



Università Politecnica
delle Marche
A. A. 2018/19

L'Orso bruno marsicano: approccio genomico per la conservazione della specie nativa italiana

(Da: Andrea Benazzo, Emiliano Trucchi, James A. Cahill et al. (2017):
Survival and divergence in a small group: The extraordinary genomic
history of the endangered Apennine brown bear stragglers. Epub
10.1073/pnas.1707279114)

Candidato: Fagiani Federico
Relatore: Dott. Barrucca Marco

Corso di Laurea in Scienze Biologiche



RIASSUNTO

Negli Appennini centrali italiani è presente una piccola popolazione di circa 50 esemplari di Orso bruno marsicano (*Ursus arctos marsicanus*) che vive in completo isolamento.

Questa particolare situazione consente di studiare le conseguenze a livello genomico della sopravvivenza all'interno di un piccolo numero di individui. Gli effetti riscontrati sono la perdita completa di variabilità nel mtDNA e lungo tratti di DNA nucleare.

La deriva genetica casuale ha contribuito a fissare mutazioni deleterie, causando vari disturbi a livello anatomico-funzionale quali: mancanza di energia, debolezza muscolare, anomalie nello sviluppo del cranio e dello scheletro, ridotta aggressività.

Tuttavia il genoma dell'Orso bruno marsicano mostra anche tratti caratterizzati da un'alta variabilità, probabilmente mantenuti da una selezione bilanciante. Queste regioni riguardano il sistema immunitario e l'apparato olfattivo.

L'ORSO APPENNINICO

L'orso appenninico è rappresentato da una piccola popolazione protetta dal 1923 dal Parco Nazionale di Abruzzo, Lazio e Molise (PNALM), priva di ogni connessione con le popolazioni affini europee. L'isolamento è stato causato inoltre dalla persecuzione e dall'espansione territoriale dell'uomo.

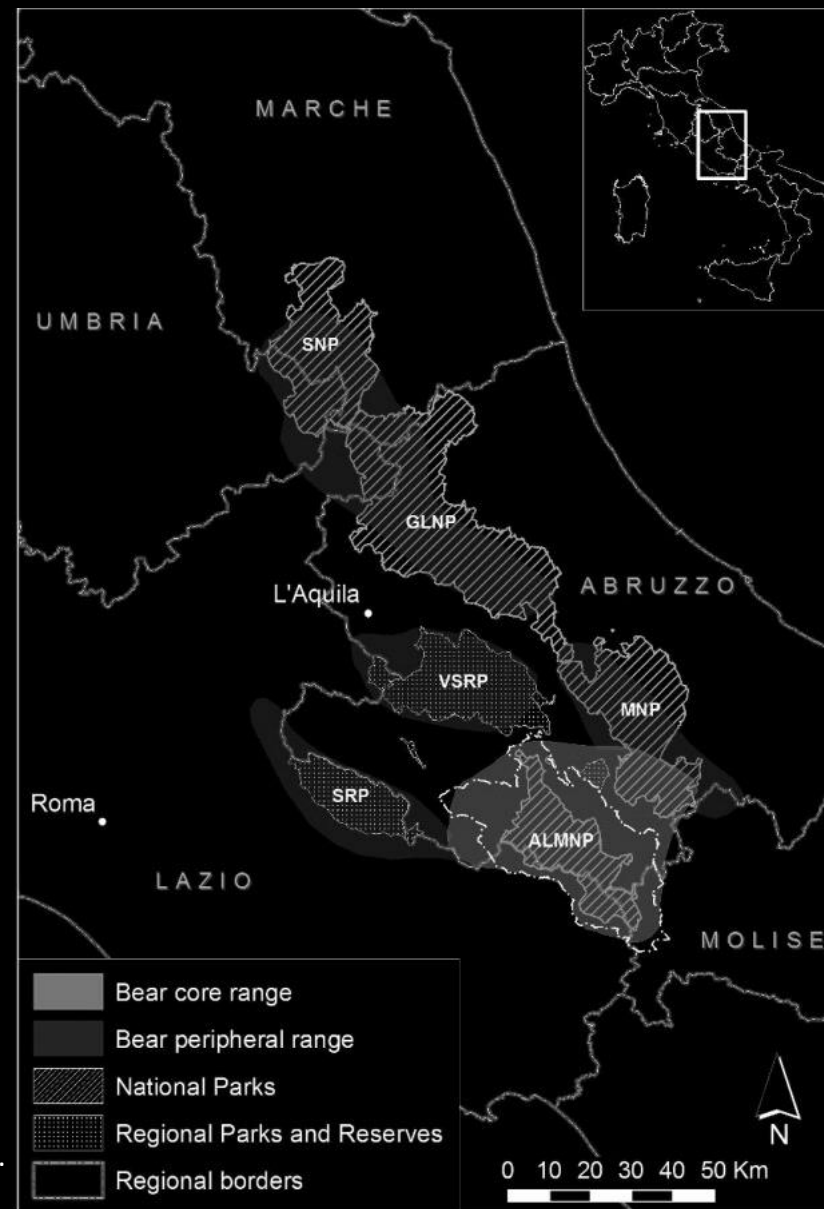
Vivere in completo isolamento e in numero così piccolo può portare facilmente all'estinzione data da:

