

**Un esempio di tesi
sperimentale in Genetica
della Conservazione:
obbiettivi, lavoro in
laboratorio ed analisi
statistiche**

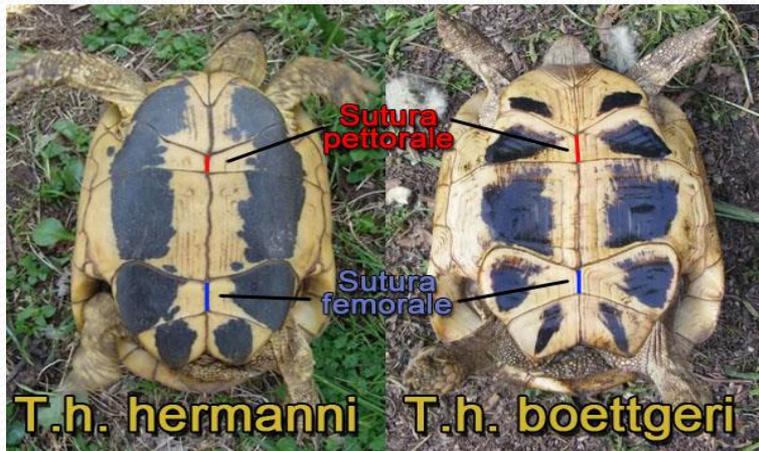
Caratterizzazione genetica ed assegnazione geografica di testuggini (*Testudo hermanni*) di origine ignota

- **Scopo:** caratterizzare geneticamente testuggini provenienti da sequestri per identificare animali potenzialmente adatti alla reintroduzione in ambiente naturale
- **Metodo:** utilizzare marcatori molecolari già descritti nelle popolazioni naturali per operare un confronto con animali di origine sconosciuta



