



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA, ANIMALI, ALIMENTI, RISORSE
NATURALI E AMBIENTE (DAFNAE)

TESI DI LAUREA TRIENNALE

**Caratterizzazione genetica e struttura di
popolazione di due razze venete di tacchino
(*Meleagris gallopavo*) mediante l'uso di
marcatori microsatellite**

Relatore: prof. MARTINO CASSANDRO

Correlatori: dott. ENRICO ZANETTI

dott.ssa GIULIA ROSSI

Laureanda: MARIA CHINELLO

Matricola:1030071

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

INDICE

RIASSUNTO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUZIONE	7
1.1 Origine e morfologia del tacchino	7
1.2 Conservazione delle risorse genetiche animali	9
1.3 Piani di conservazione	12
1.3.1 Il progetto BIONET	12
1.3.2 Le razze venete di tacchino	13
1.4 Marcatori molecolari per lo studio della biodiversità	16
1.4.1 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	16
1.4.2 SNP	17
1.4.3 Microsatelliti	17
2. OBIETTIVO	19
3. MATERIALI E METODI	21
3.1 Campionamento	21
3.2 Estrazione del DNA	22
3.3 Quantificazione e normalizzazione	23
3.4 Reazione a catena della polimerasi	24
3.5 Analisi dei frammenti su sequenziatore capillare	26
3.6 Analisi statistica dei dati	27
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	29
4.1 Polimorfismo dei marcatori	29
4.2 Diversità genetica delle razze	31
4.3 Distanze genetiche tra le razze	33
4.4 Struttura di popolazione	37
5. CONCLUSIONE	39

6. RINGRAZIAMENTI	41
7. BIBLIOGRAFIA	43

RIASSUNTO

Questo lavoro si occupa della caratterizzazione genetica di due razze locali venete di tacchino, Ermellinato di Rovigo (TER) e Comune Bronzato (TCB), coinvolte in un progetto regionale che ha la finalità di conservare e valorizzare la biodiversità.

Sono stati analizzati 192 tacchini, di cui 38 ibridi utilizzati come riferimento (THY), tramite la genotipizzazione ed analisi di 16 loci microsatellite.

Sono stati identificati una media di 9 alleli per locus, con frammenti aventi lunghezze comprese tra 71 e 394 bp. I valori di PIC (Polimorphism Information Content), non sono risultati sempre ottimali per tutti i marcatori; variando da 0,0368 a 0,746.

Nel complesso, le due razze locali mostrano valori di eterozigosità bassi, mentre più elevati sono quelli degli ibridi. La razza Ermellinato di Rovigo in particolare mostra valori piuttosto bassi, con una eterozigosità pari a 0,101. Si evidenzia poi un eccesso significativo di individui omozigoti in entrambe le razze locali.

Non ci sono differenze sostanziali per quanto riguarda il numero medio di alleli per locus. Le distanze genetiche di Reynolds e di Kinship mettono in luce distanze maggiori, rispettivamente, tra TER-TCB e tra TER-THY. La stima della coancestry molecolare (f_{ij}) indica un maggior grado di similarità medio tra i soggetti appartenenti alle razze locali. Il coefficiente di inbreeding, F_{IS} , è risultato più elevato per la razza TER, mentre l'indice di differenziazione F_{ST} è minore per il confronto tra TER e THY e poco maggiore tra TER e TCB. È stata eseguita anche un'analisi fattoriale, e i due fattori principali, se plottati in un asse cartesiano, mostrano graficamente una netta separazione tra i tre gruppi.

L'analisi della struttura di popolazione evidenzia infine come le razze e l'ibrido commerciale analizzati risultino ben distinti, e quindi marcatamente diversi dal punto di vista genetico, ma piuttosto omogenei entro razza. In altre parole, non vengono evidenziate particolari sottostrutture genetiche, indice di una spiccata similarità tra i riproduttori allevati in centri di conservazioni diversi.

I risultati di questo studio danno importanti informazioni per il monitoraggio e la gestione dei riproduttori coinvolti nel progetto di conservazione in-situ, evidenziando in particolare la necessità di apportare alcune misure correttive nella gestione al fine di garantire una performance ottimale di conservazione.

SUMMARY

This research is about the genetic characterization of two turkey Italian local breeds of the Veneto region, Ermellinato di Rovigo (TER) and Comune Bronzato (TCB), involved in a project aiming to conserve and valorise poultry biodiversity.

A total of 192 turkeys, 38 of which were commercial hybrids that were used as reference (THY), were analysed through genotyping of 16 microsatellite loci.

An average of 9 alleles per locus were identified, with fragments with length ranging from 71 to 394 bp. PIC values (Polymorphism Information Content), did not result optimal for every marker, ranging from 0,0368 to 0,746.

On the whole, the two local breeds show low values of heterozygosity, while higher were the value for the hybrids. Ermellinato di Rovigo breed shows particularly low values, equal to 0,101. A significant excess of homozygotes is evidenced for both local breeds.

No substantial differences were found regarding the average number of alleles per locus. Reynold's and Kinship genetic distances evidence higher distances among TER-TCB and TER-THY, respectively. Molecular coancestry estimates (f_{ij}) indicate a higher average similarity among individuals belonging to the local breeds. The inbreeding coefficient, F_{IS} , resulted higher for TER, while the F_{ST} differentiation index was lower for the confrontation among TER and THY and a just a bit higher among TER and TCB.

A factorial component analysis was also performed, and the two main factors, when plotted for an x/y distribution, show a distinct separation among the three breeds.

Population structure analysis evidence how the local breeds and the hybrid are well differentiated, and hence different on the genetic basis, but quite homogeneous within breed. In other words, no particular genetic substructures are evidenced, marker of a high genetic similarity among breeding individuals sampled in the different conservation nuclei.

Results of this study give important information for monitoring and manage correctly the birds involved in the in-situ conservation project, evidencing in particular the need to adopt corrective measures in the management in order to guarantee an optimal conservation performance.

1. INTRODUZIONE

1.1 Origine e morfologia del Tacchino

Il tacchino appartiene al genere *Meleagris*, sottofamiglia *Meleagridina*, specie *Galliformes*. (Cavalchini, 1983) E' un grosso gallinaceo, con testa e collo nudi, dove la pelle è ricoperta da escrescenze rosse, mentre sotto il robusto e arcuato becco troviamo i bargigli, di colore rosso pallido. Le zampe sono lunghe e la coda ha la forma tondeggiante, composta da penne erettili. Il piumaggio è caratterizzato, nel mezzo del petto, da alcune robuste setole nere, sporgenti fino a 15 cm nel maschio, quasi o del tutto assenti nella femmina. Oltre a queste, il maschio è provvisto di sproni metatarsali e della caruncola, un'escrescenza carnosa sita sopra il becco. (Cavalchini, 1983) Questo volatile è caratterizzato da un forte dimorfismo sessuale: nelle razze selvatiche, infatti, il maschio può arrivare a pesare 10-12 kg, la femmina 5-6 kg. Presenta una buona attitudine alla corsa, discreta al volo; è un animale molto prolifico, con ottima predisposizione alla cova.

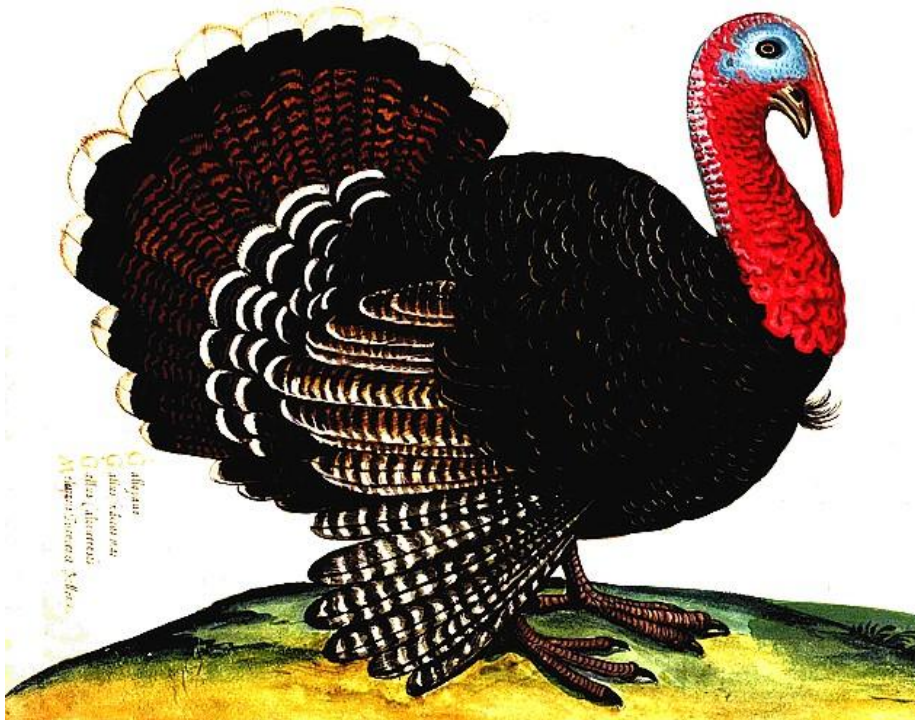
Il tacchino si divide in due specie :*Meleagris gallopavo* e *Meleagris ocellata*. Quest'ultimo, a taglia minore del tacchino domestico, non presenta il pennello di setole sul petto e il maschio ha uno sperone particolarmente pronunciato. Il "gallopavo", tacchino comune o domestico, ha tre diverse tipologie di razze: leggere; medie; pesanti (maschio fino a 18-20 kg, femmina 9-10 kg). Le due specie si possono accoppiare normalmente, dando origine a ibridi non fecondi. (Cavalchini, 1983)

