



Caratterizzazione genetica delle popolazioni di stambecco delle Alpi occidentali

Alice Brambilla

Department of Evolutionary Biology and Environmental Studies. University of Zurich.

Per ulteriori informazioni contattare: alicebrambilla1@gmail.com



Finanziamento e ringraziamenti

Questo progetto è stato finanziato dal programma dell'Unione Europea Interreg ALCOTRA V-A Francia-Italia 2014-2020 n.1664 LEMED-IBEX.

Si ringraziano i partner del progetto per la raccolta dei campioni e la condivisione delle informazioni relative alle aree da loro monitorate.

Si ringraziano inoltre Glauco Camenisch, Iris Biebach, Lukas Keller, Dominique Waldvogel e Christine Grossen dell'Università di Zurigo per la supervisione tecnico-scientifica nelle analisi e nell'interpretazione dei risultati.

Introduzione

La variabilità genetica

Preservare la variabilità genetica è una delle tre priorità globali individuate dalla IUCN (International Union for the Conservation of Nature) per la conservazione della biodiversità. Una delle ragioni principali che giustificano tale attenzione è legata al fatto che la variabilità genetica rappresenta il materiale di base necessario per l'evoluzione. Essa è infatti responsabile di parte della variabilità fenotipica individuale sulla quale agisce la selezione naturale (Réale et al. 2003). I cambiamenti climatici ed ambientali in corso fanno sì che numerose specie debbano adattarsi o spostare il proprio areale per sopravvivere (Parmesan 2006); la perdita di variabilità genetica può però ridurre il loro potenziale adattativo (Willi et al. 2006) e la loro resistenza alle patologie emergenti mettendone a repentaglio la conservazione (Frankham et al. 2002; Spielman et al. 2004).

I programmi di reintroduzione sono strumenti importanti spesso utilizzati per la conservazione di specie a rischio di estinzione. Tuttavia, possono talvolta essere accompagnati da un'ulteriore riduzione della variabilità genetica della popolazione reintrodotta a causa dell'”effetto fondatore”: infatti, il numero limitato di individui utilizzati per le reintroduzioni non rappresentano la variabilità genetica complessiva della specie/popolazione di origine e possono quindi dare origine a popolazioni con variabilità ridotta (Maudet et al. 2002; Biebach and Keller 2010).

Effetti della riduzione della variabilità genetica

Tra le cause più comuni di perdita di variabilità genetica nelle popolazioni selvatiche si possono annoverare i colli di bottiglia: drastiche e rapide diminuzioni del numero di effettivi di una popolazione (Keller et al. 1994; Hoelzel 1999; Whitehouse and Harley 2001). I colli di bottiglia causano una perdita permanente degli alleli meno frequenti nella popolazione con conseguente riduzione del potenziale adattativo delle popolazioni. Inoltre si osserva un generale aumento dell'omozigosi e della probabilità di espressione di alleli deleteri recessivi (Allendorf and Leary 1986) che, a causa della deriva genetica casuale (genetic drift) possono in alcuni casi anche aumentare di frequenza.

Uno degli effetti più conosciuti della riduzione della variabilità genetica è la depressione da inbreeding (o inincrocio). Si parla di inbreeding quando individui strettamente imparentati si accoppiano tra loro (Keller and Waller 2003). A livello genetico l'inbreeding causa un aumento del tasso di omozigosi nella prole; questo a sua volta può aumentare la probabilità di espressione di alleli deleteri recessivi, cioè di caratteri dannosi che però si manifestano solo quando gli alleli ad essi associati sono presenti in condizione di omozigosi. L'espressione degli alleli deleteri può portare alla depressione da inbreeding (Charlesworth and Willis 2009). Vi sono numerose evidenze degli effetti dannosi dell'inbreeding, che riduce sopravvivenza e fitness degli individui con conseguenze osservabili anche nella dinamica delle popolazioni (Saccheri et al. 1998; Crnokrak and Roff 1999; Slate et al. 2000; Keller and Waller 2002; Ruiz-López et al. 2012; Brambilla et al., 2015, 2018; Bozzuto et al., 2019). E' stato recentemente dimostrato che le popolazioni con elevati livelli di inbreeding riescono a purgare gli alleli deleteri più dannosi attraverso la selezione naturale

(Grossen et al., 2020). Tuttavia, nelle stesse popolazioni, l'accumulo di alleli mediamente deleteri è molto maggiore che nelle altre popolazioni e questo può in parte spiegare le cattive performance delle popolazioni con alti livelli di inbreeding (Frankham et al., 2014; Bozzuto et al., 2019).

Nel caso di popolazioni piccole ed isolate (Madsen et al. 1996; Hedrick and Kalinowski 2000) e di popolazioni passate attraverso un collo di bottiglia, l'inbreeding non può essere evitato (Keller et al., 1994). Ciò non significa però necessariamente che avvenga l'accoppiamento tra consanguinei. Infatti, l'inbreeding si accumula nel tempo nelle piccole popolazioni (Ewing et al. 2008) e questo può portare a livelli di inbreeding elevati anche se non vi è riproduzione tra parenti stretti.

