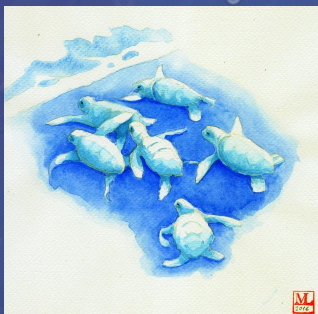


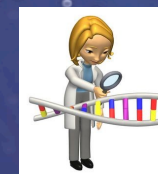


Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

Le analisi genetiche condotte sulle tartarughe marine spiaggiate raccontano un capitolo della loro storia individuale



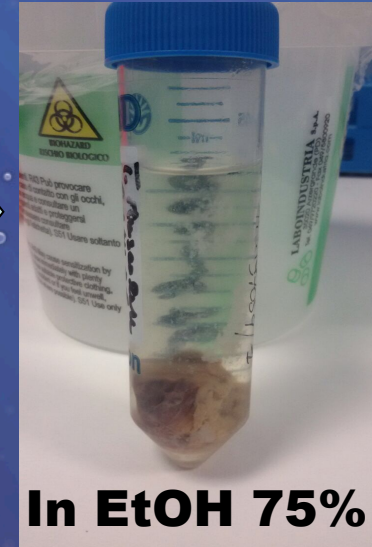
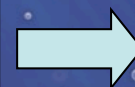
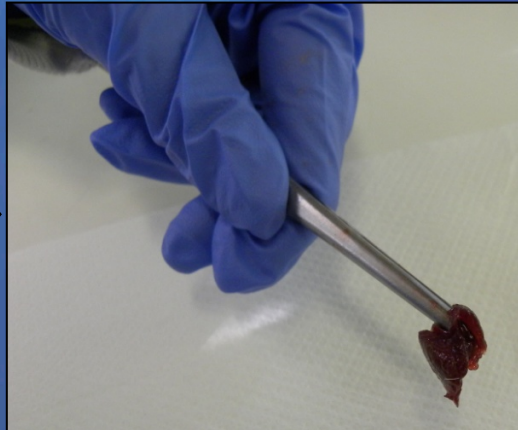
Luisa Garofalo
Laboratorio di Genetica
(Sezione di Rieti)



Corso "Tartarughe marine nel Lazio e nella Toscana: aggiornamenti, dati ed attività correlate al recupero di animali spiaggati".
IZSLT Roma, 26 giugno 2017



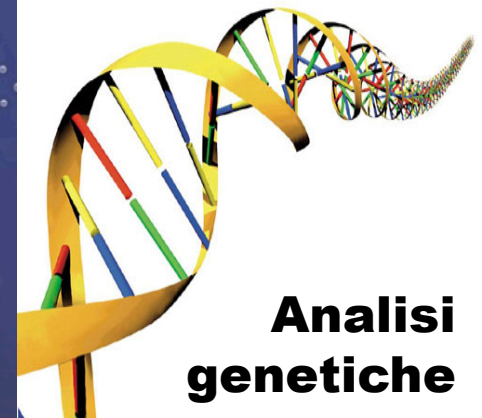
IMPORTANZA DEL SOPRALLUOGO, PRELIEVO E CONSERVAZIONE CAMPIONI



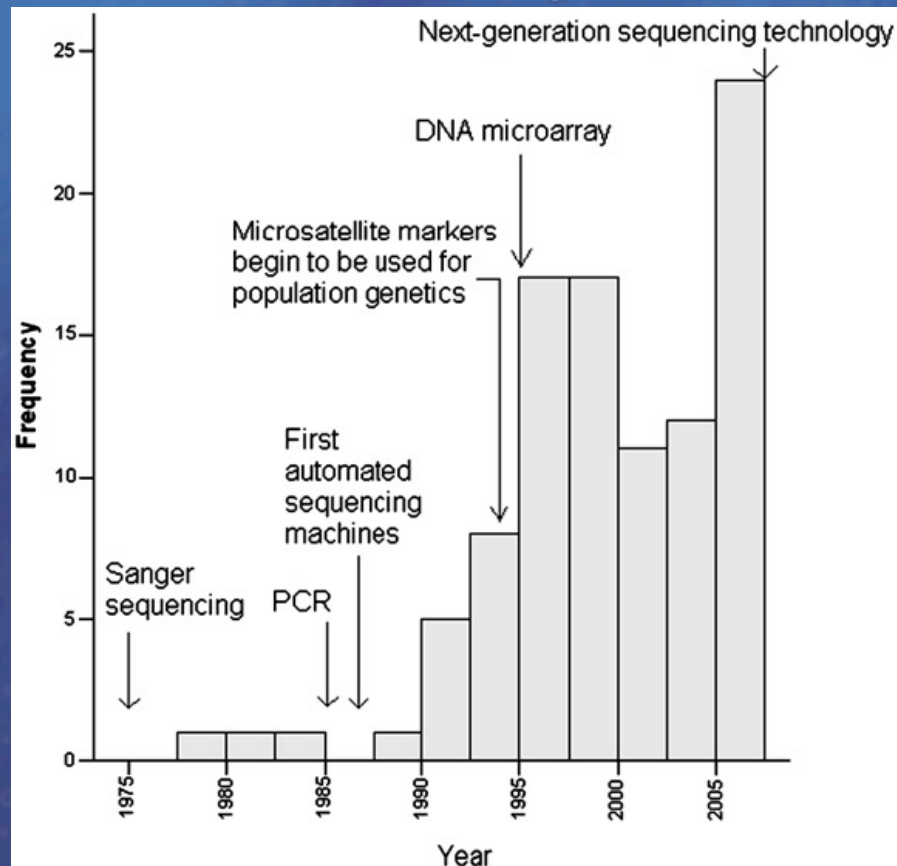
**Mantenimento
catena del freddo
nel trasporto**



Congelato



SVILUPPI NELLO STUDIO DELLA GENETICA DELLE TARTARUGHE MARINE



(Lee, 2008)

Tecniche e marcatori del passato: allozimi, RAPD, RFLP, ecc.

Tecniche e marcatori attualmente in uso: aplotipi del mtDNA, interi mitogenomi, microsatelliti

Tecniche e marcatori del futuro:

SNP, whole genome e next-generation sequencing, microarrays, trascrittomica, proteomica, ecc.



TABLE 1 | Examples highlighting how genetic tools have been used to address key research questions in marine turtle biology and conservation.

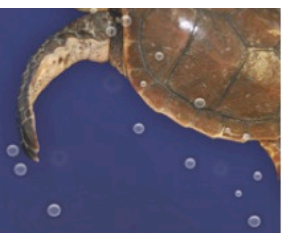
Research question	Approaches/genetic tools	Examples
POPULATION BOUNDARIES AND CONNECTIVITY		
• How isolated or connected are rookeries from one another through the exchange of nesting females?	Population structure analyses of nesting females across regions of interest (mtDNA haplotypes and/or fine-scale nuclear markers ^a)	Examples since comprehensive review in Jensen et al. (2013a) include: Dutton et al. (2014b), Shamblyn et al. (2014), Vargas et al. (2016), Gaos et al. (2016), and Matsuzawa et al. (2016)
• How does male-mediated gene flow influence population structure among rookeries?	Population structure analyses, various methods including: sampling nesting females, hatchlings and/or males in-water at breeding grounds (fine-scale nuclear markers; mtDNA haplotypes under specific circumstances ^b)	Bagda et al., 2012; Dutton et al., 2013; Roden et al., 2013
• Which nesting stocks use which foraging grounds?	Mixed stock analysis (mtDNA haplotypes) and/or assignment testing (fine-scale nuclear markers)	Stewart et al., 2013; Read et al., 2015; Jensen et al., 2016b; Shamblyn et al., 2017
• How do environmental factors influence population connectivity?	Combining genetic analyses with oceanographic modeling of key abiotic factors (e.g., ocean currents or temperature)	Putman and Naro-Maciel, 2013; Naro-Maciel et al., 2014a, 2017
EVOLUTIONARY HISTORY AND PHYLOGEOGRAPHY		
• How are marine turtles species related?	Phylogenetic analyses across marine turtle species (mtDNA and/or nuclear markers)	Bowen et al., 1993; Dutton et al., 1996; Naro-Maciel et al., 2008; Duchêne et al., 2012
• What historical patterns have led to current patterns of diversity and population structure?	Phylogeographic analyses within marine turtle species (mtDNA and/or nuclear markers)	Delhmers et al., 2006; Reis et al., 2010; LeRoux et al., 2012; Dutton et al., 2014a; Naro-Maciel et al., 2014b; Vargas et al., 2016
LIFE HISTORY		
• How old are turtles when they start to reproduce?	Genetic CMR and relatedness analyses (fine-scale nuclear markers)	Dutton et al., 2005; Dutton and Stewart, 2013
• How can we assess the male component of the population?	Paternal genotype reconstruction to assess OSRs/BSRs (fine-scale nuclear markers)	Wright et al., 2012b; Phillips et al., 2013; Stewart and Dutton, 2014; Tedeschi et al., 2015
• What reproductive strategies and behaviors do turtles use?	Maternal genetic ID; Multiple paternity analysis (fine-scale nuclear markers)	FitzSimmons, 1998; Shamblyn et al., 2011; Stewart and Dutton, 2011; Frey et al., 2014; Phillips et al., 2014; Sari et al., 2017
HUMAN THREATS AND IMPACTS		
• How are populations impacted by threats away from nesting grounds?	Mixed stock analysis (mtDNA) and assignment testing (fine-scale nuclear markers)	LaCasella et al., 2013; Clusa et al., 2016; Stewart et al., 2016
• How do recent population declines affect resilience?	Analyses to detect population bottlenecks/diversity loss (mtDNA haplotypes and/or nuclear markers)	Carreras et al., 2007; Rodríguez-Zarate et al., 2013; Gonzalez-Garza et al., 2015
• How are marine turtles affected by habitat alterations?	Physiological responses to abiotic conditions (mRNA/transcriptomic assays); Tracking M:F foraging ground rookery origins over time (mtDNA haplotypes and/or nuclear markers)	Gomez-Picos et al., 2014; Tedeschi et al., 2016; Bentley et al., 2017

We focus primarily on examples from recently published articles, and note that there are many ongoing studies that will soon add to our knowledge for the questions listed. Additionally, there are numerous other applications that have been used in other wildlife taxa not yet realized for marine turtles that may be helpful to guide future research (see Remaining Challenges and Future Directions Section).