Ha origini in America e arriva in Italia nel sedicesimo secolo (Cornoldi, 1965), dove veniva chiamato inizialmente gallo d'India, gallo pavone, gallinaccio e anche tocco (Cavalchini, 1983), per il verso che produceva la tacchina nel chiamare i suoi tacchinotti. Già a metà del XVII entrò pienamente nella cucina italiana, nell'aia dei rustici e allevato quasi ovunque; intorno agli anni '70 l'Italia diventa il maggior produttore di questa specie e l'italiano il maggior consumatore. (Ugo et al., 1985)

L'allevamento è molto diffuso nell'Italia settentrionale, precisamente Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna (Ugo et al., 1985) sia per la produzione di carne, in particolare del petto, sia per l'uso delle tacchine come incubatrici. Le razze italiane sono molteplici: Brianzolo, Castano precoce, Bronzato comune, Bronzato dei Colli Euganei, Ermellinato di Rovigo, Nero d'Italia, di Parma e di Piacenza, Romagnolo. (Cavalchini, 1983) Negli allevamenti intensivi vengono allevati solo ibridi selezionati da incroci industriali, che devono presentare mole e velocità di accrescimento maggiori, poiché gli animali vengono macellati tra le 9 e le 18 settimane di età (Cornoldi, 1965), oltre che una migliore

fertilità e un numero di uova prodotte più elevato. Questi derivano perlopiù da razze giganti con piumaggio bianco, per le richieste dei consumatori, e sono poche società internazionali a fornirli. (Cornoldi, 1965)

Figura 1. Morfologia di un tacchino maschio (acquerello di Ulisse Aldrovandi, 1599)



1.2 Conservazione delle risorse genetiche animali

In agricoltura e zootecnia le risorse genetiche e la diversità delle specie, animali e vegetali, rivestono un ruolo fondamentale, dal punto di vista naturale per la conservazione degli ecosistemi e della biodiversità, e dal punto di vista della sicurezza alimentare.

La Commissione Europea, definisce la biodiversità come “[...] *la variabilità della vita e dei suoi processi includente tutte le forme di vita, dalla singola cellula agli organismi più complessi, a tutti i processi, ai percorsi e ai cicli che collegano gli organismi viventi alle popolazioni, agli ecosistemi e ai paesaggi*” (Convenzione sulla diversità biologica, Rio de Janeiro, 1992). Viene affermato in questo contesto come la diversità biologica limiti i rischi ambientali e sia una preziosa risorsa per l’attività agricola. Inoltre, vengono richiamati gli Stati Membri a una presa di coscienza, e ad un’attuazione di piani specifici per la salvaguardia delle specie a rischio nel proprio territorio. Nel 2013 sono stati definiti gli obiettivi per il mantenimento della diversità biologica fino al 2020 e sono state elaborate le strategie atte al controllo delle perdite. Negli ultimi decenni, dato l’elevato grado di rischio a cui si è arrivati per la perdita di molte specie e razze, a livello comunitario e nazionale è stata evidenziata l’importanza strategica di provvedere alla realizzazione di adeguati approcci alla conservazione delle specie, in modo da porre un limite all’erosione genetica ed prevenire danni ecologici (perdita di ecosistemi) e biologici (perdita di varianti geniche) (FAO, 2007). Le risorse genetiche animali (AnGR) includono tutte le specie animali e vegetali che hanno importanza economica, culturale e scientifica, per quanto riguarda il cibo e l’agricoltura. Tra queste specie, sono presenti quelle domestiche, cresciute in cattività e che si sono evolute separatamente dai loro antenati selvatici, in modo da venire incontro alle esigenze umane (Diamond, 2002; Mignon-Gasteau, 2005).

Complessivamente, solo 40 specie sono state addomesticate nella storia dell’uomo. Questo basso numero è spiegato dalle molte caratteristiche necessarie ad una specie per poter essere addomesticata, che raramente sono state riscontrate. L’allevamento ha continuamente cambiato la diversità genetica e ormai, nelle razze allevate, rimane presente solo una piccola parte della diversità presente negli antenati o nella controparte selvatica (quando ancora presente). Le mutazioni, il rimescolamento di geni nelle varie generazioni e il mescolamento dei pool genetici hanno permesso di ottenere nuove opportunità per la selezione, che è alla base dell’adattamento ai cambiamenti climatici e ambientali delle specie selvatiche, ma anche dell’allevamento commerciale. (FAO, 2007)

Le risorse genetiche rappresentano un importante componente della biodiversità, soprattutto per quanto riguarda la sicurezza alimentare e il sostegno dell’agricoltura. Questo problema è emerso

con preponderanza specialmente da quando molte specie e razze sono catalogate come a rischio di estinzione (Hammond, 1996; Ruane, 1999).

Nelle aree rurali, gli animali domestici sono un'importante fonte di alimentazione e profitto, ma questi hanno anche altre funzioni, come le produzioni secondarie di pelle e lana, funzione di trasporto e lo sfruttamento ed occupazione di aree marginali, non sfruttabili appieno dall'agricoltura (Anderson, 2003).

L'addomesticazione degli animali ha interessato solo 40 delle circa 40.000 specie esistenti di vertebrati. Le specie coinvolte sono state sottoposte a miglioramenti genetici, sia dovuti al naturale adattamento ai nuovi ambienti e condizioni, sia mirati e pilotati dall'uomo, che le hanno aiutate a sopravvivere e riprodursi anche in ambienti originariamente inospitali. Questi processi sono durati per migliaia di anni e la biodiversità di razze domestiche che riscontriamo oggi ne è la conseguenza. È stato stimato che la diversità tra le razze corrisponda a circa il 50% di tutta la variabilità genetica esistente e che il 50% residuo sia composto dalla variazione presente all'interno delle razze (Hammond & Leitch, 1996), da cui si può dedurre che porzione non trascurabile di variazione genetica sia incorporata nella multiforme varietà e distribuzione di razze, che perciò dovrebbe essere mantenuta e valorizzata (Rege & Gibson, 2003).

Al fine di non perdere la variabilità acquisita nei millenni di domesticazione e specializzazione, risulta molto importante conoscere e classificare lo stato di rischio delle diverse razze. Una classificazione dei rischi può essere effettuata tenendo in considerazione diversi parametri, ma allo stato attuale buoni indicatori si possono trovare nella banca dati FAO "Domestic Animals Diversity Information System" (1992). La classificazione si basa sul pericolo di estinzione:

- Estinta: non rimangono femmine o maschi riproduttori;
- Critica: il numero delle femmine riproduttrici è minore di 100, o il numero dei maschi riproduttori è uguale o minore di 5, oppure il numero degli individui totali è uguale o minore di 120;
- Critica controllata: popolazioni per cui sono stati attivati i piani di conservazione o sono mantenute dalle compagnie commerciali;
- In pericolo: il numero delle femmine riproduttrici è maggiore di 100, ma minore di 1000 o quando il numero dei maschi riproduttori è maggiore di 5, ma minore o uguale a 20 o la popolazione totale è compresa fra 1000 e 1200;
- Pericolo controllato: popolazioni per cui sono stati attivati i piani di conservazione oppure sono mantenute dalle compagnie commerciali o da istituzioni di ricerca;

- Non a rischio: le femmine riproduttrici sono superiori a 1000, i maschi a 20 e la popolazione totale a 1200;
- Non conosciuta: non sono disponibili informazioni riguardo la situazione della razza.

È importante ricordare che la salvaguardia della diversità genetica non ricopre un ruolo fondamentale solamente in ambito scientifico, ma soprattutto come risorsa disponibile per le necessità future. A tal proposito, la priorità in ambito di conservazione è attribuita al contesto sociale, economico e culturale nel quale sono inserite le razze (FAO,2007).

Nel decennio precedente è stato svolto un importante lavoro di raccolta dati su circa 6.500 specie tra mammiferi ed uccelli, provenienti da 170 paesi diversi. Molte informazioni sono rese disponibili dalla FAO, il database DAD-IS comprende 6.379 razze appartenenti a 30 specie diverse (FAOSTAT, DAD-IS, Barker, 2001).

In Europa si trova una buona proporzione delle maggiori specie, tuttavia la situazione degli animali allevati rimane critica: il 18% delle specie a rischio nel ventesimo secolo sono già state perse e il 40% delle specie attualmente in pericolo si prevede possa scomparire nei prossimi vent'anni (FAO, 2000).

1.3 Piani di conservazione

Per adeguarsi alle richieste di mercato e alle esigenze dei consumatori, le produzioni a livello zootecnico sono sempre più rivolte all'impiego di incroci, caratterizzati in generale da migliori performances produttive a discapito delle razze locali, meno efficienti. Per la salvaguardia di queste ultime possono essere implementati piani di conservazione, attuabili tramite l'applicazione di tre strategie:

- Conservazione *in situ*, allevamento nel territorio dove la razza è storicamente presente;
- Conservazione *ex situ in vivo*, allevamento della razza fuori dall'area di provenienza;
- Conservazione *ex situ in vitro*, mantenimento delle risorse genetiche mediante crioconservazione di embrioni, seme, cellule somatiche o tessuti.