Un'ulteriore effetto della perdita di variabilità genetica è la riduzione della variabilità ai geni responsabili della risposta immunitaria. Nei vertebrati, la difesa nei confronti dei patogeni è ottenuta in primo luogo mediante barriere fisiche e poi grazie al sistema immunitario innato e acquisito (Pasare and Medzhitov, 2004; Cooper and Alder, 2006). La suscettibilità alle malattie può variare tra le popolazioni e all'interno delle stesse a causa di differenze nell'ambiente e nelle caratteristiche genetiche (Acevedo-Whitehouse and Cunningham, 2006; Wilfert and Schmid-Hempel, 2008; Quéméré et al., 2020). I geni coinvolti nella risposta immunitaria sono noti per essere estremamente variabili. Infatti, a causa dell'elevato numero di patogeni esistenti e della loro rapidità di evoluzione, anche nelle popolazioni degli ospiti viene mantenuta un'elevata variabilità. Uno dei complessi di geni più studiato e conosciuto responsabile della risposta immunitaria è il sistema maggiore di istocompatibilità MHC (Janeway et al. 2001): un complesso di geni di grandi dimensioni che codifica per proteine che vengono espresse sulla membrana cellulare e vengono riconosciute dai linfociti che attivano così la risposta immunitaria (Bernatchez and Landry, 2003). Tuttavia, vi sono numerose evidenze che anche altri geni svolgono un ruolo importante nella difesa contro numerosi patogeni. Un esempio sono i recettori toll-like (TLRs), una famiglia di proteine transmembrana che fungono da recettori durante la risposta immunitaria innata (Tschirren et al., 2013; Ammerdorffer et al. 2014). In caso di riduzione della variabilità genetica delle popolazioni ospite, diminuiscono anche le possibilità per questa di rispondere all'attacco da parte di nuovi patogeni con conseguenti rischi per la sua conservazione.

Lo stambecco alpino

Lo stambecco alpino era diffuso su tutte le Alpi fino al Medio Evo ma la caccia intensiva a seguito dello sviluppo e della diffusione delle armi da fuoco lo ha portato sull'orlo dell'estinzione (Grodinsky and Stüwe 1987). I primi segni del declino della specie risalgono al XVII secolo e nei secoli successivi lo stambecco è gradualmente scomparso dall'arco Alpino ad eccezione di un piccolo nucleo rimasto nei territori del massiccio del Gran Paradiso. Si stima che all'inizio del XIX secolo solo un centinaio di individui sopravvissessero in quell'area (Grodinsky and Stüwe 1987). Lo stambecco è quindi passato attraverso uno stretto collo di bottiglia. Le prime misure di protezione risalgono al 1821 ma il numero di individui ha ricominciato ad aumentare solo in seguito alla dichiarazione della zona come riserva reale di caccia da parte di Vittorio Emanuele II nel 1856 (Passerin d'Entrèves 2000). La popolazione del Gran Paradiso ha subito un'ulteriore riduzione numerica durante la seconda guerra mondiale. Nella prima metà de XX secolo, circa 90 esemplari furono portati dal Gran Paradiso in tre giardini zoologici in Svizzera. Qui gli stambecchi furono allevati e i loro discendenti vennero utilizzati per le prime reintroduzioni in territorio svizzero (i

nuclei del Piz Albris, Brienzer Rothorn e Mont Pleureur: Stüwe and Nievergelt, 1991). In territorio Italiano la prima reintroduzione, quella delle Alpi Marittime, risale agli anni '20. Il ripopolamento delle Alpi nei decenni successivi è poi avvenuto principalmente a partire da esemplari provenienti dal Gran Paradiso, dalle tre colonie madre in Svizzera o dalle stesse Alpi Marittime. Le prime reintroduzioni in Francia furono effettuate a partire dal 1959 anche se rimane l'ipotesi che alcuni esemplari fossero sopravvissuti nell'Haute Maurienne sin dai tempi del collo di bottiglia di metà '800.

Attualmente la specie è nuovamente presente sull'intero arco Alpino (fig.1). La distribuzione tuttavia è ancora frammentata e non tutte le aree idonee sono occupate. Ad oggi (2008-2017) si stima la presenza di circa 180 nuclei di stambecchi per un totale di circa 52.000 esemplari sulle Alpi (Brambilla et al., 2020). Lo stambecco è presente in Francia (circa 9,450 esemplari), Italia (16,400 esemplari), Svizzera (18,000 esemplari), Germania (circa 500 esemplari), Austria (circa 7400 esemplari) e Slovenia (circa 300 esemplari).

Le reintroduzioni sulle Alpi occidentali

Sulle Alpi occidentali lo stambecco Alpino è presente sia in territorio francese che italiano. Secondo le stime più recenti (Brambilla et al., 2020), in questa parte delle Alpi, si trovano attualmente più di 18.000 esemplari, suddivisi in circa 50 nuclei (Fig.1). Numerosi di questi nuclei sono monitorati dai partner del progetto Interreg ALCOTRA V-A Francia-Italia 2014-2020 LEMED-IBEX.