Depressione da
inbreeding

Deriva genetica
casuale

Ridotta variabilità
genetica per
evoluzione
adattativa

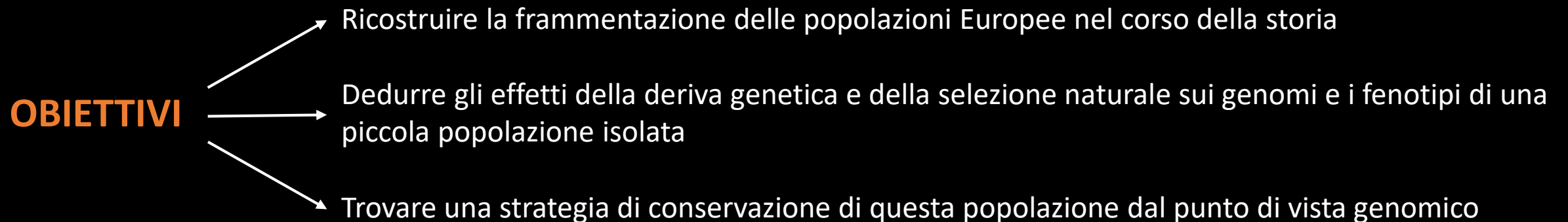
(Ciucci P., Boitani L.
(2008): The Appenine
brown bear: A critical
review of its status and
conservation problems.
Ursus 19:130-145)



La sopravvivenza ed eventualmente un'espansione demografica possono però avvenire anche in popolazioni di pochi individui caratterizzati da bassa variabilità genetica, la quale può essere prodotta dalla selezione bilanciante e dalla deriva genetica casuale a livello:

- Genotipico
- Fenotipico (speciazione)

Per mezzo di questo unico esperimento naturale è possibile valutare la straordinaria storia genomica degli ultimi esemplari dell'Orso bruno marsicano.