1.3.1 Il progetto BIONET

L'ente Veneto Agricoltura promuove e supporta dal 2000 un progetto di Conservazione e Valorizzazione di razze avicole Venete (progetto Co.Va.), divenuto ormai un capitolo del più ampio progetto BIONET. Questo schema di conservazione *in situ*, e supportato da analisi genetiche con marcatori molecolari (Cassandro et al. 2004), cerca di preservare i genotipi locali integrando le tradizioni locali e la cultura rurale delle produzioni avicole. Le specie incluse nel progetto BIONET sono attualmente cinque, con un totale di 13 razze e alcune varietà. Nello specifico le razze sono le seguenti:

- Polli: Pepoi, Robusta Lionata, Robusta Maculata, Ermellinata di Rovigo, Padovana Camosciata e Dorata Polverara Bianca e Nera, Millefiori di Rovigo;
- Faraona: Camosciata;
- Anatra: Mignon, Germanata Veneta.
- Oca Padovana
- Tacchino: Ermellinato di Rovigo, Comune Bronzato.

Queste razze sono tutte caratterizzate da una spiccata rusticità e si adattano molto bene all'allevamento all'aperto con sistemi estensivi (Veneto Agricoltura). Gli schemi di conservazione si basano sulla moltiplicazione e sul mantenimento dei riproduttori all'interno del loro sistema di produzione. La stagione riproduttiva comincia in Febbraio e si conclude a Giugno. I maschi vengono divisi in due famiglie, in base alle relazioni genetiche stimate all'inizio del progetto utilizzando marcatori molecolari. Ogni famiglia viene fatta accoppiare a turno con l'unico gruppo di

femmine. Alla schiusa i nuovi nati vengono vaccinati, mentre quando raggiungono la maturità sessuale viene prelevato loro un campione di sangue per le analisi del DNA.

Lo studio dei marcatori che affianca gli schemi di conservazione viene gestito dall'Università di Padova e viene effettuato per due scopi principali: massimizzare la variabilità genetica delle popolazioni tramite la scelta dei riproduttori più idonei e monitorare nel tempo le performance di conservazione. Per selezionare i riproduttori vengono utilizzati criteri che tengano conto di: data di nascita, famiglia di appartenenza, fenotipo (eliminando i soggetti che presentano difetti morfologici o di colore del piumaggio) e, in alcune razze, il peso, cercando di mantenerlo entro gli standard di razza. A tal fine viene effettuata una pre-selezione all'età di circa 6 mesi (Cassandro et al., 2004).

BIONET prevede l'allevamento dei riproduttori avicoli presso cinque centri di conservazione impegnati ad applicare i piani di conservazione per le razze a limitata diffusione, studiati dall'Università di Padova. I centri attualmente coinvolti sono: la Provincia di Vicenza presso l'allevamento a Montecchio Precalcino per la razza di pollo Millefiori di Lonigo; il centro di Veneto Agricoltura presso l'azienda di Sasse Rami Ceregnano (Rovigo) per le razze di pollo Padovana (camosciata e dorata), Polverara (Nera e bianca), Robusta Lionata, Robusta Maculata, Ermellinata di Rovigo, Pepoi, per le due razze di tacchino Comune Bronzato, Ermellinato di Rovigo, per la Faraona Camosciata, e per le due razze d'anatra Germanata Veneta e Mignon; il centro dell'allevamento dell'ISISS "della Lucia" a Feltre (Belluno), per le razze di pollo Polverara (bianca e nera), Robusta Lionata, Robusta Maculata, Ermellinata di Rovigo, Pepoi e per le razze di anatra Germanata Veneta e Mignon; il centro dell'allevamento ISISS "Dino Sartor" a Castelfranco Veneto (Treviso) per le razze di pollo Robusta Lionata, Robusta Maculata, Ermellinata di Rovigo, Pepoi, per le razze di tacchino Comune Bronzato, Ermellinato di Rovigo e per la Faraona Camosciata; infine, il centro dell'allevamento dell'ISISS "Duca degli Abruzzi" a Padova per le razze di pollo Padovana (camosciata, dorata, argentata, nera, bianca), Polverara nera, per l'anatra Germanata Veneta e per l'Oca Padovana.

Oltre ai centri di conservazione sopra menzionati e all'Università di Padova (Dipartimento DAFNAE), partecipa al progetto anche l'Istituto Zooprofilattico, che si occupa di monitorare i vari gruppi avicoli dal punto di vista sanitario, cercando di prevenire, e nel caso contenere, le problematiche che possono presentarsi.

1.3.2 Le razze venete di Tacchino

Le razze prese in esame per questo lavoro di tesi sono l'*Ermellinato di Rovigo* e il *Comune Bronzato* (Figura 2). Il primo risale a un incrocio effettuato nel 1958 con la razza americana *Narra Gansett*, dove, in seguito alla selezione, sono stati ottenuti soggetti con piumaggio ermellinato e

tarsi di color carnicino. Il secondo, che ha un'origine più antica ed è presente in Veneto dal XV secolo, è caratterizzato da un piumaggio particolare, che presenta colori metallici. Il petto, il collo, le spalle e la groppa sono di colore nero brillante con riflessi bronzei intensi, la coda è bruna con fasce nere, le penne delle gambe e il piumino sono nere. Inoltre, tutte le penne presentano una fascia bronzata con riflessi dorati e rosso violaceo (Cassandro et al., 2004).

Oltre al diverso piumaggio, queste due razze presentano altre differenze, illustrate nella tabella 1.1.

Tabella 1. Caratteristiche morfologiche, produttive e riproduttive delle due razze di Tacchino venete secondo lo standard di razza.

Carattere	classe	TER	TCB
peso adulti	M	10-12 kg	6-7 kg
	F	4-6 kg	3-3,5 kg
colore tarsi		carnicino	scuro
colore pelle		bianca	bianca
Uovo	colore	leggermente rosato	leggermente rosato
	peso	70-80 gr	70-85 gr
maturità sessuale	M	7 mesi	7 mesi
	F	7 mesi	7 mesi
accoppiamento M/F	M	1	1
	F	12	12
durata incubazione		28 d	28 d
			70-100 uova
produttività uova e attitudine alla cova		70-100 uova	deposte/ciclo
		deposte/ciclo	Attitudine alla cova molto spiccata
Rusticità		Molto rustico, ottimo pascolatore	Sorprendete rusticità, per allevamento biologico o naturale

Particolarità della tacchina Comune Bronzato è essere considerata una vera e propria “incubatrice naturale”. Infatti è in grado di sostenere 4 o 5 covate consecutive, rimanendo quindi nel nido fino a 100 giorni (Cassandro et al., 2004). Oltre alle loro, prestano molta cura anche nella cova di uova di altre specie e anche per questo particolare uso veniva allevata in passato (Veneto Agricoltura).



Comune Bronzato



Ermellino di Rovigo



Figura 2. Fotografie di esemplari di tacchino appartenenti alle razze Comune Bronzato ed Ermellino di Rovigo (fonte: Veneto Agricoltura)

1.4 Marcatori molecolari per lo studio della biodiversità

L'uso di marcatori molecolari per lo studio e la caratterizzazione di razze o popolazioni permette di stimare la variabilità a livello genomico. Più precisamente, i marcatori genetici incorporano parte della diversità tra gli individui dovuta a delle mutazioni che avvengono a livello del DNA. Le variazioni possono essere dovute a sostituzioni di singoli nucleotidi, inserzioni o delezioni, duplicazioni o inversioni. Quando però le mutazioni non causano cambiamenti nel genotipo o nel fenotipo, vengono considerate “neutre”. Un marcatore molecolare, per essere ideale, dovrebbe:

- non subire interferenze da parte dell'ambiente esterno;
- essere disperso nel genoma,
- essere neutrale;
- dovrebbe essere codominante, in modo da poter distinguere l'eterozigote dall'omozigote;
- facile da monitorare;
- presente in qualsiasi cellula;
- polimorfico;

I marcatori sono considerati strumenti di indagine molto rapidi ed efficaci e i motivi dell'uso di questi sono molteplici: analisi di paternità; diagnosi di anomalie genetiche; tracciabilità dei prodotti animali; miglioramento delle specie animali e vegetali; studio dell'evoluzione e della biodiversità delle popolazioni. Alcuni dei più utilizzati marcatori nucleari sono gli AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), le SNP (*single nucleotide polymorphism*) e gli SSR (*simple sequence repeat*), detti anche microsatelliti. Oltre ai marcatori presenti nel DNA genomico, molto utilizzati sono quelli presenti nel DNA mitocondriale, usati perlopiù riguardo ad analisi filogenetiche che coinvolgono specie diverse. Gli studi genetici vengono eseguiti per il contributo che apportano nella comprensione della storia e nella stima della diversità e struttura delle popolazioni, ottenute con il passare del tempo e l'evoluzione delle specie. (Barcaccia et al., 2006).

Una descrizione sintetica di alcuni tipi di marcatori è riportata nei paragrafi seguenti.

1.4.1 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Essendo marcatori biallelici e dominanti, gli AFLP danno poche informazioni a livello di singolo marcatore, mentre elevate informazioni per analisi. Sono numerosi, presenti in tutto il genoma e non richiedono la conoscenza delle sequenze genomiche per la costituzione dei primer, ma hanno tempi di analisi più lunghi. Mostrano eredità dominante, per cui il loro uso è ridotto alle analisi genetiche all'interno di popolazioni con incroci tra consanguinei (Muir et al., 2003).