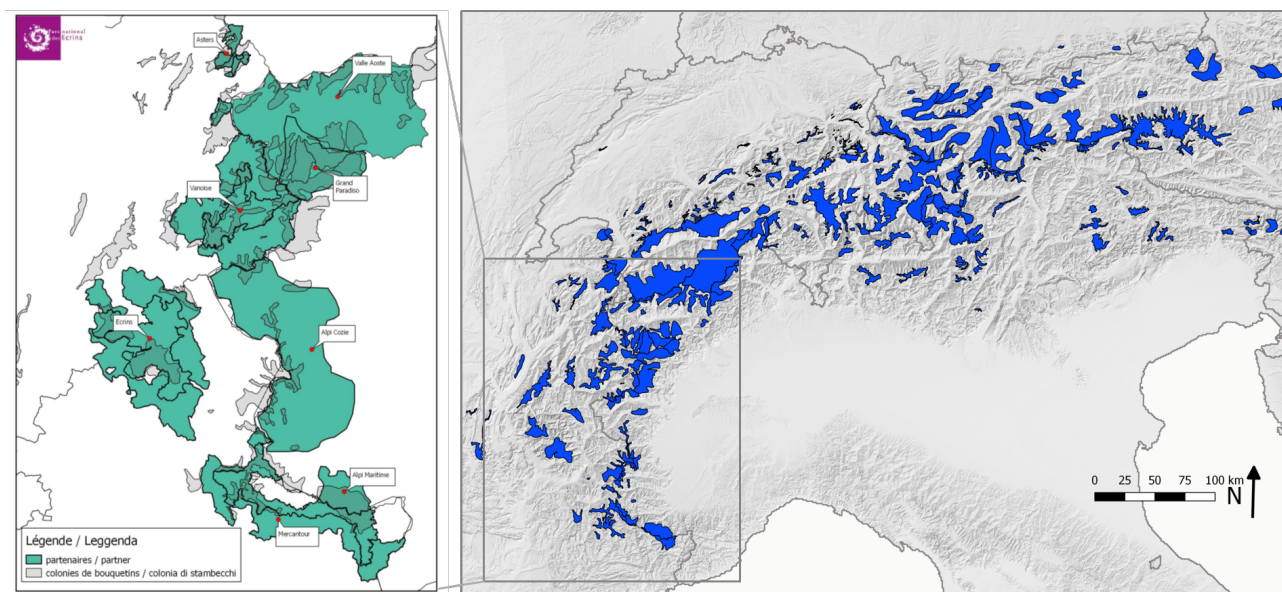


Figura 1. Mappa della distribuzione dello stambecco sulle Alpi. Il riquadro di sinistra mostra le aree di competenza dei partner del progetto LEMED-IBEX.

Effetti delle reintroduzioni sulla variabilità genetica

La storia di reintroduzione della specie è ancora ben visibile nella struttura genetica delle popolazioni attuali. Le diverse popolazioni sono state fondate in modi diversi sia per quanto riguarda le popolazioni sorgente e il loro numero (alcuni nuclei sono stati creati a partire da una sola popolazione mentre altri a partire dall'immissione di individui provenienti da due o più popolazioni) che per quanto riguarda il numero di individui immessi. Inoltre, il numero di individui immessi non rispecchia necessariamente quello degli individui che hanno effettivamente contribuito alla fondazione della popolazione poiché la sopravvivenza e il successo riproduttivo dei fondatori sono molto variabili. Negli anni successivi alle reintroduzioni ci sono poi altri fenomeni che possono in parte contribuire a dare forma alle popolazioni come ad esempio la deriva genetica. Come evidenziato dallo studio di Biebach e Keller (2009), effettuato su 40 popolazioni di stambecco reintrodotte in Svizzera dall'inizio del 1900, il numero delle popolazioni sorgente utilizzate per le reintroduzioni sembra essere l'elemento che più contribuisce alla diversità genetica osservabile nelle popolazioni attuali.

Definizione di popolazione

Secondo la definizione della IUCN, le sub-popolazioni si definiscono come “geographically (or otherwise) distinct groups in the population between which there is little exchange (typically one successful migrant individual or gamete per year or less)”. Nel caso dei monitoraggi delle popolazioni di stambecco, si utilizzano però generalmente altri criteri per suddividere le popolazioni (Brambilla et al., 2020). In generale, si utilizzano come unità di campionamento per i censimenti i diversi nuclei la cui storia di reintroduzione è nota. Nel caso però di aree con densità elevate, dove i confini dei diversi nuclei non sono ben definiti o per le popolazioni i cui territori si trovano a cavallo di diverse unità amministrative o di diverse regioni/stati, si tendono ad utilizzare come unità di campionamento le porzioni di territorio di competenza dei diversi enti di gestione. Questo approccio è da ritenersi valido per quanto riguarda il monitoraggio dell'andamento della specie. Infatti, è un metodo pragmatico che consente di seguire gli andamenti nel tempo e di avere delle serie storiche. Tuttavia, non sempre i nuclei amministrativi e le unità di campionamento utilizzate nei censimenti corrispondono a delle vere e proprie popolazioni. Al fine di favorire la conservazione della specie favorendo l'aumento della variabilità genetica delle diverse popolazioni, è pertanto importante identificare correttamente le popolazioni di stambecco dal punto di vista genetico.

Obiettivi

Il presente lavoro, svolto nell'ambito del progetto Interreg ALCOTRA V-A Francia-Italia 2014-2020 ha come obiettivo quello di caratterizzare dal punto di vista genetico le popolazioni dell'arco alpino occidentale. I due obiettivi specifici sono:

- Definire le popolazioni dal punto di vista genetico (assegnare ciascuna unità di campionamento ad una popolazione);
- Descrivere le caratteristiche genetiche di ciascuna delle popolazioni identificate al fine di individuare quelle più vulnerabili.

Metodi

Raccolta campioni genetici

I campioni biologici per le analisi genetiche di questo studio sono stati raccolti durante le attività del progetto LEMED-IBEX negli anni 2017-2019. Alcuni dei campioni derivano invece da sessioni di campionamento precedenti.

Il campionamento è stato effettuato per coprire i territori di competenza dei diversi enti. A ciascun partner è stato chiesto di selezionare le unità di campionamento nelle quali raccogliere un numero minimo di 15 campioni. Le unità di campionamento sono state scelte in base alle conoscenze pregresse sulla storia di fondazione dei diversi nuclei e agli spostamenti osservati degli animali cercando di coprire al meglio l'intero territorio del progetto e di selezionare le aree più interessanti o che necessitassero di approfondimenti.

