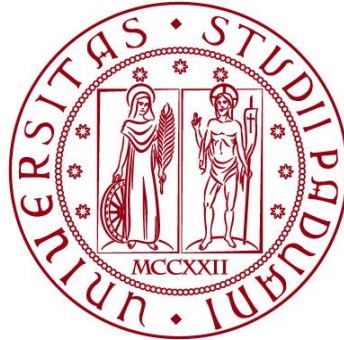


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**LA TRASCRIPTOMICA DEL PAESAGGIO PER STUDIARE
L'IMPATTO DEI CAMBIAMENTI CLIMATICI SUGLI
ORGANISMI**

**Tutor: Prof.ssa Chiara Papetti
Dipartimento di Biologia**

Laureando: Michele Sonara

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

Introduzione	1
Capitolo 1: La trascrittomico del paesaggio	3
1.1 Concetti base	3
1.2 Obiettivi e peculiarità	3
1.3 Criticità e soluzioni	5
1.3.1 Variabili confondenti nel campionamento	5
1.3.2 Scale temporali di espressione genica.....	6
1.3.3 Risposte tessuto-specifiche	7
Capitolo 2: Condurre uno studio di trascrittomico del paesaggio	8
Capitolo 3: Studiare l'impatto dei cambiamenti climatici	13
3.1 Risposta agli stress	13
3.2 Conservazione	15
Capitolo 4: Studi sui coralli	16
4.1 I coralli come specie chiave per la conservazione	16
4.2 Studio sulla tolleranza termica dei coralli	17
4.2.1 Svolgimento dello studio	17
4.2.2 Analisi dell'acclimatamento.....	19
4.2.3 Analisi dell'adattamento.....	20
4.2.4 Migrazione assistita per il ripristino delle barriere coralline.....	21
Conclusione	22
Bibliografia	24

Introduzione

Negli ultimi decenni, è stato possibile correlare meccanismi ecologici su piccola scala a processi biologici su larga scala sviluppando nuovi campi di ricerca ecologica grazie ai progressi in ambito computazionale, statistico, del telerilevamento e della biologia molecolare ad alto rendimento (Keagy et al., 2023). In particolare, due decenni fa, sono state poste le basi della genetica del paesaggio con la pubblicazione di Manel et al. (2003). Grazie all'integrazione di marcatori genetici, si è sviluppata successivamente la genomica del paesaggio (Keagy et al., 2023). Da allora, strumenti e tecnologie di sequenziamento si sono sviluppati molto velocemente fino a consentire l'analisi delle variazioni di sequenza in tutto il genoma (Keagy et al., 2023). Questi progressi hanno permesso la scoperta dei meccanismi molecolari alla base delle risposte ecologiche ed evolutive in organismi modello e non (Keagy et al., 2023).

Negli anni, *review* come quella di Forester et al. (2021) hanno valutato l'utilizzo di altri approcci omici per poter tenere in considerazione aspetti diversi dalla sola variazione della sequenza di DNA (Keagy et al., 2023). All'interno di questo elaborato sono trattate le peculiarità dell'approccio trascrittomico.

Il termine "*landscape transcriptomics*", ossia "trascrittomica del paesaggio", viene utilizzato per la prima volta da Hansen (2010) ma, successivamente, si è continuato a riferirsi alla disciplina solo indirettamente. Nella *review* di Keagy et al. (2023), è stata esplicitata la necessità di utilizzare il termine "trascrittomica del paesaggio" separatamente dalle discipline adiacenti, date le peculiarità dell'uso della trascrittomica in contesti paesaggistici.

La trascrittomica del paesaggio è un campo di ricerca emergente che integra concetti di ecologia del paesaggio, biologia dei macrosistemi, genomica del paesaggio, ecofisiologia e trascrittomica comparativa (Keagy et al., 2023). Essa può rivelare i legami tra i processi su scala paesaggistica e la variazione genetica e fenotipica (Keagy et al., 2023). Quindi, la trascrittomica del paesaggio permette di determinare come i modelli di espressione genica in tutto il genoma colleghino la variazione ambientale nel paesaggio (ad esempio di parametri ambientali come la temperatura e l'altitudine) alle funzioni degli organismi e alla differenziazione genetica tra le popolazioni (Keagy et al., 2023).

In un contesto globale in cui il cambiamento climatico e altri disturbi antropogenici stanno accelerando, colpendo la distribuzione, la connettività e il rischio di estinzione delle specie, è necessario studiare come queste ultime rispondano ai cambiamenti ambientali (Keagy et al., 2023). La trascrittomica del paesaggio permette di comprendere le risposte degli organismi ad ambienti complessi (Keagy et al., 2023) dove, data la moltitudine di fattori di stress presenti in un paesaggio (ad esempio, temperatura, interazioni biotiche, tipo di nutrizione e presenza di contaminanti), è fondamentale campionare singoli trascrittomi delle popolazioni selvatiche, lungo diversi gradienti ambientali (Keagy et al., 2023),

affinché si possano correlare le risposte cellulari alle dinamiche di popolazione, di comunità e di ecosistema (Alvarez et al., 2015). I risultati ottenuti da questo tipo di studi possono essere utilizzati da modelli predittivi per l'integrazione di dati riguardanti la biodiversità su diverse scale spaziali (Keagy et al., 2023). Questo tipo di informazioni possono essere utilizzate per informare chi si occupa di politiche ambientali, conservazione e gestione delle risorse naturali e quindi per mitigare l'impatto dei cambiamenti climatici globali (Keagy et al., 2023).

Capitolo 1: La trascrittomico del paesaggio

1.1 Concetti base

Prima di trattare il ruolo della trascrittomico del paesaggio nella ricerca scientifica, è bene chiarire i concetti su cui si basa e da cui prende il nome questo campo di studi: “trascrittomico” e “paesaggio”.

La trascrittomico è lo studio del trascrittoma, ossia la raccolta di trascritti di RNA presenti nel tessuto di un organismo al momento del campionamento (Keagy et al., 2023).

Gli approcci trascrittomici contemporanei utilizzano tecnologie di sequenziamento ad alto rendimento per ottenere dati di sequenza che vengono convertiti in dati quantitativi di espressione genica (Keagy et al., 2023). A partire da questi dati, tramite le differenze di sequenza che riflettono le risposte alla selezione passata, si può capire come si è evoluto il genoma e, attraverso le differenze di identità e intensità di espressione genica che riflettono esperienze pregresse e condizioni attuali, si possono ottenere informazioni su presente e passato degli organismi (Keagy et al., 2023).

L'espressione genica è il primo fenotipo, il precursore di tutte le altre variazioni fenotipiche (Keagy, et al., 2023). Quindi, i trascrittomi forniscono un'opportunità unica per stabilire legami tra la variazione genetica funzionale e la risposta fenotipica, specialmente in un contesto di eterogeneità ambientale, temporale e spaziale (Keagy et al., 2023).

Il termine “*landscape*”, ossia “paesaggio”, è spesso inteso per indicare aree geografiche molto grandi, ad esempio continentali (Keagy et al., 2023). Tuttavia, in ambito di ecologia del paesaggio, i paesaggi possono essere definiti in riferimento all'eterogeneità spaziale piuttosto che alla distanza geografica fisica in sé (Balkenhol et al., 2017). Quindi, la scala spaziale da considerare può dipendere dalla dimensione del corpo e dalla capacità di dispersione dell'organismo oggetto di studio (Keagy et al., 2023).

Ad esempio, un'area boschiva di 1km² può non costituire un paesaggio per un grande animale che spostandosi può non sperimentare un'elevata eterogeneità ambientale (Keagy et al., 2023). Invece, questa stessa area può risultare come un paesaggio per un piccolo animale, dato che anche piccole caratteristiche del territorio, come rocce e tronchi, alterano le condizioni del loro microambiente locale (ad esempio, temperatura, luce, umidità) fornendo dei gradienti ambientali paragonabili a quelli su macro-scala latitudinale ed altitudinale (Keagy et al., 2023).

1.2 Obiettivi e peculiarità

La trascrittomico del paesaggio ha il potenziale di trasformare il modo in cui approcciamo l'ecologia, l'evoluzione e la conservazione perché fornisce una

ricchezza di informazioni uniche riguardo le risposte delle popolazioni ai processi su livello paesaggistico, rispetto a genomica, proteomica e metabolomica (Keagy et al., 2023). Infatti, tramite la raccolta di trascritti si possono ottenere informazioni sulle differenze tra le popolazioni presenti in un paesaggio, come la variazione di espressione genica e delle reti geniche (dedotte dalla correlazione tra l'espressione di diversi geni) o le variazioni di una sequenza (Keagy et al., 2023).

La trascrittomica del paesaggio integra la genomica funzionale e l'ecofisiologia ai contesti ecologici e spaziali dell'ecologia del paesaggio per studiare la base delle risposte ai fattori ambientali, sia a breve che a lungo termine (Keagy et al., 2023).