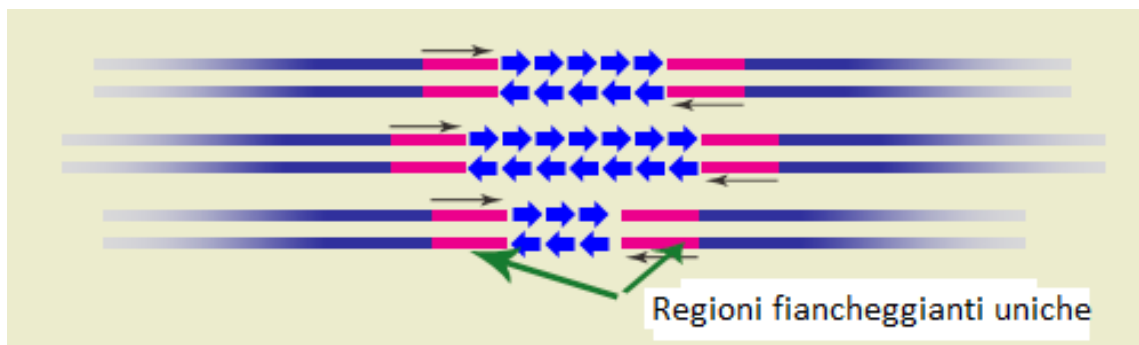
1.4.2 SNP

Riguardano mutazioni a livello di singolo nucleotide e perciò non cambiano la lunghezza della sequenza di DNA nella regione. Sono molto frequenti, distribuiti in tutto il genoma e presenti tanto in regioni codificanti che non codificanti. Essendo però marcatori biallelici, sono relativamente poco informativi se se ne analizza un basso numero (Muir et al., 2003).

1.4.3 Microsatelliti

I micro satelliti sono sequenze ripetute di DNA non codificante costituiti da unità di ripetizione molto corte (1-5 bp) disposte secondo pattern ripetitivi in tandem. I microsatelliti presentano un alto livello di polimorfismo, sono perciò marcatori molto informativi e molto utilizzati negli studi di genetica di popolazione. Sono inoltre presenti nel genoma degli eucarioti in numero elevato, anche se si possono riscontrare marcate differenze tra specie e generi diversi. Grazie alla genotipizzazione dei loci microsatellite, cioè determinando la lunghezza e il numero delle ripetizioni, è possibile creare un profilo del DNA utile ad identificare un individuo. I profili genetici danno indicazioni sulle relazioni tra le popolazioni e i singoli individui e, indirettamente, sull'origine e lo sviluppo della diversità tra le specie (Muir et al., 2003).

Figura 3. Rappresentazione grafica della struttura di un locus microsatellite. Il numero di ripetizioni interne alle regioni fiancheggianti è altamente variabile tra i diversi individui.



2. OBIETTIVO

L'obiettivo di questa tesi è di quantificare la variazione genetica e di analizzare la struttura di popolazione in due razze locali venete di tacchino coinvolte in un progetto di conservazione *in vivo*, utilizzando sedici marcatori microsatellite.

Obiettivo secondario è di utilizzare tali informazioni per monitorare il piano di conservazione.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento

In questo progetto sono stati analizzati un totale di 192 tacchini, precisamente: 79 Bronzato Comune, 75 Ermellinata di Rovigo, provenienti dai centri di conservazione di Ceregnano e Montebelluna, e 38 ibridi commerciali, da un allevamento intensivo ad Este. In quest'ultimo centro, sono state rilevate in prevalenza femmine, ma gli animali erano troppo giovani per determinarne effettivamente il sesso, mancava il dimorfismo sessuale.

Tabella 2. Numerosità delle popolazioni

RAZZA	N		N_centro	M_centro	F_centro
TCB	79	Ceregnano	34	9	25
		Montebelluna	45	17	28
TER	75	Ceregnano	39	16	23
		Montebelluna	36	17	19
THY	38	Este	38		

Il campione di sangue è stato ottenuto tramite prelievo dalla vene ulnare, utilizzando dei tubi tipo Vacutainer contenenti citrato di sodio come anticoagulante.

I prelievi sono stati effettuati arrecando il minor stress possibile agli animali, che sono stati trattati seguendo le buone pratiche di cattura e manipolazione.

I campioni di sangue sono stati mantenuti refrigerati e quindi stoccati a -20C fino al momento dell'estrazione del DNA. Ogni campione è stato marcato con la razza di appartenenza, il codice della matricola del soggetto, il sesso dell'animale ed il relativo centro di conservazione.

3.2 Estrazione del DNA

L'analisi del DNA e la sua estrazione sono avvenuti presso il laboratorio DNA dell'Università degli Studi di Padova, dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali ed Ambiente.

I campioni di sangue sono stati scongelati e da ognuno sono stati prelevati 10 µl. Questi sono stati mescolati a 300 µl di Cell Lysis Solution (TRIS 50mM, EDTA 20mM, SDS 2%) e mantenuti in un incubatore per un'ora a 37°C in agitazione per permettere la lisi cellulare. Dopo incubazione, ad ogni campione sono stati aggiunti 1,5 µl di RNAsi (4 ng/ml) e incubati di nuovo per altri 30 minuti per permettere la degradazione dell'RNA da parte dell'enzima. Sono stati quindi aggiunti 100 µl di soluzione PPS (protein precipitation solution, Ammonio acetato 10 molare) per ottenere la precipitazione delle proteine, quindi i campioni sono stati centrifugati a 14000rpm, a 3°C per 10 minuti. Il surnatante, contenente il DNA, è stato quindi trasferito in tubi nuovi contenenti 300 µl di isopropanolo a cui sono stati aggiunti 1,5 µl di glicogeno (20 µg/ml). Questa operazione ha l'obiettivo di far precipitare il DNA ed ottenere la formazione del fiocco. Per far aderire il fiocco alla parete del tubo, i campioni sono stati centrifugati a 10°C per 3 minuti. Dopo aver tolto il surnatante, i tubi e il DNA sono stati lavati due volte con 300 µl di etanolo al 70% e centrifugati di nuovo a 3°C per 30 minuti. Il DNA purificato è stato infine risospeso in 100 µl di ddH₂O tramite agitazione su vortex e stoccato a -20°C.

3.3 Quantificazione e normalizzazione

Il DNA estratto è stato quantificato per mezzo di un fluorimetro da banco Qbit (Qiagen) ed il relativo kit. La concentrazione del DNA quantificato è stata normalizzata a 10 ng/ μ l diluendo con ddH₂O per facilitare il successivo protocollo di PCR.

3.4 Reazione a catena della polimerasi

Per l'amplificazione del DNA è stato utilizzato un set di 16 coppie di primer complementari a regioni fiancheggianti loci microsatelliti.

Tabella 3. Elenco delle sequenze forward e reverse per i 16 loci microsatelliti analizzati. Marcatura con fluoro foro Wellred su primer forward.

Locus		Fluoroforo	Sequenza (5'-3')
MNT4	F	D4	CGACACTCGAAAGGTGTTTC
MNT4	R		AGCAGCTTTCATCCCATTG
MNT27	F	D3	GATCATAAGCACGTCACAATC
MNT27	R		CCTGGGTTTGGTTGCATATC
MNT34	F	D4	CTTCCCACATCTAAGGGATTC
MNT34	R		CAAAGTGCTTCCCCCAATAG
MNT56	F	D4	GCAGGACGAGAATTGCTTTC
MNT56	R		ATCAACCCCAAACAAAACCTC
MNT75	F	D2	TGTGGCACAGTGAGGTTAGG
MNT75	R		GCTGAAAGTGAAGGGACAGG
MNT85	F	D2	GGTTTGGAAAGAGGAAAGAAGC
MNT85	R		ATCTCATGTGAGCCCCAGTC
MNT116	F	D2	TACAAATGGGGCATTGCAG
MNT116	R		TGAGACATATGAGTAGGGCTTAGG
MNT156	F	D3	GCAAAGGTGGGTAAAAGGTG
MNT156	R		TTCACATGCTTTTACTTGAGACATC
MNT211	F	D3	TTTTCCCATGACCAAGTGAC
MNT211	R		TTGCATTGGGAAGGCTTAAC
MNT238	F	D2	TCTTACACTCGTTGCTTGGTG
MNT238	R		CAATCACAAGTTGGCCTCAG
MNT281	F	D3	ATCAGTGCAACGATCCAAAG
MNT281	R		ACATGTGTGCTGGTTGTTGG
MNT297	F	D4	CCCAAATTGCACCTTACAG
MNT297	R		TGAATGCATTTAGGCTTAGTGAAG
MNT319	F	D2	TGCAAAGGCAATTATTTTCTCC
MNT319	R		ACAGGGATGTCATGGGAAAG

MNT389	F	D3	TAGCTTCTTTCTATAAAATGTTCTGTG
MNT389	R		TCACAAAGGAAGGAAGGAAAAC
MNT404	F	D4	AACCAGCTCTGGAGATACCG
MNT404	R		GGACTGCAAGGACAACATCC
MNT427	F	D2	GACTGTTGAATCAGCTAGAATAGCAC
MNT427	R		GGGATCCAGAAATTCAGTTTG

I loci analizzati sono situati in cromosomi diversi del genoma del tacchino o, quando situati nello stesso cromosoma, in regioni tra loro distanti, permettendo di poter affermare con relativa sicurezza che i marcatori siano soggetti a segregazione indipendente. Per permettere la detection, i primer forward sono stati marcati con tre diversi fluorofori di tipo WellRed (Sigma-Aldrich) che, una volta eccitati, emettono luce a lunghezze d'onda specifiche per ognuno. L'amplificazione è stata eseguita in un termociclatore GeneAmp 9700 con il kit per la PCR (Qiagen, Hilden, Germany), usando, per ogni pozzetto di PCR, 50 ng di DNA purificato (per un volume pari a 5 µl), 12,5 µl di MasterMix (una soluzione contenente l'enzima Taq-polimerasi hot-start, dNTPS e MgCl₂), 5 µl di Qsolution e 2,5 µl di una soluzione di primer (concentrazione finale di ogni primer pari a 0.2 µM), per ottenere un volume finale di reazione pari a 25 µl. L'amplificazione dei diversi loci è stata effettuata suddividendo i primer in due gruppi, o multiplex, in modo da ottenere amplificati tutti e 16 i loci in sole due reazioni di PCR per campione.