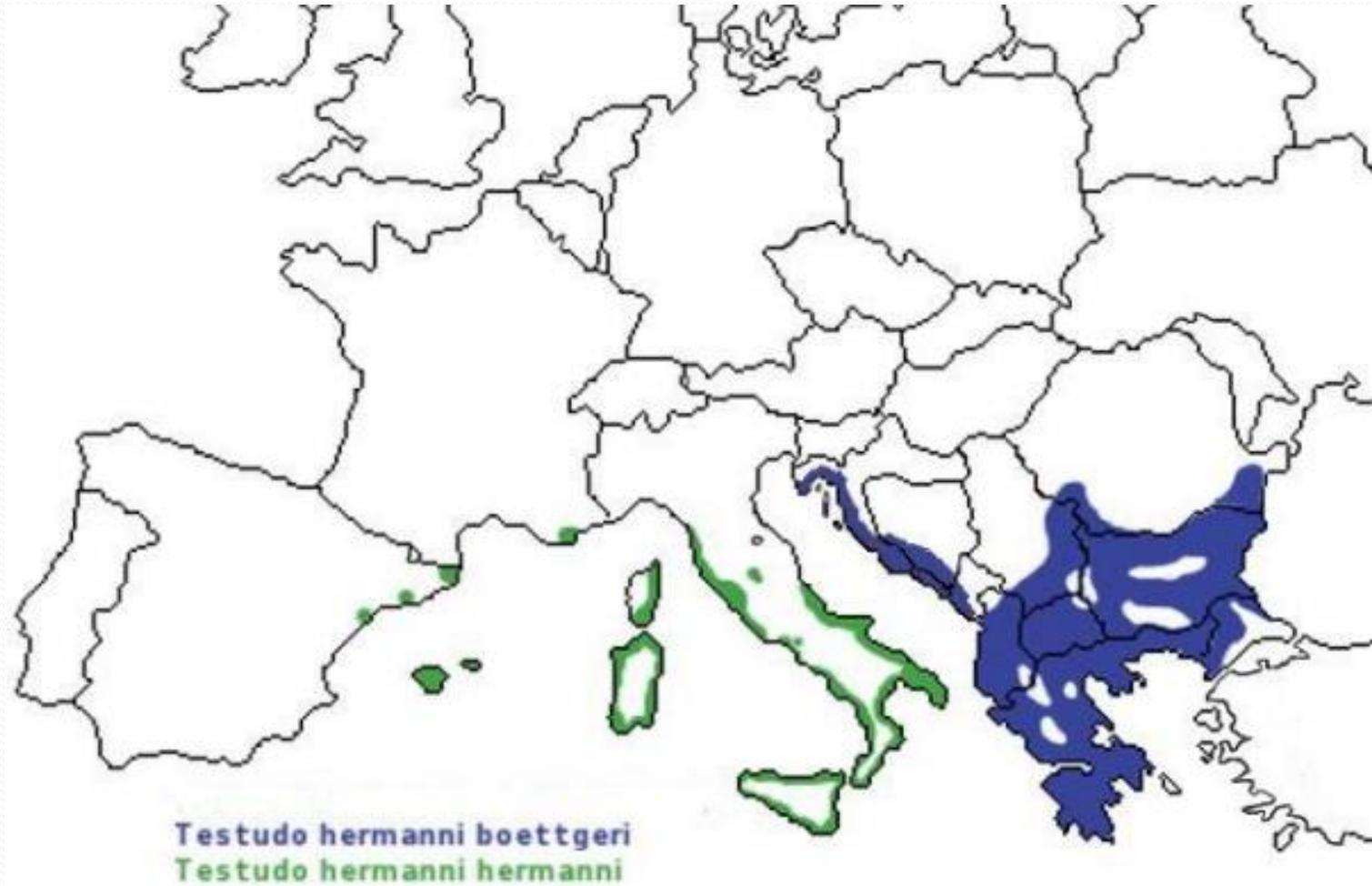
Introduzione alla specie

- *Testudo hermanni*
- Due sottospecie:
 - *Testudo hermanni hermanni*
 - *Testudo hermanni boettgeri*
- Distinzione morfologica spesso incerta



Dominio	Eukariota
Regno	Animalia
Phylum	Chordata
Classe	Reptilia
Ordine	Testudines
Sottordine	Cryptodira
Famiglia	Testudinidae
Genere	Testudo
Specie	<i>T. hermanni</i>

Areale di distribuzione



Habitat e caratteristiche ecologiche:

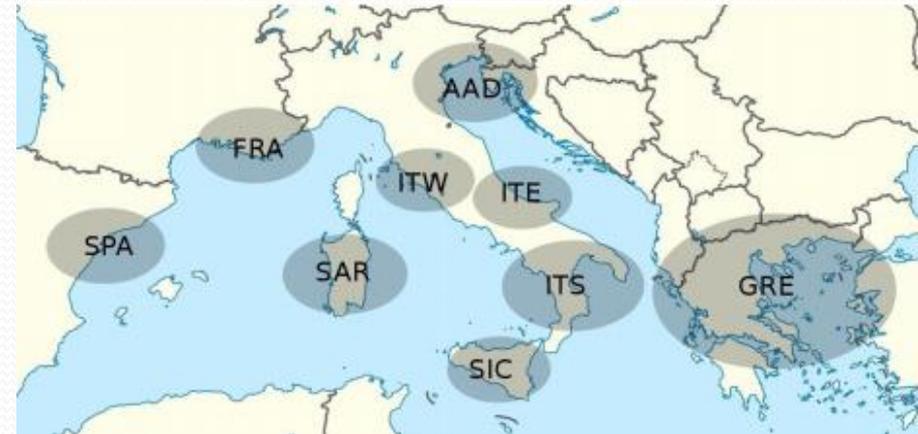
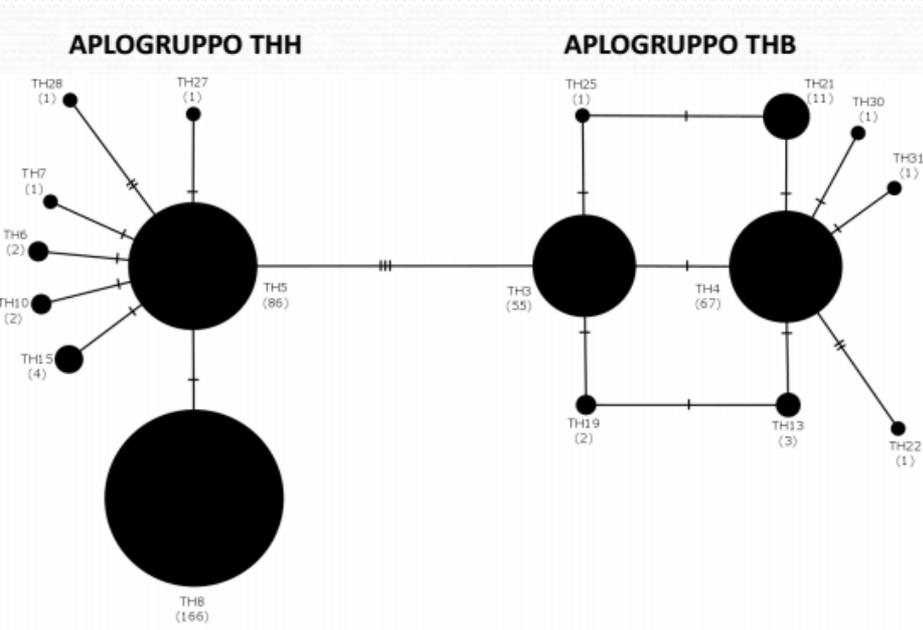
- Foreste (querce soprattutto) ma anche macchia mediterranea
- Dieta vegetariana: principalmente erbe; in misura inferiore frutti, bacche, funghi
- Animali ectotermi → ibernazione in inverno; possibile estivazione con temperature elevate
- Dimorfismo sessuale evidente
- Riproduzione da maggio a settembre, sesso dipendente dalla temperatura alla schiusa (♀ con temperature $\geq 31,5^{\circ}\text{C}$, ♂ con temperature $\leq 31,5^{\circ}\text{C}$)