Le interazioni tra fattori biotici, fattori abiotici e modelli di espressione genica sono complesse perché i fattori abiotici (come le condizioni atmosferiche, la struttura dell'habitat e la presenza di contaminanti) modellano la distribuzione delle popolazioni, mentre i fattori biotici (come la disponibilità di cibo e la presenza di predatori, concorrenti e malattie) sono associati spesso alle caratteristiche del paesaggio (Keagy et al., 2023). Quindi, condurre degli studi che identifichino l'espressione genica differenziale, i gruppi funzionali di geni e le reti di coespressione diventa necessario perché permette di comprendere i meccanismi molecolari alla base della risposta fisiologica su una scala di biodiversità maggiore, sia nello spazio che nel tempo (Whitham et al., 2006).

L'approccio trascrittomico allo studio del paesaggio comporta il campionamento in molteplici posizioni nello spazio considerato (Keagy et al., 2023). Possiamo dedurre se i geni vengono espressi in base all'habitat, al sito di campionamento (di solito si confrontano coppie di siti di campionamento), alla popolazione o a nessuna di queste categorie utilizzando un modello statistico in cui l'espressione genica è predetta basandosi sull'ambiente, sui siti di campionamento e sull'interazione tra i due, considerando l'identità della popolazione fissa o come effetto casuale (Keagy et al., 2023). Una volta effettuato il campionamento su vari gradienti ambientali, se si osserva una relazione tra la variazione ambientale principale e l'espressione genica, significa che l'espressione genica in questione dipende dal fattore ambientale di interesse (Keagy et al., 2023).

Date queste caratteristiche, la trascrittomica del paesaggio permette di trovare l'effetto statistico principale causato dall'ambiente evitando genotipi e ambienti confondenti, specialmente quando gli individui all'interno dei siti di campionamento sono strettamente correlati (Keagy et al., 2023). Grazie a questi studi, si può comprendere quali geni condividano funzioni simili e se i cambiamenti nell'intero trascrittoma generino risposte fisiologiche all'ambiente (Keagy et al., 2023). Inoltre, si può rilevare se le associazioni tra espressione genica e variazione ambientale siano attribuibili a tutto il trascrittoma, suggerendo un ampio *range* di fenotipi che rispondono, oppure conferibile ad una sola parte del trascrittoma,

suggerendo che soltanto uno specifico sottoinsieme di tratti risponda (Keagy et al., 2023).

1.3 Criticità e soluzioni

La trascrittómica presenta alcune sfide distinte rispetto alle altre discipline omiche applicate a studi sul paesaggio (Keagy et al., 2023). Di seguito sono riportate le problematiche legate agli studi di trascrittómica del paesaggio.

1.3.1 Variabili confondenti nel campionamento

Quando si conducono studi di trascrittómica del paesaggio si devono affrontare sfide riguardo la raccolta, l'analisi e l'interpretazione dei dati trascrittomici estrapolati da campionamenti in ambiente naturale (Keagy et al., 2023).

La stocasticità ambientale è un problema quando si usano i trascritti come bioindicatori e quando si vuole identificare come i trascrittomi variano in condizioni specifiche, quali condizioni ambientali alterino più spesso i trascrittomi e quali geni siano coinvolti nei fenotipi adattivi (Keagy et al., 2023).

Inoltre, la selezione casuale di individui dall'ambiente può essere influenzata da numerose variabili, talvolta sconosciute (Keagy et al., 2023). Il trascrittoma di un dato organismo può variare a causa di fattori diversi dai fattori ambientali e, per la maggior parte degli organismi, è poco compreso come cambia la variazione dei singoli trascrittomi in risposta alla variazione ambientale, sia in periodi temporali brevi che lunghi (Keagy et al., 2023). Diversi fattori possono generare notevoli variazioni nell'espressione genica che possono rendere difficile separare le risposte trascrittomiche all'ambiente da quelle di altre fonti di variazione individuale (Keagy et al., 2023). Ad esempio, i ritmi circadiani possono avere una grande influenza sui profili di trascrizione e l'età dello sviluppo, il sesso, lo stato riproduttivo e la condizione immunitaria possono influenzare i modelli di trascrizione (Keagy et al., 2023).

Una soluzione parziale alle complicazioni appena riportate è il controllo statistico, che consiste nel registrare e includere molti dati sulle potenziali variabili confondenti (ad esempio, le condizioni atmosferiche, se non sono l'obiettivo dello studio) e cercare di controllare le variabili esterne durante il campionamento (Keagy et al., 2023). Questo approccio richiede un aumento della dimensione del campione e quindi un aumento dei costi in termini di tempo e denaro, ma lo studio nel complesso rimane attuabile economicamente dato che il costo del sequenziamento continua a diminuire (Keagy et al., 2023).

Un altro problema deriva dal fatto che le popolazioni possono variare in quanto a risposta trascrizionale, rendendo a volte difficile la rilevazione della risposta media all'ambiente della popolazione (Keagy et al., 2023).

Una possibile soluzione può essere quella di avere una buona replica di campioni nei diversi ambienti del paesaggio in analisi (Keagy et al., 2023). La genetica quantitativa ha dimostrato che, in base alla specifica domanda di ricerca, vi sono compromessi tra aumentare il numero di famiglie di individui campionate o quello di individui campionati all'interno delle famiglie (Keagy et al., 2023). Per esempio, se la domanda che ci si pone riguarda i geni la cui espressione è influenzata principalmente da una variabile del paesaggio, allora il numero di siti di campionamento dovrebbe essere prioritario rispetto a quello degli individui nei singoli siti (Keagy et al., 2023). In opposizione, se l'interesse è principalmente nella variazione di espressione genica all'interno dei siti, l'approccio migliore risulta quello contrario (Keagy et al., 2023). L'utilizzo di simulazioni può aiutare a scegliere quale metodo utilizzare (Wagner et al., 2016).

Per motivi di comodità, il raggruppamento dei campioni è una pratica comune, specialmente per piccoli organismi o tessuti, ma risulta critico per l'analisi dei risultati in quanto amplifica le differenze medie tra le popolazioni e minimizza le variazioni tra individui (Keagy et al., 2023).

1.3.2 Scale temporali di espressione genica

Il tempo di espressione di ogni gene può variare, tanto che un gene può influenzare l'espressione degli altri gradualmente, andando a formare una rete genica (Keagy et al., 2023). Pertanto, i *pattern* di espressione genica rilevati possono essere condizionati da campionamenti eseguiti durante una situazione di stress ambientale (Keagy et al., 2023).

Per rispondere ai cambiamenti ambientali nel tempo, la maggior parte degli organismi ha sviluppato dei ritmi biologici che riguardano il comportamento, i processi fisiologici e la regolazione dell'espressione genica (Keagy et al., 2023). Ad esempio, i ritmi circadiani scandiscono l'espressione genica in modo ampiamente diffuso tra i taxa degli eucarioti, sia unicellulari che pluricellulari, e sono particolarmente importanti per le specie sessili (Keagy et al., 2023). Inoltre, i ritmi circadiani possono interagire con altri tipi di ritmi che coinvolgono l'espressione genica, come quello scandito dalla frequenza delle maree (Connor & Gracey, 2011). Ad esempio, i coralli di barriera sono noti per modulare l'espressione di migliaia di geni in risposta ai ritmi circadiani ma anche alla temperatura stagionale, e al ciclo lunare (Wuitchik et al., 2019).

Tra le soluzioni possibili a queste complicazioni vi è quella di progettare esperimenti che considerino un'ampia scala temporale e anche i cambiamenti ambientali nel tempo che potrebbero non essere gli stessi tra le regioni geografiche studiate, a causa della fenologia o di fenomeni come le maree (Keagy et al., 2023). In alternativa, una strategia può essere quella di scegliere un determinato momento e una singola fase dello sviluppo per le singole analisi (Keagy et al., 2023).

1.3.3 Risposte tessuto-specifiche

Negli studi di trascrittomica del paesaggio che coinvolgono organismi multicellulari, una fase delicata è la scelta dei tessuti perché diversi tessuti esprimono diversi set di geni, e a diversi livelli, a causa delle loro differenze metaboliche, fisiologiche e ambientali (Keagy et al., 2023). Tra le popolazioni, le differenze specifiche dei tessuti nell'espressione genica possono essere importanti e possono variare (Keagy et al., 2023). All'interno di un singolo organo, sono le differenze tra i tipi cellulari del tessuto ad essere sostanziali (Keagy et al., 2023).

Per i primi stadi di vita o per organismi piccoli (ad esempio, artropodi, avannotti e semi), gli studi trascrittomici hanno spesso omogeneizzato l'intero organismo o addirittura aggregato individui diversi per ragioni pratiche. Tuttavia, è necessario avere un'attenta considerazione del tessuto scelto e riconoscere i limiti che la scelta fatta comporta a livello dei risultati (Keagy et al., 2023).

Capitolo 2: Condurre uno studio di trascrittomico del paesaggio

In questo capitolo, si definisce come progettare e condurre uno studio di trascrittomico del paesaggio.

1. Definire lo studio

Inizialmente si devono determinare le domande e le priorità dello studio, ponendo particolare attenzione al potere statistico necessario per gestire la possibile varianza elevata dell'espressione genica (Keagy et al., 2023).

Prima di prendere decisioni di campionamento, deve essere considerata attentamente l'analisi statistica prevista (Keagy et al., 2023).