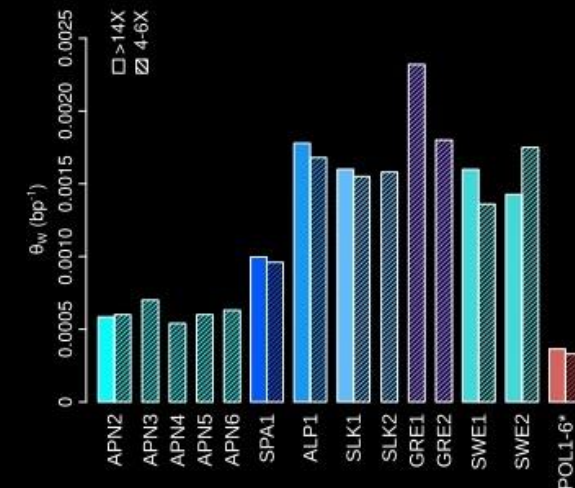
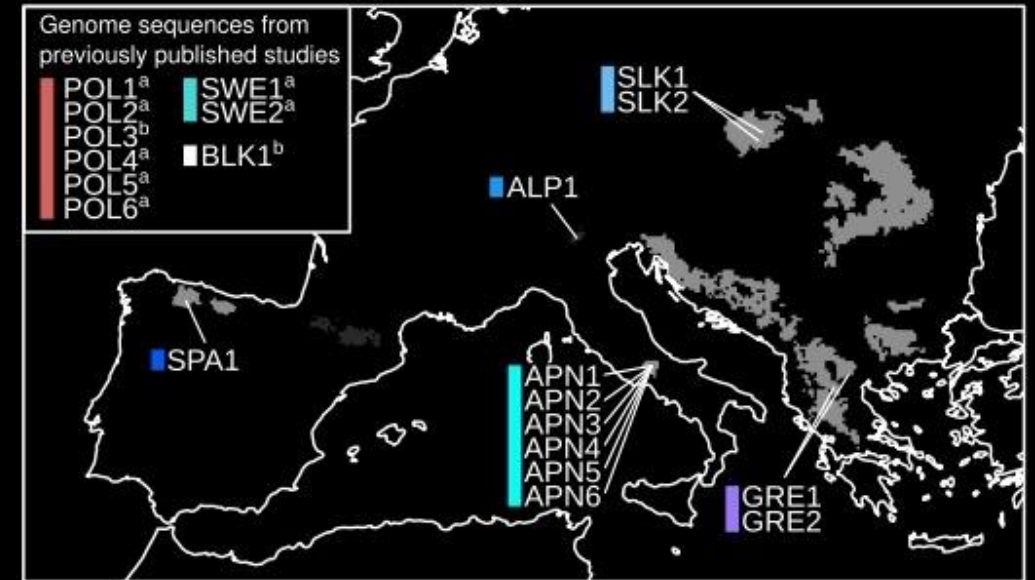
RISULTATI

Analisi attraverso sequenziamento paired-end Illumina di 6 genomi di orsi appenninici e 6 europei (2 dalla Grecia, 2 dalla Slovacchia, 1 dalle Alpi e 1 dalla Spagna).

↓
Comparati con gli interi genomi di 2 esemplari di Orso bruno dalla Svezia, 6 Orsi polari e 1 Orso nero

↓
1 individuo dagli Appennini, 1 dalle Alpi, 1 dalla Slovacchia e 1 dalla Spagna sequenziati a una profondità media di copertura di 15x contro il 5x degli altri individui

↓
Tutti gli orsi Appenninici, a livello nucleare, presentano rispettivamente 2/3 e 1/3 di siti eterozigoti in confronto all'orso della Spagna e agli altri orsi bruni. In compenso, presentano il doppio di siti eterozigoti rispetto all'Orso polare.