^aE.g., panels of informative microsatellite and/or SNP markers.

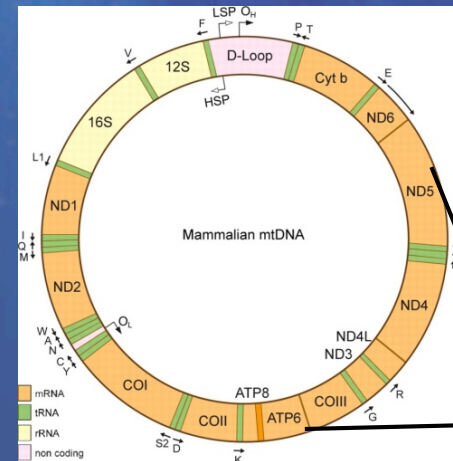
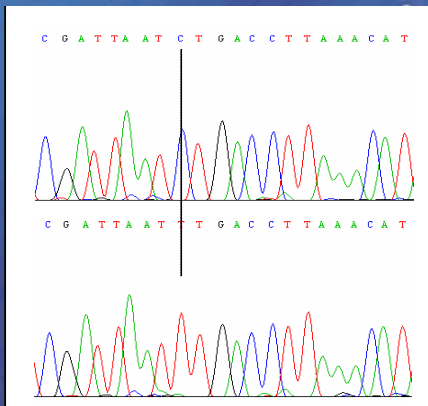
^bmtDNA haplotypes may be informative in specific cases, such as sampling in-water males in breeding areas within regions where there is clear differentiation between rookeries based on nesting female haplotypes.

(Review, Komoroske et al., 2017)

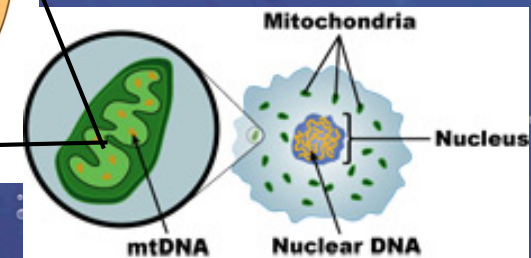


SCELTA DEI MARCATORI MOLECOLARI

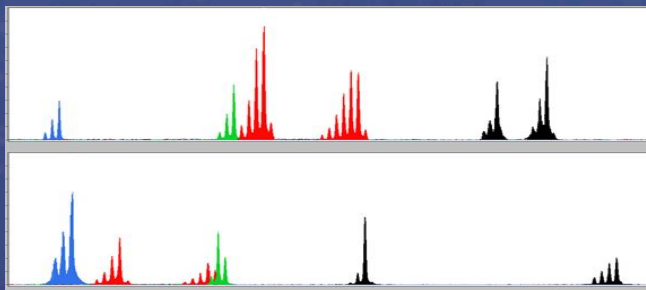
a) variabilità di sequenza



Assenza di
marcatori
genetici legati
al sesso



b) variabilità di lunghezza

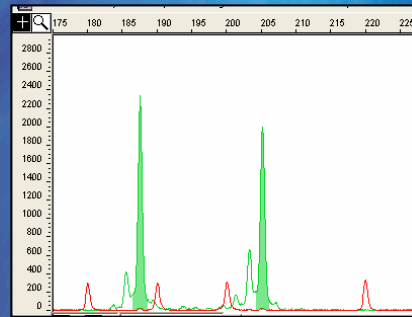
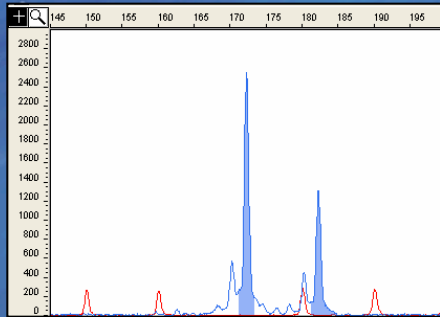


...(CA)₂ (CA)₂(CA)₂(CA)₂...

..... (CA)₂(CA)₂(CA)₂...



MARCATORI NUCLEARI

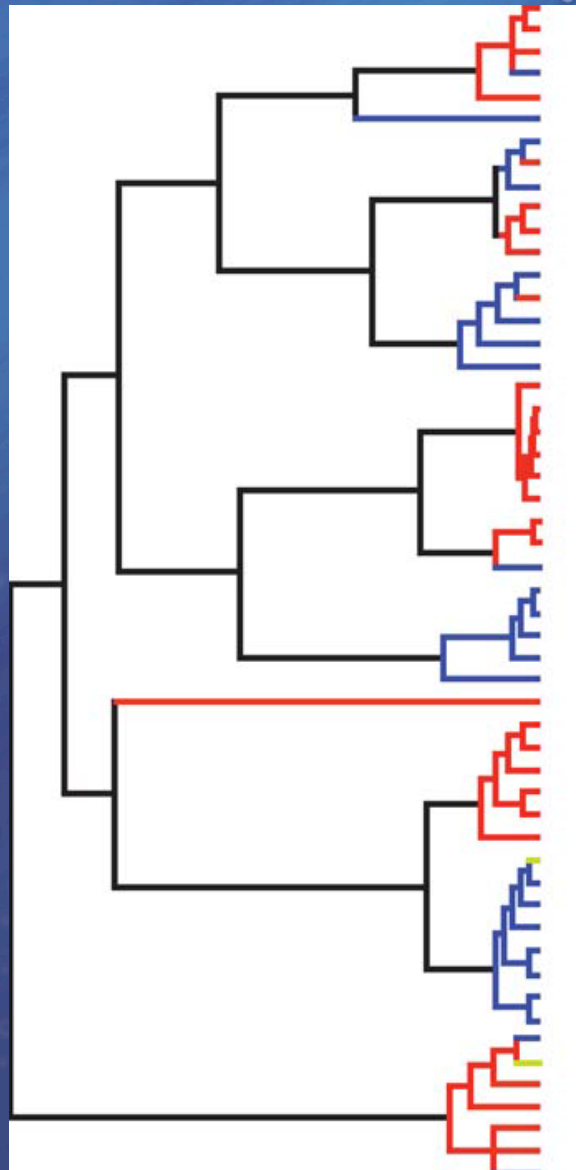


**STR (Short Tandem Repeats) -
microsatelliti**

- **Permettono l'identificazione individuale e l'analisi delle parentele**
- **Consentono di stimare il N° di riproduttori, fitness e intervalli riproduttivi**
- **Possibilità di rilevare la paternità multipla tra i nidiacei di una colonia**
- **Stima del flusso genico mediato dai maschi**
- **Ma.. servono database condivisi e costruiti sugli stessi loci (difficoltà di fare delle Mixed Stock Analyses basate su questi marcatori)**



FILOGENESI



(Bowen&Karl, 2007)

Lepidochelys olivacea

Lepidochelys kempi

Caretta caretta

Eretmochelys imbricata

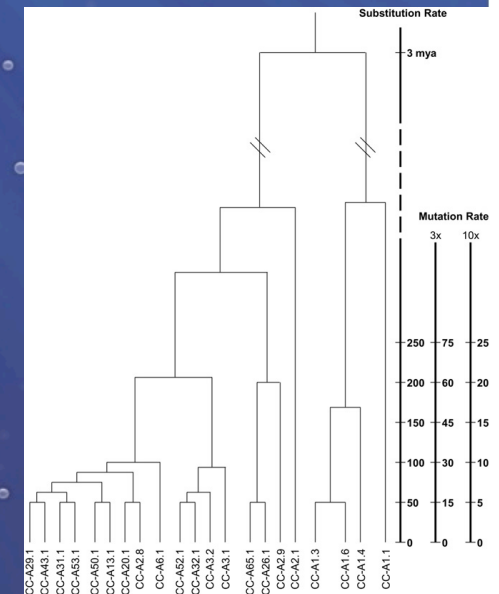
Natator depressus

Chelonia mydas

Dermochelys coriacea

MARKER di ELEZIONE:
D-loop mitocondriale (o Regione di Controllo)

E FILOGEOGRAFIA



(Clusa et al., 2013)



Indo-Pacific lineages (rosso), Atlantic lineages (blu.)

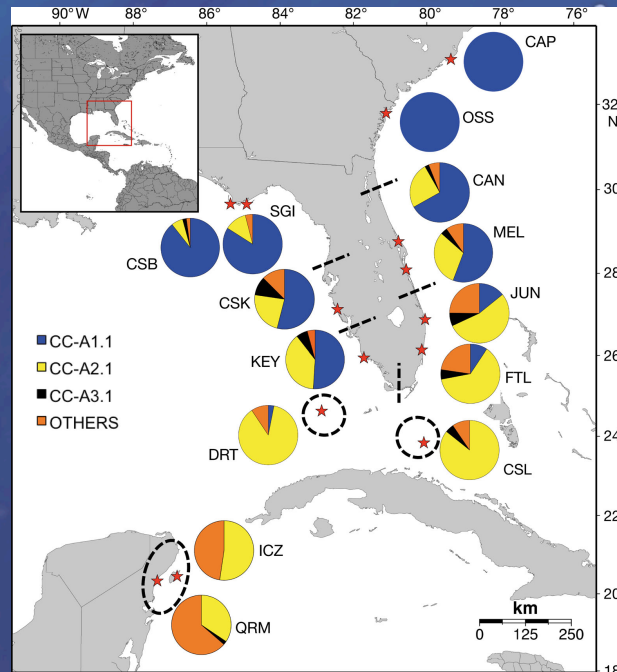
Colonizzazione del Mediterraneo a partire dall'Atlantico



