

Metodi molecolari al servizio della conservazione nel genere *Alectoris*

Filippo BARBANERA

Dipartimento di Biologia - Unità di Zoologia e Antropologia
Via A. Volta, 4 - 56126 Pisa - filippo.barbanera@unipi.it

Dal 2001 il laboratorio di **Genetica della Conservazione ed Evoluzione Molecolare dei Vertebrati del Dipartimento di Biologia** dell'Università di Pisa svolge ricerche di genetica di popolazione sulle pernici del genere *Alectoris* (Phasianidae). In particolare, tre specie sono oggetto di studio. La pernice rossa (*A. rufa*: Fig. 1), distribuita in Europa sud-occidentale, la coturnice orientale (*A. chukar*), presente dalla Penisola Balcanica attraverso tutto il Paleartico orientale fino alla Manciuria, e la pernice berbera (*A. barbara*), detta anche "pernice sarda" in quanto in Europa si trova (quasi) esclusivamente in Sardegna (Fig. 2). Queste tre specie sono classificate come *Least Concern* (IUCN, 2013). Tuttavia, BirdLife International (2004) include questi stessi taxa tra quelli d'interesse europeo per la conservazione (*Species of European Conservation Concern*) con valutazione "vulnerabile" (*A. rufa* e *A. chukar*) o "minacciato" (*A. barbara*). La trasformazione e la perdita dell'habitat, la meccanizzazione e l'uso dei pesticidi in agricoltura unitamente alla forte pressione venatoria costituiscono fattori di minaccia rilevanti per le tre specie oggetto di questo contributo.



Fig. 1. Pernice rossa fotografata sull'isola di Pianosa (foto F. Barbanera)

Il genere *Alectoris* si è evoluto recentemente. Si tratta di un gruppo di specie non più antico di sei milioni di anni. La pernice berbera è verosimilmente uno dei taxa alla base della radiazione adattativa

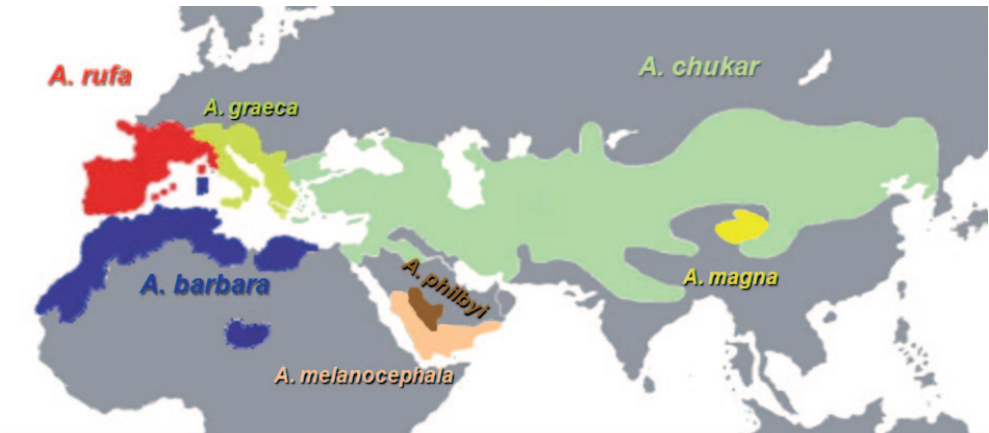


Fig. 2. Areale delle sette specie di pernici del genere *Alectoris*

dell'intero genere, mentre la pernice rossa e la coturnice orientale sono tra le specie evolutivamente più giovani (Watson, 1962; Randi *et al.*, 1998). Non sorprende, pertanto, che in natura buona parte delle pernici *Alectoris* sia in grado di incrociarsi con successo in condizioni di parapatria, come accade, ad esempio, tra *A. rufa* ed *A. graeca* sulle Alpi Marittime (Bernard-Laurent, 1984) oppure tra *A. chukar* e la coturnice di Przewalski (*A. magna*) in Cina centrale (Liu *et al.*, 2006). L'ibridizzazione in natura sorprende ancor meno se si considera come negli uccelli un gran numero di specie sia in grado di incrociarsi e produrre prole fertile (McCarthy, 2006), in modo particolare tra i galliformi (21% delle specie: Grant e Grant, 1992). Nel caso del genere *Alectoris* l'ibridizzazione avviene in natura ed in cattività per opera dell'uomo. E' così possibile affermare che tali pernici si comportano come popolazioni morfologicamente e geneticamente molto ben differenziate piuttosto

che come "vere" specie, essendo capaci di superare facilmente barriere riproduttive prevalentemente di tipo ecologico.