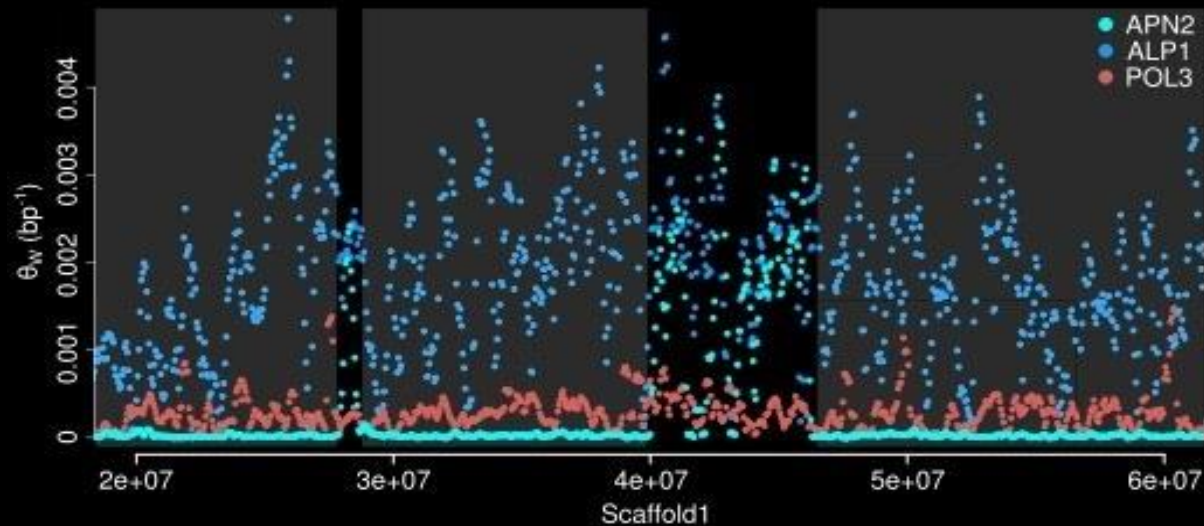
INBREEDING

Gli orsi appenninici mostrano ampi pattern di omozigosi lungo il genoma nucleare (da 1 a 50 Mb) alternati a zone con un livello di variabilità simile agli altri orsi (nel grafico Alpino e Polare), ma di una grandezza di massimo 50 kb.

Questa distribuzione di variabilità genetica è presente soltanto nell'orso Appenninico e suggerisce un recente inbreeding.

Effettivamente il coefficiente di inbreeding stimato (F), che mostra le zone del genoma con poca eterozigosità, varia nell'orso Appenninico da 0.69 a 0.77, mentre nelle altre specie è inferiore a 0.29 (tranne lo spagnolo con 0.57).

Le zone di eterozigosità dell'Orso bruno marsicano fanno dedurre comunque una storia caratterizzata da un numero molto maggiore di individui all'interno della popolazione.