2. Campionamento sul campo

Campionare in repliche di transetti o selezionando siti in coppia conferisce una varianza più controllata rispetto ad una progettazione casuale, che può portare a variabili ambientali interdipendenti (Keagy et al., 2023).

Il *pooling*, ossia il raggruppamento di campioni, può essere considerato come opzione ma la sua utilità è fonte di disaccordo in letteratura (Keagy et al., 2023).

Il *pooling* consente di accedere ad una maggiore quantità di RNA, di omogeneizzare la varianza all'interno del sito e risulta una strategia economica per aumentare il numero di campionamenti delle popolazioni. Tuttavia, raggruppare i campioni non dà peso ai geni con espressione medio-bassa e, negli studi in cui la variazione individuale è importante (per esempio, quando si vogliono associare le differenze di espressione genica con le differenze di sequenza), questo è un aspetto critico (Keagy et al., 2023).

Durante il campionamento è necessario considerare fonti esterne di variazione, come la temperatura, l'umidità, l'intensità della luce o le variazioni nel tempo, così come variabili biologiche come sesso, stato riproduttivo, classe di età o stadio di sviluppo, per poi standardizzare, stratificare o registrare come *covariate* (variabili associate di interesse non primario) queste variabili (Keagy et al., 2023).

In molti casi, la trascrittomico può essere eseguita utilizzando campionamento non letale (Keagy et al., 2023). Questo è fondamentale per studi che coinvolgono specie di interesse per la conservazione, con le quali possono esserci poche alternative nel campionamento delle popolazioni selvatiche se si vuole capire l'evoluzione dei fenotipi adattivi e la risposta agli stress (Keagy et al., 2023).

In aggiunta, utilizzare un metodo di campionamento che assicura una rapida stabilizzazione dei campioni di tessuto evita cambiamenti nella trascrizione dovuti allo stress di raccolta e gestione (Keagy et al., 2023).

3. Estrazione dell'RNA

La procedura estrazione di RNA ideale dipende dal tessuto e dalla quantità e qualità di conservazione del campione (Keagy et al., 2023). Poiché la trascrittoma del paesaggio tende a coinvolgere molti campioni, per non confondere errori tecnici con altre fonti di variazione sarà necessaria un'adeguata randomizzazione dei campioni di ogni gruppo di estrazione (Keagy et al., 2023). Ci sono diverse classi di molecole di RNA di potenziale interesse che possono essere analizzate con tecniche diverse: mRNA (RNA messaggeri), che sono tipicamente trascritti in proteine, e vari smallRNA come miRNA, piRNA e siRNA (Chen & Rechavi, 2022), coinvolti spesso nella regolazione dei geni (Keagy et al., 2023).

4. Creazione di una libreria di sequenze

Per generare una libreria di sequenze è necessario scegliere quale tecnica di sequenziamento dell'RNA utilizzare (Keagy et al., 2023). Tra questi, il metodo di sequenziamento RNAseq, detto *whole transcript*, assegna più letture ai trascritti più lunghi, mentre il metodo 3' RNAseq, assegna un numero approssimativamente uguale di letture ai trascritti indipendentemente dalla loro lunghezza (Ma et al., 2019). Il metodo 3' rileva più trascritti brevi mentre il metodo *whole transcript* rileva un numero maggiore di geni espressi differenzialmente, indipendentemente dalla *sequencing depth* (Ma et al., 2019), cioè il numero di volte che una base o una regione del genoma viene letta durante il sequenziamento.

Considerare la misura della *sequencing depth* è importante, in quanto una maggiore *depth* consente di registrare più precisamente i geni con minore espressione, nonché di fare deduzioni più accurate riguardo l'espressione dei geni, ma ad un costo maggiore che può indurre a sacrificare il numero di campionamenti da confrontare (Keagy et al., 2023). La scelta della *sequencing depth* può essere guidata dopo uno studio pilota iniziale mediante campionamento ridotto e *in silico* (Keagy et al., 2023).

Le tecniche per generare librerie di sequenze stanno migliorando molto (Stark et al., 2019). A dimostrazione di ciò, il costo della preparazione e del sequenziamento della libreria RNAseq è diminuito a meno di 200\$ per campione, e gli approcci di 3' *sequencing* consentono di preparare e sequenziare la libreria di campioni per meno di 100\$ per campione, con prezzi che continuano a scendere (Keagy et al., 2023). Pertanto, ora è economicamente fattibile condurre un campionamento di trascrittomi su larga scala, tipicamente centinaia di individui (Keagy et al., 2023).

5. Indagine bioinformatica

a. Conteggio dei trascritti

Diverse pubblicazioni, come quella di Chung et al. (2021), hanno confrontato le varie opzioni possibili per il conteggio dei geni trascritti

(Keagy et al., 2023). La disponibilità di un trascrittoma o un genoma di riferimento determina quale strumento utilizzare tanto che, in assenza di un trascrittoma di riferimento, si può assemblarne uno *de novo* dai dati (Keagy et al., 2023). In ogni caso, si deve controllare che il riferimento rappresenti adeguatamente la variazione della popolazione, in modo che il conteggio non sovrastimi la divergenza della sequenza da quella di riferimento (Keagy et al., 2023).

b. Analisi statistica

I dati di espressione genica raccolti in replica, lungo diversi gradienti ambientali, possono essere modellizzati statisticamente come l'espressione genetica prevista dagli effetti fissi della variabile ambientale di interesse, dalla replica del gradiente ambientale considerata e dall'interazione tra i due (Keagy et al., 2023). Si possono considerare ulteriori effetti fissi per incorporare covarianti ed ulteriori effetti casuali per incorporare altre fonti di varianza (Keagy et al., 2023). Questo modello si complica se vengono implementate misure ripetute di popolazioni o individui campionati in molteplici punti nel tempo (Keagy et al., 2023).

Gli studi trascrittomici sperimentali di solito coinvolgono lo studio di pochi fattori, spesso uno o due, su pochi livelli e con matrici modello relativamente semplici (Keagy et al., 2023). Dato il piccolo numero di repliche biologiche, specialmente in relazione al numero di geni quantificati, le analisi di espressione genica stimano la varianza genica utilizzando i dati per tutti o la maggior parte dei geni (Todd et al., 2016).

Gli attuali pacchetti statistici per l'analisi dei dati di espressione genica più popolari funzionano in modo simile ma differiscono nei dettagli (Keagy et al., 2023), e sono DESeq2 (Love et al., 2014), edgeR (Robinson et al., 2010) e lima-voom (Law et al., 2014). Oggi, si possono normalizzare i dati utilizzando un qualsiasi pacchetto di analisi dell'espressione genica anche se è richiesto un intenso lavoro computazionale (Keagy et al., 2023). Quindi, l'accesso a un *cluster* di calcolo ad alte prestazioni è utile (Keagy et al., 2023).

Il fatto che il livello di espressione di un gene sia spesso correlato al livello di espressione di altri geni è una caratteristica dei dati sull'espressione genica da considerare (Keagy et al., 2023). Un approccio comune per spiegare ed esplorare la rilevanza funzionale di questa coespressione è quello di unire i geni in gruppi basati su modelli di espressione correlati (Keagy et al., 2023). Nel caso specifico della trascrittomica del paesaggio, un'analisi univariata *gene-by-gene* o *module-by-module* è un buon punto di partenza (Keagy et al., 2023). Tuttavia, approcci di modellazione più flessibili possono essere vantaggiosi per gestire le complesse strutture di dati risultanti dal campionamento di organismi nel tempo su ampie dimensioni spaziali (Keagy et al., 2023). In particolare, l'uso di modelli statistici multivariati che

tengano conto della dipendenza tra i geni e delle potenziali dipendenze spaziotemporali o genetiche è vantaggioso (Keagy et al., 2023). La GJAM, *Generalized Joint Attribute Modelling* di Clark et al. (2017) può essere un approccio utile per i dati di trascrittomico del paesaggio (Keagy et al., 2023).

c. Interpretazione funzionale

Dopo che i geni sono stati identificati nell'analisi statistica, si deve caratterizzare la loro funzione potenziale utilizzando annotazioni geniche e spesso sono necessari termini di ontologia genica per collegare il cambiamento dell'espressione genica con un potenziale effetto fenotipico (Keagy et al., 2023). Tuttavia, i database di ontologia genica sono spesso sottosviluppati per i sistemi non modello (Courtier-Orgozo et al., 2020).

d. Considerare altri dati omici

L'integrazione dei dati trascrittomici con i dati di sequenziamento dell'intero genoma permette di valutare i segni lasciati dalla selezione sui geni o su ipotetiche regioni di regolazione dei geni. Inoltre, permette di considerare gli eQTL (*Expression Quantitative Trait Loci*) ossia regioni del genoma con varianti di sequenza che alterano l'espressione di un gene associato ad un tratto quantitativo (Keagy et al., 2023).