Per quanto concerne l'ibridizzazione in cattività, l'incrocio tra pernice rossa e coturnice orientale è senza dubbio il caso più rilevante da un punto di vista conservazionistico. La pernice rossa è incrociata dall'uomo con la coturnice orientale per abbattere i costi di allevamento attraverso la produzione di animali più rustici e capaci di deporre un numero significativamente più elevato di uova rispetto a soggetti *A. rufa* geneticamente "puri". Poiché gli individui ibridi di prima generazione (F1) *A. rufa* x *A. chukar* sarebbero facilmente riconoscibili da un punto di vista morfologico anche in assenza di controlli di tipo genetico (*pattern* del collare: cf., Goodwin, 1986; barratura alare: cf., Wilkinson, 1991), gli allevatori re-incrociano (*backcross*) gli ibridi F1 con pernici rosse per una o più generazioni, fin tanto che i reincroci (ibri-

di di seconda o terza generazione o ancor più) ed i soggetti "puri" risultano fenotipicamente non più distinguibili. A seguito di massicce operazioni di ripopolamento per fini squisitamente di tipo venatorio ("put and take" o il così detto "lancio pronta caccia": Byers e Burger, 1979) piuttosto che di gestione mirata della specie, il rilascio (illegale) degli ibridi ha prodotto un profondo inquinamento genetico nella specie *A. rufa*, con virtuale scomparsa di popolazioni geneticamente integre almeno per quanto attiene la porzione più occidentale dell'areale (Barbanera *et al.*, 2005, 2010, 2011a; ma vedi anche il contributo di Negri *et al.*, 2013). In un recente lavoro prodotto da ricercatori spagnoli in cui al monitoraggio della riproduzione sul campo era associata una robusta indagine genetico-molecolare, è stato dimostrato che, sebbene gli ibridi *A. rufa* x *A. chukar* rilasciati in natura siano predati con frequenza doppia rispetto a quella delle pernici rosse geneticamente "pure", tale minor sopravvivenza è ben compensata dal più elevato numero di uova deposte per covata e dalla più alta frequenza di seconde covate a cura dei maschi (Casas *et al.*, 2012).

Malauguratamente, altri fattori minacciano la sopravvivenza delle specie *Alectoris*. Tra questi, l'origine geografica sconosciuta dei soggetti selezionati per le operazioni di ripopolamento costituisce motivo di perdita di struttura genetica e potenzialità adattative delle popolazioni. Ancora una volta la situazione della pernice rossa è assai esemplificativa. Infatti, è consuetudine impiegare in operazioni

di ripopolamento pernici rosse di origine non locale, bensì provenienti da porzioni dell'areale distribuzione della specie assai lontane. Pertanto, si tratta di animali che possiedono adattamenti di tipo comportamentale e fisiologico che possono essere assai diversi da quelli delle popolazioni al rinforzo delle quali sono destinati. Per fare solo un esempio, in Italia le pernici rosse sono importate dalla Francia oppure dalla Spagna. Si tratta di operazioni commerciali che non tengono in considerazione l'identità tassonomica dei soggetti coinvolti (Fig. 3). Ad esempio, il più importante allevamento di pernice rossa dell'Italia centrale rilascia in natura pernici prodotte dall'incrocio tra fondatori originali della Vandea (*A. r. rufa*, Francia), peraltro non scevri da inquinamento con geni *A. chukar*, ed animali provenienti dall'Andalusia (*A. r. intercedens*, Spagna) (Barbanera *et al.*, 2010).

Tutto ciò fa parte di un fenomeno di carattere ben più generale noto col nome di "omogeneizzazione biotica", ovvero la graduale sostituzione di biota nativi da parte di altri non nativi, un processo che aumenta la similarità genetica, tassonomica o funzionale tra due o più regioni nel tempo (Olden *et al.*, 2004). L'effetto sinergico dell'inquinamento genetico e del rimescolamento biotico produce la così detta "omogeneizzazione genetica", un vero e proprio caos causato dal mancato rispetto dell'identità genetica e dell'origine geografica nella gestione delle risorse naturali. In questo senso, la pernice rossa è certamente una specie paradigmatica.

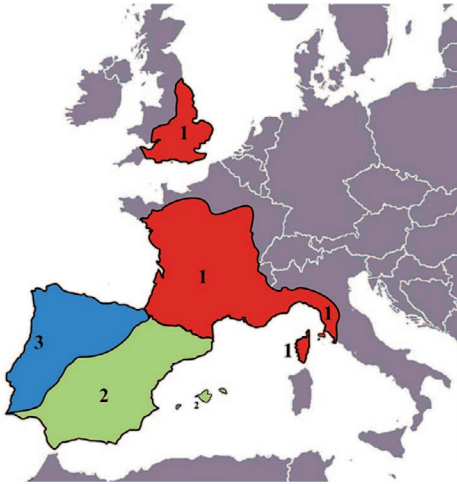


Fig. 3. Distribuzione approssimativa delle tre sottospecie di pernice rossa: 1. *Alectoris rufa rufa* (inclusa la popolazione introdotta in Inghilterra), 2. *A. r. intercedens*, 3. *A. r. hispanica*.