Popolazioni diverse hanno caratteristiche genetiche diverse

✓ DNA mitocondriale (mtDNA):

✓ Loci microsatellite (STR):



Problemi principali: estinzioni, traslocazioni, sequestri

- Principali minacce in ambiente naturale:
 - Agricoltura intensiva
 - Incendi
 - Prelievi in natura per commercio

→ E' una specie protetta

- Migliaia di animali orientali introdotti illegalmente in Italia
- Sequestri a opera del Corpo Forestale dello Stato alla frontiera o possessori di animali non denunciati: molti recinti con animali di origine sconosciuta

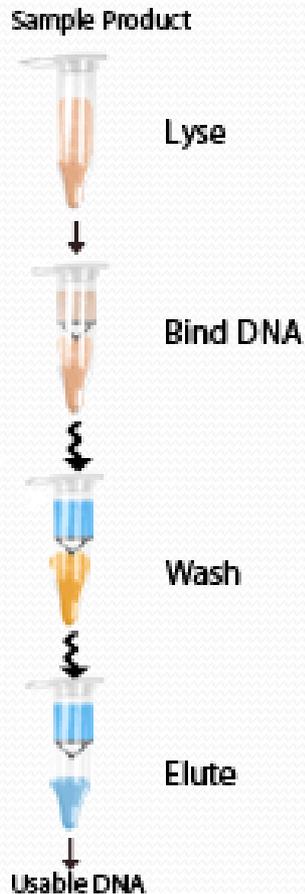
Raccolta dati: il lavoro sul campo

- Prelievo sangue (globuli rossi nucleati)

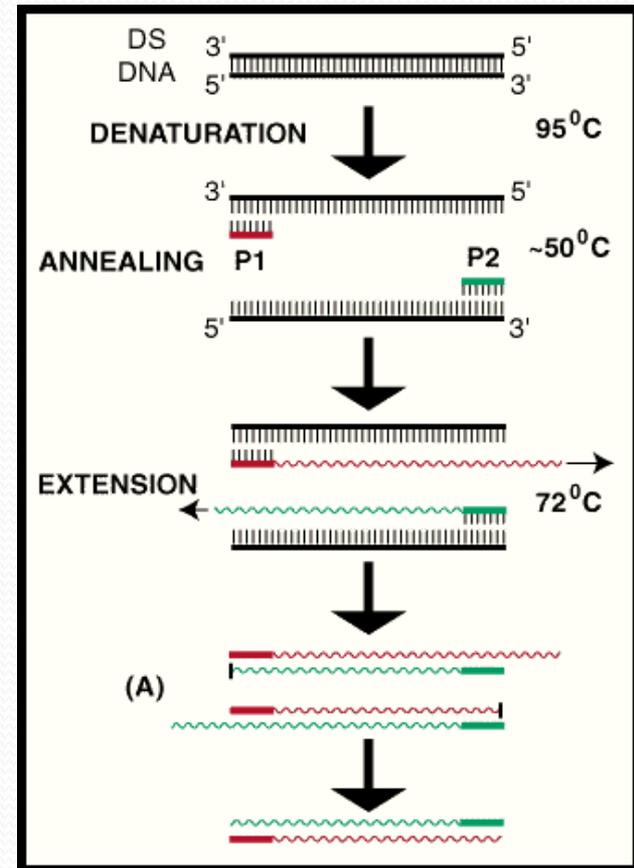


Il lavoro in laboratorio (mtDNA)