Le condizioni di amplificazioni sono state le seguenti:

- Denaturazione iniziale di 5 minuti a 95°C,
- 45 cicli di:
 - denaturazione a 95°C per 30 secondi;
 - annealing a 58°C per 1 minuto e 30 secondi;
 - estensione a 72°C per 30 secondi.
- Estensione finale a 60°C per 30 minuti.

3.5 Analisi dei frammenti su sequenziatore capillare

Gli amplificati, marcati con i diversi fluorofori, sono stati separati usando un sequenziatore capillare automatico (CEQ 8000 Genetic Analysis System, BeckmanCoulter, Fullerton, CA, USA). A questo scopo, 2 μ l del prodotto di PCR sono stati mescolati con 20 μ l di SLS, 0,45 μ l di Size Standard 400 (AB-Sciex) e 17,55 μ l di ddH₂O. Le soluzioni sono state disposte in una specifica piastra da 96 pozzetti e caricate sullo strumento.

Il programma utilizzato prevede una separazione della durata di 45 minuti che permette di separare frammenti di lunghezza massima pari a 400 bp.

L'analisi degli elettroferogrammi, e lo scoring dei frammenti sono stati effettuati tramite il software CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (BeckmanCoulter).

E' stato infine creato un dataset contenente i genotipi dei 192 diversi soggetti per i 16 loci microsatelliti.

3.6 Analisi statistica dei dati

Il dataset precedentemente ottenuto è stato sottoposto a controllo qualità per identificare errori nella genotipizzazione. Il numero di alleli totali, la media degli alleli per locus tra le razze, la frequenza allelica, l'eterozigosità attesa (HE) e osservata (HO) (eterozigosità osservata in accordo con *Nei, 1978*) sono state stimate usando il software Genetix (Belkhir, 1996-2002). Gli Exact test sull'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) (Guo and Thompson, 1992) sono stati applicati usando la simulazione Markov Chain Monte Carlo (100 gruppi, 5.000 ripetizioni per gruppo e 10.000 di dememorization) come attuato in GENEPOP versione 3.4 (Raymond and Rousset, 1995). Il Polimorphism Information Content (PIC) (Botstein et al., 1980), che rappresenta una sintesi generale dell'informazione data dal marcatore, è stata calcolata usando il software MOLKIN (Gutiérrez and Goyache, 2004), così come gli indici di fissazione (FIS, FST e FIT), stimati secondo Weir and Cockerham (1984), per quantificare la diversità tra razze e all'interno della stessa. La distanza FST tra le razze è stata ottenuta usando MOLKIN (v3.0). La distanza di Reynolds (DR) (Reynolds et al., 1983) è stata stimata usando PHYLIP 3.66 (Felsenstein, 2005). È stato costruito un albero Neighbor-Joining utilizzando le distanze DR usando il software MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). L'indice di similarità medio dei soggetti entro razza (kinship, f_{ij}) e la distanza kinship tra le razze (Dk) è stata stimata usando il software MOLKIN 3.0 seguendo la formula descritta da Caballero and Toro (2002), e presentata da Meuwissen (2001). Per migliorare le priorità della conservazione, MOLKIN 3.0 (Gutiérrez et al., 2005) è stato usato per quantificare il contributo alla diversità di ogni popolazione del dataset completo usando il metodo proposto da Caballero and Toro (2002). Dk tra le razze è stata ottenuta semplicemente eseguendo la media dei valori di tutte le coppie di individui delle razze, entro razza e tra razza.

Il software STRUCTURE v.3 (Pritchard et al., 2000) utilizza una metodologia di clustering per dedurre la struttura di popolazione usando i dati sui loci genotipizzati. L'applicazione del metodo include l'individuazione della struttura della popolazione, l'inferenza di popolazioni genetiche differenti (K), l'assegnazione degli individui alle diverse popolazioni/razze e l'identificazioni degli individui estranei o frutto di incrocio. Le analisi sono state ottenute impostando un mixed model con frequenze alleliche correlate. Per la fase di burn-in sono state impostate 100.000 iterazioni seguite da 250.000 ripetizioni per i valori di K, compresi fra 1 e 7, con 50 corse per ogni K. K è il valore che corrisponde al numero di cluster esaminato durante le analisi. Il K che maggiormente si adatta ai dati genetici è stato stabilito a partire dai valori di $\ln Pr(X|K)$ sulle 50 corse effettuate in modo indipendente per ogni valore di K, come suggerito da Evanno et al. (2005). La procedura SIMCOEF (Rebeck et al., 2002) della statistica R (v. 2.6.0) è stata usata per fare un paragone delle

50 soluzioni, definendo come identiche le soluzioni con 95% o più di similarità, e considerando come soluzione più probabile quella che compariva con maggior frequenza.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Polimorfismo dei marcatori

Il numero totale di alleli individuato dai 16 loci è 148, con una media (\pm DS) pari a $9,25\pm 3,53$. Il locus che presenta il maggiore numero di alleli è stato il MNT211 con 15 alleli, mentre il minor numero di alleli, ovvero 4, viene osservato nel locus MNT156.

La lunghezza dei frammenti va da un minimo di 71 (MNT56) a un massimo di 394 (MNT297). Un certo numero di alleli privati sono stati riscontrati nelle popolazioni analizzate, in particolare 35 per TCB, 28 per TER e 40 per THY. Di questi, 11 presentavano frequenze superiori al 15%.

Tabella 4. Analisi del polimorfismo dei loci microsatellite analizzati. Gli alleli in grassetto mostrano frequenza superiore al 15%.

Locus	NA	PIC	EAS	Dim		All. Privati			H att			H oss		
				min	max	TCB	TER	THY	TCB	TER	THY	TCB	TER	THY
MNT56	7	0,231	1,314	71	105		71, 105	97	0,051	0,141	0,615	0,013	0,040	0,684
MNT4	10	0,672	3,517	87	171	155, 157, 161, 171	149	87, 143	0,576	0,686	0,450	0,158	0,038	0,243
MNT34	14	0,673	3,391	208	248	244, 248	208, 214, 236, 238, 240 , 242	220, 222 , 224	0,446	0,591	0,565	0,321	0,467	0,605
MNT404	8	0,433	1,821	234	298	276	249	238, 272 , 286	0,228	0,292	0,699	0,234	0,068	0,710
MNT297	14	0,551	2,537	206	394	340, 358, 394	206, 212, 294, 384, 386 , 388, 390	286, 369	0,271	0,566	0,524	0,197	0,463	0,405
MNT238	13	0,409	1,765	86	200	86, 92, 104, 122, 126, 196, 200	102,	106	0,583	0,154	0,519	0,273	0,027	0,342
MNT116	12	0,746	4,522	81	163	153	99, 103, 162	81, 97, 149	0,687	0,597	0,671	0,436	0,360	0,649
MNT75	9	0,310	1,488	178	290	178, 184, 204, 222, 290		198, 218	0,515	0,040	0,375	0,449	0,013	0,342
MNT85	7	0,328	1,527	183	349	239	183	251 , 259 , 349	0,026	0,238	0,653	0	0	0,526

MNT319	5	0,037	1,038	282	338	294, 310, 338	282	0,064	0	0,055	0,013	0	0
MNT427	9	0,580	2,791	259	351		259	0,412	0,401	0,705	0,413	0,068	0,816
MNT156	4	0,437	2,185	115	123		115	0,087	0,151	0,587	0,039	0	0,474
MNT27	5	0,291	1,456	105	171		109, 111	0,087	0,267	0,532	0,039	0,013	0,447
MNT211	15	0,389	1,658	167	213	181, 197, 199, 209	213	0,332	0,116	0,794	0,269	0,027	0,816
MNT281	10	0,255	1,357	179	273	271	213	0,0258	0,252	0,606	0	0	0,658
MNT389	6	0,382	1,844	316	354	338,354	331, 334	0,4855	0,252	0,077	0,493	0,028	0,079

NA: numero alleli; PIC: contenuto di informazione del polimorfismo, EAF: effective allele size; DIM: dimensione minima e massima dei frammenti; H att: eterozigosità attesa; H oss: eterozigosità osservata.

