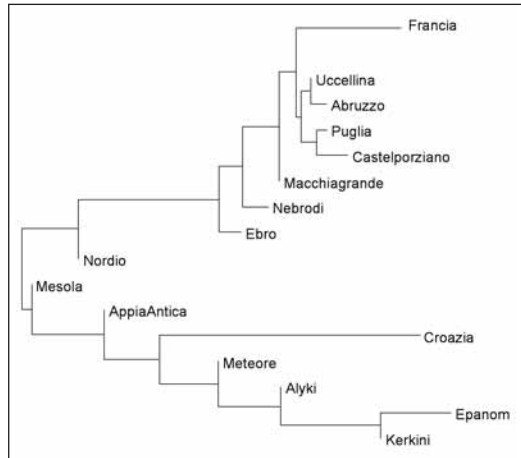


Figura 4. Rappresentazione ad albero (cladogramma) delle relazioni tra le diverse popolazioni campionate. L'albero è basato sulle distanze genetiche F_{st} linearizzate e calcolate a partire dai dati di 10 marcatori nucleari.

servati nei diversi siti campionati. Infatti, un ridotta variabilità genetica è spesso fonte di preoccupazione per la sopravvivenza di una specie o di una popolazione, sia a lungo termine (per il ridotto potenziale evolutivo in caso di cambiamenti ambientali), sia a breve termine (per la ridotta sopravvivenza associata ad alti livelli di consanguineità). Nel caso della testuggine, forse con l'esclusione della popolazione francese che appare la più minacciata, la variabilità genetica si attesta sui limiti inferiori per le specie non in pericolo (Frankham et al., 2002), ma non raggiunge mai valori estremamente bassi. L'eterozigotità ai loci nucleari, per esempio, non scende mai al di sotto del 40% nelle singole popolazioni analizzate separatamente (Francia: 29%), e raggiunge valori intorno al 50% nelle due sottospecie. Un'ulteriore evidenza rassicurante sembra essere anche il fatto che le popolazioni italiane, localizzate in aree dove le attività umane e il degrado ambientale sono stati intensi, hanno valori di diversità genetica simili o solo leggermente inferiori a quelli osservati per esempio in popolazioni greche che hanno subito un disturbo ambientale sicuramente inferiore.

In conclusione, le analisi genetiche finora condotte sulla testuggine di Hermann hanno fornito importanti informazioni sullo status tassonomico, sulla struttura di popolazione, e sulla composizione genetica dei singoli individui. Da un punto di vista gestionale, si può affermare che la specie, da un punto di vista genetico, non appare in una situazione di minaccia imminente,

e si può quindi pensare di utilizzare individui mantenuti in cattività, ma anche provenienti da popolazioni naturali, per avviare programmi di reintroduzione in aree ecologicamente adatte dove la specie è però attualmente estinta. La forte divergenza tra le sottospecie e gran parte delle popolazioni, e la presenza di individui ibridi, suggerisce però che la probabilità di successo delle re-immissioni aumenterebbe di molto se la scelta degli animali da rilasciare fosse fatta dopo aver analizzato il loro genotipo.

Bibliografia

- Alvarez Y, Mateo JA, Andreu AC, Diaz-Paniagua C, Diez A, and Bautista JM. 2000 - Mitochondrial DNA haplotyping of *Testudo graeca* on both continental sides of the straits of Gibraltar. *Journal of Heredity* 91: 39-41.
- Bour R. 2004 - *Testudo boettgeri* Mojsisovics, 1889. *Mammouria* 7: 9-10.
- Conner JK, and Hartl DL. 2005 - *Elementi di genetica ecologica*. Piccin, Padova.
- Forlani A, Crestanello B, Mantovani S, Livoreil B, Zane L, Bertorelle G, and Congiu L. 2005 - Identification and characterization of microsatellite markers in Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*, Testudinidae). *Molecular Ecology Notes* 5: 228-230.
- Frankham R, Ballou JD, and Briscoe DA. 2002 - *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fritz U, Auer M, Bertolero A, Heylan A, Fattizzo T, Hundsdorfer AK, Sampayo MM, Pretus JL, Siroky P, and Wink M. 2006 - A rangewide phylogeography of Hermann's tortoise, *Testudo hermanni* (Reptilia : Testudines: Testudinidae): implications for taxonomy. *Zoologica Scripta* 35: 531-543.
- Mirimin L, Vernesi C, Bertolucci C, Mazzotti S, and Bertorelle G. 2004 - Mitochondrial DNA variation and divergence in three Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*) populations. *Italian Journal of Zoology, Supplement* 2: 199-201.
- van der Kuyl AC, Ph Ballasina DL, Dekker JT, Maas J, Willemsen RE, and Goudsmit J. 2002 - Phylogenetic relationships among the species of the genus *Testudo* (Testudines: Testudinidae) inferred from mitochondrial 12S rRNA gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 22: 174-83.