Frequenze e network degli aplotipi del

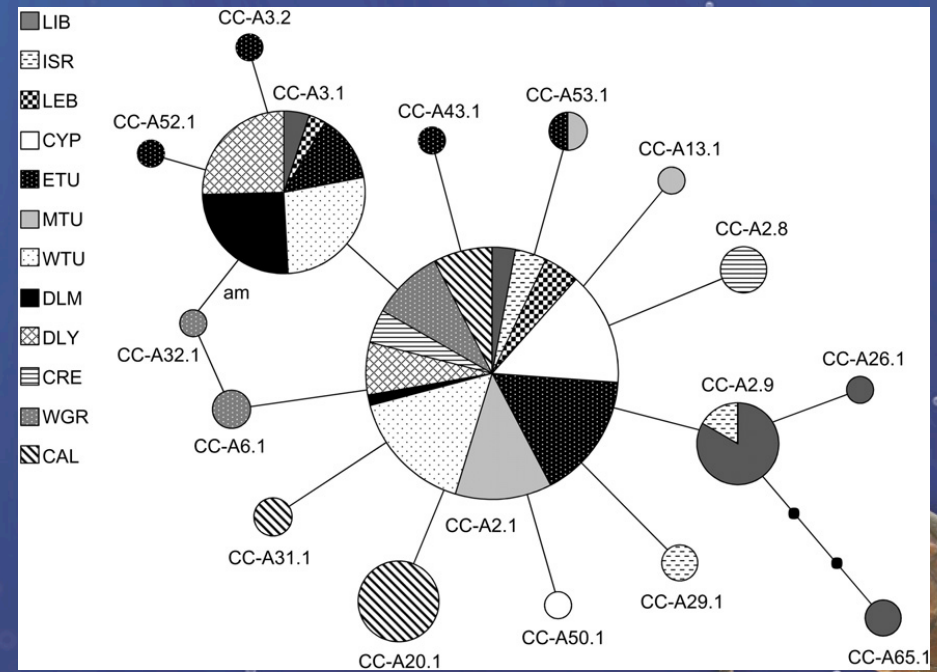
D-LOOP MITOCONDRIALE

Atlantico



(Shamblin et al., 2012)

Mediterraneo

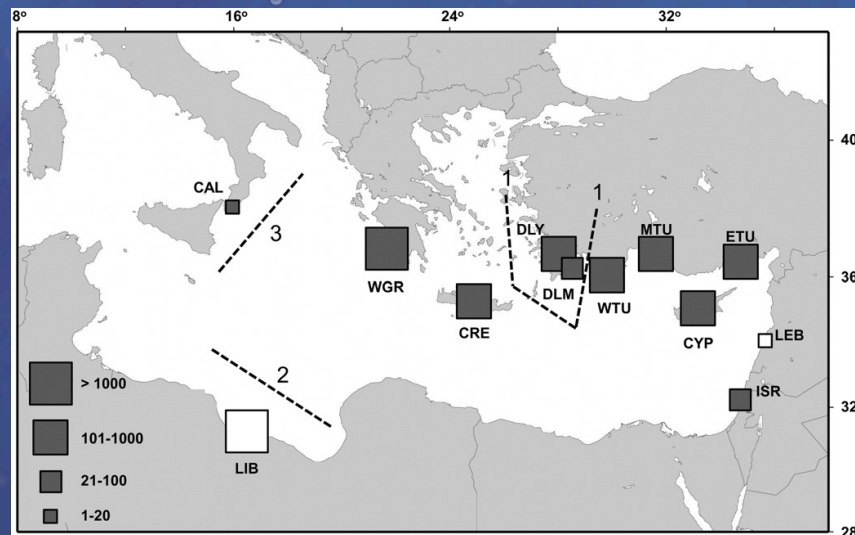


(Clusa et al., 2013)

MEDITERRANEO

Colonizzazione del Mediterraneo da parte di tartarughe atlantiche con aplotipo CC-A2.

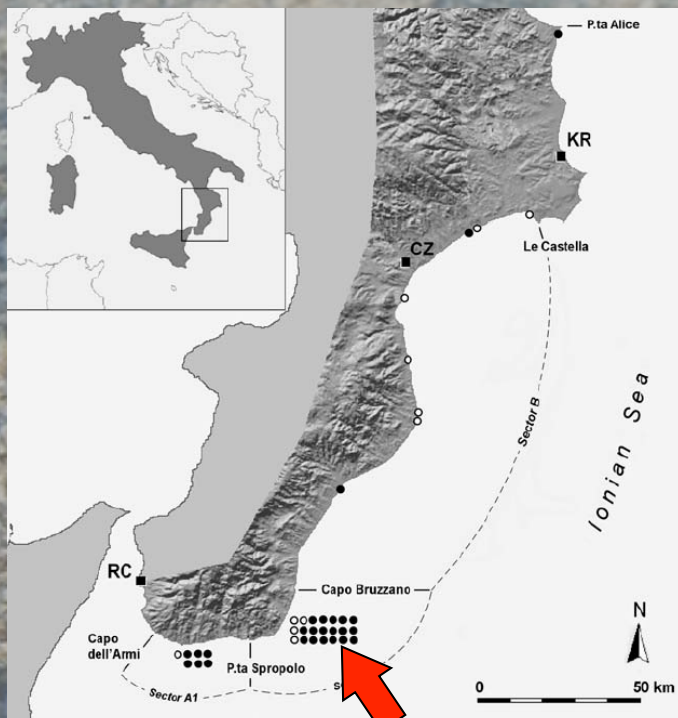
Inizialmente si pensava fosse avvenuta con un unico evento, successivamente si è verificato che le colonizzazioni sono state in realtà multiple.



(Clusa et al., 2013)

Le principali colonie si trovano nella porzione sud-orientale del bacino. L'Italia rappresenta un sito di nidificazione marginale.





Progetto di monitoraggio
dell'UniCAL (dal 2000)

Si è stimato che in quest'area
vengano deposti annualmente
almeno 15-20 nidi, con un
numero di nidi/anno per l'intera
Italia di 30-40.

(Mingozzi et al., 2007)

Nel 2016 sono stati ritrovati **38** nidi

di *C. caretta* in Calabria

(Caretta Calabria Conservation,
dati non pubblicati).

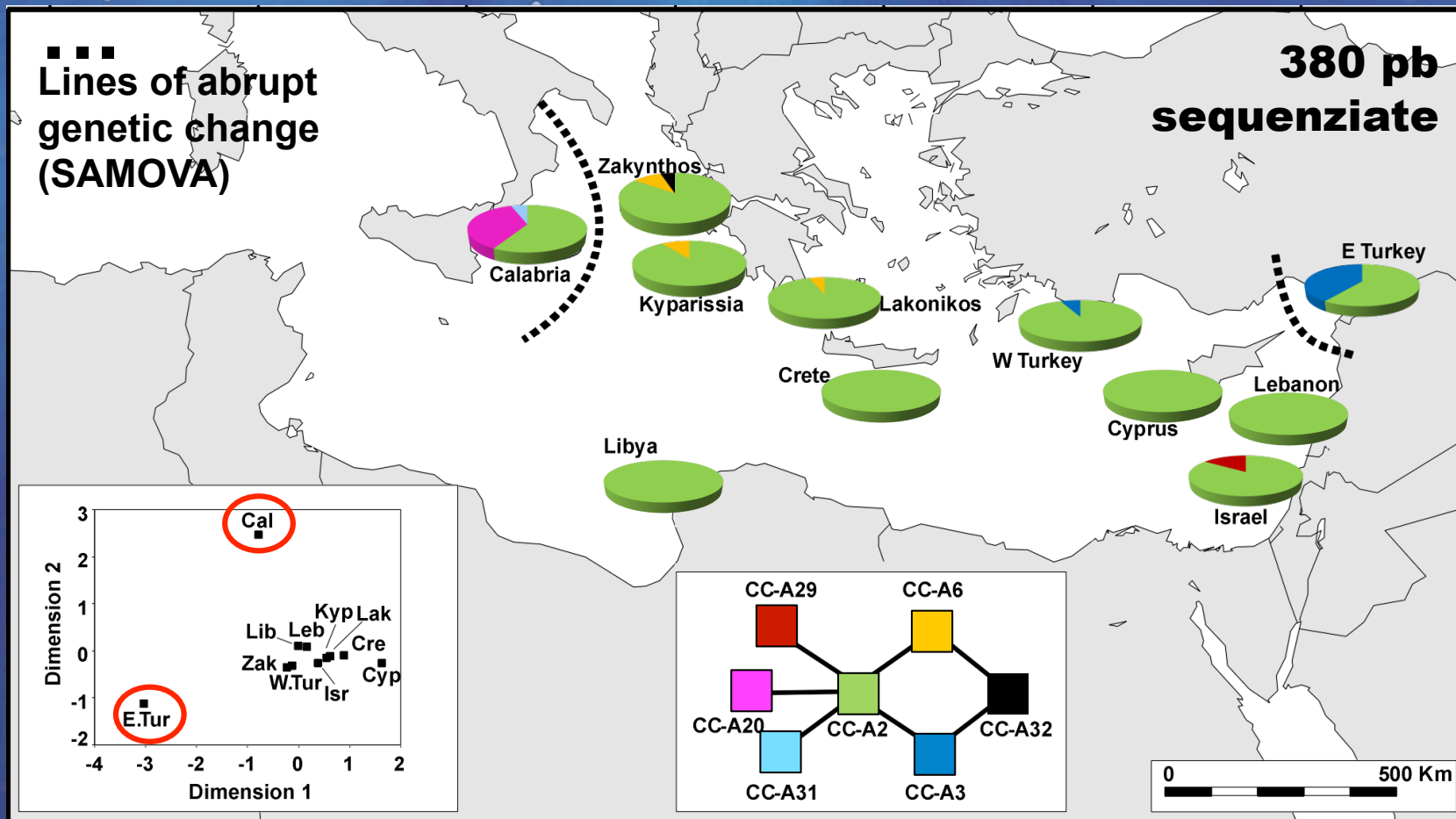


Trend in



(foto P. Storino)

DIVERSITÀ MITOCONDRIALE NELLE COLONIE DEL MEDITERRANEO (AL 2009)