Che cosa si può fare per contrastare le suddette minacce? Alcuni interventi gestionali recentemente messi in pratica per la conservazione della pernice rossa sono apparsi quantomeno discutibili. In Toscana, ad esempio, si è assistito al tentativo di reintroduzione della specie in un'area protetta (Parco Regionale delle Alpi Apuane) utilizzando animali dell'allevamento sopra menzionato, con lo scopo di creare un serbatoio riproduttivo naturale anche per territori limitrofi a forte vocazione venatoria. In generale, sempre più frequenti sono le operazioni in cui è evidente lo spreco di risorse che potrebbero essere più proficuamente impiegate a beneficio di specie simili alla pernice rossa ma in condizioni più favorevoli per la loro ripresa (ad esempio, in Italia, la coturnice). Non a caso, a fronte della penuria di fondi re-

peribili, sempre più spesso si sente parlare di *triage* nel mondo della conservazione (cf., Wiens *et al.*, 2012). Tuttavia, volendo in ogni modo perseguire una politica di tutela attiva, per quanto concerne l'ibridizzazione di origine antropica la sola attività di contrasto è rappresentata dall'individuazione ed eradicazione dei soggetti ibridi (praticabile in allevamento, assai meno in natura). Per quanto attiene invece il tema dell'omogeneizzazione, l'impiego esclusivo di animali di origine geografica nota e il più possibile di tipo locale nel rispetto della struttura filogeografica della specie rappresenta l'unica iniziativa auspicabile (Fraser e Bernatchez, 2001). In ogni caso, le analisi genetiche sono fondamentali per l'identificazione dei soggetti ibridi e per la determinazione dell'origine geografica dei soggetti impiegati nelle operazioni di gestione delle specie *Alectoris* sul territorio ed in cattività.

Il campionamento biologico è alla base di qualsiasi analisi genetica. Tra i campioni ottenibili in modo del tutto non invasivo le feci e le penne rintracciabili a terra costituiscono fonti preziose per l'estrazione del DNA. Anche resti del pasto (o le borre di rapaci) consumato da predatori della specie di interesse possono rappresentare ottime sorgenti di DNA (il Falco sacro, ad esempio, per *A. chukar* in Asia). Qualora reperibili (ad esempio, in cattività), si possono usare penne in crescita il cui calamo è ancora in condizioni trofiche, e, pertanto, molto vantaggiose per l'estrazione del DNA. Nel caso di soggetti di cattura il prelievo di sangue è una scelta praticabi-

le senza particolari difficoltà nelle pernici *Alectoris*, considerata anche la taglia e la robustezza degli animali in questione. Giacché *A. rufa*, *A. chukar* ed *A. barbara* sono tre specie legalmente cacciabili in larga parte del loro areale, nel corso della stagione venatoria è sempre possibile ottenere campioni dai cacciatori (tessuti da organi interni), avendo cura di richiedere un solo campione per battuta di caccia onde evitare il campionamento di soggetti appartenenti alla medesima brigata. Tutti i campioni (e le aliquote molecolari che ne deriveranno nel corso delle analisi genetiche) devono essere obbligatoriamente preservati a bassa temperatura. L'estrazione del DNA rappresenta il naturale passo successivo al campionamento. In alternativa ai classici protocolli di biologia molecolare (fenolo:cloroformio, etc.) un'ampia gamma di prodotti commerciali è oggi disponibile per estrarre il DNA da qualsiasi tipo di campione biologico. Ad esempio, nel caso delle feci, esistono prodotti specifici per recuperare il DNA che, tuttavia, è generalmente scarso e degradato e si presta all'investigazione solo tramite alcuni marcatori molecolari. Tra questi, il sequenziamento dei geni del DNA mitocondriale è ancora molto in uso in genetica di popolazione animale (non umana). I geni del DNA mitocondriale mostrano un elevato grado di polimorfismo, sono solitamente ereditati per via materna e non sono soggetti a ricombinazione. Sono dotati di un'elevata velocità di mutazione: fino a circa venti volte quella dei geni del DNA nucleare. Il sequenziamento

dei geni del DNA mitocondriale permette di ottenere molte informazioni soprattutto a livello intra-specifico in termini di ricostruzioni di parentele genetiche, analisi demografiche e filogeografiche. Poiché si tratta di un genoma aploide, il DNA mitocondriale mal si presta allo studio del flusso genico e a stime della variabilità genetica di una data popolazione. Peraltro, il sequenziamento di più geni per un singolo individuo non sempre assicura un'informazione qualitativamente più rilevante rispetto a quella reperibile da un singolo gene. Infatti, tutti i geni mitocondriali sono ospitati sullo stesso cromosoma. In molti casi, pertanto, può essere più vantaggioso impiegare marcatori di tipo complementare. Ad esempio, nel caso di un soggetto con fenotipo "pernice rossa" ma con linea materna corrispondente alla specie *A. chukar*, il DNA mitocondriale suggerisce che un siffatto individuo potrebbe aver avuto un antenato appartenente ad una specie diversa da quella indicata dal fenotipo attuale. Per dimostrare che si tratta di un soggetto ibrido occorrono marcatori nucleari (Rhymer e Simberloff, 1996), cioè marcatori che monitorando la linea paterna e materna (marcatori biparentali) possono inferire il contributo delle specie parentali nel genoma dell'individuo in questione.