L'indice PIC è una misura che indica quanto informativo sia un marcatore microsatellite. Nel calcolo, questo indice tiene conto degli alleli e della loro frequenza. Bisogna considerare che più questo indice è alto, maggiori alleli presenta un microsatellite, e quindi è più variabile. Valori di PIC compresi tra 0,25 a 0,50 indicano una buona informazione. I marcatori microsatelliti analizzati in questo lavoro non presentano tutti buoni livelli di PIC. Il valore più elevato corrispondente a 0,746 è stato osservato per il marcatore MNT116, mentre il valore più basso (0,0368) è di MNT319. I marcatori microsatellite sono stati utilizzati in precedenza per studi di diversità genetica. Ne è un esempio lo studio di Mock (et al., 2002), in cui 6 sottospecie di tacchino selvatico, precisamente *Meleagris gallopavosilvestris*, *osceola*, *intermedia*, *merriami*, *mexicana* e *gallopavo*, sono state analizzate per mezzo di cinque loci microsatellite, al fine di conoscerne la storia evolutiva. L'analisi di 5 loci ha portato a determinare un numero di alleli per locus molto variabile, ma mediamente più alta che nelle razze locali qui riportate (15,6 e 9,25 alleli/locus, rispettivamente).

4.2 Diversità genetica delle razze

L'eterozigosità attesa è un indice per valutare la naturale variazione genetica ed è definita dalla frequenza degli alleli. L'eterozigosità attesa può essere descritta come la probabilità che un genotipo, selezionato in una popolazione che presenta l'equilibrio di Hardy-Weinberg, sia eterozigote. Il calcolo dei parametri relativi alla diversità genetica entro razza è riportata in Tabella 5. I valori più bassi di eterozigosità osservata si osservano in TER (0.101), seguito da TCB (0.209). L'ibrido commerciale, come atteso, mostra il valore più alto (0,487). Confrontando i valori di eterozigosità osservata ed attesa, un eccesso significativo di soggetti omozigoti si osserva nelle razze locali, così come minori valori medi di "polimorphism information content" (PIC) ed "effective allele size" (EAF). Per quanto riguarda il numero medio di alleli (NMA) non si riscontrano invece differenze marcate.

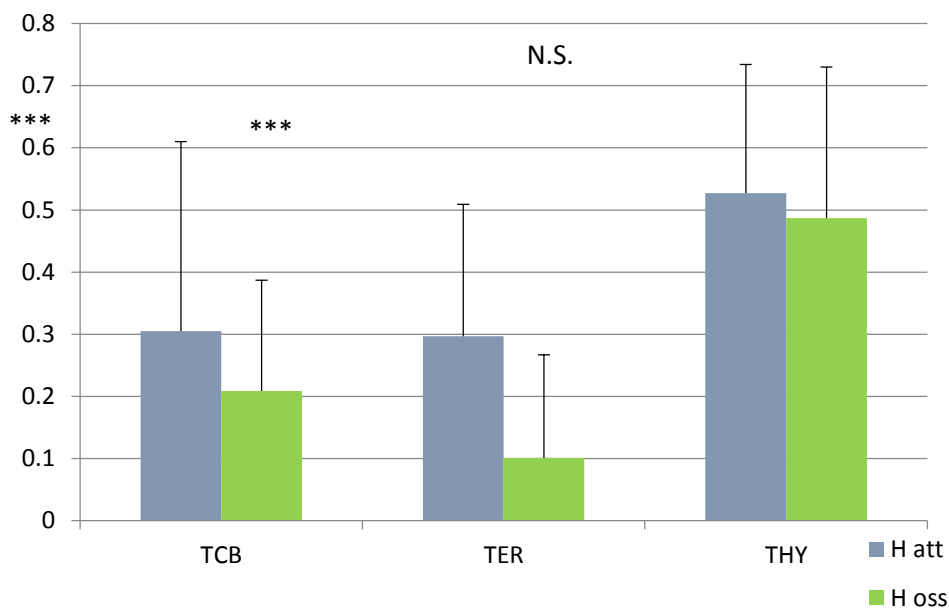
Tabella 5. Valori di eterozigosità attese (H_{att}) e osservate (H_{oss}), Hardy-Weinberg Exact probability test (HW_{ext}), Polimorphism information content (PIC), Effective allele size (EAF) e numero medio di alleli per locus (NMA)

Razza	H att	±DS	H oss	±DS	HWext	PIC	EAF	NMA
TCB	0,305	±0,305	0,209	±0,178	p<0.001	0,174	1,615	4,56
TER	0,297	±0,212	0,101	±0,166	p<0.001	0,132	1,582	4,50
THY	0,527	±0,207	0,487	±0,243	n.s.	0,294	2,395	4,88

n.s.: notsignificant.

Il grafico 1 mostra visivamente le differenze tra H_{att} e H_{oss} nelle tre popolazioni. L'Hardy-Weinberg Exact test effettuato evidenzia differenze significative tra i due parametri nelle razze locali TER e TCB.

Grafico 1. Eterozigosità attesa e osservata nelle tre popolazioni.



In uno studio relativo all'analisi della diversità genetica del Tacchino Romagnolo effettuato da Maretto e Cassandro (2013) sfruttando gli stessi marcatori microsatellite, il numero di alleli per locus in questa razza risultava più basso rispetto a TER e TCB, con una media di $2,32 \pm 1,13$. L'eterozigosità osservata, pari a $0,55 \pm 0,36$, che non si discostava da quella attesa ($0,54 \pm 0,29$), risultava superiore rispetto alle razze venete e simile a quanto osservato per l'ibrido commerciale. In un altro lavoro di Latch (et al., 2002), riguardante il tacchino selvatico *Meleagris gallopavo silvestris*, eseguito tramite lo screening di 102 loci microsatellite, sono stati individuati solo 7 loci polimorfici, ognuno dei quali con un numero medio di alleli per locus compreso tra 5 e 15. L'eterozigosità osservata è sempre risultata minore di quella attesa, con valori medi pari a 0,523. In uno studio di Chaves (et al., 2009) alcune linee consanguinee sono state analizzate tramite genotipizzazione a 78 loci microsatellite. I valori di eterozigosità riportati, compresi tra 0.31 e 0.38, risultano simili a quelli evidenziati nelle razze locali.

4.3 Distanze genetiche tra le razze

Per quanto riguarda le distanze, sono state calcolate quelle di Reynolds (DR) e di Kinship (DK). Le due distanze sono calcolate sulla base di approcci e algoritmi diversi. Il risultati ottenuti con le due non concordano pienamente. Per quanto riguarda DR, infatti, le distanze maggiori si misurano nel confronto TER-TCB, seguiti da TER-THY e TCB-THY. Per quanto riguarda le distanze di kinship, il confronto di TER-THY presenta distanza maggiore di TER-TCB e TER-THY.

Le razze venete comunque mostrano una differenziazione marcata, a suggerire come siano state allevate e mantenute senza incorrere in situazioni di incrocio o flusso genico. L'analisi della struttura di popolazione, presentata in seguito, conferma questa ipotesi.

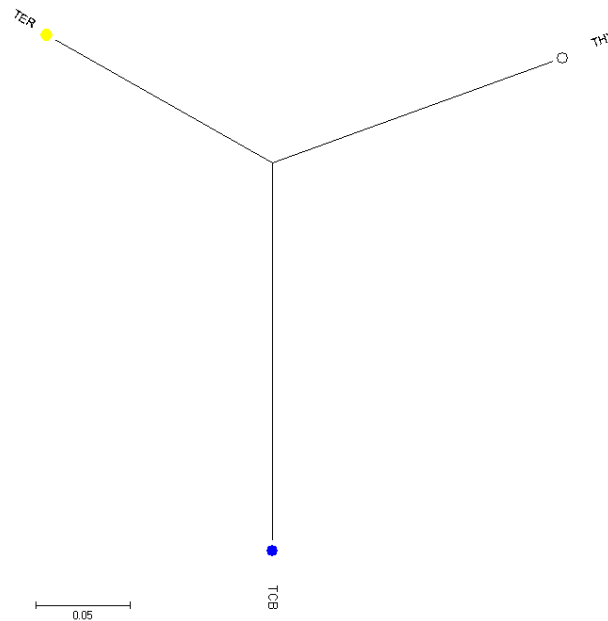
Il parametro definito "coancestry molecolare" (f_{ij}) rappresenta una misura del grado di parentela medio dei soggetti entro popolazione, considerando la distanza di Kinship. Viene calcolato come media dei confronti multipli a due a due di tutti i soggetti in base alla quota di alleli condivisa ed è compreso tra 0 e 1; più è alto, più gli individui sono simili tra di loro. I valori di F_{ij} sono molto simili tra Comune Bronzata e Ermellinata di Rovigo, come si può vedere in tabella 6, e sono marcatamente più alti se confrontato con il valore ottenuto dagli ibridi; ciò a indicare un maggior grado di consanguineità.

Le DR sono state impiegate per tracciare un albero filogenetico di tipo Neighbour-Joining, mostrato in figura 4.

Tabella 6. Distanze di Reynolds (sopra la diagonale, in corsivo), distanze di Kinship (sotto la diagonale), coancestry molecolare entro razza (f_{ij} , in grassetto, sulla diagonale).