MDS plot

Network evolutivo degli
aplotipi mediterranei

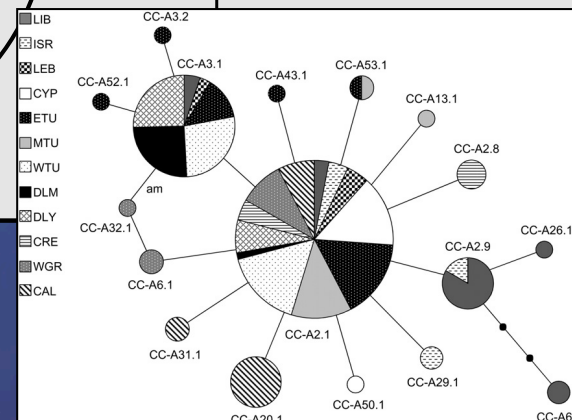
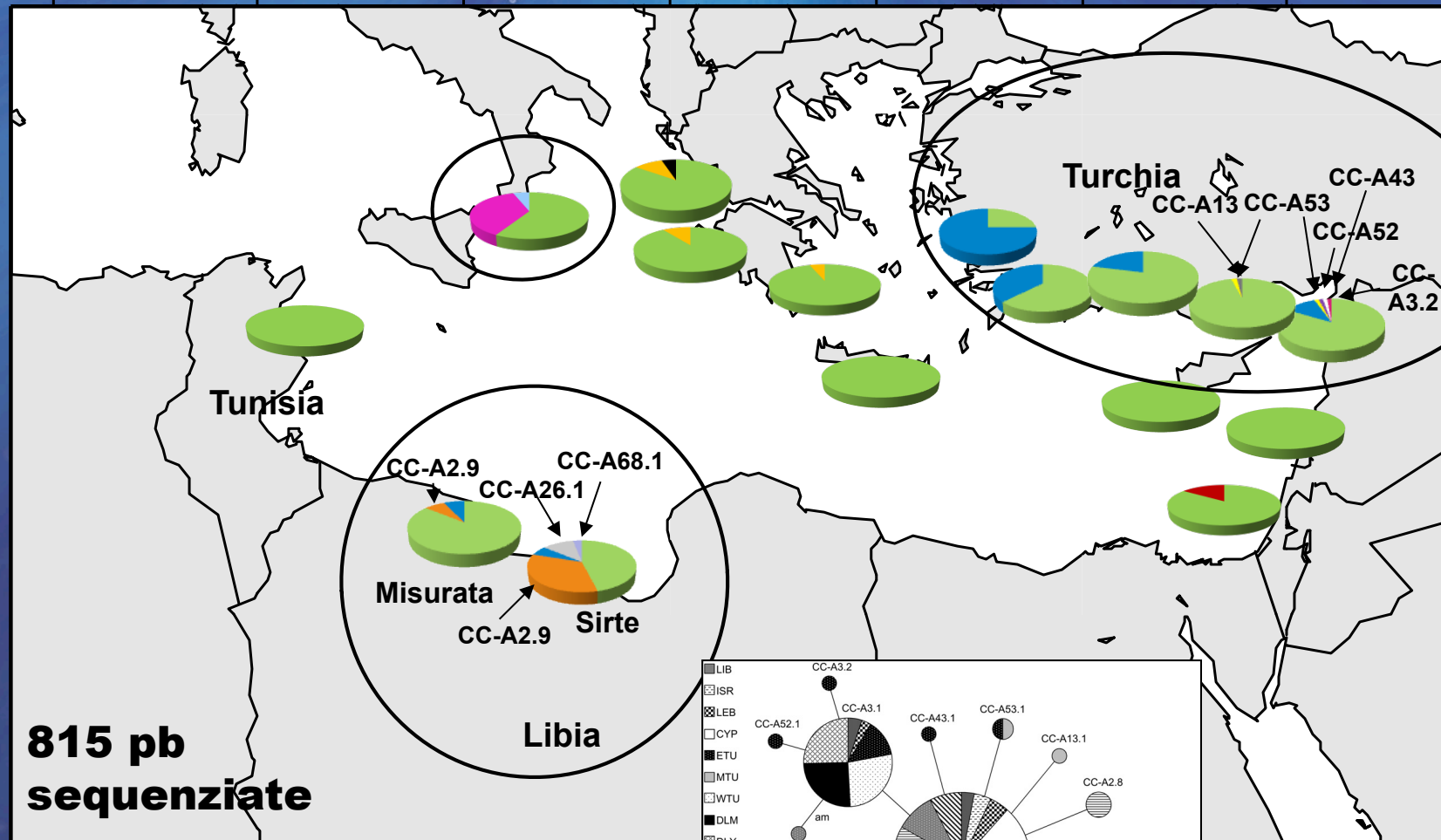
RISULTATI

- **La popolazione nidificante in Calabria aggiunge una quota di diversità mitocondriale nuova per il Mediterraneo;**
- **La diversità delle colonie calabresi e turche è incompatibile con un processo di fissazione casuale delle linee evolutive e deriva genetica;**
- **Possibilità di eventi recenti e multipli di colonizzazione da fonti interne al Mediterraneo o più probabilmente dall'Atlantico;**
- **La popolazione riproduttiva calabrese potrebbe essere considerata una “Evolutionary Significant Unit”, sulla base del mtDNA.**

(Garofalo et al., 2009)



AGGIORNAMENTO AL 2012



IMPLICAZIONI

- Nuovi sub-aplotipi vengono identificati all'interno degli aplotipi più comuni (es. CC-A2), diventando indizi della provenienza da una specifica colonia (es. CC-A2.8 di Creta) rispetto al “calderone” complessivo mediterraneo;
- Nuove colonie mai studiate vengono caratterizzate ex novo, aggiungendosi al database delle “rookeries source”;
- Il quadro complessivo cambia continuamente, facendo variare anche le MSA che si fanno sugli stock di pesca/spiaggiamento;
- Si modificano anche le “Evolutionary Significant Units” da conservare.



Aumento delle colonie analizzate



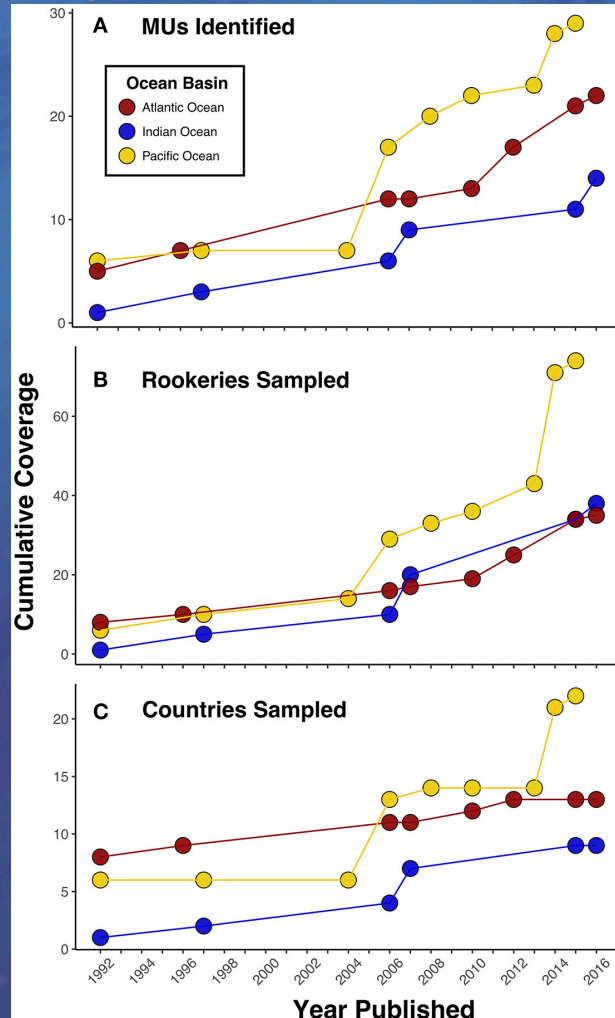
**Aumento dei marcatori genetici
utilizzati**



**Aumento della lunghezza delle
sequenze e del numero di loci STR**



**Aumento delle MU (Unità di
Management) e aumento della
conoscenza della specie**



(Komoroske et al., 2017)



NIDI OCCASIONALI E NUOVE COLONIZZAZIONI

Negli ultimi anni si sono osservate per la prima volta nidificazioni lungo la costa mediterranea della Spagna. In Italia sono in continuo aumento e segnalazioni di nidi occasionali (Toscana, Campania) e le aree che si stanno confermando siti di deposizione regolari (es. Puglia e Sicilia).

Benvenute al Nord! "Genetic makeup" delle femmine di *Caretta caretta* nel sito di nidificazione più settentrionale d'Italia

Luisa GAROFALO*, Letizia MARSLI*, Giuliana TERRACIANO*, Matteo BAINI*, Matteo SENESE*, Cecilia MANCUSI*, Rita LORENZINI*

1. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Centro di Referenza Nazionale per la Medicina Feroce Veterinaria
Via Tuscolana, 21 00100 Roma, Email: luisa.garofalo@izs.it
2. Dipartimento di Scienze Fisiche, della Terra e dell'Ambiente, Università di Salerno, Via Mattioli, 4 81100 Salerno
3. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, S.S. dell'Albanella e dei Braccioni, 4 50123 Pisa
4. APAT, Settore RSC - Via Marconi, 14 57100 Livorno

INTRODUZIONE

Due nidi della tartaruga marina *Caretta caretta* sono stati ritrovati per la prima volta in Toscana. Questi, posti a circa 50 km di distanza l'uno dall'altro (Fig.1), risultano i primi nidi di nidificazione italiani più settentrionali. Entrambi sono stati rinvenuti accidentalmente lungo le coste delle province di Grosseto, il primo sulla spiaggia di Scartino nel 2013, il secondo sul Tombolo della Cannelletta a Orbetello nel 2015. Sempre nella stessa provincia, due femmine adulte riprodottrici sono state rinvenute morte, una sulla spiaggia di Castiglione della Pescaia nel 2011 e l'altra interrata nelle reti da pesca al largo del Golfo di Follonica nel 2016 (Fig.1). Inoltre, una femmina è stata avvistata quinquennale (2010) mentre emergeva per deporre la uova sulla spiaggia di Capalbi in questo caso l'ovale è ancora in attesa di schiusa.

MATERIALE

NIDI: per i dati di campo relativi ai due nidi rinvenuti nel 2013 e 2015, si rimanda ad un altro poster presentato in questo congresso. Per l'analisi genetica è stato analizzato un singolo piccolo morto per nido.

FEMMINE: 1. Individuo rinvenuto (04/02/2011) a Castiglione della Pescaia - Confed Canopo Longhi (CCCL) 70 cm. Affermata dell'ovale di nidificazione in fase di sviluppo.