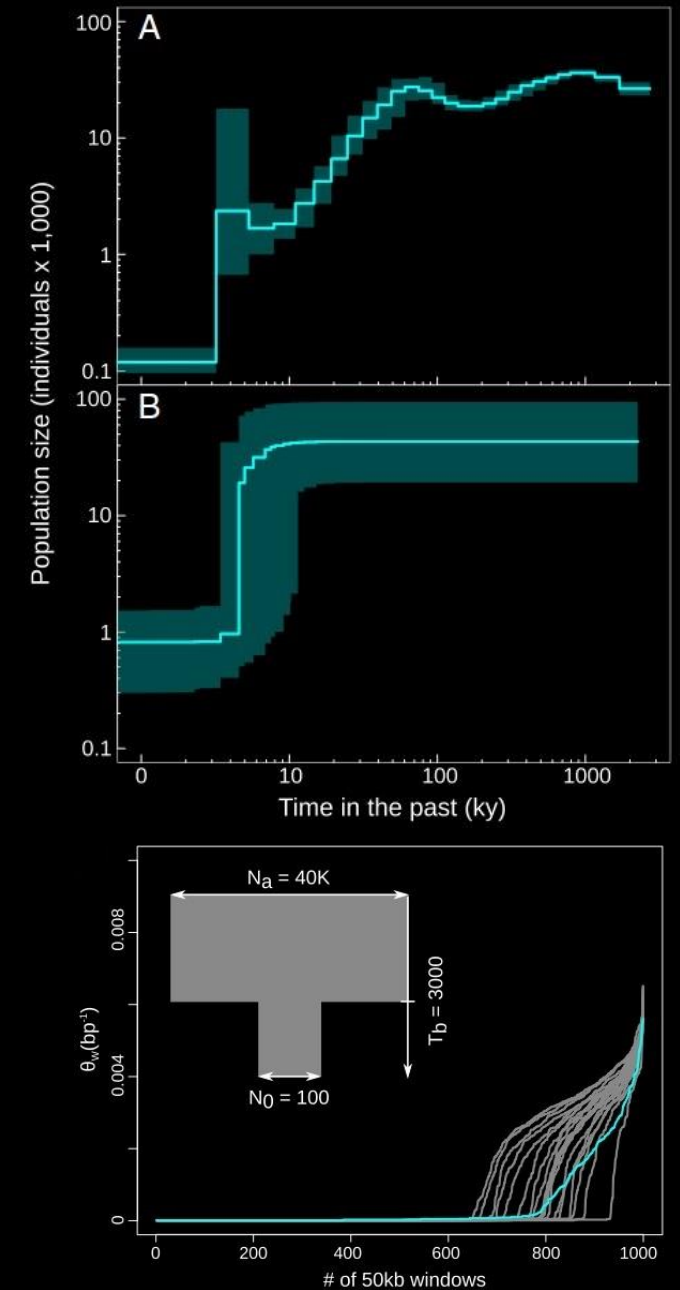
DINAMICA DEMOGRAFICA

Metodo PSMC per ricostruire la variazione della dimensione della popolazione passata attraverso il tempo. Popolazione di circa 20,000-40,000 individui va incontro ad un drastico declino circa 100 mila anni fa, a causa della glaciazione. Circa 10-15 mila anni fa, riscaldamento dell'Olocene, si osservano due situazioni (GRAFICO A):

- “Pattern continentale” = il declino demografico si ferma e il numero della popolazione resta costante intorno ai 2000-3000 individui
- “Pattern peninsulare” = espansione transitoria seguita da un declino finale a un piccolo numero di individui (Spagna e Appennini)

Metodo ABC mostra un drastico declino intorno ad 8000 anni fa (GRAFICO B), e modelli di simulazione coalescente simulano diversi effetti “collo di bottiglia”, mostrando, oltre alla diminuzione della popolazione, anche l'accumulo di regioni di omozigosi.

Tutto ciò è la prova di un processo di frammentazione di una precedente popolazione connessa nel continente pan-Europeo.



STORIA DELLA DIVERGENZA E FRAMMENTAZIONE

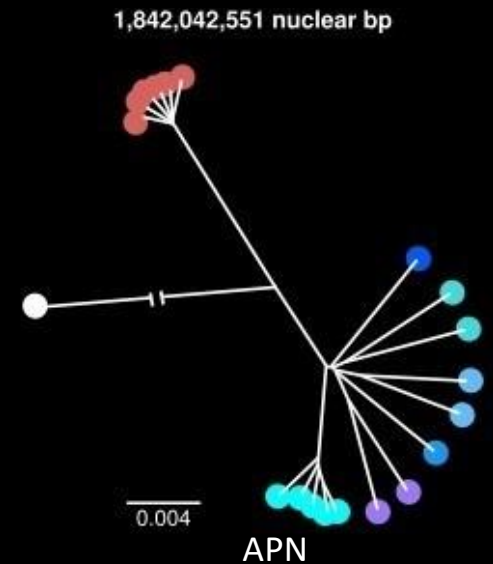
Viene creato un albero filogenetico “neighbor-joining” utilizzando la sequenza dell’intero genoma nucleare, che mostra una quasi iniziale separazione degli orsi bruni di diverse aree geografiche. Tuttavia gli esemplari appenninici mostrano una forte correlazione tra loro rispetto agli esemplari delle altre aree.