	TCB	TER	THY
TCB	0,634	<i>0,224</i>	<i>0,239</i>
TER	<i>0,468</i>	0,661	<i>0,197</i>
THY	<i>0,277</i>	<i>0,345</i>	0,445

Figura 4. Albero Neighbour-Joining tracciato secondo le distanze di Reynolds



Nella tabella 7 sono riportate le statistiche F calcolate entro razza (Fis) e tra le razze (Fst). Il Fis, o coefficiente di inbreeding, misura la deviazione dalla situazione di equilibrio di H-W, ovvero la sproporzione di individui omozigoti od eterozigoti entro la popolazione. Il parametro Fst invece è proporzionale alla differenziazione tra le razze in esame. I risultati mostrano come il Fis sia più alto per TER e via minore per TCB e THY, pur indicando per TER una maggior eccesso di soggetti omozigoti. L'indice Fst risulta leggermente minore tra Ermellinata di Rovigo e gli ibridi, mentre è più alto tra TER e TCB.

Tabella 7. Indici Fis (coefficiente di inbreeding, diagonale) ed Fst tra le razze.

	TCB	TER	THY
TCB	0,308		
TER	0,201	0,624	
THY	0,213	0,179	0,063

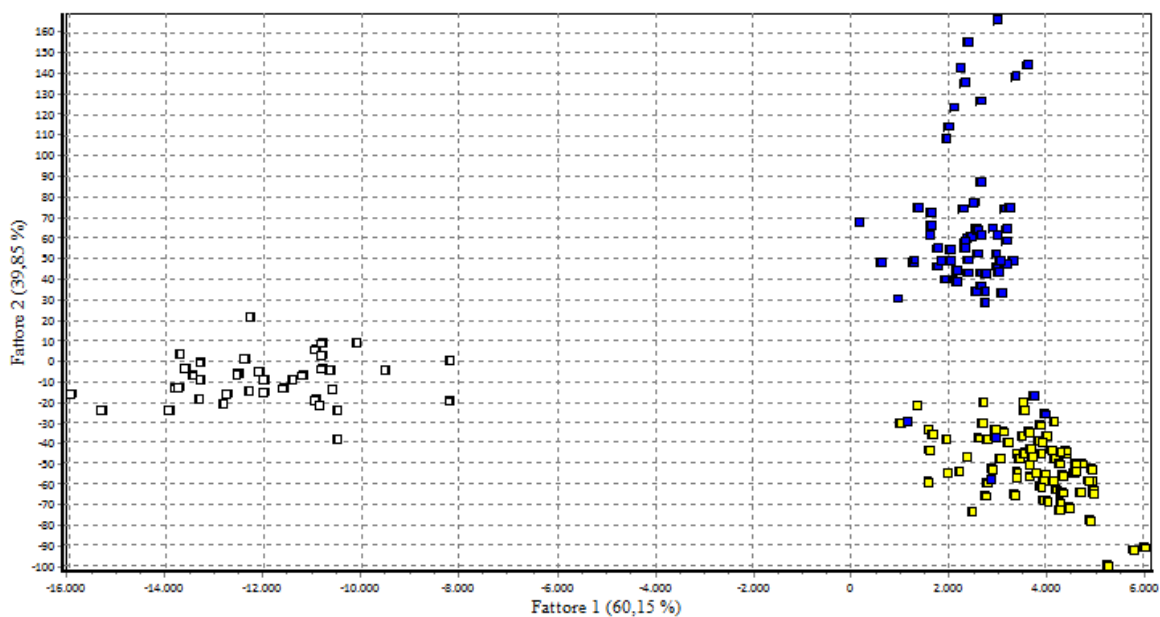
L'indice Fis riportato nello studio riguardante il Tacchino Romagnolo (Maretto e Cassandro, 2013), risultava pari a 0,016, mostrando come, a differenza di TER e TCB, non sia presente un elevato eccesso di omozigosi in questa razza. Considerando invece le quattro sottospecie dell'*Eastern wild turkey* (Boone and Rhodes, 1996), studiate per verificare se queste popolazioni selvatiche avessero subito suddivisioni genetiche significative, gli indici FIS e FST sono risultati piuttosto bassi, a indicare popolazioni nella situazione di equilibrio di Hardy-Weinberg e altamente differenziate (Fis media=0,014; Fst, media= 0,054).

Particolare interesse riveste l'analisi fattoriale, una cui rappresentazione spaziale è riportata in figura 5. L'analisi fattoriale è una tecnica statistica che permette di ottenere una riduzione della complessità del numero di fattori che spiegano un fenomeno, in questo caso i genotipi individuali ottenuti ai diversi loci microsatellite. Essa si propone di determinare un numero di variabili "latenti" più ristretto e riassuntivo rispetto al numero di variabili di partenza.

I diversi soggetti analizzati sono rappresentati come punti che possiedono specifiche coordinate X/Y su un plot 2D formato dai fattori principali.

I tre gruppi risultano ben separati. Il primo fattore (asse x) spiega circa il 60% della variabilità totale e permette una buona differenziazione tra gli ibridi (a sinistra) e le razze locali (a destra). Il secondo asse (y), invece, rende visibile la separazione tra le due razze Venete. Solo alcuni soggetti TCB (5 soggetti) vengono erroneamente attribuiti al cluster dei TER. Questa erronea attribuzione è probabilmente dovuta ad un'eccessiva presenza di alleli nulli per questi soggetti.

Figura 5. Analisi fattoriale delle componenti. Plot dei primi tre fattori principali.



colore blu: TCB; giallo: TER; grigio: THY.

Questo tipo di analisi è stata riportata anche in uno studio effettuato da Mock (et al., 2004) per studiare l'entità di variazione genetica che ha interessato il *Meleagris Gallopavo silvestris* in seguito a tre grandi migrazioni. Le popolazioni considerate erano cinque, ma, nonostante la differente localizzazione geografica, mostravano da bassi a moderati livelli di diversità genetica.

La tabella 8 esprime in forma numerica la perdita o guadagno di diversità genetica nel caso una popolazione venga eliminata dall'analisi. La variazione sopra menzionata viene scomposta in due fattori che tengono conto rispettivamente della quota di variabilità dovuta alle differenze dei soggetti entro razza (diversità interna) e della quota dovuta alla differenziazione tra le razze o gruppi (distanza media). Sia TER che TCB mostrano valori positivi di diversità interna e valori negativi per la distanza media, ma mentre per TCB la distanza media compensa la diversità media mostrando una perdita netta se questa razza fosse esclusa dal piano di conservazione, questo non accade per TER, la cui esclusione porterebbe ad un guadagno. Questa analisi è un'altra conferma della bassa quota di variabilità genetica incorporata in questa razza.

Tabella 8. Guadagno/perdita di diversità genetica

Razza	GD	Diversità interna	Distanza media	Perdita/guadagno
TCB	0,432	+4,953	-7,498	-2,545
TER	0,474	+9,123	-2,179	+6,944
THY	0,358	-10,566	-8,693	-19,260

4.4 Struttura di popolazione

La struttura di popolazione delle tre razze analizzate è stata studiata usando il software STRUCTURE v.2.3.3. e prevede l'assegnazione di un soggetto ad un gruppo sulla base di un modello statistico di tipo "admixture" con frequenze alleliche correlate. Il numero di gruppi (K) che meglio rappresenta la popolazione in esame è stato calcolato utilizzando una specifica metodica (grafico 2). Il valore ottenuto, pari a tre, ben si accorda alle aspettative, in quanto sono tre i tipi genetici di tacchino analizzati. Un valore superiore avrebbe comportato la presenza di sottogruppi/sottopopolazioni ed una disomogeneità che mal si sarebbe accordata con i risultati sperimentali riportati nei paragrafi precedenti.

Il grafico quindi conferma la netta differenziazione tra le razze analizzate e, a parte al caso di pochi soggetti TER erroneamente attribuiti a TCB, una spiccata omogeneità dei soggetti entro razza.

La struttura genetica osservata per i tacchini, risulta simile a quella misurate per le altre razze locali coinvolte nel progetto di conservazione, in particolare le razze di pollo (Zanetti et al., 2011). La marcata differenziazione visibile tra le razze e la spiccata omogeneità genetica dei soggetti, entro razza, allevati nei diversi centri di conservazione della regione che aderiscono al progetto Bionet, è diretta conseguenza del piano di gestione degli accoppiamenti che mira a mantenere in purezza le razze locali e alla modesta selezione fenotipica atta a mantenere gli standard di razza.