Marcatori del DNA nucleare di tipo codominante quali i loci del DNA microsatellitare ben si prestano all'individuazione di soggetti ibridi. I polimorfismi del DNA microsatellitare sono variazioni di lun-

ghezza del DNA molto frequenti a livello individuale. La procedura sperimentale per l'impiego dei microsatelliti è in parte simile a quella per il sequenziamento dei geni del DNA mitocondriale, fatto salvo che la genotipizzazione dell'individuo avviene tramite il *sizing* degli alleli amplificati in PCR senza necessità del loro sequenziamento (previa verifica del motivo di ripetizione atteso in un congruo numero di individui per popolazione e dell'uso di un controllo sequenziato e di lunghezza nota nelle procedure di *sizing*). Le tabelle genotipiche prodotte per ogni popolazione oggetto di studio permettono di ottenere informazioni importanti ai fini gestionali quali, ad esempio, la misurazione del flusso genico, della variabilità genetica, etc. Grazie alla presenza di regioni conservate fiancheggiando le porzioni geniche ipervariabili, i loci microsatellitari isolati dal genoma di specie modello (ad

esempio, il gallo domestico) possono essere genotipizzati (*cross-amplifications*) in specie assai meno ben caratterizzate (tra i galliformi, il Fagiano, il Francolino nero, la Starna, la Pernice rossa, etc.). L'impiego di marcatori del DNA mitocondriale ben si sposa con l'uso di loci del DNA microsatellitare in ambito conservazionistico. Essi sono alla base della definizione di Unità Evolutivamente Significative (*Evolutionarily Significant Units*: Ryder 1986), di cui, ad esempio, la Coturnice della Sicilia (*A. graeca whitakeri*) è un chiaro esempio come dimostrato da Randi *et al.* (2003). La popolazione di coturnice siciliana mostra chiara monofilia del DNA mitocondriale rispetto alle linee fletiche delle altre sottospecie di coturnice (a loro volta un gruppo monofiletico), e significativa divergenza del pool genico nucleare come evidenziato dalle distanze tra gli individui in base ai genotipi multilocus.

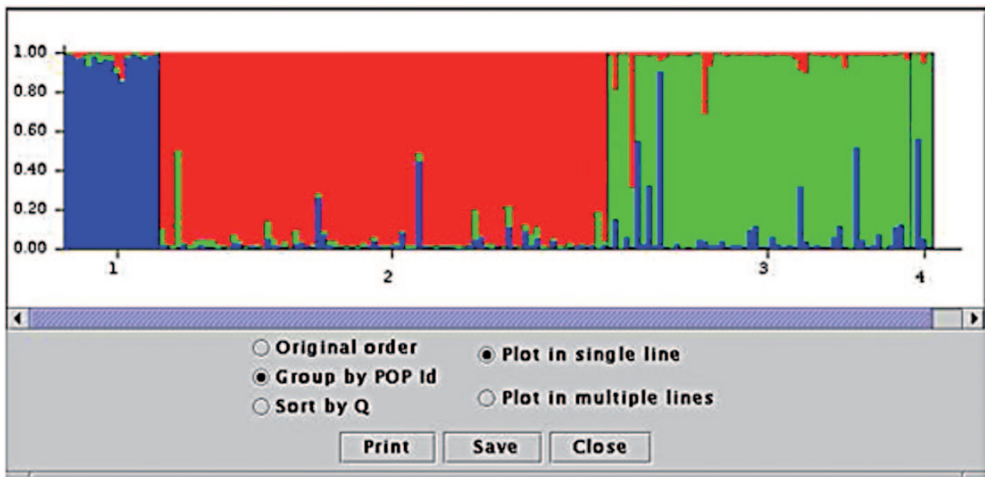


Fig. 4. Schermata video tratta dal programma STRUCTURE impiegato per l'analisi Bayesiana dei genotipi del DNA microsatellitare

I microsatelliti sono peraltro molto utili anche per individuare organismi ibridi impiegando *software* specifici per l'elaborazione dei dati genotipici quali, ad esempio, *STRUCTURE* (Pritchard et al., 2000). Questo programma determina la struttura genetica secondo il metodo Bayesiano (stima probabilità a posteriori sulla base delle frequenze alleliche) e assegna gli individui alle popolazioni investigate con l'uso di dati multilocus, realizzando una serie di simulazioni e ripartendo gli individui in un numero *K* di gruppi (*clusters*) indipendentemente dall'appartenenza alle popolazioni originarie e/o alla loro origine geografica. E' così possibile determinare con che probabilità un certo individuo può essere assegnato in base al suo genotipo ad un gruppo genetico o ad un altro.