Combinare i dati trascrittomici raccolti con quelli genomici o con il resto del trascrittoma può aiutare a comprendere l'evoluzione dell'espressione genica e a caratterizzare la correlazione genetica tra individui e popolazioni aiutando ulteriormente l'interpretazione dei trascritti campionati (Keagy et al., 2023). Wray (2007) afferma che le mutazioni nelle regioni *cis*-regolatorie siano alla base dell'adattamento rispetto ai cambiamenti amminoacidici, data la dimensione minore dell'effetto e una ridotta probabilità di pleiotropia negativa. Tuttavia, vi è spesso un sostanziale flusso genico attraverso diversi paesaggi che può oscurare alcuni alleli localmente adattivi ma con effetti irrisori (Keagy et al., 2023). Questo suggerisce che solo le varianti con effetto maggiore sono mantenute in modo stabile (Yeaman & Whitlock, 2011). In questo caso, l'espressione può alternativamente evolvere a causa di cambiamenti nei regolatori, cioè mutazioni *trans* (Keagy et al., 2023).

Inoltre, i dati trascrittomici potrebbero essere abbinati a informazioni sull'accessibilità della cromatina (ad esempio, ATACseq, *Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing*) o sulla metilazione per comprendere la regolazione ambientale dell'espressione genica (Keagy et al., 2023).

6. Possibili esperimenti aggiuntivi

Per testare le ipotesi generate dallo studio possono essere utilizzati ulteriori esperimenti (Keagy et al., 2023). Ad esempio, è possibile determinare se l'apparente $G \times E$ (l'interazione tra il genotipo e l'ambiente quando il genotipo

cambia a seconda di come variano i tratti nell'ambiente) abbia spiegazioni alternative: come una correlazione tra il genotipo e l'ambiente che genera associazioni genetiche false con i fenotipi responsivi all'ambiente dovuta a dei genotipi segregati in ambienti particolari all'interno delle repliche dei campionamenti (Saltz et al., 2018). In particolare, si potrebbero portare gruppi di individui in laboratorio per fare dei confronti controllati, anche se gli esperimenti controllati in laboratorio o mesocosmo sono spesso limitati a trattamenti che potrebbero ignorare importanti fattori ambientali causali o interattivi (Keagy et al., 2023). La trascrittomico del paesaggio comporta la raccolta di campioni lungo diversi ambienti, dove si rivelano geni espressi solo in condizioni naturali; tuttavia, l'interpretazione dei risultati può essere complicata a causa della natura multivariata degli ambienti e della mancanza di gruppi di controllo e di vere repliche di individui e ambienti (Keagy et al., 2023). Quindi l'integrazione di studi di trascrittomico su paesaggi naturali con esperimenti controllati (in campo, laboratorio o mesocosmo) può fornire un approccio potente per ottenere migliori risultati che considerano molteplici aspetti ambientali, spesso correlati, in particolare quando ci si pone domande relative alla plasticità trascrizionale (Keagy et al., 2023). Ad esempio, una volta identificate le fonti ipotetiche di variazione nell'espressione genica, esperimenti successivi più controllati possono confermare ipotetici collegamenti causali tra la variazione ambientale e l'espressione del gene (Keagy et al., 2023). In laboratorio e mesocosmo ci si avvale di tecnologie come la manipolazione dell'espressione dei geni utilizzando RNAi (RNA *interference*), il trasferimento di RNA mediato da virus e la CRISPR/Cas (Keagy, et al., 2023). Questi tipi di esperimenti possono essere logisticamente più difficili rispetto all'approccio correlazionale della trascrittomico del paesaggio, ma permettono un'analisi migliore degli effetti del genotipo (G), dell'ambiente (E, *environment*) e della G×E (Keagy et al., 2023).

Capitolo 3: Studiare l'impatto dei cambiamenti climatici

Ci sono ampie prove degli impatti ecologici dei recenti cambiamenti climatici, in tutti i tipi di ambiente (Walther et al., 2002). Molti processi ecologici e fisiologici sono sensibili alle variabili climatiche come temperatura e precipitazioni (Walther et al., 2002). Le risposte biotiche ai cambiamenti climatici coprono diversi ecosistemi e gerarchie di organismi e le loro basi meccaniche sono state ben stabilite attraverso studi sperimentali sul comportamento, l'ecologia e la fisiologia di molte specie selvatiche (Walther et al., 2002). Tali studi permettono di comprendere meccanismi dettagliati mediante i quali i cambiamenti climatici influenzano la fisiologia, i tempi stagionali, la dinamica demografica e le distribuzioni geografiche degli organismi (Walther et al., 2002). Diversi casi di studio, soprattutto in ambiente marino, hanno indicato che il cambiamento climatico può rafforzare gli effetti dannosi dell'attività antropica e spingere la tolleranza agli stress delle specie e degli ecosistemi oltre i loro limiti (Walther et al., 2002). Tuttavia, la complessità delle interazioni ecologiche rende difficile estrapolare informazioni dagli studi su individui e popolazioni al livello di comunità o di ecosistema (Walther et al., 2002).

Campionare singoli trascrittomi dalle popolazioni selvatiche, lungo diversi gradienti ambientali, permette di correlare le risposte cellulari alle dinamiche di popolazione, di comunità e di ecosistema (Alvarez et al., 2015). Ciò consente di comprendere le risposte degli organismi ad ambienti dove il cambiamento climatico e le altre attività umane contribuiscono agli stress (Keagy et al., 2023). La trascrittomica del paesaggio è quindi fondamentale per attenuare gli effetti del cambiamento climatico globale a livello di specie e territorio (Keagy et al., 2023).

3.1 Risposta agli stress

Quantificare l'impatto dei potenziali stress associati ad ambienti complessi è un obiettivo fondamentale della biologia degli organismi, con implicazioni per la gestione e la conservazione delle specie. Gli stress ambientali includono fattori abiotici e biotici in ambienti naturali e mediati dall'uomo, come l'esposizione a parassiti o agenti patogeni, eventi climatici estremi, inquinanti e limitazioni nutrizionali (Killen et al., 2013). Le popolazioni possono adattarsi ai fattori di stress cambiando l'espressione genica media o la risposta trascrizionale alle fluttuazioni ambientali e questa plasticità trascrizionale può essere un tratto chiave sotto selezione, dato che sta alla base della plasticità di altri fenotipi (Keagy et al., 2023).

La trascrittomica del paesaggio fornisce un metodo efficiente per monitorare la risposta degli esemplari catturati in natura all'esposizione acuta, cronica o precedente ad uno stress o una combinazione di questi. Ad esempio, i glucocorticoidi nei vertebrati (che sono coinvolti, tra le altre cose, nella risposta allo stress) possono influenzare direttamente l'espressione genica perché i recettori dei

glucorticoidi agiscono come fattori di trascrizione per diverse reti geniche (Weikum et al., 2017).

Negli studi di trascrittomico del paesaggio, la durata dell'esposizione agli stress ambientali analizzata non deve essere così lunga da causare effetti significativi e a lungo termine sulla salute e sulla funzione dell'organismo affinché i trascrittomi possano fornire una valutazione efficace della risposta all'ambiente dell'organismo (Keagy et al., 2023). Questo perché, ad esempio, l'esposizione ad un contaminante ambientale in un certo punto della vita dell'organismo, può modificare la trascrizione e causare cambiamenti nello sviluppo, fisiologici o comportamentali, che influenzano la salute futura, la longevità e la *fitness* (Keagy et al., 2023). Tuttavia, quando questi cambiamenti si realizzano, il contaminante potrebbe non essere più rilevato nell'organismo o nell'ambiente (Sponsler et al., 2019) mentre le reti geniche alla base della risposta biologica potrebbero essere già state modificate (Keagy et al., 2023). Inoltre, l'esposizione a fattori di stress può influenzare l'espressione dei geni nelle generazioni successive, dopo che l'evento di stress in sé è terminato, attraverso diversi tipi di meccanismi (Keagy et al., 2023).

Se le risposte trascrizionali a particolari stress sono già state ben definite da lavori precedenti, la trascrittomico del paesaggio può permettere di identificare quali stress ci sono (o ci sono stati) in un particolare punto nello spazio e potenzialmente mappare questi stress in regioni geografiche ampie (Keagy et al., 2023).

Laddove il tessuto può essere campionato in modo non letale (ad esempio, nel caso di foglie, tessuto branchiale e sangue), misure ripetute di trascrittomi possono fornire la capacità di differenziare il tipo di risposta allo stress, acuta o cronica (Keagy et al., 2023). Ciò implica che, la trascrittomico del paesaggio consente di monitorare contemporaneamente l'esposizione a stress multipli e diversi (Keagy et al., 2023).

Campionare in un adeguato intervallo temporale (nel caso di un'ondata di calore ad esempio) potrebbe rivelare la plasticità dell'espressione genica (Keagy et al., 2023). Tuttavia, una parte sostanziale della risposta trascrizionale all'ambiente può essere svantaggiosa, dal punto di vista adattativo, e indicare i sintomi del fallimento nel mantenere l'omeostasi (Keagy et al., 2023). In questo caso, sono necessarie ulteriori informazioni o una comprensione del ruolo funzionale dei geni espressi differenzialmente (Keagy et al., 2023).

Grazie ad esperimenti in laboratorio, si può capire a priori cosa viene indotto da stress ambientali specifici per poi sviluppare librerie di risposte trascrizionali agli stress, valutabili rispetto alle osservazioni in natura (Keagy et al., 2023). Successivamente, queste librerie di risposte trascrizionali possono essere utilizzate per dedurre stress specifici del paesaggio in ambienti più complessi (Keagy et al., 2023). In definitiva, tale approccio permette di definire categorie funzionali di geni dal punto di vista ecologico, evitando di affidarsi solo a geni identificati in base alla funzione molecolare nota o al ruolo in un organismo modello noto (Keagy et al., 2023).