Grafico 2. Calcolo K più probabile (metodo Evanno)

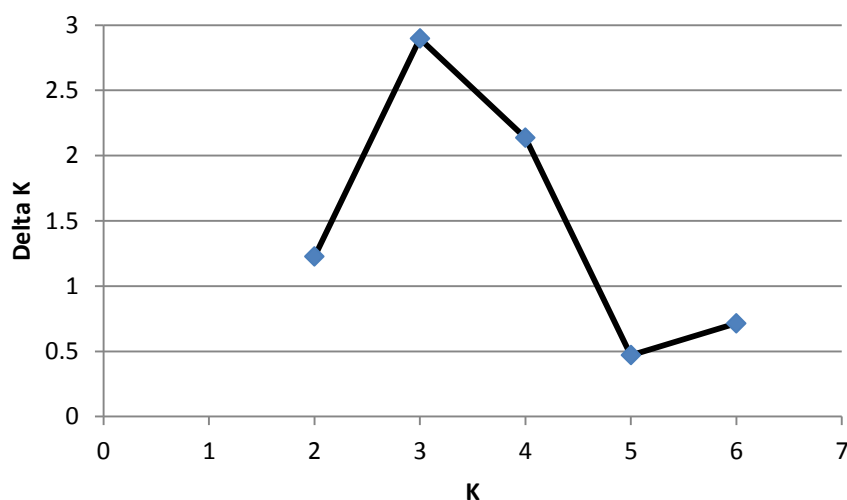
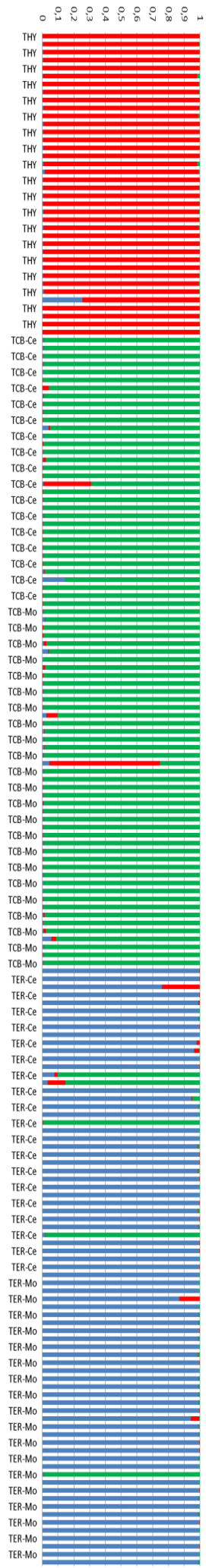


Grafico 3. Bar-plot delle assegnazioni individuali ottenute col software STRUCTURE per K=3. THY: tacchino ibrido; TER-Ce/TER-Mo: tacchino Ermellinato di Rovigo conservato a Ceregnano/Montebelluna; TCB-Ce/TCB-Mo: tacchino Comune Bronzato conservato a Ceregnano/Montebelluna.



5. CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi, che riguarda la caratterizzazione genetica e la struttura di popolazione di due razze venete di tacchino coinvolte in un progetto di conservazione *in-situ*, ha permesso di quantificare la variazione genetica nelle razze Tacchino Ermellino di Rovigo e Comune Bronzato, utilizzando sedici marcatori microsatellite. Le informazioni ottenute riguardo polimorfismo dei marcatori, all'eterozigosità attese ed osservate, alle distanze genetiche e agli indici di differenziazione e alla struttura di popolazione, hanno per la prima volta permesso di ottenere, oltre che ad una panoramica sulla genetica di queste popolazioni, informazioni molto importanti per un corretto monitoraggio del piano di conservazione.

I bassi livelli di eterozigosità rilevati, uniti agli alti coefficienti di inbreeding e di coancestry molecolare stimati, evidenziano la necessità di apportare alcune manovre correttive al piano di riproduzione, in special modo per quanto concerne la razza Ermellino di Rovigo.

Le correzioni da apportare al piano di conservazione potrebbero riguardare l'aumento delle famiglie, e cioè dei gruppi di riproduttori maschi che a turno vengono introdotti tra le femmine per la fecondazione. Il numero attuale di famiglie, attualmente pari a due, potrebbe essere aumentato a tre o quattro, compatibilmente alla possibilità di gestione appropriata da parte degli enti preposti alla conservazione. Da valutare è anche l'allungamento dell'intervallo generazionale che potrebbe essere prolungato da uno a due anni; in questo modo l'eventuale diminuzione di variabilità genetica potrebbe essere semplicemente e significativamente rallentato.

Un'altra soluzione può prevedere l'introduzione di nuovi soggetti non imparentati dall'esterno, sebbene non risulti semplice trovare individui corrispondenti agli standard di razza presso allevatori od hobbisti del Veneto o delle regioni limitrofe.

Un'ultima strategia per massimizzare la variabilità già presente all'interno delle razze in esame potrebbe prevedere un pre-screening a livello genetico di tutti i candidati riproduttori, scegliendo coloro i quali possano garantire il mantenimento della diversità allelica.

6. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il professore Martino Cassandro, per avermi dato l'opportunità di seguire, con la mia tesi di laurea, questo progetto. Il dottore Enrico Zanetti e la dottoressa Giulia Rossi per avermi assistito, insegnato e consigliato durante questi mesi di preparazione. La mia famiglia e gli amici più cari per il sostegno ricevuto in questi anni.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, S. Animal genetic resources and sustainable livelihoods *Ecological Economics* Volume 45, Issue 3, 2003, pp 331-339 Valuing Animal Genetic Resources.
2. Barcaccia G., Falcinelli M. 2006. *Genetica e Genomica*. Liguori editore, Vol III, pp 1048-1062
3. Boone M.D., Rhodes O.E., 1996. Genetic structure among subpopulations of the Eastern Wild Turkey (*Meleagris gallopavo silvestris*). *American Midland Naturalist*, vol. 135, pp 168-171
4. Brochure Veneto Agricoltura.
<http://www.venetoagricoltura.org/upload/File/sperimentazione/scheda%20avicoli.pdf>
5. Caballero A., and Toro M. A.. 2002. Analysis of genetic diversity or the management of conserved subdivided populations. *Conserv. Genet.* 3:289-299.
6. Cassandro M., De Marchi M., Targhetta C., Dalvit C., Ramanzin M., Baruchello M.. 2004. An in-situ marker-assisted conservation scheme of 11 Italian avian breeds.
7. Cavalchini Guidoboni L., 1983. Il tacchino, allevamento, incubazione, patologia. *Edagricole*, pp 11-16, 27-33.
8. Chaves L.D. Harry D.E., Reed K.M., 2009. Genome-wide genetic diversity of 'Nici', the DNA source for the CHORI-260 turkey BAC library and candidate for whole genome sequencing. University of Minnesota, USA
9. Cornoldi G., 1965. Il tacchino, tecniche moderne di allevamento e di commercializzazione. *Edagricole*, pp 21-27, 54.
10. DAD-IS. 2006. Domestic Animal Diversity Information System. FAO
11. Decisione del Consiglio 93/626/CE, del 25 ottobre 1993, relativa alla conclusione della Convenzione sulla diversità biologica. Convenzione di Rio de Janeiro sulla diversità biologica.
12. Diamond, J. 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418:700-707.

13. E. Zanetti, M. De Marchi, M. Abbadì and M. Cassandro. Variation of genetic diversity over time in local Italian chicken breeds undergoing in situ conservation. 2011. Poultry Science Volume 90, Issue 10 Pp. 2195-2201
14. Evanno G., Regnaut S. and Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study (2005) Molecular Ecology 14, 2611–2620.
15. FAO. 1992. The New World Screw Worm Eradication Programme. Rome.
16. FAO. 2000. World Watch List for Domestic Animal Diversity, third ed. FAO, Rome.
17. FAO. Roma, 2007. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture, edito da Barbara Rischkowsky e Dafydd Pilling.
18. Hammond K., Leitch HW, 1996. The FAO global program for the management of farm animal genetic resources
19. Hammond, K. 1996. The status of global farm animal genetic resources. In: Proceedings of the Symposium on the Economics of Valuation and Conservation of Genetic Resources for Agriculture, Centre for International Studies on Economic Growth, Tor Vergata University, Rome , 13-15 May.
20. Latch E.K., Smith E.J., Rhodes O.E., 2002. Isolation and characterization of microsatellite loci in wild and domestic turkeys (*Meleagris gallopavo*). Molecular Ecology Notes 2, 176-178
21. Maretto F, Cassandro M. Genotipizzazione Tacchini Romagnoli. Relazione tecnica 4 Sett. 2013. DAFNAE Università di Padova
22. Mignon-Grasteau, S., Boissy, A., Bouix, J., Faure, J.-M., Fisher, A.D., Hinch, G.N., Jense, P., Le Neindre, P., Mormede, P., Prunet, P., Van de Putte, M., Beaumont, C. 2005. Genetic of adaptation and domestication in livestock. Livestock Production Science, 93(1):3-14.
23. Mock K.E., Latch E.K., Rhodes O.E. Jr. 2004. Assessing losses of genetic diversity due to translocation: long-term case histories in Merriam's turkey (*Meleagris gallopavo merriami*). Conservation genetics 5: 631-645
24. Mock K.E., Theimer T.C., Rhodes E., Greenberg D.L., Keim P. 2002. Genetic variation across the historical range of the wild turkey (*Meleagris gallopavo*). Molecular Ecology 11, 643-647

25. Muir W. M., Aggrey S. E. 2003. Poultry Genetics, Breeding and Biotechnology. Cambridge, USA
26. Rege, J.E.O., Gibson, J.P. 2003. Animal genetic resources and economic development: issue in relation to economic valuation. *Ecological Economics* 45, 319-330.
27. Relazione della Commissione al Parlamento Europeo, al Consiglio e al Comitato Economico e Sociale Europeo, “Risorse genetiche in agricoltura - dalla conservazione all’uso sostenibile” . Bruxelles, 28 novembre 2013
28. Ruane, J. 1999. In: Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources. J.K. Oldenbroek ed. DLO insitute for Animal Science and Health. The Netherlands, pp 59-73.
29. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
30. Ugo, C. Aghina, S. Maletto, 1985. 100 norme pratiche per allevare tacchini, polli e faraone. pp 16-18, 54.
31. Veneto Agricoltura, progetto BIONET.
http://www.venetoagricoltura.org/upload/File/erbacee_bollettino/Verbale%20WP4%20del%2001_10_2013.pdf
32. Veneto Agricoltura, progetto Co.Va.
<http://www.venetoagricoltura.org/basic.php?ID=361>