Nel caso di un soggetto ibrido il genotipo frammisto sarà visualizzato come una barra di almeno due colori, il primo facente riferimento alla probabilità di appartenenza alla specie parentale "1", e il secondo a quella di appartenenza alla specie parentale "2" (Fig. 4). Ovviamente non tutti i marcatori del DNA nucleare funzionano come i microsatelliti. I Polimorfismi del DNA Amplificato a Caso (*Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) producono un'impronta genetica multilocus per ogni individuo in una singola reazione di amplificazione tramite PCR. I marcatori RAPD, sviluppati all'inizio degli anni '90, sono stati criticati circa (i) la riproducibilità dell'amplificazione di loci le cui bande appaiono deboli in elettroforesi su gel di agarosio, (ii) la corrispondenza locus: banda su gel, e

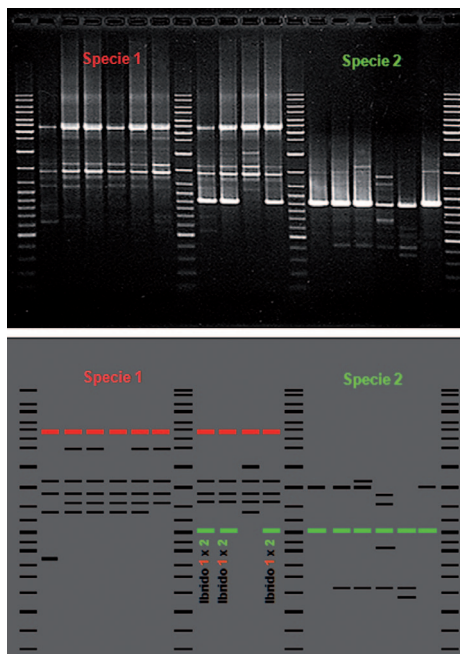


Fig. 5. Gel elettroforesi (in alto) e sua relativa interpretazione schematica (in basso) esemplificativi di un profilo RAPD per due specie parentali (1, in rosso, sinistra; 2, in verde, destra) e tre individui ibridi (1 x 2) tra i quattro disposti al centro. Sono visibili quattro marcatori di peso molecolare.

(iii) l'eredità mendeliana di tipo dominante (Perez et al., 1998). È certamente sconsigliabile l'impiego dei marcatori RAPD facendo uso dell'intero profilo genotipico di ogni individuo in studi di variabilità genetica (scarsa riproducibilità del grado di polimorfismo, non distinzione tra genotipo omozigote ed eterozigote). Al contrario, i marcatori RAPD possono essere proficuamente impiegati per individuare soggetti ibridi limitandosi allo *screening*

di singole bande specie-specifiche preventivamente selezionate tra gruppi di controllo delle specie parentali coinvolte. Una volta ottenuti i profili di amplificazione di numerosi individui campionati in tutto l'areale di distribuzione delle specie da paragonare, si tratta di selezionare *primers* RAPD che abbiano generato almeno una banda sempre presente in tutti gli individui saggiati di una specie (ed in tutte le repliche degli stessi) e mai in quelli dell'altra, e viceversa. E' un'indagine tanto più lunga e faticosa quanto più le specie analizzate sono evolutivamente affini. Ad esempio, il confronto tra pernice rossa e coturnice orientale ha condotto alla selezione di soli quattro marcatori RAPD a fronte di oltre 120 *primers* saggiati (Fig. 5).

È molto importante, infine, stimare la dimensione delle bande usando *software* di analisi dell'immagine dei profili elettroforetici, evitando perciò di procedere con grossolane stime "ad occhio". Terminata la selezione dei marcatori, il saggio di un individuo sospetto è rapido e molto economico. Nel complesso, i marcatori RAPD non lavorano in modo probabilistico come i microsatelliti, bensì in modo categorico (0/1): un individuo che mostra le bande specie-specifiche di due specie è ibrido. Tuttavia, qualora presenti una sola banda specie-specifica per un certo numero di *primers* selezionati, non è detto che si tratti di un soggetto geneticamente "puro". La probabilità che si tratti di un soggetto ibrido e, pertanto, di un falso negativo, è tanto maggiore quanto più scarso è il numero di *primers* per il quale è stato saggia-

to e tanto più alta la categoria di reincrocio cui il soggetto stesso eventualmente appartiene (Boecklen e Howard, 1997).