Utilizzando il metodo ABC citato in precedenza, si è costruito un complesso modello di metapopolazione che connette tutte le popolazioni di orsi bruni europei:

1. Larga popolazione ancestrale (circa 100 mila anni fa)
2. Migrazione verso il sud-Europa dopo il riscaldamento dell’Olocene, frammentazione delle popolazioni a livello numerico ma non di connettività
3. Successiva frammentazione dell’habitat data dall’introduzione di tecnologie agrarie da parte dell’uomo



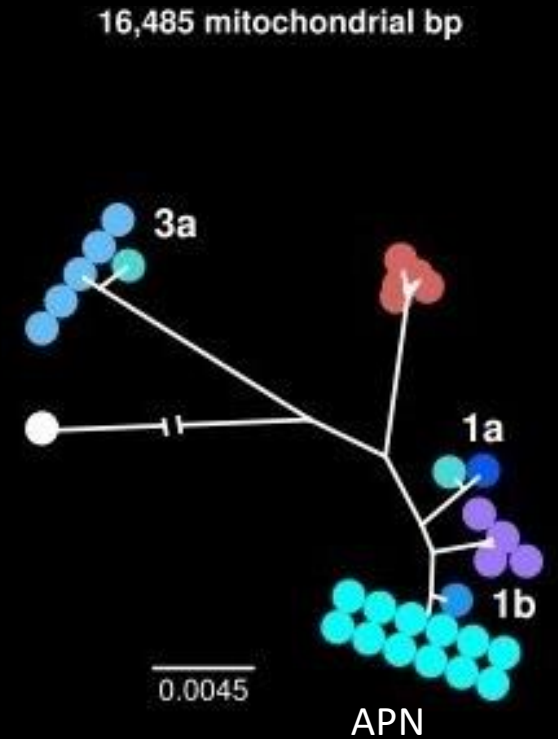
Aumento dell’isolamento e taglio della connettività tra le varie popolazioni, inclusa quella dell’Orso bruno marsicano (stimato intorno a 2000-300 anni fa secondo l’approccio statistico F).



mtDNA:

Si costruisce un albero “neighbor-joining” prendendo in considerazione il genoma mitocondriale e vengono messe in evidenza le differenze tra i genomi appenninici e quelli delle Alpi, della Grecia, della Spagna e della Slovacchia. Si possono identificare 3 cluster in base ai rifugi glaciali e alle migrazioni post-glaciali:

- 1 a = Spagna e Svezia del Sud
- 1 b = Italia, Balcani e Carpazi del sud
- 3 a = nord-est Europa

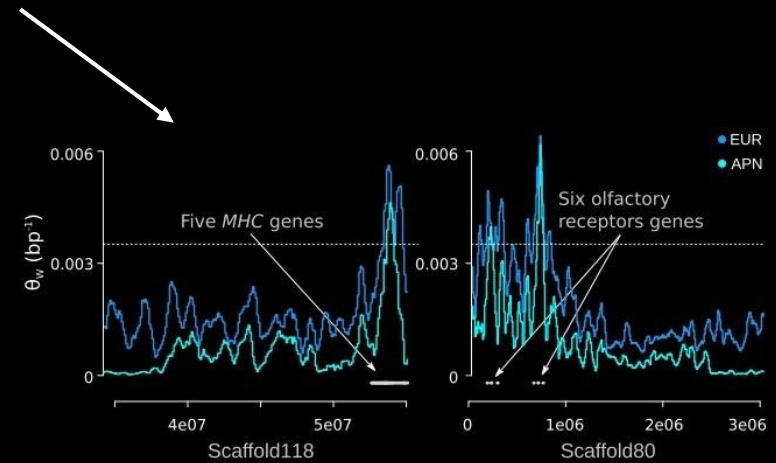
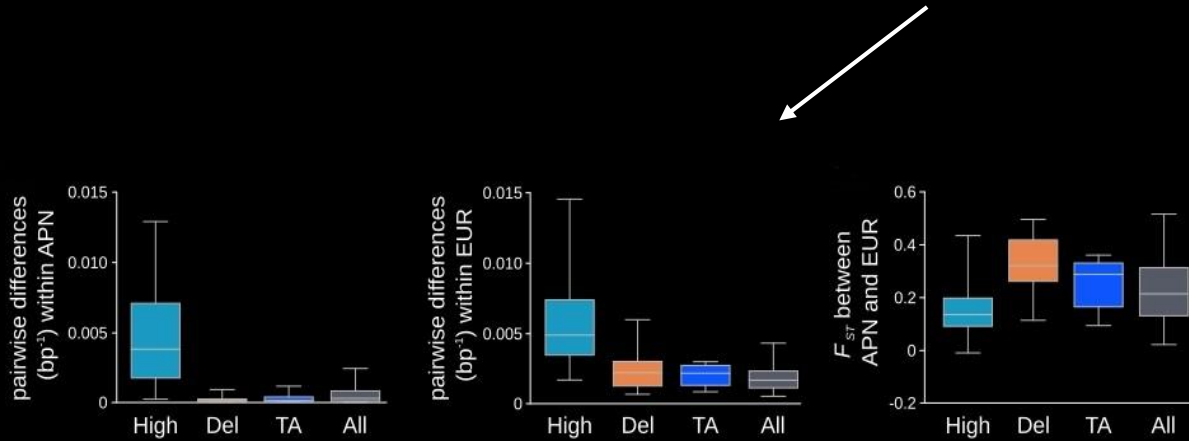