L'approccio trascrittomico può essere logisticamente più semplice di una serie di altri sistemi di monitoraggio ambientale ed è molto rilevante dal punto di vista biologico ed ecologico poiché le risposte di trascrizione riflettono un cambiamento funzionale immediato associato all'esposizione allo stress (Keagy et al., 2023). Pertanto, la trascrittomica del paesaggio identifica lo stress ambientale, quantifica la risposta dell'organismo allo stress e ci permette di valutare le conseguenze a lungo termine dell'esposizione a tale stress (Keagy et al., 2023). Quindi, le firme trascrizionali possono essere utilizzate per identificare dove concentrare le strategie di gestione e conservazione (Keagy et al., 2023).

3.2 Conservazione

La trascrittomica del paesaggio ha il potenziale di stabilire ipotesi e test per l'indagine sulla relazione tra la variazione genica funzionale e l'ambiente, permettendo di identificare le popolazioni che stanno sperimentando stress (Keagy et al., 2023). Di fatto, ricopre un ruolo fondamentale negli studi di conservazione e gestione delle specie perché permette di concentrare il lavoro dove veramente necessario (Keagy et al., 2023).

La risposta trascrizionale potrebbe identificare le varianti genetiche adattive da utilizzare in allevamento e in attività come la traslocazione (Hayes & Banish, 2017). Confrontare le popolazioni che stanno sperimentando un particolare stress permette di identificare popolazioni più resistenti che possono essere utilizzate per la migrazione assistita: ad esempio, introducendo i genotipi di una popolazione donatrice nelle popolazioni meno adattate ad un determinato ambiente (Keagy et al., 2023). Tuttavia, individuare popolazioni idonee allo spostamento è una sfida dato che solo perché una popolazione si trova attualmente in una posizione non significa che sia localmente adattata (Keagy et al., 2023). Per di più, l'ambiente dove una popolazione deve essere trasferita artificialmente può cambiare prima che lo spostamento sia completato, uscendo dal range in cui la popolazione stessa è adattata in modo ottimale (Keagy et al., 2023). Pertanto, distinguere le popolazioni che stanno sopravvivendo da quelle che stanno prosperando è fondamentale per condurre migrazioni assistite (Keagy et al., 2023).

Inoltre, considerando le risposte genomiche a un determinato stress, la trascrittomica del paesaggio può rivelare dei percorsi molecolari e fisiologici inaspettati di risposta che possono essere sfruttati per mitigare l'impatto sul paesaggio migliorandone le condizioni (Keagy et al., 2023).

Capitolo 4: Studi sui coralli

4.1 I coralli come specie chiave per la conservazione

Gli organismi marini spesso vivono in ampie aree geografiche caratterizzate da ambienti eterogenei dove le popolazioni possono sperimentare forti gradienti di temperatura, a cui rispondono in maniera significativamente diversa a seconda della loro soglia di tolleranza (Thomas et al., 2018). Perciò, in un contesto globale in cui il cambiamento climatico sta intensificando gli stress ambientali e alterando la distribuzione delle specie, comprendere i meccanismi della variazione di tolleranza termica tra individui e tra specie risulta un obiettivo urgente per la ricerca ecologica (Thomas et al., 2018).

Le barriere coralline costituiscono ecosistemi dinamici ma fragili e particolarmente vulnerabili agli impatti dei cambiamenti climatici (Thomas et al., 2018). Negli ultimi decenni, il riscaldamento delle acque oceaniche ha portato allo sbiancamento dei coralli e quindi ad un calo delle loro popolazioni a livello globale, con proiezioni di scomparsa delle barriere coralline entro il 2030-2050 (Thomas et al., 2018). Le barriere coralline si formano in luoghi soggetti a vari regimi di temperatura diversi, dove i coralli presenti in un'area geografica possono essere capaci di sopportare temperature che causano lo sbiancamento nei conspecifici di altre aree (Thomas et al., 2018). Per i coralli, la variazione naturale della tolleranza termica è un fattore chiave per la sopravvivenza ad un rapido cambiamento ambientale (Thomas et al., 2018).

I coralli di barriera possiedono delle caratteristiche che potrebbero permettere loro di sopravvivere al cambiamento climatico nel prossimo futuro (Thomas et al., 2018).

- Le popolazioni di coralli hanno generalmente grandi dimensioni effettive e alti livelli di diversità genetica (Thomas et al., 2018). Quest'ultima è un elemento chiave nell'adattamento ai cambiamenti ambientali poiché livelli più alti di diversità genetica forniscono una maggiore probabilità di ottenere combinazioni alleliche che conferiscono fenotipi vantaggiosi in un nuovo ambiente (Barrett & Schluter, 2008).
- Le specie coralline attraversano gradienti di temperatura ampi e, di conseguenza, hanno probabilmente un'abbondanza di variazione genetica nei tratti associati alla tolleranza termica (Thomas et al., 2018).
- I coralli diffondono le loro larve a grandi distanze, ciò significa che le popolazioni di coralli sono generalmente caratterizzate da alti livelli di flusso genico (Thomas et al., 2018). Quindi, lo scambio di varianti genetiche vantaggiose tra popolazioni sparse su grandi aree è elevato (Thomas et al., 2018). Inoltre, un'elevata capacità di dispersione implica un'alta capacità di colonizzazione di nuovi habitat (Thomas et al., 2018).

La perdita dei coralli potrebbe portare al crollo di interi ecosistemi (Keagy et al., 2023). Quindi, prevedere la risposta delle popolazioni di coralli ai futuri cambiamenti climatici è di primaria importanza per la conservazione delle specie marine e può essere fatto tramite studi multi-specie, multi-stress e multi-disciplinari sulla capacità dei coralli di resistere allo stress termico (Thomas et al., 2018). L'intervento sulla capacità di adattamento delle popolazioni di coralli ai cambiamenti climatici deve basarsi su una concreta comprensione dell'architettura genetica che conferisce la tolleranza termica (Bay et al., 2017).

Attualmente, sono in corso interventi di ripristino delle barriere coralline per ricostruire quelle distrutte da uragani, malattie e ondate di calore (Keagy et al., 2023). Questi lavori richiedono l'identificazione di popolazioni resistenti allo stress che possano sopportare condizioni future avverse; perciò, dato che la variazione della tolleranza termica si riflette in differenze di espressione genica, la trascrittomico del paesaggio risulta un approccio potenzialmente molto informativo (Keagy et al., 2023).

Nei seguenti paragrafi, verranno riportati i metodi e i risultati di una serie di studi di conservazione svolti in una barriera corallina delle isole Samoa. Da questi studi si evince come le popolazioni di coralli mostrino una notevole plasticità fenotipica che permette loro di far fronte ad eventi stressanti ripetuti.

4.2 Studio sulla tolleranza termica dei coralli

Lungo diverse aree nelle Samoa Americane, l'espressione genica basale è stata utilizzata per identificare i gruppi di geni dei coralli che potrebbero conferire una tolleranza futura al calore e/o il recupero dopo lo sbiancamento (Keagy et al., 2023).

Nella *review* di Thomas et al. (2018), vengono riassunti i risultati di oltre un decennio di ricerche sui meccanismi di tolleranza termica dei coralli nella barriera corallina di Ofu, nelle isole Manu'a delle Samoa Americane (Thomas et al., 2018). Questi studi si sono concentrati sul genere *Acropora* ma il tipo di distribuzione spaziale dei coralli identificata ad Ofu è simile in altre barriere coralline nel mondo: in Florida, nel centro America e in Australia occidentale (Thomas et al., 2018).

Le ricerche ad Ofu sono state condotte in un'area geografica considerabile paesaggio per le popolazioni di corallo da cui sono state ottenuti i trascritti. Quest'ultimi hanno permesso di dimostrare come la variazione nella tolleranza termica tra i coralli coinvolga centinaia di geni e derivi dalla combinazione dei processi di acclimatamento e adattamento (Thomas et al., 2018).

4.2.1 Svolgimento dello studio

Il gradiente di temperatura nella laguna di Ofu è un laboratorio naturale ideale per lo studio della tolleranza termica nei coralli (Thomas et al., 2018). La

barriera corallina lungo la costa meridionale di Ofu si trova nel Parco Nazionale delle Samoa Americane e forma una serie di pozze con più di 800 specie di coralli (Craig et al., 2001). Durante le basse maree, la barriera corallina ostacola la corrente e nelle pozze di marea, che si formano nella zona della barriera detta *back-reef*, l'acqua diventa stagnante e si riscalda (Thomas et al., 2018). Con l'alta marea, le pozze poi si risciacquano e di conseguenza, i coralli sono esposti ad ampie fluttuazioni di temperatura e luce durante il ciclo delle maree (Thomas et al., 2018). Rispetto alle popolazioni nella zona di *fore-reef*, i coralli in queste pozze hanno livelli più alti di proteine dello stress (Barshis et al., 2010) e tassi di crescita più veloci (Smith et al, 2007).