In conclusione, prendiamo in esame alcune popolazioni di pernici *Alectoris* del Parco Nazionale dell'Arcipelago Toscano oggetto di studio in questi anni a Pisa. Tra queste, la popolazione di pernice rossa dell'isola di Pianosa (Barbanera *et al.*, 2005). Colonia penale fin dal 1856, Pianosa sin da allora ha ospitato la specie *A. rufa*. Ritenuta estinta intorno al 1850, la specie era in realtà presente all'inizio del 1900. Le analisi genetiche, condotte al fine di caratterizzare la struttura della popolazione e renderne eventualmente possibile l'uso come ceppo sorgente pre-adattato per future operazioni di ripopolamento, hanno dimostrato che si tratta in verità di una risorsa inquinata da geni *A. chukar*. Metà degli animali saggiati mostrava linea mitocondriale *A. rufa*, cioè quella corrispondente al fenotipo degli animali, metà linea mitocondriale *A. chukar*. La genotipizzazione RAPD ha rivelato che più del 90% degli animali testati era ibrido *A. rufa* x *A. chukar*. Tale inquinamento è stato molto verosimilmente causato da un ripopolamento condotto alla fine degli anni '80 impiegando pernici rosse di allevamento in assenza di analisi genetiche in grado di attestare la loro reale condizione di soggetti ibridi.

Una storia per certi versi simile è quella della popolazione di Coturnice orientale dell'isola di Montecristo. Riserva di caccia sin dai tempi dei Savoia, a Montecristo

l'attività venatoria si è protratta per decenni. Negli anni '50, non ultima tra le specie introdotte, anche la Coturnice orientale fu rilasciata sull'isola. Di origine sconosciuta, la popolazione di *A. chukar* si riprodusse con successo fino a raggiungere una dimensione molto consistente anche grazie alla costante fornitura di cibo da parte del personale della società privata che aveva in gestione l'isola per l'attività venatoria. Quando la medesima società fallì e Montecristo divenne finalmente Riserva Naturale nel 1971, la popolazione di Coturnice orientale subì una forte riduzione. La Coturnice orientale, non più foraggiata dall'uomo, non trovò sufficiente sostentamento nell'ambiente microinsulare. Le analisi genetiche condotte tramite il sequenziamento di geni del DNA mitocondriale e l'uso di marcatori RAPD hanno dimostrato che la popolazione di Coturnice orientale di Montecristo è ibrida *A. chukar* x *A. rufa*. Mentre un solo animale tra tutti quelli saggiati mostrava linea mitocondriale *A. rufa* (tutti i rimanenti, *A. chukar*), l'80% del totale mostrava un profilo RAPD ibrido tra le due specie. La ragione di tale ibridizzazione è da ricercarsi esclusivamente in una gestione dissennata delle risorse dell'isola. Verso il 1960 fu introdotta a Montecristo anche la Pernice rossa, nel tentativo di immettere una risorsa "autoctona" (l'isola si trova al limite del *range* di distribuzione della specie *A. rufa*). Fino al 1968 le due specie erano avvistabili insieme in molti punti dell'isola. Alla chiusura della riserva di caccia, la forte crisi demografica e la competizione con la Coturni-

ce orientale, certamente più a suo agio nell'ambiente di roccia granitica dell'isola, fecero sì che la Pernice rossa scomparisse non prima, verosimilmente, di essersi incrociata con la Coturnice orientale stessa. Mentre a livello del DNA mitocondriale la traccia di una siffatta introgressione può sparire in una generazione tramite l'incrocio con un soggetto femminile con linea materna *A. chukar*, nel DNA nucleare la suddetta commistione genetica è ancora ben visibile. L'ipotesi alternativa, cioè che le Coturnici orientali introdotte su Montecristo fossero ibride è assai poco verosimile, in quanto l'incrocio con la Pernice rossa in cattività non porta vantaggi significativi all'allevamento della specie *A. chukar*. Pertanto, oggi a Montecristo è presente una risorsa ibrida oltre che alloctona (Barbanera *et al.*, 2007).

Fino all'inizio degli anni 2000 si riteneva che l'isola d'Elba ospitasse una popolazione autoctona di Pernice rossa. A causa dell'estrema esiguità della popolazione, lo studio genetico condotto si è basato sulla raccolta di feci sia nella regione occidentale del Monte Capanne sia nell'area mineraria orientale. Il DNA mitocondriale ha mostrato una larga prevalenza (65%) di individui con linea mitocondriale *A. chukar*, e l'abbondante presenza di soggetti ibridi è stata acclarata dall'uso di marcatori microsatellitari. A dispetto del fatto che dagli inizi degli anni '90 non fossero state più condotte operazioni di ripopolamento sull'isola, è verosimile che interventi antecedenti abbiano inquinato la popolazione di Pernice rossa elbana generando

una situazione simile a quella di Pianosa (Barbanera *et al.*, 2009a; Guerrini e Barbanera, 2009).