In aggiunta ai nuclei monitorati dai partner LEMED-IBEX, sono stati raccolti campioni in altre aree ritenute interessanti ai fini del progetto: o per prossimità geografica (es. le Riserve Naturali del Vercors e del Queyras) o a causa di recenti eventi epidemici (es. alcuni nuclei delle Alpi Orientali: Marmolada, Marmarole, Pale di S. Martino, Tarvisio, Monte Canin, Monte Plauris).

I campioni sono stati raccolti mediante prelievi di sangue o biopsie del tessuto dermico durante le catture. Campioni di tessuto sono stati raccolti anche mediante biopsie da remoto utilizzando un fucile lancia siringhe. Il sangue è stato congelato subito dopo le catture mentre i campioni di tessuto sono stati conservati in alcool (95%) fino al momento dell'estrazione di DNA.

Per ciascun campione sono state registrati i dati relativi all'individuo e le informazioni sull'area di campionamento. Sono anche state raccolte informazioni relative alle unità di campionamento: localizzazione geografica, popolazione teorica di appartenenza (in base alle conoscenze degli esperti dell'area), storia di fondazione (anno, numero e provenienza degli individui immessi).

Estrazione del DNA

L'estrazione e l'analisi del DNA sono state effettuate nei laboratori del gruppo del Prof. Lukas Keller, del dipartimento di Evolutionary Biology and Environmental Studies dell'Università di Zurigo. Il DNA è stato estratto dai campioni di sangue e tessuto tramite filtrazione transmembrana o cattura magnetica (Kit Dneasy Tissue and Blood e Biosprint 96, Qiagen) applicando il protocollo appropriato per ciascun tipo di campione.

Genotipizzazione

I campioni sono stati genotipizzati mediante PCR multiple a 51 loci microsatellite polimorfici. Per omogeneità con le analisi svolte in precedenza su altre popolazioni, 37 marker neutrali (sui 51 genotipizzati) sono stati utilizzati per le analisi presentate in questo lavoro. Per maggiori dettagli sui marcatori utilizzati si vedano Brambilla et al. (2015) e Biebach e Keller (2009). L'analisi per elettroforesi capillare è stata eseguita con un sequenziatore automatico ABI 3730 (Applied Biosystems). I marker sono stati analizzati automaticamente e poi controllati manualmente utilizzando il software GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems). A ciascun elettroferogramma è stato assegnato un indice di qualità (0: nessun segnale; 1: segnale di intensità molto bassa, omozigote; 2:

segnale di intensità media; 3: segnale di buona intensità). Per ridurre il rischio di drop out, il genotipo è stato accettato solo quando derivante da elettroferogrammi con qualità 2 e 3. Il controllo manuale e l'assegnazione del punteggio sono stati ripetuti due volte da operatori diversi. I genotipi sono stati sottoposti ad ulteriore selezione e sono stati utilizzati per le analisi solo i campioni con un N di loci non genotipizzati <15.

Analisi dei dati

Definizione delle popolazioni

Per definire le popolazioni a livello genetico è stato utilizzato il seguente flusso di indagine:

- Assegnazione di ciascun campione alla relativa unità di campionamento;
- Calcolo di misure di diversità e distanza genetica tra le diverse unità di campionamento (Pairwise Fst, Fis, Ho, He, Na);
- Assegnazione dei campioni ai diversi cluster genetici (quando necessario, questo step è stato ripetuto a scala ridotta per comprendere al meglio le differenze tra unità di campionamento contigue);
- Assegnazione delle diverse unità di campionamento a popolazioni omogenee dal punto di vista genetico combinando i risultati ottenuti negli step precedenti e le conoscenze relative alla storia di fondazione delle diverse colonie (quando necessario sono stati consultati i referenti delle diverse aree).

Caratterizzazione delle popolazioni

Una volta aggregate le unità di campionamento ed assegnati di conseguenza i campioni alle rispettive popolazioni, la caratterizzazione genetica delle popolazioni è stata effettuata utilizzando i seguenti strumenti:

- Assegnazione delle popolazioni ai rispettivi cluster genetici;
- Calcolo di indici diversità genetica per ciascuna popolazione (Fst, Fis, Ho, He, Na);
- Calcolo dei coefficienti di inbreeding per ciascuna popolazione;
- Calcolo della distanza genetica (pairwise Fst) tra ciascuna coppia di popolazioni.

Risultati e discussione

In totale sono stati genotipizzati N=658 campioni appartenenti a 32 unità di campionamento. Di questi, N=580 sono stati utilizzati per le analisi (loci NA <15). In Tabella 1 si trova un elenco delle unità di campionamento indagate. Per ciascuna sono riportate le informazioni disponibili sulla storia di fondazione, eventuali reintroduzioni e sugli ipotetici movimenti/scambi di animali che avvengono con altre aree. Per le analisi sono anche stati utilizzati i genotipi di N=129 individui provenienti da: Albris, Brienzer Rothorn e Mont Pleureur, le prime tre popolazioni svizzere reintrodotte che sono state utilizzate come fonte per numerose altre reintroduzioni su tutto l'arco alpino. Per la suddivisione in cluster sono state utilizzate tutte le popolazioni dell'arco alpino per le quali sono disponibili dati genetici (N=68).