1. Estrazione DNA: separare il DNA dal resto delle macromolecole



2. Amplificazione tramite Reazione a Catena della Polimerasi (PCR): ottenere tante copie di una specifica sequenza



3. Purificazione prodotti da PCR: eliminare primers e deossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs) non incorporati in sequenze



Genotipizzazione: lettura delle sequenze nucleotidiche del DNA mitocondriale e identificazione genotipo nucleare ai loci microsatellite

mtDNA

STR



C:\Users\Giu94\Desktop\Cose mie\Tesi Testudo\Assignment\Testudo_input_8loci_348_reference.txt - Notepad++

File Modifica Cerca Visualizza Formato Linguaggio Configurazione Macro Esegui Plugin Finestra ?

Testudo_input_8loci_348_reference.txt

```
1 Title line:"FREQUENCY"
2 GAL136
3 TEST56
4 TEST71
5 TEST76
6 GAL75
7 TEST10
8 TEST88
9 GAL73
10 GAL263
11 Pop
12 AAD-Mesola_20, 069071 199203 128128 116116 071075 212212 191207 079079 089111
13 AAD-Mesola_29, 069071 199199 128128 116116 071071 214214 191209 079093 071071
14 AAD-Mesola_31, 069071 199203 126128 116116 071071 212214 191201 083093 071099
15 AAD-Mesola_49, 071071 199203 126126 116116 071071 214216 201207 079083 071071
16 AAD-Mesola_69, 069069 199203 126126 116116 069071 212212 209209 085099 071071
17 AAD-Mesola_70, 071071 199203 128128 116116 071071 214214 191209 079079 125125
18 AAD-Mesola_82, 071071 199199 126128 116116 071071 212212 209209 089093 089089
19 AAD-Mesola_96, 071071 199203 126128 116116 071071 214214 191209 093093 071071
20 AAD-Mesola_108, 069071 199203 128128 116116 075079 214214 209209 081093 071071
21 AAD-Mesola_109, 071071 199199 126128 116116 071071 186214 191209 081093 071071
22 AAD-Mesola_116, 069071 203203 128128 116116 069071 210212 191191 079085 071071
```

Allineamento multiplo di sequenze: verso la creazione del network degli aplotipi

The screenshot displays the BioEdit Sequence Alignment Editor window. The title bar reads "BioEdit Sequence Alignment Editor". The menu bar includes "File", "Edit", "Sequence", "Alignment", "View", "Accessory Application", "RNA", "World Wide Web", "Options", "Window", and "Help". The address bar shows the file path: "C:\Users\Giu94\Desktop\Cose mie\Tesi Testudo\Alignment\testudo_mesola_seq.fas". The status bar indicates "55 total sequences" and "shade threshold 100%". The main window shows a multiple sequence alignment of 55 sequences, labeled from XFUS_0096 to XFUS_0133. The alignment is displayed in a grid format with columns numbered 40 to 160. The sequences are color-coded by nucleotide: A (green), C (blue), G (red), and T (orange). The interface includes a menu bar, a toolbar, and a status bar. The Windows taskbar at the bottom shows the system clock as 22:35 on 28/11/2016.

Test statistici ai loci microsatellite

Test d'assegnazione di individui a potenziali popolazioni d'origine:

- No distribuzione nulla
- Punteggio di somiglianza di genotipo a popolazioni naturali: distanze geniche o *Likelihood* calcolata sulla base delle frequenze alleliche