Nel corso degli anni gli studi genetici condotti a Pisa sulle specie del genere *Alectoris* si sono estesi all'Asia orientale. Dapprima, sono state investigate le popolazioni di Coturnice orientale del Mar Egeo e del Mediterraneo orientale (Cipro). In breve, sono state suggerite Unità di Gestione (*Management Units*) distinte all'interno di singole isole (Cipro) così come tra isole diverse quali la stessa Cipro e Limnos (Mar Egeo settentrionale). Ad esempio, è stata dimostrata la presenza di individui *A. chukar* di origine asiatica sia in natura sia in cattività nella popolazione di Creta. Si tratta di conspecifici non appartenenti alle sottospecie del Mediterraneo giunti dall'Estremo Oriente (Cina) come stock commerciale per allevamento. Purtroppo la presenza di *A. chukar* dell'Estremo Oriente nel Mediterraneo non è insolita. Le analisi filogenetiche di tipo Bayesiano condotte a Pisa tramite l'uso di marcatori del DNA mitocondriale (Regione di Controllo, Citocromo-b) impiegando circa 200 campioni raccolti nell'areale nativo della specie *A. chukar*, hanno permesso di dimostrare come le linee mitocondriali *A. chukar* riscontrate (i) nelle Pernici rosse ibride *A. rufa* x *A. chukar* di Portogallo, Spagna, Francia (Corsica inclusa), Italia e Inghilterra, di coturnici (ii) ibride *A. graeca* x *A. chukar* dell'Appennino italiano, (iii) di Coturnici orientali di Creta, e (iv) della coturnice

orientale di Montecristo sono tutte originarie della Cina (Barbanera *et al.* 2009 a,b).

Presso l'Allevamento Faunistico Sperimentale del Corpo Forestale dello Stato di Bieri (Lucca), tra il 2002 e il 2008 sono stati condotti incroci tra la Pernice sarda e la Pernice rossa. Le generazioni di ibridi sperimentali (F1, F2 e F3 e reincroci di prima e seconda generazione su entrambe le specie parentali: Barbanera *et al.*, 2011b) sono state impiegate quale modello per selezionare *primers* RAPD specie-specifici per il riconoscimento degli ibridi *A. barbara* x *A. rufa* potenzialmente riscontrabili in natura. Il rischio di perdere il genoma nativo della pernice sarda non è così remoto. Pernici rosse sono state osservate in diverse zone della Sardegna (cf., Grussu, 2008), e in un recente lavoro (Scandura *et al.*, 2010) è stato segnalato un primo soggetto ibrido *A. barbara* x *A. rufa*. Le bande di riferimento per entrambe le specie relative ai *primers* RAPD *A. barbara* vs. *A. rufa* selezionati sono state sequenziate in soggetti di diverse generazioni. È stata così dimostrata la perfetta corrispondenza tra locus e banda su gel in individui diversi e l'ereditarietà di tali frammenti genici attraverso diverse generazioni di ibridi sperimentali.

In conclusione, laddove possibile, l'impiego di marcatori diversi per natura (DNA mitocondriale/DNA nucleare) e tipo di inferenza (probabilistica/categorica) è non solo auspicabile ma strettamente necessario per una corretta gestione genetica delle risorse *Alectoris* sul territorio ed in cattività.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare Monica Guerrini (Dipartimento di Biologia, Università di Zoologia e Antropologia, Università Pisa) con cui mi pregio di lavorare insieme da anni e senza la quale le analisi genetiche non sarebbero mai state possibili.

Letteratura citata

Barbanera F., Forcina G., Guerrini M., Dini F., 2011a. Molecular phylogeny and diversity of the Corsican red-legged partridge: Hybridization and management issues. *Journal of Zoology*, 285: 56-65.

Barbanera F., Guerrini M., Bertoncini F., Cappelli F., Muzzeddu M., Dini F., 2011b. Sequenced RAPD markers to detect hybridization in the barbary partridge (*Alectoris barbara*, Phasianidae). *Molecular Ecology Resources*, 11: 180-184.

Barbanera F., Guerrini M., Hadjigerou P., Panayides P., Sokos P., Wilkinson P., Khan A.A., Khan B.Y., Cappelli F., Dini F., 2007. Genetic insight into Mediterranean chukar (*Alectoris chukar*, Galliformes) populations inferred from mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetica*, 131: 287-298.

Barbanera F., Guerrini M., Khan A.A., Panayides P., Hadjigerou P., Sokos C., Gombobaatar S., Samadi S., Khan B.Y., Tofanelli S., Paoli G., Dini F., 2009a. Human-mediated introgression of exotic chukar (*Alectoris chukar*, Galliformes) genes from East Asia into native Mediterranean partridges. *Biological Invasions*, 11: 333-348.

Barbanera F., Marchi C., Guerrini M., Panayides P., Sokos C., Hadjigerou P., 2009b. Genetic structure of Mediterranean chukar (*Alectoris chukar*, Galliformes) populations: conservation and management implications. *Naturwissenschaften*, 96: 1203-1212.