Tabella 1. Elenco delle unità di campionamento incluse nelle analisi con informazioni sulla storia di fondazione

Unità di campionamento	Anno di fondazione	Storia di fondazione (N ind e popolazione di origine)	Altre immissioni (Anno, N ind e origine)	Note
Marittime Gesso	1920-1933	24 (6 sopravvissuti) Gran Paradiso		
Val Varaita	anni '80	Vedi note	1999-2002 17 Alpi Marittime; 2006 11 Saastal (CH)	Inizialmente individui migrati naturalmente (Val Pellice e Queyras)
Valle Stura	anni '80		1999-2003 10 Marittime Gesso	Inizialmente individui migrati naturalmente (Marittime Gesso)
Valle Po	anni '80			Inizialmente individui migrati naturalmente (oVal Pellice e Queyras)
Contamine Montjoie	1975-1976	16 Mont Pleurer		
Arve et Giffre	1969-1972	26 Pleureur		
Tarvisio	1978-1992	20 Gran Paradiso	1993-1994 Maritt. Gesso	
Monte Canin	2002-2006	6 Marittime Gesso + 18 Lagenberg Wildpark (CH) e Tiergarten Salzburg		Rilascio "non ufficiale" 3 individui da Tarvisio
Monte Plauris	1989-1991	12 Gran Paradiso		
Marmarole	1965-1975	10 Albris		
Marmolada	1978-1979	8 Gran Paradiso	2006-2007 15 Tarvisio	
Paneveggio	2000-2002	30 Alpi Marittime	2010-2013: 14 Marmarole	
Val Troncea	1987-1988	12 Gran Paradiso		Animali provenienti da Val Pellice e Queyras
Rocciamelone	1970			Immigrazione Valli di Lanzo (Gran Paradiso)
Orsiera	1995-1999	12 Gran Paradiso		1998-1999 6 individuo immigrati dal Queyras
Oisans	1989-1990	28 Haute Maurienne		
Champsaur	1994-1995	31 Haute Maurienne		
Cerces	1959-1960	6 Pleureur		
Valle Orco	Pop sorgente			
Valsavarenche	Pop sorgente			
Mercantour Est	come Marittime Gesso	Gran Paradiso		
Mercantour Argentera	come Marittime Gesso	Gran Paradiso		
Tinee Ubaye-Bachelard Haute Var	1987-1994	48 Alpi Marittime	2005 Belledonne (10 ff); 2006 Haute Maurienne (3ff), Peis-Champ (5 mm + 7 ff)	
St Ours Haute Ubaye	1995	Haute Maurienne (4 mm 6 ff) e Mercantour Est		
St Paul Ubaye	1995-1998			Immigrazione da S.Ours, Queyras, Val Varaita
Ristolas Queyras	come Queyras	Haute Maurienne		
Haute Maurienne	Pop sorgente			
Peysey Champagny	1969	5 Mont Pleurer	1980 5 ff + 6 mm Haute Maurienne	
Frontiere	1927-1932			Immigrazione Gran Paradiso
Queyras	1995-1998	26 Haute Maurienne		Immigrazione Valle Pellice
Vercors	1989-1990	15 ff + 13 mm Haute Maurienne	2000-2002 20 ff + 16 mm Haute Maurienne	
Val Veny	1950-1960	Gran Paradiso + Pleureur		
Gressoney	1970-1986	Gran Paradiso		
Tersiva		Gran Paradiso		

Definizione delle popolazioni

Come discusso più diffusamente in seguito, bisogna notare che la definizione di popolazione può non essere univoca nel caso dello stambecco. Va infatti considerato che le similarità tra le diverse popolazioni possono avere doppia origine: possono cioè originarsi per effettiva omogeneità genetica legata alla prossimità geografica (che può favorire il flusso genetico e far sì che nuclei diversi si “fondano” in un’unica popolazione) oppure perché sono state fondate a partire dallo stesso nucleo e sono quindi molto simili anche se geograficamente distanti. In questo caso quindi la somiglianza non indicherebbe scambi genetici in corso. Inoltre, soprattutto nel caso in cui la suddivisione tra nuclei venga fatta per motivi di conservazione, i criteri da adottare possono cambiare in base agli obiettivi. Per questo lavoro è stato necessario definire le popolazioni per poterle descrivere e confrontare tra loro. Abbiamo quindi operato una suddivisione che rispecchi quanto più possibile le differenze genetiche tra le aree, tenendo anche in considerazione la storia di fondazione e possibili scambi tra esse. Nel caso di nuclei isolati la definizione delle popolazioni ha coinciso con le relative aree di campionamento. Le aree più complesse da caratterizzare sono invece risultate essere quelle della zona Alpi Marittime-Mercantour, L’area del Queyras e i dintorni del Gran Paradiso (compresi alcuni nuclei del Parco Nazionale della Vanoise e della Valle d’Aosta).

La suddivisione complessiva delle popolazioni è presentata in Tabella 2. Qui di seguito viene descritta la suddivisione operata per area geografica/partner.

Alpi Marittime – Mercantour – Queyras

La ripartizione in cluster genetici delle popolazioni che si trovano nell’area delle Alpi Marittime - Queyras è rappresentata graficamente in Fig.2.