Si deduce una forte barriera genetica in Svezia e un’alta affinità tra gli orsi Appenninici e Alpini.

Le differenze riscontrate tra i genomi nucleari e mitocondriali (sequenze identiche) suggeriscono inoltre che le popolazioni erano precedentemente omogeneizzate da parte dei maschi, mentre la filopatria femminile era riscontrabile nella struttura del mtDNA. Ciò spiega la visione secondo cui la frammentazione dell’habitat sia il fattore capace di incrementare la filopatria femminile.

ADATTAMENTO E MALADATTAMENTO

Vengono evidenziati due processi evolutivi con conseguenze opposte



Fissazione di vari alleli deleteri a causa della deriva:

Il genoma dell'Orso bruno marsicano presenta maggiore variazione in siti non sinonimi.

Mutazioni non sinonime fissate sono deleterie, causando vari disturbi morfo/funzionali tra cui: dimensioni corporee più piccole, disturbi cardiaci, muscolo-scheletrici e relativi all'alimentazione. Inoltre vengono fissati anche geni correlati al TA (tame/aggressive) behavior che rendono questa specie molto più mite rispetto alle specie affini.

Mantenimento di variabilità in specifiche famiglie di geni:

Le regioni più variabili corrispondono a quelle con minor perdita di variabilità negli orsi non appenninici.

Corrispondo inoltre a loci codificanti che includono 6 geni del sistema immunitario, 39 geni del sistema olfattivo e 2 geni legati alla digestione di carboidrati. Presenti in parecchie copie e controllati dalla selezione bilanciante. Questo rappresenta il meccanismo attraverso cui l'Orso bruno marsicano riesce ad affrontare le sfide dell'ambiente.