Barbanera F., Negro J.J., Di Giuseppe G., Bertoncini F., Cappelli F., Dini F., 2005. Analysis of the genetic structure of red-legged partridge (*Alectoris rufa*, Galliformes) populations by means of mitochondrial DNA and RAPD markers: a study from central Italy. *Biological Conservation*, 122: 275-287.

Barbanera F., Pergams O.R.W., Guerrini M., Forcina G., Panayides P., Dini F., 2010. Genetic consequences of intensive management in game birds. *Biological Conservation*, 143: 1259-1268

Bernard-Laurent A., 1984. Hybridation naturelle entre Perdrix bartavelle (*Alectoris graeca saxatilis*) et Perdrix rouge (*Alectoris rufa rufa*) dans les Alpes Maritimes. *Gibier Faune Sauvage*, 2: 79-96.

BirdLife International, 2004. *Birds in Europe: population estimates, trends and conservation status*. Cambridge, UK

Boecklen W.J., Howard D.J., 1997. Genetic analysis of hybrid zones: numbers of markers and power of resolution. *Ecology*, 78: 2611-2616.

Byers S.M., Burger G.V., 1979. Evaluation of three partridge species for put and take hunting. *Wildlife Society Bulletin*, 7:17-20.

Casas F., Mougeot F., Sanchez-Barbudo I., Davila J.A., Vinuela J., 2012. Fitness consequences of anthropogenic hybridization in wild red-legged partridge (*Alectoris rufa*, Phasianidae) populations. *Biological Invasions*, 14:295-305.

Fraser D.J., Bernatchez L., 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, 10: 2741-252.

Goodwin D., 1986. Further notes on chukar and hybrid partridges in Britain and Europe. *Avicultural*

Magazines, 92: 157-160.

Grant P.R., Grant B.R., 1992. Hybridization of bird species. *Science*, 256: 193-197.

Grussu M., 2008. Gli uccelli alloctoni in Sardegna: una checklist aggiornata. The alien birds of Sardinia: an updated checklist. In: *Le specie alloctone in Italia: censimenti, invasività e piani d'azione* (eds Galasso G., Chiozzi G., Azuma M. & Banfi E.). *Memorie*, 36: 65.

Guerrini M., Barbanera F., 2009. Non-invasive genotyping of the red-legged partridge (*Alectoris rufa*, Phasianidae): semi-nested PCR of mitochondrial DNA from feces. *Biochemical Genetics*, 47: 873-883.

IUCN, 2013. Red List of Threatened Species. Version 2013.2. www.iucnredlist.org. Downloaded on 10 November 2013.

Liu N-F., Wen L-Yi, Huang Z-H., Hou P., 2006. Introgressive hybridization between *Alectoris magna* and *A. chukar* in the Liupan Mountain Region. *Acta Zoologica Sinica*, 52:153-159.

McCarthy E., 2006. *Handbook of Avian Hybrids of the world*. Oxford University Press, UK

Negri A., Pellegrino I., Mucci N., Randi E., Tizzani P., Meneguz P.G., Malacarne G., 2013. Mitochondrial DNA and microsatellite markers evidence a different pattern of hybridization in red-legged partridge (*Alectoris rufa*) populations from NW Italy. *European Journal of Wildlife Research*, 59: 407-419

Olden D.J., Poff N.L., Douglas M.R., Douglas E.M., Fausch K.D., 2004. Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology and Evolution*, 19: 18-24.

Perez T., Albornoz J., Dominguez A., 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology*, 7: 1347-1357.

Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.

Randi E., Lucchini V., Bernard-Laurent A., 1998. Evolutionary genetics of the *Alectoris* partridges: the generation and conservation of genetic diversity at different time and space scales. *Gibier Faune Sauvage*, Vol. 15 (Hors série Tome 2), pp. 407- 415.

Randi E., Tabarroni C., Rimondi S., Lucchini V., Sfougaris A., 2003. Phylogeography of the rock partridge (*Alectoris graeca*). *Molecular Ecology*, 12: 2201-2214.

Rhymer J.M., Simberloff D., 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27: 83-109.

Ryder O., 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*, 1:9-10

Scandura M., Iacolina L., Apollonio M., Dessì-Fulgheri F., Baratti M., 2010. Current status of the Sardinian partridge (*Alectoris barbara*) assessed by molecular markers. *European Journal of Wildlife Research*, 56: 33-42.

Watson G.E., 1962. Sympatry in Palearctic *Alectoris* partridges. *Evolution*, 16: 11-19.

Wiens J.A., Goble D.D., Scott J.M., 2012. Time to accept conservation triage. *Nature*, 488: 281.

Wilkinson P, 1991. Mystery photographs. *British Birds*, 84: 264-265.