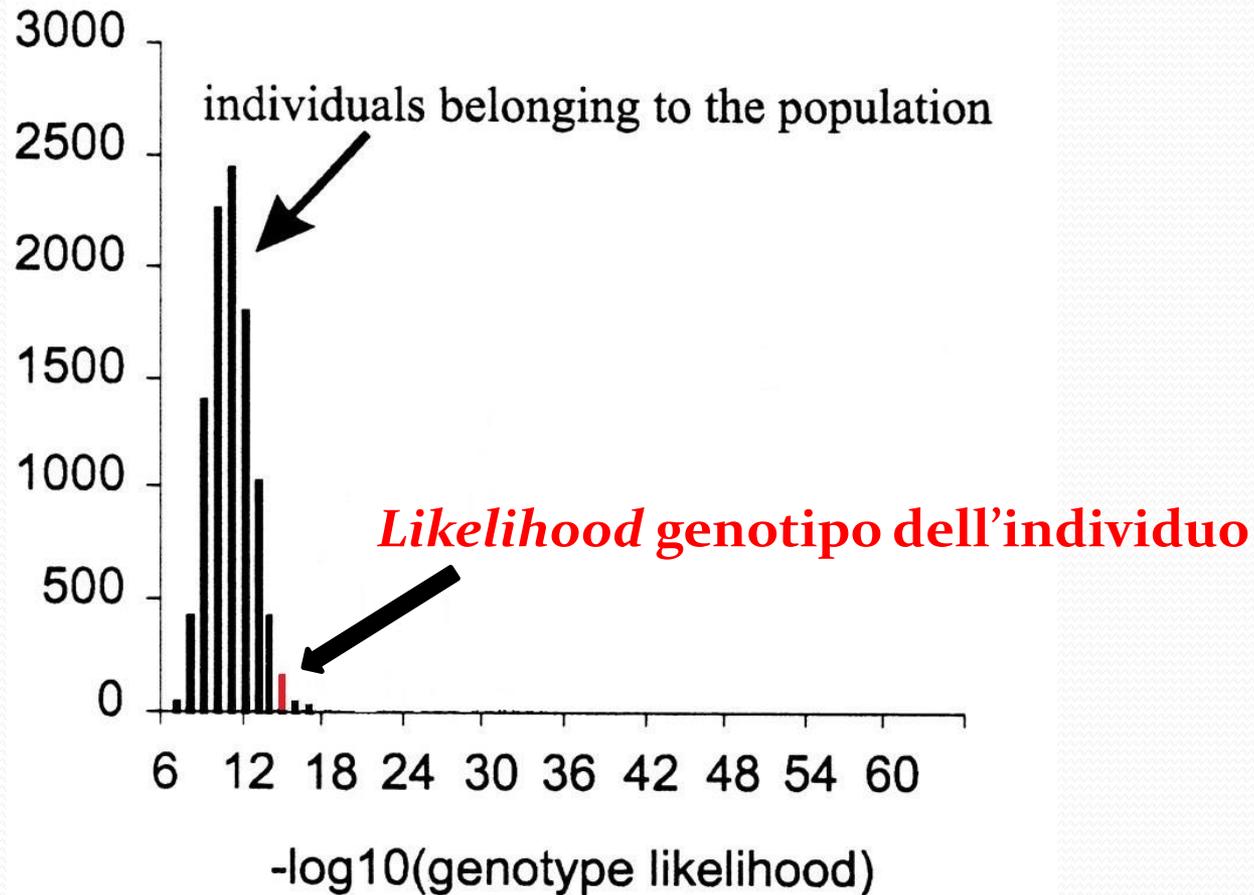
Es. con frequenze alleliche: ogni potenziale popolazione d'origine è descritta dalle sue frequenze alleliche per ogni locus. Si calcola il punteggio di probabilità (*Likelihood*) di un individuo di originare da ciascuna popolazione in base al suo genotipo presso gli stessi loci. Si assegna l'individuo alla popolazione con punteggio maggiore.

- Il punteggio può essere così espresso (varia tra 0 e 100): $score_{i,l} = \frac{L_{i,l}}{\sum_{j=1}^k L_{i,j}}$
- **Problema:** ci sarà sempre una popolazione che restituirà un punteggio più alto delle altre, anche senza essere la reale popolazione d'origine dell'individuo

Test d'esclusione: popolazioni di riferimento escluse come origine dell'individuo con certa significatività statistica (per esempio per $p < 0,05$):

Distribuzione nulla costruita tramite Monte Carlo Re-sampling:

1. Simulare popolazioni molto grandi (es. 10 000 individui ognuna)
2. Ogni individuo simulato porta un genotipo multilocus generato in base alle reali frequenze alleliche di ciascuna popolazione di riferimento
3. Creare distribuzione di probabilità del criterio scelto (es. *Likelihood* calcolata sulle frequenze alleliche)
4. Confrontare con tale distribuzione il valore del criterio ottenuto per l'individuo analizzato