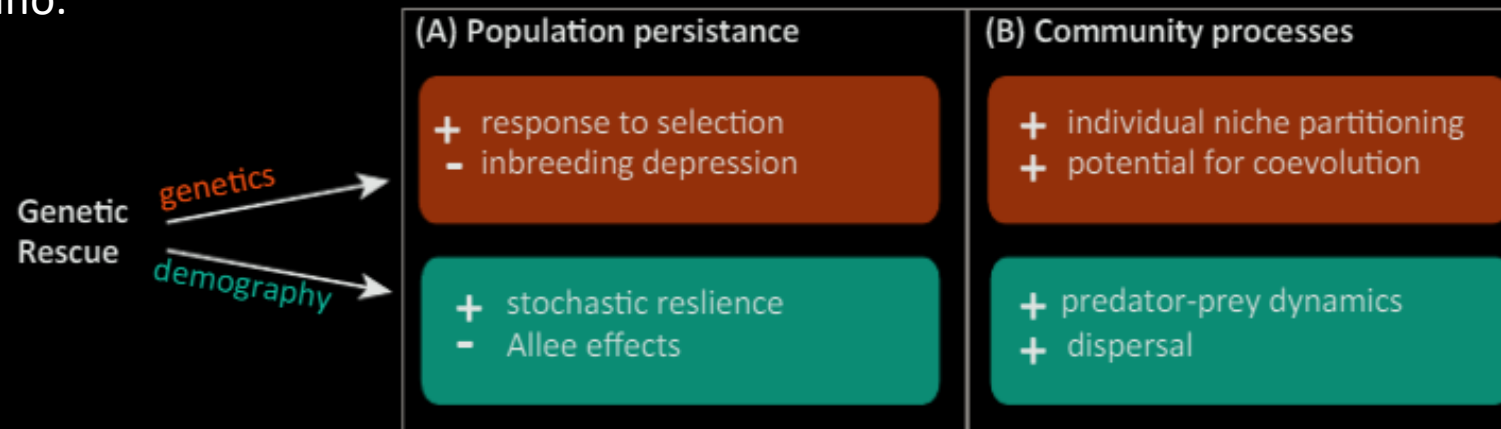
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

La sopravvivenza dell'orso appenninico è quindi garantita dalla variabilità di geni cruciali per la difesa da patogeni e la percezione chimica, l'assenza di competizione all'interno dell'habitat e il cambio di dieta da onnivora a vegetariana. A livello genomico la componente comportamentale viene mutata producendo un temperamento meno aggressivo così da non scontrarsi con l'uomo.

Per evitare l'estinzione si può considerare l'introduzione di esemplari alloctoni (Alpi o Slovenia), con due diverse conseguenze:

1. Riduzione dell'inbreeding e aumento dell'eterozigotità
2. Possibile rischio di introduzione di geni aggressivi con eventuale alterazione dell'equilibrio attuale

La soluzione migliore è quindi quella di prendere in considerazione l'opzione di reintroduzione solo in caso di depressione da inbreeding, cercando ora di adottare altre strategie per la conservazione della specie nativa italiana di Orso bruno marsicano.



(Whiteley AR, Fitzpatrick SW, Funk WC, Tallmon DA (2015): Genetic rescue to the rescue. Trends Ecol Evol 30:42-49)

A brown bear cub is lying on its back in a grassy field. The cub is looking directly at the camera with a calm expression. Its front paws are raised near its face, and its hind legs are also visible, resting on the ground. The background is a dense field of green grass. The text "GRAZIE PER L'ATTENZIONE!" is overlaid in white, bold, sans-serif font across the center of the image.

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

REFERENZE

- Andrea Benazzo, Emiliano Trucchi, James A. Cahill et al. (2017): Survival and divergence in a small group: The extraordinary genomic history of the endangered Apennine brown bear stragglers. Epub 10.1073/pnas.1707279114.
- Ciucci P., Boitani L. (2008): The Apennine brown bear: A critical review of its status and conservation problems. *Ursus* 19:130-145.
- Whiteley AR, Fitzpatrick SW, Funk WC, Tallmon DA (2015): Genetic rescue to te rescue. *Trends Ecol Evol* 30:42-49.
- Charlesworth D, Willis JH (2009): The genetics of inbreeding depression. *Nat Rev Genet* 10:783-796
- Burger R, Lynch M (1995): Evolution and extinction in a changing environment: A quantitative-genetic analysis. *Evolution* 49:151-163
- Prufer K, et al. (2014): The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai mountains. *Nature* 505:43-49
- Maisano Delser P, et al. (2016): Population genomics of *C. melanopterus* using target gene capture data: Demographic inferences and conservation perspectives. *Sci Rep* 6:33753

(Tutte le immagini sono prese dall'articolo citato nella pagina iniziale, ad eccezione di quelle in cui indicato)