2. Individuo rinvenuto (1/08/2016) RT/905/2016 nel Golfo di Follonica, CCCL 77 cm. Presenti numerosi follicoli prossimi all'ovulazione.

METODI

L'estrattone del DNA è stato effettuato con il Qiagen Mini Kit (QIAGEN) partendo da 25 mg di tessuto muscolare dei piccoli e delle femmine morte. Per l'amplificazione si è successivamente eseguito di 15 µl di base (B) del D-loop mitocondriale sono stati utilizzati primer CCAS152 e H950, seguendo il metodo illustrato in (1). L'amplicazione degli spallati è conforme alle raccomandazioni dell'Archea Car Center for Sea Turtle Research (ACCSRT, <http://accsrt.it/italy>).

RESULTATI

Gli spallati D-loop ottenuti dall'analisi dei piccoli morti sono CC-A16 (nido 2013) e CC-A2 (nido 2015). Quelli delle femmine adulte sono CC-A13 (individuo 2011) e CC-A2 (individuo 2016).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'identificazione di due spallati mitocondriali differenti nei due siti ancora indica che essi sono stati depositi di femmine diverse. L'apollone CC-A2 è il più comune in tutte le colonie di nidificazione mediterranea ed diffusa anche in quelle atlantiche (2). Poiché una femmina di *C. caretta* generalmente non si riproduce in due anni consecutivi è presumibile che i nidi ritrovati nel 2013 non sia stato depositato dall'individuo rinvenuto morto nel 2016, nonostante quest'ultima coincidesse con i nidi la stessa spiaggia D-loop CC-A2. L'apollone CC-A16 invece è stata identificata finora solo in una colonia atlantica della Florida (2) e in una rinvenuta nel 2002 sulla spiaggia di Bari Donata (Caretta, senza mitocondriale) (3). Due individui parziali dell'apollone CC-A16 invece sono stati catturati accidentalmente sulle acque costiere dell'Adriatico (4 e dati non pubblicati) e un altro nella porzione meridionale del Mar di Levante (5). Dai precedenti avvistamenti che le acque costiere del 2002 sono frequenzate di individui prevalentemente adulti e di origine mediterranea, con una preponderanza di femmine BS. La presenza di questo nido di individui provenienti dall'Atlantico conferma finora l'esistenza di giovani (1, 6), ma è stata dimostrata la possibilità che avvengano da parte di femmine atlantiche nuove colonizzazioni di siti riproduttivi nel Mediterraneo (1). La femmina che ha depositato le uova a Scartino nel 2013 potrebbe quindi provenire dalla Florida, oppure potrebbe essere nata in qualche colonia mediterranea (ad esempio la Croia, dove era stata identificata in passato l'apollone CC-A16) ma una sequenza di 380 bp, in cui questo apollone non è stato ancora campionato. Come emerge in questo nel 10 altro studi (1, 3), i siti di nidificazione più settentrionali italiani possono rappresentare veri e propri siti di nidificazione per l'intera fascia mediterranea.

BIBLIOGRAFIA (1) Carraro et al. (2015), Mar. Biol., 158: 2085-2095.
(2) Carraro et al. (2015), Aquatic Conserv., Mar. Ecol. Prog. Ser., 1: 869-884.
(3) Muffett et al. (2016), Sci. Rep., 6: 27883.
(4) Vitiello et al. (2015), Aqua. Mar. Biol., 1: 173-182.
(5) Cioia et al. (2016), Mar. Biol., 169: 509-519.
(6) Carraro et al. (2015), Aquatic Conserv., Mar. Ecol. Prog. Ser., 1: 869-884.

RINGRAZIAMENTI Il ringraziamento è rivolto al Prof. Roberto Pico per aver permesso l'uso del microscopio sulla tartaruga morta nel 2013.

Indizi di connettività nella regione ionica tra colonie di nidificazione della tartaruga marina *Caretta caretta*

Luisa GAROFALO*, Gianni INSACCO*, Dino SCARAVELLI*, Rita LORENZINI*

1. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Centro di Referenza Nazionale per la Medicina Feroce Veterinaria
Via Tuscolana, 21 00100 Roma, Email: luisa.garofalo@izs.it
2. Museo Civico di Storia Naturale, Via degli Stessi, 9 37013 C.so. Ragnoli.
3. Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 10 40064 Ozzano dell'Emilia (Bologna).

INTRODUZIONE

L'attività di nidificazione della tartaruga marina *Caretta caretta* in Sicilia è stata per lungo tempo in declino, ma negli ultimi anni si è verificata una sostanziale ripresa anche in zone distanti dalle isole Pelagie. Ciò ha portato a riconsiderare l'importanza di quest'area di riproduzione per la specie in Italia e ad individuare due zone di nidificazione frequente lungo la costa argentina e palermitana (1). Il ritrovamento di 13 nidi lungo la costa sud-orientale nelle province di Catania, Ragusa e Siracusa negli anni 2010-2013 (Inscaco, dati non pubblicati) lascia ipotizzare la presenza di un terzo possibile hotspot riproduttivo in Sicilia. Caratterizzando per la prima volta il DNA mitocondriale di due nidi rinvenuti lungo il versante ionico siciliano, ed analizzando anche uno depositato sul lato tirreno, abbiamo voluto indagare se le femmine che si riproducono ora in Sicilia potrebbero in futuro costituire un'unità genetica distinta rispetto alle altre mediteranee.

MATERIALI E METODI

Il DNA è stato estratto a partire da 25 mg di tessuto dei piccoli morti oppure, se non disponibili, dai pezzi di uova non schiusi recando all'interno di tre nidi rinvenuti lungo le coste tirreniche e ioniche della Sicilia (Fig.1, Tab.1). È stato campionato un solo piccolo/uovo per nido. L'amplificazione e il sequenziamento del D-loop mitocondriale sono stati effettuati seguendo i protocolli illustrati in (2). Gli spallati ottenuti all'interno le sequenze sono stati classificati secondo la nomenclatura dell'Archea Car Center for Sea Turtle Research (ACCSRT, <http://accsrt.it/italy>).

Tabella 1. Dati relativi ai tre nidi analizzati e alle loro distanze rispetto al centro di riferimento (0°).

Lungo	Data	N° di uova	Successo	Apollone	D-loop
1. Nido	15/05/2013	38	0%	CC-A2	(870 bp)
2. Nido	15/05/2013	31	0%	CC-A2	(870 bp)
3. Nido	15/05/2013	31	0%	CC-A2	(870 bp)

Figura 1. La mappa mostra la posizione dei tre nidi analizzati in gruppo, oltre colore nella quale è stata rinvenuta l'apollone CC-A13 (2). Le frecce indicano le ipotesi connettive tra le aree di nidificazione, con la loro intensità e la loro direzione. La mappa mostra la posizione dei tre nidi analizzati e delle loro distanze rispetto al centro di riferimento (0°).

RESULTATI

I risultati dell'analisi del D-loop dei tre nidi analizzati sono riportati in Tab.1. Analizzando i dati di campo relativi a ciascun nido, per il nido numero 3 si è ottenuta una sequenza più corta delle altre, poiché erano disponibili solo pezzi di uova schiuse dai quali si è ottenuto DNA di bassa qualità.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Secondo quanto emerso dall'analisi genetica un insieme di due femmine (due parentali dell'apollone CC-A2 e l'altra del CC-A13) ha depositato le proprie uova sulle spiagge ioniche siciliane nel 2013. L'apollone CC-A2, ritrovato nel nido di Pellicci (PA), era stato precedentemente identificato anche in nido nel deserto lungo le coste siciliane che si affacciano sul Tirreno (Palermo) e sulla costa di Sicilia (Agrigento) (3). Questo apollone è ampiamente diffuso in Mediterraneo ed è presente a frequenze molto elevate anche in alcune colonie atlantiche (2) con un quilibrio indicativo di una specifica provenienza geografica. L'apollone CC-A13, del quale si è osservato un solo esemplare anche in due nidi rinvenuti nel 2006 e 2007 della provincia di Catania (4), è invece molto raro in Mediterraneo. La stessa apollone CC-A13 è stata rinvenuta in un nido di riproduzione (5) in Sicilia, insieme a Lophocarenum e Lophocarenum, viene considerata unità genetica indipendente (6). Questo apollone, invece, ancora da accertare il numero effettivo di femmine parentali dell'apollone CC-A13, si è riprodotto nel Mediterraneo centrale ed il loro grado di fedeltà per determinati siti di nidificazione. Tra individui recenti l'apollone CC-A13 sono stati rinvenuti in passato anche nelle acque costiere del Tirreno (2, Nord Adriatico (Gennarini, dati non pubblicati) e Tirreno (5)). Questo apollone è quindi raro nel Mediterraneo e non è mai stato rinvenuto finora nelle colonie atlantiche di questa specie. La sua presenza nei tre nidi di Sicilia potrebbe indicare una migrazione da una colonia atlantica verso la Sicilia o da una colonia mediterranea verso la Sicilia.

BIBLIOGRAFIA (1) Carraro et al. (2015), Aqua. Mar. Biol., 1: 181-188.
(2) Carraro et al. (2015), Mar. Biol., 158: 2085-2095.
(3) Carraro et al. (2015), Mar. Biol., 158: 2085-2095.
(4) Carraro et al. (2015), Mar. Biol., 158: 2085-2095.
(5) Carraro et al. (2015), Mar. Biol., 158: 2085-2095.
(6) Carraro et al. (2015), Mar. Biol., 158: 2085-2095.