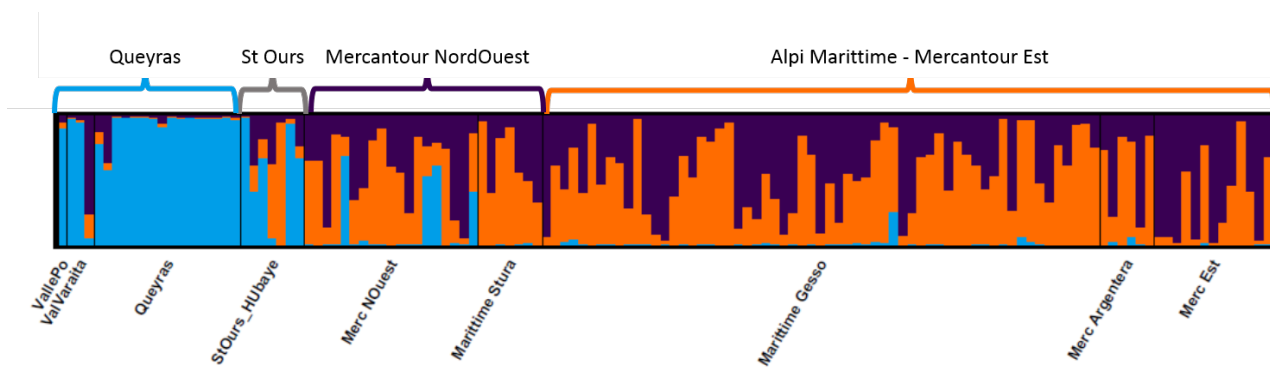


Figura 2. Ripartizione in cluster basata sulla struttura genetica delle popolazioni delle Alpi sud occidentali. Nella parte inferiore del grafico sono indicate le aree di campionamento, nella parte superiore è indicata la suddivisione in popolazioni.

Le origini di tale ripartizione vanno ricercate più nella storia di fondazione dei diversi nuclei che nella loro posizione geografica. Infatti, la popolazione Mercantour Nord-Ouest. è stata fondata con individui provenienti dalle Alpi Marittime-Mercantour Est ma è stata poi oggetto di ripopolamenti. Invece, i fondatori della popolazione di Saint Ours provenivano per metà dalle Alpi Marittime Mercantour Est e per metà dal Parco Nazionale della Vanoise. A causa delle diverse storie di fondazione e poiché il flusso genetico tra i diversi nuclei non sembra essere elevato, nonostante le

similarità genetiche, la popolazione Alpi Marittime-Mercantour Est viene considerata separata anche dalla popolazione più vicina che è quella del Mercantour Nord-Ouest. Infine, la popolazione del Queyras è quella apparentemente più distante e ciò si può spiegare con il fatto che questo nucleo si è formato dall'incrocio tra animali di provenienza molto diversa. Essa comprende individui che vivono in Valle Varaita, Valle Po, Val Troncea, Saint Paul Ubaye, Ristolas (queste ultime tre accorpate già in origine nel nucleo Queyras presentato in Fig. 2).

Alpi Cozie

Le popolazioni Orsiera e Rocciamelone delle Alpi Cozie sono state considerate due popolazioni distinte a causa della distanza geografica che le separa. Tuttavia, come si può osservare in Figura 4, esse risultano appartenere allo stesso cluster genetico e tale somiglianza è da ricercare nella storia di fondazione. Entrambe derivano infatti da individui provenienti dal Gran Paradiso. Gli individui campionati nella Val Troncea sono invece stati assegnati alla popolazione del Queyras.

Ecrins

Le tre unità di campionamento del Parco Nazionale degli Ecrins risultano appartenere a tre popolazioni geneticamente distinte: Oisans, Champsaur, Cerces (Fig.4). Nonostante la prossimità genetica, le tre popolazioni sono infatti geograficamente distanziate e hanno storie di fondazione diverse (sono state fondate, rispettivamente con individui provenienti da: Haute Maurienne (le prime due) e Pleureur). In particolare, l'appartenenza allo stesso cluster genetico che si può osservare tra Oisans e Champsaur è probabilmente legata al fatto che condividono la popolazione fondatrice (entrambe sono state infatti fondate con individui provenienti da Haute Maurienne). Le analisi effettuate finora non consentono però di stabilire se vi sia un flusso genetico tra i tre nuclei.

Valle d'Aosta – Gran Paradiso – Vanoise – Alta Savoia

La suddivisione in popolazioni dell'area Gran Paradiso, Valle d'Aosta, Vanoise, Alta Savoia è risultata complessa in quanto le aree occupate sono molto vicine tra loro. A causa delle combinazioni tra storie di fondazione e flusso genetico è difficile definire le popolazioni in modo univoco. In seguito alle analisi, sono state identificate cinque popolazioni principali (Fig. 3).

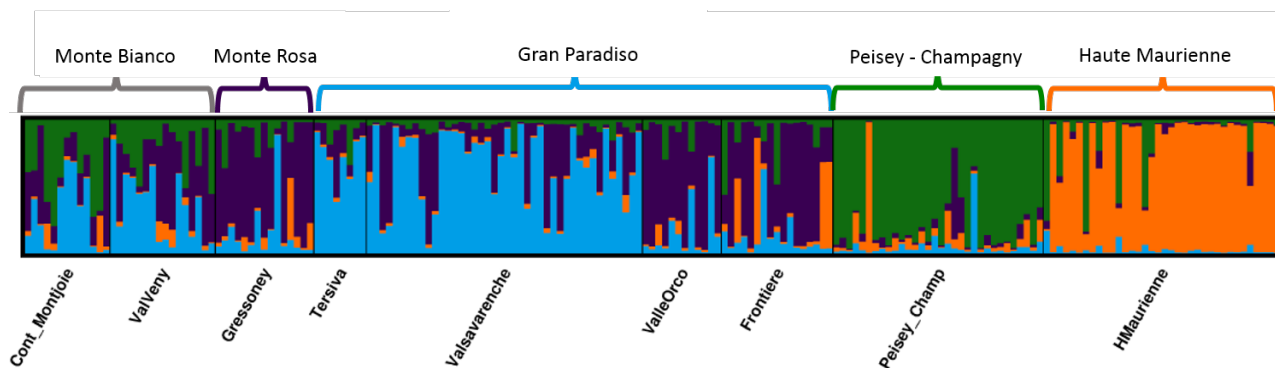


Figura 3. Ripartizione in cluster basata sulla struttura genetica delle popolazioni di Valle d'Aosta, Gran Paradiso, Vanoise e Alta Savoia. Nella parte inferiore del grafico sono indicate le aree di campionamento, nella parte superiore è indicata la suddivisione in popolazioni.