In particolare, i lavori di ricerca analizzati da Thomas et al. (2018) riguardano due pozze di marea nella *back-reef*, a 500m di distanza tra loro e che sperimentano due gradienti di temperatura diversi. La variabilità termica è maggiore nella pozza più piccola (24.5-35°C) e minore nella pozza più grande (25-32°C), mentre in entrambe è presente una diversità di specie e una percentuale di corallo vivo simili (Craig et al, 2001).

La variazione della tolleranza termica tra le popolazioni di coralli nelle due pozze può essere studiata misurando la resistenza allo sbiancamento (Thomas et al., 2018). Per fare ciò, è richiesta un'analisi standardizzata replicando i gradienti termici naturali all'interno di serbatoi portatili (Palumbi et al, 2014). In particolare, vengono eseguiti dei test sottoponendo a stress termico frammenti corallini appartenenti a colonie diverse (Thomas et al., 2018). I test sono distinti per ogni specie di corallo a causa delle diverse risposte al calore: alcune specie richiedono più giorni di trattamento, altre possono morire anche con un'esposizione breve allo stress (Thomas et al., 2018). I campioni di corallo da cui si deve estrarre l'RNA per l'analisi trascrittomiche sono mantenuti in RNAlater, ossia un *buffer* per conservare tessuti che stabilizza e protegge l'RNA (Thomas et al., 2018).

Sequenziando l'RNA prelevato dai frammenti corallini campionati, Seneca e Palumbi (2015) hanno dimostrato che le colonie di *A. hyacinthus*, provenienti da entrambe le pozze di marea studiate, hanno una risposta fisiologica allo stress termico che coinvolge migliaia di trascritti (Thomas et al., 2018). Questi risultati hanno mostrato che lo stress termico acuto colpisce inizialmente la sintesi delle proteine, il ciclo cellulare e il metabolismo, mentre il successivo sbiancamento è associato alle attività che coinvolgono il trasporto dell'RNA, la matrice extracellulare, la calcificazione, la replicazione e la riparazione del DNA (Seneca & Palumbi, 2015). Il campionamento ad alta risoluzione temporale (ogni 30min) ha svelato che i componenti del trascrittoma cambiano significativamente entro 90min dall'inizio dello stress termico (Traylor-Knowles et al, 2017a).

Analizzando i livelli di espressione genica all'interno dei singoli campioni di tessuto si è visto che la risposta complessiva allo stress è composta da varie risposte provenienti da diversi tipi cellulari (Traylor-Knowles et al, 2017b). Quindi,

se l'espressione di un determinato gene cambia, questo stesso gene potrebbe essere soltanto una delle componenti della risposta complessiva allo stress e non essere direttamente coinvolto nella risposta di sbiancamento (Traylor-Knowles et al., 2017b). In aggiunta, i dati ottenuti tramite tecniche istologiche suggeriscono che i geni responsabili della risposta al calore si trovano fuori dalle cellule contenenti simbionti (Traylor-Knowles et al., 2017b).

Dato il numero di trascritti coinvolti nella risposta allo stress termico, classificare i geni più importanti per la tolleranza termica risulta estremamente difficile (Thomas et al., 2018). Per semplificare le interpretazioni della risposta allo stress, le ricerche ad Ofu sono state condotte avvalendosi della tecnica del *pooling*: sono stati considerati gruppi di geni co-regolati, anche detti moduli di trascrizione, che possono rappresentare unità fisiologiche distinte (Thomas et al., 2018). Il *pooling* ha rivelato che le classi di geni maggiormente correlate alla variazione nelle risposte di sbiancamento non sono quelle più abbondanti (ad esempio, i geni dell'apoptosi) ma quelle meno abbondanti (Rose et al., 2016).

Sotto stress termico sperimentale, i coralli della pozza con alta variabilità termica mostrano tassi di sopravvivenza maggiori rispetto ai coralli della pozza con variabilità termica bassa (Oliver & Palumbi, 2011). In condizioni di controllo, una grande parte dei geni differenzialmente reattivi tra le due pozze sono regolati costitutivamente di più nei coralli della pozza con alta variabilità, suggerendo che questi geni partono con un livello più alto di espressione prima dell'effettivo stress termico (Barshis et al., 2010). In condizioni ambientali, i trascritti presenti costitutivamente in quantità maggiore includono i classici geni dello stress termico: come quelli per Hsp70, TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptors*), perossidasi e metalloproteasi zinco-dipendenti (Barshis et al., 2010). Queste caratteristiche di partenza possono consentire alle singole colonie di mantenere la resilienza fisiologica durante episodi di frequente stress ambientale (Thomas et al., 2018).

4.2.2 Analisi dell'acclimatemento

Lo stress termico derivante da eventi climatici estremi, che generalmente guidano lo sbiancamento, si verifica nell'arco di settimane, quindi la capacità dei coralli di cambiare fisiologia in risposta alle variazioni ambientali dovrà avvenire entro questi termini per essere efficace contro le temperature di riscaldamento dell'acqua (Thomas et al., 2018). L'acclimatemento può essere un meccanismo chiave per la resilienza di fronte al riscaldamento delle acque perché sta alla base della plasticità fisiologica, spesso reversibile, che consente ad un individuo di mantenere le prestazioni in ambienti differenti durante la vita (Thomas et al., 2018). Negli studi di conservazione, l'acclimatemento è particolarmente rilevante per gli organismi a lunga vita, come i coralli, perché questo meccanismo agisce durante la vita dell'individuo (Thomas et al., 2018).

Nel caso di Ofu, sono stati effettuati dei trapianti reciproci tra gli individui delle due pozze di marea nella *back-reef* per quantificare i livelli di acclimatamento (Thomas et al., 2018). Il cambiamento fenotipico accumulato tra due popolazioni che vivono in habitat diversi ha dimostrato che la capacità di acclimatamento è una caratteristica primaria dell'adattabilità all'aumento di temperatura (Palumbi et al., 2014).

L'analisi trascrittomiche svolta tramite RNAseq ha dimostrato l'impatto degli stress ambientali a breve termine sulle barriere coralline (Thomas et al., 2018). L'esposizione regolare a cicli di maree forti innesca una grande ma transitoria risposta trascrittomiche in *A. hyacinthus* che coinvolge centinaia di geni (Ruiz-Jones & Palumbi, 2017). In particolare, gli studi sulle colonie di *A. hyacinthus* trapiantate hanno rivelato 74 geni espressi differenzialmente tra le due pozze di marea (Palumbi et al., 2014).

I dati suggeriscono anche che l'acclimatamento si realizza, almeno in parte, attraverso la regolazione di gruppi di geni co-espressi (Thomas et al., 2018). Attraverso dei test controllati, i coralli sono stati sottoposti a temperature maggiori di quelle naturali ed è stato dimostrato che l'espressione di questi gruppi di geni diventa più intensa con l'aumentare dello stress (Thomas et al., 2018).

4.2.3 Analisi dell'adattamento

Tramite l'adattamento, le configurazioni alleliche che conferiscono maggiore resistenza allo sbiancamento possono essere tramandate tra diverse generazioni di individui (Thomas et al., 2018). L'adattamento a livello locale è frutto dell'equilibrio tra la selezione naturale e il flusso genico (Thomas et al., 2018). Quando il flusso genico è elevato, lo *swamping* genetico può sostituire gli alleli localmente adattati con quelli maladattati e le differenze genetiche tra le popolazioni vengono meno (Tigano & Friesen, 2016). Se la selezione è abbastanza forte da sopraffare gli effetti del flusso genico, gli alleli vantaggiosi possono mantenere invariata la loro frequenza all'interno della popolazione e di conseguenza non si perde l'adattamento locale (Thomas et al., 2018).

Quando il flusso genico è alto, come nella maggior parte dei coralli di barriera, l'adattamento favorisce l'avvicinamento di diversi loci in sequenze genomiche brevi e a bassa ricombinazione (Thomas et al., 2018). In questo caso, anche se un gran numero di geni può contribuire alla variazione fenotipica, regioni cromosomiche specifiche possono svolgere un ruolo particolarmente importante nel cambiamento evolutivo (Thomas et al., 2018).

Dopo 12 mesi di esperimenti di trapianto reciproco tra i coralli delle due pozze di marea ad Ofu, sono state identificate delle differenze nei livelli di tolleranza termica dovute ai limiti dell'acclimatamento (Thomas et al., 2018). Considerando tutto il trascrittoma, sono state individuate le differenze di espressione a seconda della pozza di origine (Thomas et al., 2018). I risultati

indicano che i geni mediatori della tolleranza termica hanno livelli di espressione costitutivi dovuti all'adattamento locale dei coralli (Thomas et al., 2018). Questi polimorfismi di espressione differiscono tra le pozze: sotto stress termico, i coralli trapiantati dalla pozza con bassa variabilità termica a quella con alta variabilità hanno un'espressione significativamente più bassa per un dato gruppo di geni e le colonie trapiantate non possono raggiungere i livelli di espressione dei coralli autoctoni (Thomas et al., 2018). Ciò suggerisce che le differenze genetiche fisse che regolano l'espressione coordinata di gruppi di geni guidano l'adattamento allo stress termico (Thomas et al., 2018).