Luoghi di incontri estivi... anche per tartarughe marine! Caratterizzazione mitocondriale dei nidi di *Caretta caretta* deposti sulle spiagge dell'Adriatico centro-meridionale e dello Ionio settentrionale

Luisa GAROFALO*, Giacomo MARZANO*, Annachiara CAPUTO*, Piero CARLINI*, Vincenzo OLIVIERI*, Rita LORENZINI*

1. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Centro di Referenza Nazionale per la Medicina Feroce Veterinaria
Via Tuscolana, 21 00100 Roma, Email: luisa.garofalo@izs.it
2. Centro di Ricerca e Sviluppo, Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Via San Giuseppe 1 70123 Corvino San Rocco (Bari)
3. Centro ricerca tartarughe marine, Osservatorio Nazionale Tartarughe Marine, Via S. Calisto, Capriano 73021 Calimera (Lecce)
4. Dipartimento di Ecologia, Museo di storia naturale del Salento, S.P. Calimera, Capriano 73021 Calimera (Lecce)
5. Centro Studi Etno-Cultura, Via dei Martiri 15 60125 Pesaro

INTRODUZIONE

In passato gli eventi di nidificazione della tartaruga marina *Caretta caretta* sulle spiagge pugliesi sono stati sporadici e mai associati ad una raccolta di materiale biologico finalizzata all'analisi genetica dei nidi. In questo lavoro abbiamo voluto caratterizzare il DNA mitocondriale delle femmine che hanno deposto le proprie uova lungo le coste adriatiche e ioniche pugliesi (province di Lecce e Taranto) negli anni 2007-2012. Abbiamo analizzato anche un piccolo proveniente da un nido rinvenuto nel 2013 sulla spiaggia di Roseto degli Abruzzi (Teramo). Il sito di nidificazione più settentrionale descritto finora lungo l'Adriatico (1). Lo scopo del lavoro è quello di verificare se le femmine che si sono riprodotte lungo le coste del basso Adriatico e dell'Ionio sono provenienti dalle vicine colonie di nidificazione calabresi e greche, oppure se sono originarie di siti più lontani.

MATERIALI E METODI

Il DNA è stato estratto a partire da 25 mg di tessuto dei piccoli morti oppure, se non disponibili, dai pezzi di uova non schiusi recando all'interno di tre nidi rinvenuti lungo le coste tirreniche e ioniche della Sicilia (Fig.1, Tab.1). È stato campionato un solo piccolo/uovo per nido. L'amplificazione e il sequenziamento del D-loop mitocondriale sono stati effettuati seguendo i protocolli illustrati in (2). Gli spallati ottenuti all'interno le sequenze sono stati classificati secondo la nomenclatura dell'Archea Car Center for Sea Turtle Research (ACCSRT, <http://accsrt.it/italy>).

Tabella 1. Dati relativi ai tre nidi analizzati e alle loro distanze rispetto al centro di riferimento (0°).

Lungo	Data	N° di uova	Successo	Apollone	D-loop
1. Nido	15/05/2013	38	0%	CC-A2	(870 bp)
2. Nido	15/05/2013	31	0%	CC-A2	(870 bp)
3. Nido	15/05/2013	31	0%	CC-A2	(870 bp)

Figura 1. Localizzazione dei tre nidi analizzati e delle loro distanze rispetto al centro di riferimento (0°). La mappa mostra la posizione dei tre nidi analizzati e delle loro distanze rispetto al centro di riferimento (0°).

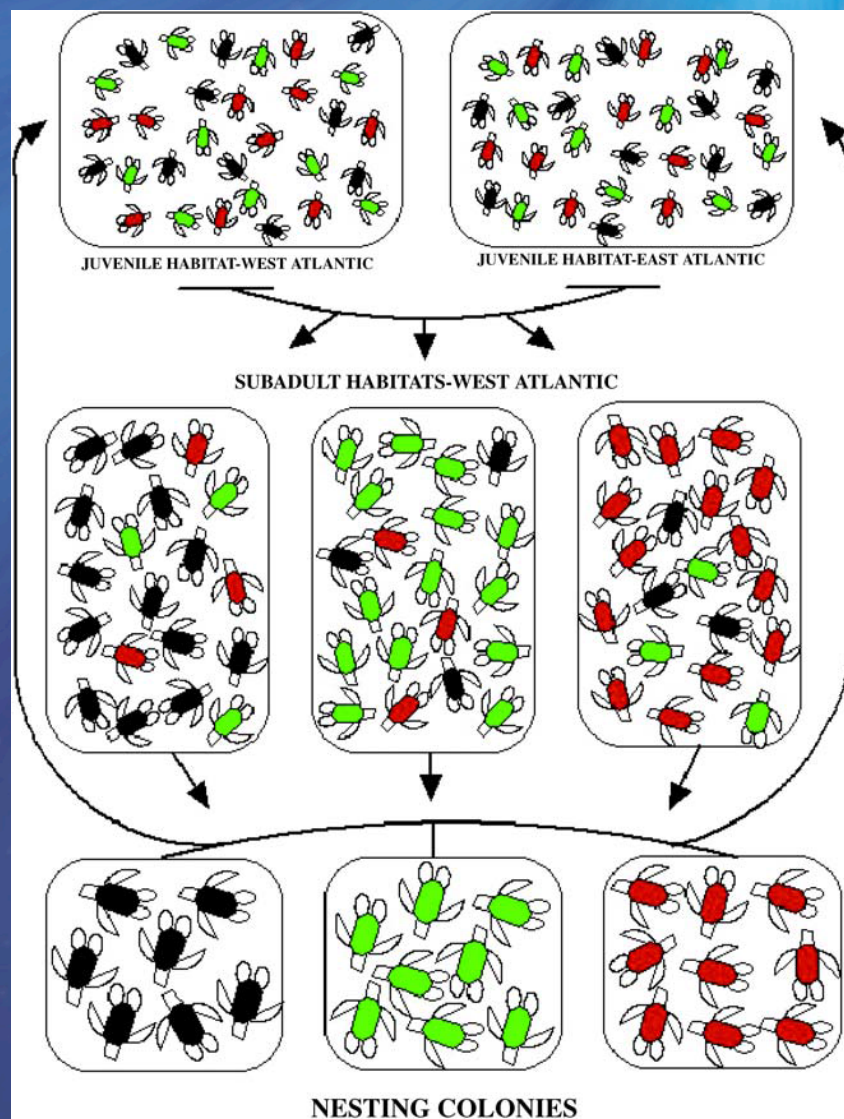
RESULTATI

I risultati dell'analisi del D-loop dei tre nidi analizzati sono riportati in Tab.1. Analizzando i dati di campo relativi a ciascun nido, per il nido numero 3 si è ottenuta una sequenza più corta delle altre, poiché erano disponibili solo pezzi di uova schiuse dai quali si è ottenuto DNA di bassa qualità.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Secondo quanto emerso dall'analisi genetica un insieme di due femmine (due parentali dell'apollone CC-A2 e l'altra del CC-A13) ha depositato le proprie uova sulle spiagge ioniche siciliane nel 2013. L'apollone CC-A2, ritrovato nel nido di Pellicci (PA), era stato precedentemente identificato anche in nido nel deserto lungo le coste siciliane che si affacciano sul Tirreno (Palermo) e sulla costa di Sicilia (Agrigento) (3). Questo apollone è ampiamente diffuso in Mediterraneo ed è presente a frequenze molto elevate anche in alcune colonie atlantiche (2) con un quilibrio indicativo di una specifica provenienza geografica. L'apollone CC-A13, del quale si è osservato un solo esemplare anche in due nidi rinvenuti nel 2006 e 2007 della provincia di Catania (4), è invece molto raro in Mediterraneo. La stessa apollone CC-A13 è stata rinvenuta in un nido di riproduzione (5) in Sicilia, insieme a Lophocarenum e Lophocarenum, viene considerata unità genetica indipendente (6). Questo apollone, invece, ancora da accertare il numero effettivo di femmine parentali dell'apollone CC-A13, si è riprodotto nel Mediterraneo centrale ed il loro grado di fedeltà per determinati siti di nidificazione. Tra individui recenti l'apollone CC-A13 sono stati rinvenuti in passato anche nelle acque costiere del Tirreno (2, Nord Adriatico (Gennarini, dati non pubblicati) e Tirreno (5)). Questo apollone è quindi raro nel Mediterraneo e non è mai stato rinvenuto finora nelle colonie atlantiche di questa specie. La sua presenza nei tre nidi di Sicilia potrebbe indicare una migrazione da una colonia atlantica verso la Sicilia o da una colonia mediterranea verso la Sicilia.

BIBLIOGRAFIA (1) Carraro et al. (2015), Aqua. Mar. Biol., 1: 181-188.
(2) Carraro et al. (2015), Mar. Biol., 158: 2085-2095.
(3) Carraro et al. (2015), Mar. Biol., 158: 2085-2095.
(4) Carraro et al. (2015), Mar. Biol., 158: 2085-2095.
(5) Carraro et al. (2015), Mar. Biol., 158: 2085-2095.
(6) Carraro et al. (2015), Mar. Biol., 158: 2085-2095.



**Quindi filopatria, ma non
più così stretta come si
pensava prima...**

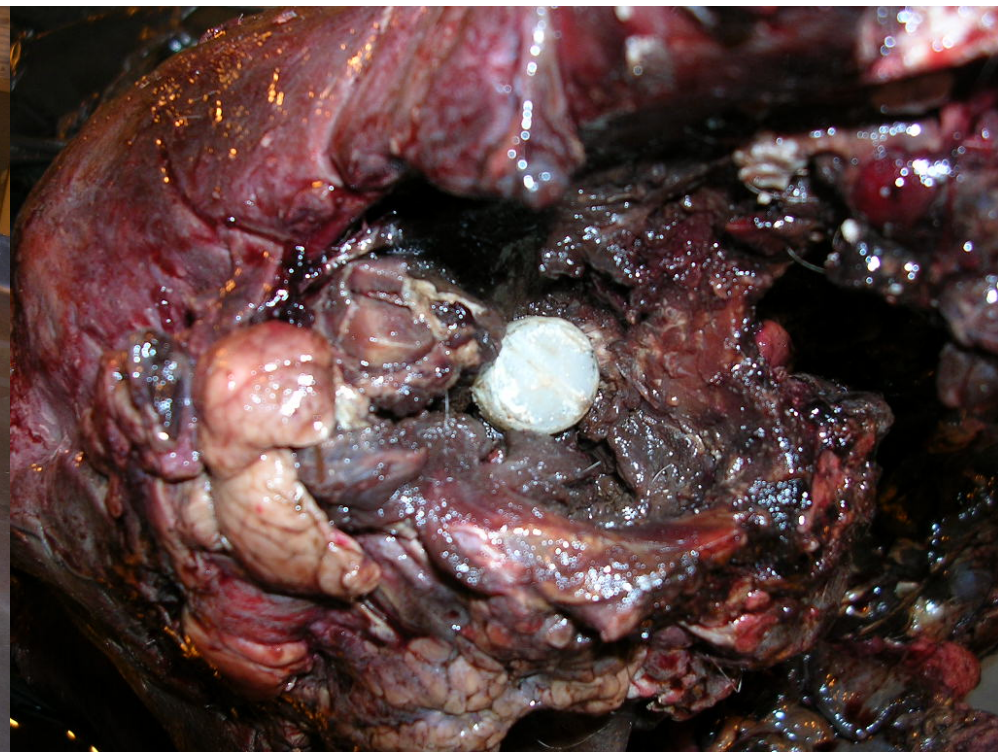


**Le tartarughe marine si
possono adattare ai
cambiamenti naturali e
mediati dall'uomo**



**Alcune linee si sono perse,
altre si sono differenziate
nel tempo... ma**





**I pericoli maggiori in mare derivano dalla pesca accidentale,
dall'impatto con le imbarcazioni, dall'ingestione di materie plastiche
e rifiuti vari...**