Peisey-Champagny e Haute Maurienne costituiscono due popolazioni separate. Lo stesso vale per Arve et Giffree (ASTERS, non presente in figura 3). Anche in questo caso la suddivisione è basata sia sulla storia di fondazione che sulla posizione geografica. Nell'area del Monte Bianco invece, le unità di campionamento di Contamine Montjoie e della Val Veny sono state accorpate nella popolazione Monte Bianco. Infatti, a causa della prossimità geografica non è possibile stabilire se le somiglianze tra i due nuclei derivino esclusivamente dalla storia di fondazione (entrambe sono state in parte fondate con animali provenienti dal Mont Pleureur) o se si tratta effettivamente di una popolazione unica con riproduzione di individui tra le due aree. Il nucleo di Gressoney Monte Rosa, sebbene geneticamente non troppo dissimile dagli altri, è stato definito come popolazione a parte poiché è geograficamente distante dagli altri. Infine, la popolazione del Gran Paradiso, è stata definita accorpendo sia gli individui residenti all'interno del Parco (Valsavarenche e Valle Orco) sia quelli della Tersiva e di Frontiere che risultano geneticamente molto simili e geograficamente prossime e attraverso le quali sono stati osservati spostamenti di individui.

Alpi Orientali

Le unità di campionamento delle Alpi Orientali (Marmolada, Marmarole, Monte Plauris, Monte Canin e Tarvisio) sono state considerate popolazioni separate. Marmolada, Marmarole e Plauris sono geograficamente distanti mentre Tarvisio e Monte Canin sono quasi confinanti. Tuttavia, poiché hanno storie di fondazione diversa e le differenze genetiche sono evidenti, le abbiamo considerate come due popolazioni. Sono stati raccolti anche campioni nell'area di Paneveggio Pale di San Martino. Tuttavia, il numero di campioni dai quali è stato possibile estrarre con successo il DNA è risultato troppo limitato per includere questo nucleo nelle analisi.

Caratterizzazione delle popolazioni

Le analisi della struttura genetica di tutte le popolazioni di stambecco sulle Alpi mostrano che le popolazioni si suddividono in 5 gruppi genetici (Fig.4). E' interessante notare come la ripartizione delle diverse popolazioni rispecchi la storia di fondazione di ciascuna, come già osservato da Biebach e Keller (2009, 2012) per le popolazioni svizzere. Da queste prime analisi descrittive, sembra possibile confermare quanto già osservato per le popolazioni svizzere e cioè che la storia di fondazione è l'elemento principale che determina le caratteristiche delle popolazioni attuali. Questo si può spiegare con il fatto che gli stambecchi hanno bassa tendenza alla dispersione (Scillitani et al., 2012) e tempi di generazione molto lunghi (8 anni). Un flusso genetico spontaneo, legato alla migrazione di individui, che consenta un aumento della variabilità genetica delle diverse popolazioni è quindi poco probabile, soprattutto quando le aree di reintroduzione si trovano distanti tra loro.