Genotipo dell'individuo poco frequente nella popolazione simulata
→ bassa probabilità di essere generato da quella popolazione

Misura della probabilità: porzione della distribuzione con valori "peggiori" (più estremi)

→ significatività dell'assegnazione

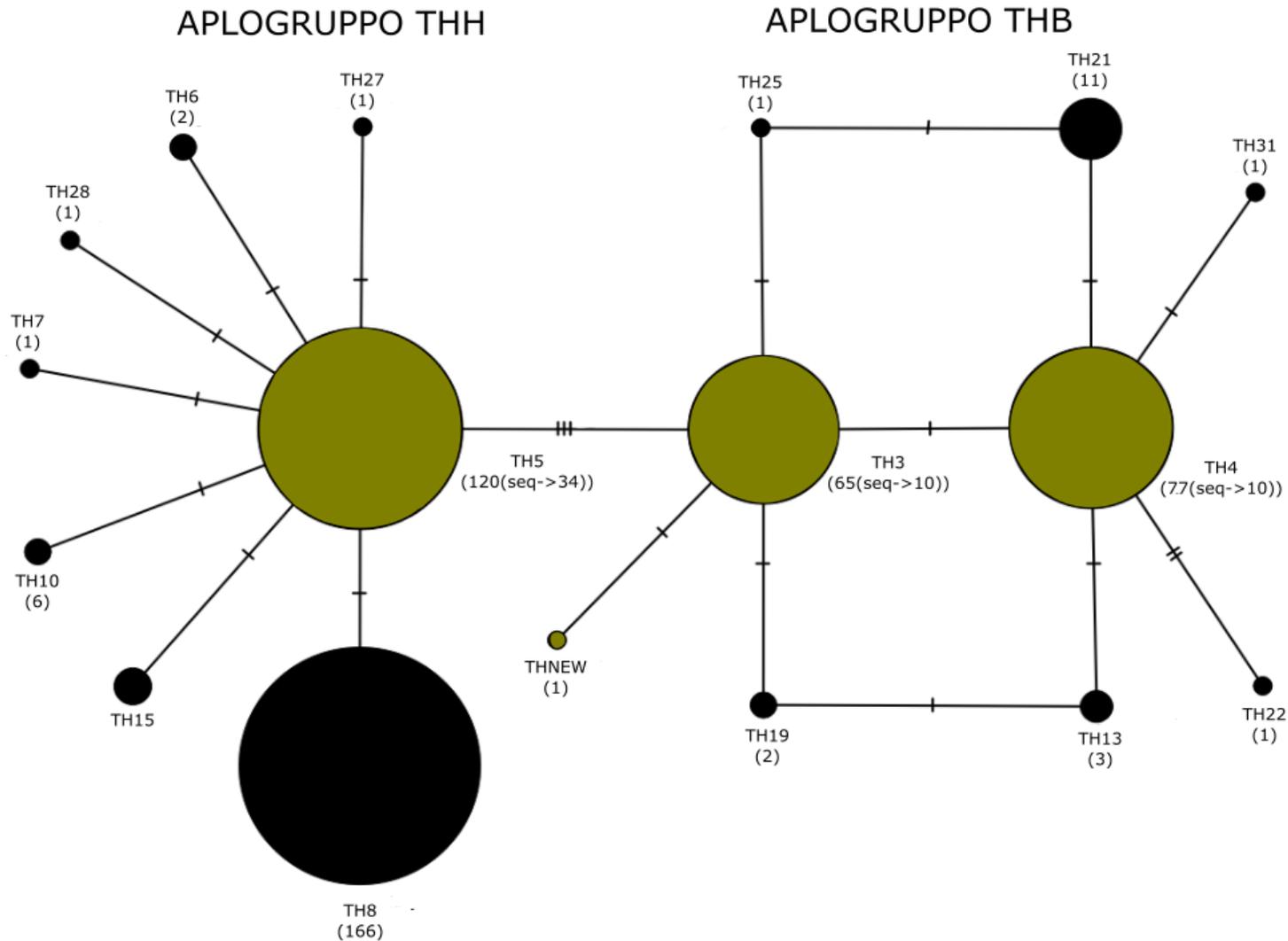
Il test d'esclusione risponde alla domanda:

quanto è probabile osservare il genotipo dell'animale di origine sconosciuta, o genotipi più estremi (meno probabili) in una certa popolazione?