**+ sulla terra:
Perdita degli habitat
idonei alla
riproduzione**



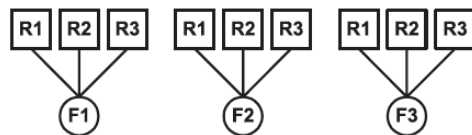
ANALISI GENETICA DEGLI STOCK

MSA: Mixed Stock Analyses

Elaborazioni statistiche bayesiane di dati genetici. Servono a stimare la proporzione di individui (spiaggiati o pescati) che provengono da una data colonia.



(a) many-to-one



(b) many-to-many

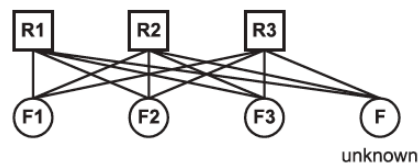
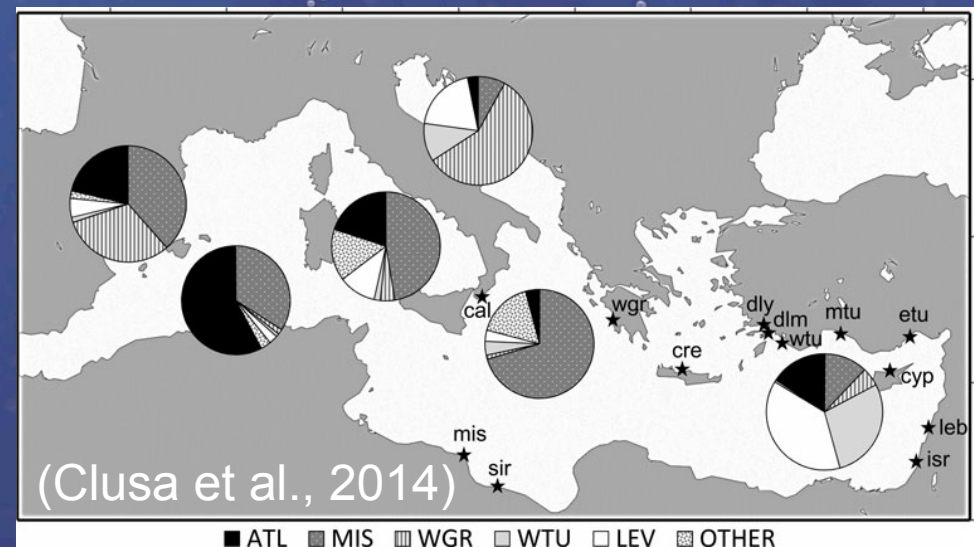


Fig. 1 Schematic diagrams of traditional and new mixed stock analyses. (a) Many-rookeries-to-one foraging-ground (foraging-ground-centric approach; traditional mixed stock analysis); (b) many-to-many approach. R, rookery (square); F, foraging ground (circle). The many-to-one method divides the mixed stock analysis into two or more independent problems and ignores the dependence among contributions of one rookery to several different foraging grounds.



MIGRAZIONI

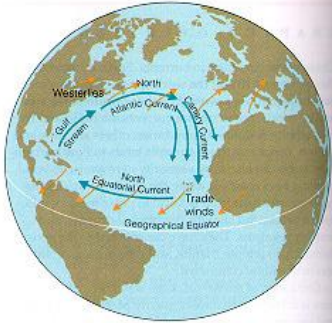
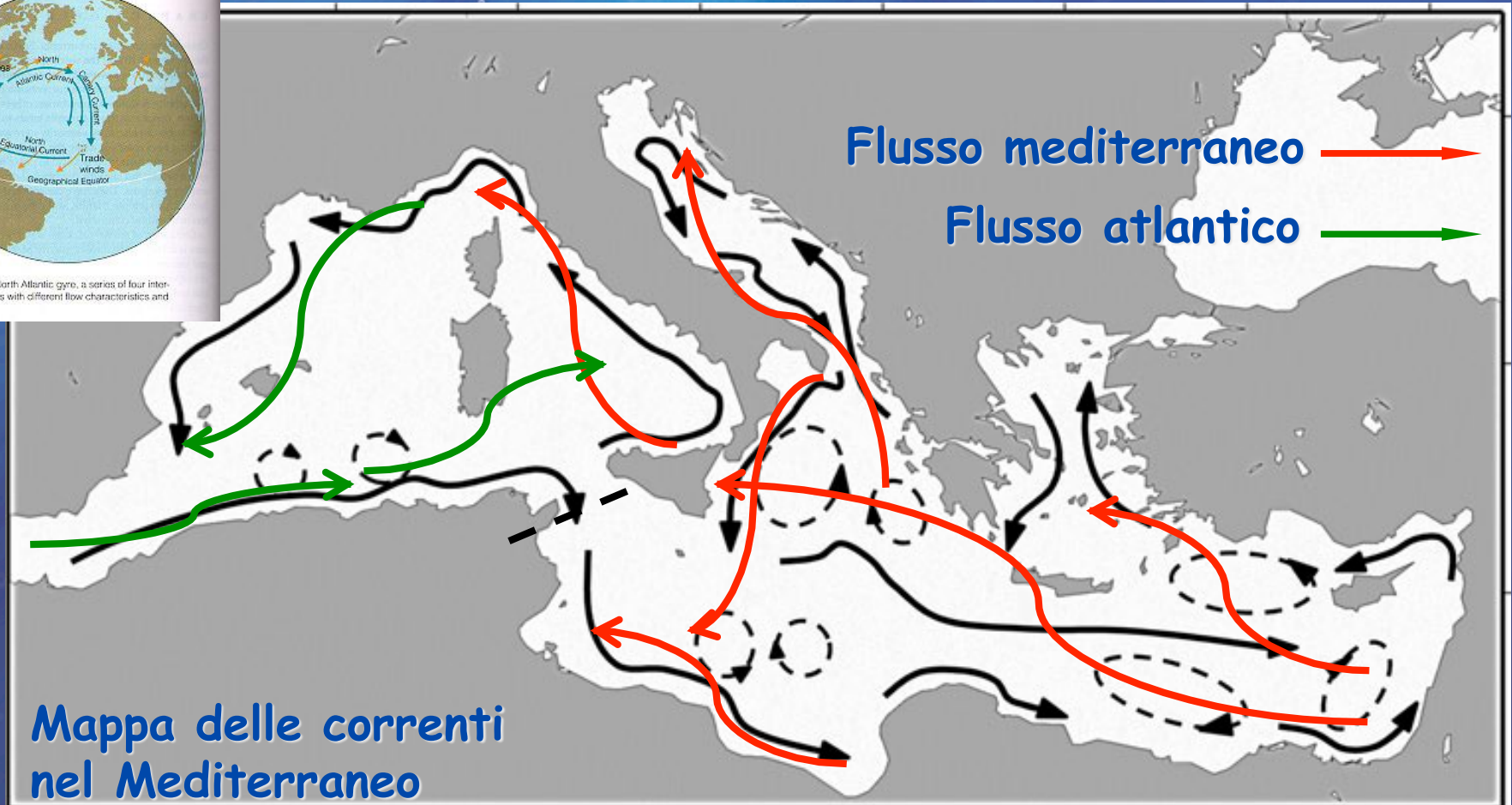


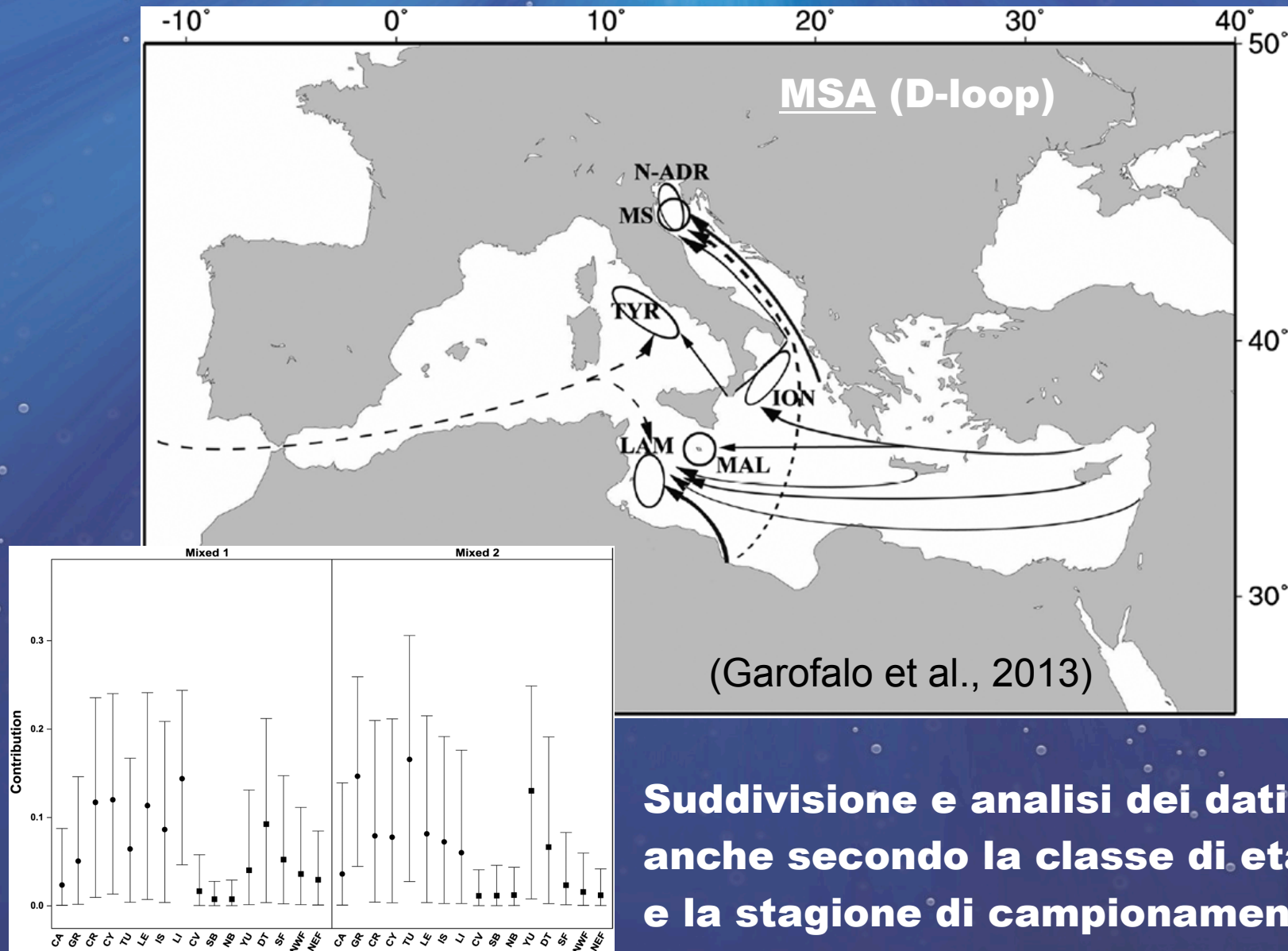
Figure 9.3 The North Atlantic gyre, a series of four inter-connected currents with different flow characteristics and temperatures.