4.2.4 Migrazione assistita per il ripristino delle barriere coralline

Una volta identificati, i coralli con elevata tolleranza termica possono essere trapiantati per generare popolazioni tolleranti all'aumento della temperatura e quindi allo sbiancamento, migliorando significativamente il successo degli sforzi di ripristino delle barriere (Thomas et al., 2018).

È necessario considerare la teoria del *reciprocal home site advantage*, secondo cui l'adattamento ad un ambiente avviene a costo dell'adattamento ad altri ambienti (Hereford, 2009). Le colonie con il più alto tasso di sopravvivenza nella pozza di marea ad alta variabilità crescono meno quando trapiantati nell'altra pozza (Bay & Palumbi, 2017). Dagli studi si evince che anche se alcuni coralli sono localmente adattati ad ambienti con temperature estreme, avere altri tratti correlati alla salute non adattati può ostacolare la sopravvivenza in ambienti diversi (Thomas et al., 2018).

Conclusione

Lo studio di Thomas et al. (2018) trattato in questo elaborato è uno degli esempi di lavori di ricerca ecologica che fino ad oggi hanno utilizzato gli strumenti e i metodi della trascrittomico del paesaggio senza riferirsi a questa disciplina direttamente. Grazie a Keagy et al. (2023) la questione è stata presentata alla discussione scientifica con l'intento di generare nuove ricerche che possano sfruttare al meglio il campionamento dei trascrittomi considerando anche le informazioni di tipo spaziale.

Gli studi condotti sulla barriera corallina di Ofu dimostrano il grande potenziale della trascrittomico del paesaggio applicata alla conservazione e la gestione delle specie. Tuttavia, le informazioni ottenute dai trascritti riguardo la ripetibilità dei meccanismi evolutivi, il mantenimento della variazione genetica e il ruolo della plasticità nell'evoluzione adattativa sono applicabili anche in altri ambiti della biologia degli organismi, dell'ecologia e dell'evoluzione. Ad esempio, nella gestione delle colture vegetali e ittiche, lo sviluppo di biomarcatori trascrizionali, in particolare quelli che possono essere sviluppati in modo non letale, è fondamentale per studiare la risposta allo stress dei pesci in acquacoltura e delle piante nelle serre e nelle camere di crescita (Keagy et al., 2023).

Un aspetto promettente degli studi di trascrittomico del paesaggio, che si può notare anche nel lavoro di Thomas et al (2018), è quello legato alla classificazione funzionale dei geni attraverso il *pooling* dei trascritti. A mio personale avviso, sarebbe particolarmente interessante riuscire a prevedere teoricamente come possono variare le risposte di gruppi di geni correlati in diversi contesti ambientali.

Nei prossimi anni, le continue emissioni di gas a effetto serra porteranno ad un aumento del riscaldamento globale con un conseguente aumento delle temperature e dell'acidificazione degli oceani (IPCC, 2023). Inoltre, pubblicazioni scientifiche più recenti di quella di Thomas et al. (2018) dimostrano che i coralli di barriera stanno continuando ad affrontare situazioni di stress ambientale dovute ai cambiamenti climatici (ad esempio, Anthony et al., 2020; Thirukanthan et al., 2023). Alla luce di ciò, ritengo che gli studi di conservazione riguardo questi organismi chiave per l'ecologia debbano proseguire ma che non possano bastare gli interventi applicati fino ad oggi. È necessario integrare nuovi metodi di ricerca e la trascrittomico del paesaggio risulta essere un ottimo punto di partenza per le prossime ricerche di conservazione.

Nella *review* di Keagy et al. (2023) viene rimarcata l'esistenza di studi trascrittomici su piccola scala spaziale con il potenziale di scalare fino a livello paesaggistico tramite l'aumento di campionamenti negli ambienti di interesse. Offrendo una base di dati trascrittomici e ambientali preesistente, alcuni di questi studi possono essere un buon punto di partenza per i futuri progetti di ricerca basati sulla trascrittomico del paesaggio. Ad esempio, nei lavori di conservazione si

potrebbe risolvere il problema della scarsità di letteratura trascrittomico riguardo le specie non modello.

Rispetto alle ricerche condotte ad Ofu citate in questo elaborato, si potrebbero ampliare gli studi di trascrittomico nelle barriere coralline considerando un gradiente ambientale più ampio, non solo la *back-reef*, oppure considerando molteplici fattori di stress contemporaneamente. Questo comporterebbe degli sforzi computazionali maggiori ma potrebbe descrivere in modo più esaustivo la situazione degli organismi che, in natura, sperimentano diversi stress contemporaneamente. Ad esempio, si potrebbero considerare i trascritti legati alla risposta allo stress termico insieme a quelli legati allo stress dovuto all'acidificazione delle acque.

Infine, ritengo che potrebbe essere utile eseguire degli studi paralleli tra varie barriere coralline nel mondo per poter fare dei confronti su scala globale. Questo richiederebbe coordinazione tra la comunità scientifica e la politica per fare degli investimenti che considerino le limitazioni tecniche ed economiche dei paesi in via di sviluppo dove sono presenti importanti barriere coralline, come Indonesia, Malesia, Filippine, Papua Nuova Guinea, Timor-Leste e le Isole Salomone (Thirukanthan et al., 2023), che quindi avranno bisogno di contributi a livello internazionale.

Bibliografia

- Alvarez, M., Schrey, A. W., & Richards, C. L. (2015). Ten years of transcriptomics in wild populations: what have we learned about their ecology and evolution? *Molecular Ecology*, *24*(4), 710-725. Tratto da <https://doi.org/10.1111/mec.13055>
- Anthony, K. R., Helmstedt, K. J., Bay, L. K., Fidelman, P., Hussey, K. E., Lundgren, P., Mead, D., McLeod, I. M., Mumby, P. J., Newlands, M., Schaffelke, B., Wilson, K. A., Hardisty, P. E. (2020). Interventions to help coral reefs under global change - A complex decision challenge. *PLOS ONE*, *15*, 8. Tratto da <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236399>
- Balkenhol, N., Dudaniec, R. Y., Krutovsky, K. V., Johnson, J. S., Cairns, D. M., Segelbacher, G., Selkoe, K. A., von der Heyden, S., Wang, I. J., Selmoni, O., & Joost, S. (2017). Landscape Genomics: Understanding Relationships Between Environmental Heterogeneity and Genomic Characteristics of Populations. In C. Springer, *Population Genomics* (p. 261-322). O. P.: Rajora (Ed.). doi:10.1007/13836_2017_2
- Barrett, R. D., & Schluter, D. (2008). Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution*, *23*, 38-44. Tratto da <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.09.008>
- Barshis, D. J., Stillman, J. H., Gates, R. D., Toonen, R. J., Smith, L. W., & Birkeland, C. (2010). Protein expression and genetic structure of the coral *Porites lobata* in an environmentally extreme Samoan back reef: does host genotype limit phenotypic plasticity? *Molecular Ecology*, *19*, 1705-1720. Tratto da <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04574.x>
- Bay, R. A., & Palumbi, S. R. (2017). Transcriptome predictors of coral survival and growth in a highly variable environment. *Ecology and Evolution*, *7*, 4794-4803. Tratto da <https://doi.org/10.1002/ece3.2685>
- Bay, R. A., Rose, N., Barrett, R., Bernatchez, L., Ghalambor, C. K., Lasky, J. R., Rachel, B. B., Stephen, R. P., Ralph, P. (2017). Predicting Responses to Contemporary Environmental Change Using Evolutionary Response Architectures. *The American Naturalist*, *189*, 463-473. Tratto da <https://doi.org/10.1086/691233>
- Chen, X., & Rechavi, O. (2022). Plant and animal small RNA communications between cells and organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *23*(3), 185-203. Tratto da <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00425-y>
- Chung, M., Bruno, V. M., Rasko, D. A., Cuomo, C. A., Muñoz, J. F., Livny, J., Shetty, A. C., Mahurkar, A., & Dunning Hotopp, J. C. (2021). Best practices on the differential expression analysis of multi-species RNA-seq. *Genome Biology*, *22*(1), 121. Tratto da <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02337-8>
- Clark, J. S., Nemergut, D., Seyednasrollah, B., Turner, P. J., & Zhang, S. (2017). Generalized joint attribute modeling for biodiversity analysis: median-zero, multivariate, multifarious data. *Ecological Monographs*, *87*(1), 34-56. Tratto da <https://doi.org/10.1002/ecm.1241>
- Connor, K. M., & Gracey, A. Y. (2011). Circadian cycles are the dominant transcriptional rhythm in the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(38), 16110-16115. Tratto da https://doi.org/10.1073/pnas.11110_76108