Si deve stabilire una soglia di significatività: per esempio per $p < 0,05$ si ritiene poco probabile che quella popolazione abbia generato quell'individuo.

- Se tutte le popolazioni di riferimento sono escluse tranne una, si può assegnare l'individuo analizzato a quella popolazione

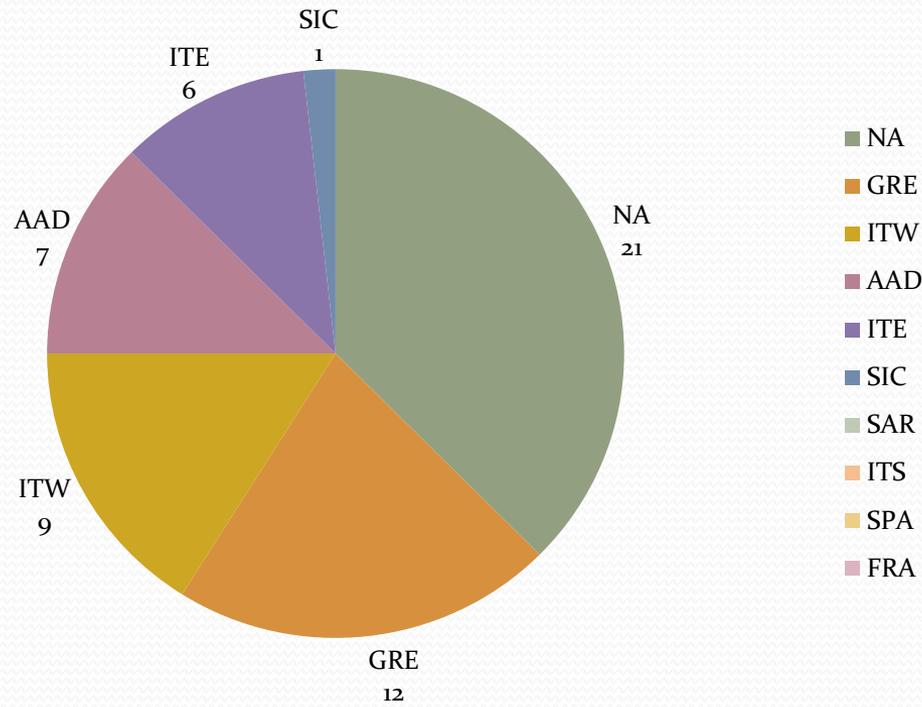
I risultati - mtDNA



I risultati - STR

- Loci microsatellite (test d'assegnazione)

**Risultato assegnazione di individui a
potenziali popolazioni d'origine
(soglia punteggio: 80%)**



Non Assegnati:

- Abbassare soglia punteggio
- Utilizzare altri marcatori

I risultati - STR

Punteggio di somiglianza	Probabilità d'esclusione	Interpretazione risultati
Alto (>80%)	Tutte le popolazioni escluse tranne una (solo una $p > 0,05$)	Individui di sicura attribuzione geografica
Alto (>80%)	Più popolazioni non escluse (molteplici $p > 0,05$)	Individui attribuibili a più aree geografiche vicine
Basso (<80%)	Tutte le popolazioni escluse (nessuna $p > 0,05$)	Individui geneticamente simili a quelli campionati in una certa area geografica ma probabilmente non provenienti esattamente da quell'area
Basso (<80%)	Più popolazioni non escluse (molteplici $p > 0,05$)	Individui non classificabili

Ibridi: assegnazione geografica ad area abitata da una sottospecie ma mtDNA caratteristico dell'altra

Grazie ad una combinazione di metodi molecolari e statistici è possibile genotipizzare animali di origine ignota, ed indagare sulla loro probabile provenienza geografica.

Nella ricerca di animali adatti alla reintroduzione in natura, bisogna tener conto almeno di due principali aspetti:

- Genotipo affine alle popolazioni già presenti
- Stato di salute generale degli animali in cattività

Conclusioni

- Gli animali sono stati caratterizzati geneticamente
 - identificazione provenienza a livello di ampie aree geografiche
 - evidenziati animali molto probabilmente ibridi
- Prospettive future:
 - Ampliare il numero di loci per l'analisi statistica
 - Descrivere aree non ancora sufficientemente indagate (Croazia per es.) per avere un quadro più completo sulla distribuzione di questa specie in natura



Grazie per l'attenzione!