Il Tirreno è un crocevia di diversi flussi migratori, sia di individui di origine mediterranea sia atlantica, soprattutto giovani.



**6 stock italiani e maltesi derivanti da spiaggiamenti o pesca
analizzati per l'mtDNA (D-loop) e per 6 loci microsatellite.**



RISULTATI

- ✓ **Complessivamente le acque costiere italiane e maltesi sono frequentate da tartarughe mediterranee, con un contributo maggiore da parte delle colonie più vicine e più grandi;**
- ✓ **Le tartarughe giovani di diversa provenienza si mescolano maggiormente rispetto agli individui più adulti (strutturamento);**
- ✓ **Animali di origine atlantica sono limitati alle aree più occidentali (Tirreno e Lampedusa);**
- ✓ **Esistono tragitti migratori specifici dalle rookeries ai foraging grounds, in particolare: il nord-Adriatico sembra frequentato da individui principalmente greci, l'area intorno a Lampedusa da individui libici e le acque ioniche italiane da tartarughe turche;**
- ✓ **Il Tirreno è frequentato da tartarughe calabresi e occasionalmente atlantiche. Gli individui analizzati sono piuttosto grandi (51-80 cm) ed in prevalenza femmine.**
- ✓ **Poca strutturazione ai marcatori biparentali, il che suggerisce un alto flusso genico mediato dai maschi.**



Implicazioni per la conservazione

I risultati delle analisi genetiche possono essere utilizzati per:

1. Valutare l'esistenza di Evolutionary Management Units da tutelare

2. Definire quali popolazioni sono isolate geneticamente e quali hanno un flusso genico continuo

3. Individuare quali popolazioni nidificanti siano maggiormente “impattate” dalla cattura accidentale o da spiaggiamenti dovuti a cause antropiche

4. Monitorare eventuali cambiamenti nella composizione genetica degli stock nel tempo e rilevare colonizzazioni di nuove femmine nidificanti

5. Comprendere aspetti sconosciuti della biologia ed ecologia della specie

ANALISI GENETICA DI INDIVIDUI MUSEALI



72 individui da 4 musei (3 italiani ed uno maltese), sequenza corta D-loop + 4 loci STR



Buon successo di amplificazione e composizione genetica nel secolo scorso sovrapponibile all'attuale

(Garofalo et al., 2011)



IDENTIFICAZIONE DI INDIVIDUI IBRIDI



Diversi individui ibridi (es. *C. caretta* x *E. imbricata*, *C. caretta* x *C. mydas*) sono stati ritrovati nel Pacifico e nell'Atlantico (in particolare in Brasile).

Finora nessun individuo ibrido è stato ritrovato in Mediterraneo...



(Garofalo et al., 2012)

Sospetto ibrido
dalla morfologia
(mix di 3 specie)



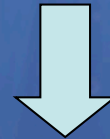
ANALISI GENETICA
(D-loop + 3 geni
nucleari
sequenziati)

NO IBRIDO



Neospiroorchis* in *C. caretta

Determinazione della presenza, prevalenza e patologia di trematodi digenei del sistema cardiocircolatorio in individui di *C. caretta* spiaggiati in Nord-Adriatico.

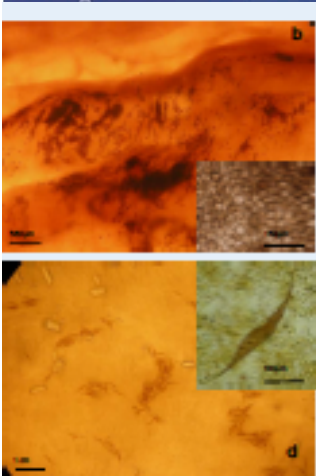


Ricerca delle uova in campioni fecali ed omogenati di milza. Analisi istologica degli organi. Analisi molecolare sia dei parassiti ritrovati, sia degli ospiti.



Prima segnalazione di *Neospiroorchis* sp. nel Mediterraneo + infezione da *Hapalotrema mistroides*. Tartarughe di origine mediterranea (dalla Grecia e da Creta).

(Marchiori et al., submitted)



Analisi strutturale delle mutazioni non-sinonime nei geni ND1 e ND3

(Novelletto et al., 2016)

Table 4: Structural classification of the amino acid substitutions in NADH ubiquinone oxidoreductase subunits ND1 and ND3

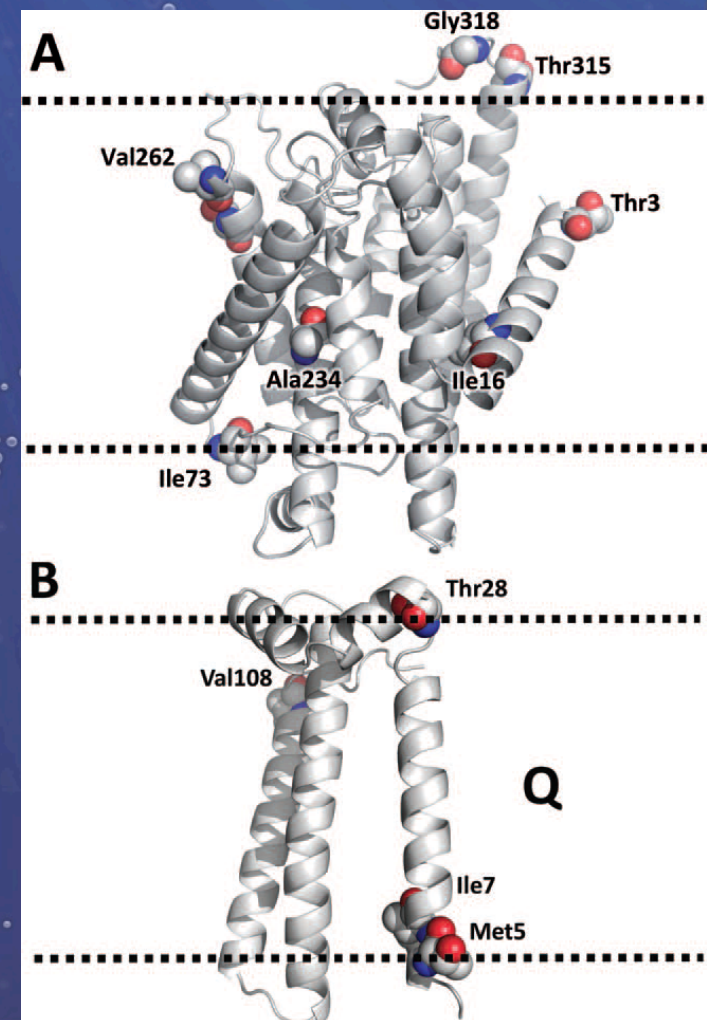
Gene	Position	Ancestral codon	Mutated codon	Ancestral residue	Mutated residue	Structural classification
ND1	3	ACC	GCC	Thr	Ala	C ^a
ND1	16	ATC	GTC	Ile	Val	B
ND1	73	ATC	ACC	Ile	Thr	A
ND1	234	GCC	ACC	Ala	Thr	C ^b
ND1	262	GTA	ATA	Val	Met	B
ND1	315	ACC	GCC	Thr	Ala	A
ND1	318	GGC	AGC	Gly	Ser	A
ND3	5	ATA	ACA	Met	Thr	A
ND3	7	ATC	ACC	Ile	Thr	A
ND3	28	ACA	ATA	Thr	Met	A

Note. For structural classification, A = located in a transmembrane α -helix tail, qualified as hydrophilic or hydrophobic adaptation due to membrane thickness alteration; B = conservative residue substitution (hydrophobic to hydrophobic, internal to membrane); C = nonconservative residue substitution, structural adaptation derived from concerted mutations.

^aThis mutation is most likely necessary to establish hydrophobic interactions with surrounding residues belonging to the flanking subunit.

^bThis mutation is justified by a hydrogen bond established with the side-chain carboxyl of the conserved residue Asp56.

Possibili geni sotto selezione e
varianti vantaggiose per
l'adattamento termico



DIREZIONI FUTURE

• **Integrazione dei dati genetici con altri tipi di dati
(isotopi stabili, scheletrocronologia, ormoni,
telemetria, modelli oceanografici delle correnti, ecc.)**

Seascape genomics = dati genetici + ambientali





**Grazie a
tutti per
l'attenzione!**