- Courtier-Orgogozo, V., Arnoult, L., Prigent, S. R., Wiltgen, S., & Martin, A. (2020). Gephebase, a database of genotype–phenotype relationships for natural and domesticated variation in Eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, *48(D1)*, D696–D703. Tratto da <https://doi.org/10.1093/nar/gkz796>
- Craig, P., Birkeland, C., & Belliveau, S. (2001). High temperatures tolerated by a diverse assemblage of shallow-water corals in American Samoa. *Coral Reefs*, *20*, 185–189. Tratto da <https://doi.org/10.1007/s003380100159>
- Forester, B. R., Landguth, E. L., Hand, B. K., & Balkenhol, N. (2021). Landscape Genomics for Wildlife Research. In C. Springer, *Population Genomics: Wildlife* (p. 145–184). P.A.: Hohenlohe, Rajora, O.P. (eds). Tratto da https://doi.org/10.1007/13836_2018_56
- Ghalambor, C. K., Hoke, K. L., Ruell, E. W., Fischer, E. K., Reznick, K. N., & Hughes, K. A. (2015). Non-adaptive plasticity potentiates rapid adaptive evolution of gene expression in nature. *Nature*, *525(7569)*, 372–375. Tratto da <https://doi.org/10.1038/nature15256>
- Hansen, M. M. (2010). Expression of interest: transcriptomics and the designation of conservation units. *Molecular Ecology*, *19(9)*, 1757–1759. Tratto da <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04597.x>
- Hayes, M. F., & Banish, N. P. (2017). Translocation and reintroduction of native fishes: a review of bull trout *Salvelinus confluentus* with applications for future reintroductions. *Endangered Species Research*, *34*, 191–209. Tratto da <https://doi.org/10.3354/esr00849>
- Hereford, J. (2009). A Quantitative Survey of Local Adaptation and Fitness Trade-Offs. *The American Naturalist*, *173*, 579–588. Tratto da <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/597611>
- IPCC, 2023: Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, pp. 1-34, doi: 10.59327/IPCC/AR6-9789291691647.001
- Keagy, J., Drummond, C. P., Gilbert, K. J., Grozinger, C. M., Hamilton, J., Hines, H. M., Lasky, J., Logan, C. A., Sawers, R., Wagner, T. (2023). Landscape transcriptomics as a tool for addressing global change effects across diverse species. *Molecular Ecology Resources*, *00*, 1–16. Tratto da <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13796>
- Killen, S. S., Marras, S., Metcalfe, N. B., McKenzie, D. J., & Domenici, P. (2013). Environmental stressors alter relationships between physiology and behaviour. *Trends in Ecology & Evolution*, *28(11)*, 651–658. Tratto da <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.005>
- Law, C. W., Chen, Y., Shi, W., & Smyth, G. K. (2014). voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biology*, *15(2)*, R29. Tratto da <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15(12)*, 550. Tratto da <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Ma, F., Fuqua, B. K., Hasin, Y., Yukhtman, C., Vulpe, C. D., Lusic, A. J., & Pellegrini, M. (2019). A comparison between whole transcript and 3' RNA sequencing methods

using Kapa and Lexogen library preparation methods. *BMC Genomics*, 20(1), 9. Tratto da <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5393-3>

- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G., & Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 4, 189-197. Tratto da [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00008-9)
- Oliver, T. A., & Palumbi, S. R. (2011). Do fluctuating temperature environments elevate coral thermal tolerance? *Coral Reefs*, 30, 429-440. Tratto da <https://link.springer.com/article/10.1007/s00338-011-0721-y>
- Palumbi, S. R., Barshis, D. J., Traylor-Knowles, N., & Bay, R. A. (2014). Mechanisms of reef coral resistance to future climate change. *Science*, 344, 895-898. Tratto da <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1251336>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. Tratto da <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rose, N. H., Seneca, F. O., & Palumbi, S. R. (2016). Gene Networks in the Wild: Identifying Transcriptional Modules that Mediate Coral Resistance to Experimental Heat Stress. *Genome Biology and Evolution*, 8, 243-252. Tratto da <https://doi.org/10.1093/gbe/evv258>
- Ruiz-Jones, L. J., & Palumbi, S. R. (2017). Tidal heat pulses on a reef trigger a fine-tuned transcriptional response in corals to maintain homeostasis. *Science Advances*, 3, 1-10. Tratto da <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.1601298>
- Saltz, J. B., Bell, A. M., Flint, J., Gomulkiewicz, R., Hughes, K. A., & Keagy, J. (2018). Why does the magnitude of genotype-by-environment interaction vary? *Ecology and Evolution*, 8(12), 6342-6353. Tratto da <https://doi.org/10.1002/ece3.4128>
- Seneca, F. O., & Palumbi, S. R. (2015). The role of transcriptome resilience in resistance of corals to bleaching. *Molecular Ecology*, 24, 1467-1484. Tratto da <https://doi.org/10.1111/mec.13125>
- Smith, L. W., Barshis, D., & Birkeland, C. (2007). Phenotypic plasticity for skeletal growth, density and calcification of *Porites lobata* in response to habitat type. *Coral Reefs*, 26, 559-567. Tratto da <https://doi.org/10.1007/s00338-007-0216-z>
- Sponsler, D. B., Grozinger, C. M., Hitaj, C., Rundlöf, M., Botías, C., Code, A., Lonsdorf, E. V., Melathopoulos, A. P., Smith, D. J., Suryanarayanan, S., Thogmartin, W. E., Williams, N. M., Zhang, M., & Douglas, M. R. (2019). Pesticides and pollinators: A socioecological synthesis. *Science of the Total Environment*, 662, 1012-1027. Tratto da <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.016>
- Stark, R., Grzelak, M., & Hadfield, J. (2019). RNA sequencing: the teenage years. *Nature Reviews Genetics*, 20(11), 631-656. Tratto da <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0150-2>
- Thirukanthan, C. S., Azra, M. N., Lananan, F., Sara', G., Grinfelde, I., Rudovica, V., Vincevica-Gaile, Z., Burlakovs, J. (2023). The Evolution of Coral Reef under Changing Climate: A Scientometric Review. *Animals*, 13, 949. Tratto da: <https://doi.org/10.3390/ani13050949>
- Thomas, L., Rose, N. H., Bay, R. A., López, E. H., Morikawa, M. K., Ruiz-Jones, L., & Palumbi, S. R. (2018). Mechanisms of Thermal Tolerance in Reef-Building Corals across a Fine-Grained Environmental Mosaic: Lessons from Ofu, American

- Samoa. *Frontiers in Marine Science*, 4, 434. Tratto da <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2017.00434>
- Tigano, A., & Friesen, V. L. (2016). Genomics of local adaptation with gene flow. *Molecular Ecology*, 25, 2144–2164. Tratto da <https://doi.org/10.1111/mec.13606>
- Todd, E. V., Black, M. A., & Gemmel, N. J. (2016). The power and promise of RNA-seq in ecology and evolution. *Molecular Ecology*, 25(6), 1224–1241. Tratto da <https://doi.org/10.1111/mec.13526>
- Traylor-Knowles, N., Rose, N. H., & Palumbi, S. R. (2017b). The cell specificity of gene expression in the response to heat stress in corals. *Journal of Experimental Biology*, 15, 1837–1845. Tratto da <https://doi.org/10.1242/jeb.155275>
- Traylor-Knowles, N., Rose, N. H., Sheets, E. A., & Palumbi, S. R. (2017a). Early Transcriptional Responses during Heat Stress in the Coral *Acropora hyacinthus*. *The Biological Bulletin*, 232, 91–100. Tratto da <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/692717>
- Wagner, T., Fergus, C. E., Stow, C. A., Cheruvilil, K. S., & Soranno, P. A. (2016). The statistical power to detect cross- scale interactions at macroscales. *Ecosphere*, 7(7), e01417. Tratto da <https://doi.org/10.1002/ecs2.1417>
- Walther, G.- R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T. J. C., Fromentin, J.- M., Hoegh- Guldberg, O., & Bairlein, F. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416(6879), 389–395. Tratto da <https://doi.org/10.1038/416389a>
- Weikum, E. R., Knuesel, M. T., Ortlund, E. A., & Yamamoto, K. R. (2017). Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(3), 159–174. Tratto da <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.152>
- Whitham, T. G., Bailey, J. K., Schweitzer, J. A., Shuster, S. M., Bangert, R. K., LeRoy, C. J., Lonsdorf, E. V., Allan, G. J., DiFazio, S. P., Potts, B. M., Fischer, D. G., Gehring, C. A., Lindroth, R. L., Marks, J. C., Hart, S. C., Wimp, G. M., & Wooley, S. C. (2006). A framework for community and ecosystem genetics: From genes to ecosystems. *Nature Reviews Genetics*, 7(7), 510–523. Tratto da <https://doi.org/10.1038/nrg1877>
- Wray, G. A. (2007). The evolutionary significance of cis-regulatory mutations. *Nature Reviews Genetics*, 8(3), 206–216. Tratto da <https://doi.org/10.1038/nrg2063>
- Wuitchik, D. M., Wang, D., Pells, T. J., Karimi, K., Ward, S., & Vize, P. D. (2019). Seasonal temperature, the lunar cycle and diurnal rhythms interact in a combinatorial manner to modulate genomic responses to the environment in a reef-building coral. *Molecular Ecology*, 28(16), 3629–3641. Tratto da <https://doi.org/10.1111/mec.15173>
- Yeaman, S., & Whitlock, M. C. (2011). The genetic architecture of adaptation under migration-selection balance: The genetic architecture of local adaptation. *Evolution*, 65(7), 1897–1911. Tratto da <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01269.x>