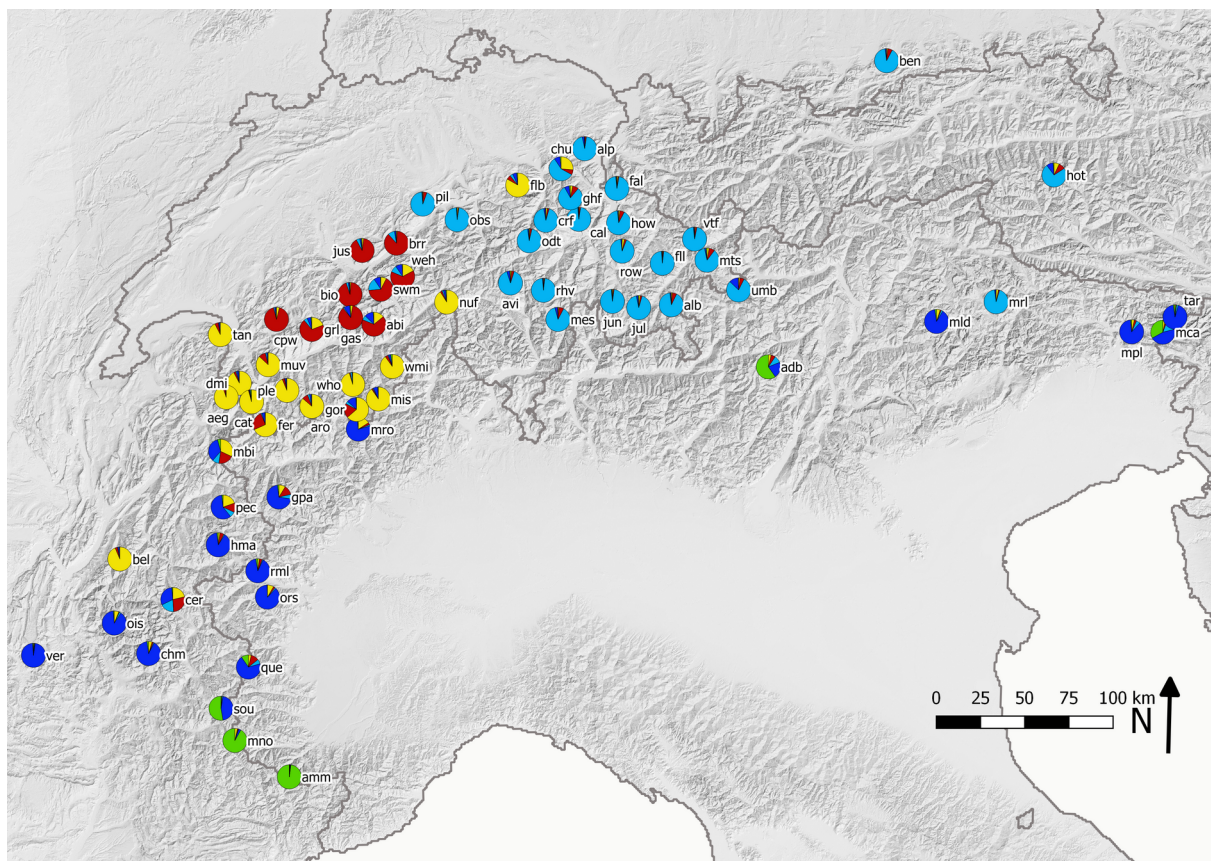


Figura 4. Struttura genetica di 68 popolazioni dell'arco alpino. In totale sono stati identificati 5 cluster. Gli spicchi mostrano la proporzione di ciascuna popolazione che appartiene ai diversi cluster.

Nella Tabella 2 sono riportati i valori di alcuni indici utilizzati per descrivere la diversità genetica. La tabella comprende tutte le popolazioni incluse nel progetto (definite in base a quanto esposto nel paragrafo precedente). In aggiunta, sono stati riportati i valori misurati nelle prime tre popolazioni svizzere reintrodotte all'inizio del 1900 ed utilizzate come fonte per numerose successive reintroduzioni.

Come atteso, la variabilità genetica nelle popolazioni di stambecco è estremamente bassa (Tab. 2). Il range dell'eterozigosi (H_e) nelle diverse popolazioni va da un minimo di 0.31 a un massimo di 0.46. Il numero medio di alleli (sNa , ovvero la media standardizzata del numero di alleli per ciascun locus microsatellite) va da un minimo di 1.89 a un massimo di 2.49. In entrambi i casi, anche i valori massimi, sono indice di variabilità genetica molto bassa. E' interessante notare come vi siano notevoli differenze tra le diverse popolazioni. La popolazione del Gran Paradiso risulta avere la variabilità maggiore sia per quanto riguarda l'eterozigosi ($H_e=0.46$) che il numero di alleli ($sNa=2.49$). E' anche quella che presenta il numero più alto di alleli privati ($n=3$), ovvero di alleli che non si trovano in nessun'altra delle popolazioni. Questo risultato era atteso poiché si tratta dell'unica popolazione che non si è mai estinta e che dunque è passata attraverso un solo collo di bottiglia. Altre popolazioni con una variabilità genetica relativamente alta sono Brienzer Rothorn ($H_e= 0.46$, $sNa= 0.31$), Monte Bianco ($H_e=0.45$; $sNa=2.41$), Peisey-Champagny ($H_e=0.45$; $sNa=2.34$).

Tabella 2. parametri di diversità genetica delle 21 popolazioni indagate. Per confronto sono state incluse anche tre popolazioni svizzere (Albris, Brienzer Rothorn, Pleureur).

Population	Sampling units included	N samples	Het obs	Het exp	Tot Na	s Na	Private Alleles
Albris	Albris	61	0.43	0.41	94	2.21	
Alpi Marittime Mercantour Est	Mercantour_est, Argentera_Mercantour, AlpiMarittime_ValleGesso	80	0.31	0.31	77	1.89	
Arve et Giffre	Arve et Giffre	27	0.41	0.39	95	2.21	
Brienzer Rothorn	Brienzer Rothorn	39	0.46	0.46	95	2.31	1
Cerces	Cerces	37	0.34	0.34	91	1.97	
Champsaur	Champsaur	24	0.42	0.39	92	2.15	
Gran Paradiso	Tersiva, Frontiere, Valle Orco, Valsavarenche	79	0.45	0.46	115	2.49	3
Haute Maurienne	Haute Maurienne	36	0.36	0.36	97	2.11	
Marmarole	Marmarole	26	0.33	0.32	77	1.91	1
Marmolada	Marmolada	28	0.38	0.38	95	2.18	
Mercantour Nord Ouest	Tinee_Ubaye_Bachelard Valle Stura	26	0.33	0.32	92	2.01	
Monte Bianco	Contamine_Montjoie MonteBianco	29	0.43	0.45	104	2.41	
Monte Canin	Monte Canin	14	0.42	0.36	90	2.14	
Monte Plauris	Monte Plauris	17	0.40	0.38	90	2.12	
Monte Rosa	Monte Rosa	15	0.42	0.42	102	2.38	
Oisans	Oisans	10	0.34	0.31	80	1.92	
Orsiera	Orsiera	12	0.38	0.33	83	2.02	
Peisey Champagny	Peisey Champagny	32	0.45	0.45	97	2.34	
Pleureur	Pleureur	29	0.43	0.41	103	2.34	1
Queyras	Ristolas, SaintPaul_Ubaye, Valle Po, Val Varaita, Val Troncea	34	0.40	0.42	105	2.37	
Rocciamelone_Lera	Rocciamelone_Lera	6	0.50	0.40	89	2.22	
SaintOurs	SaintOurs_HauteUbaye	7	0.34	0.35	76	1.90	
Vercors	Vercors	9	0.35	0.32	78	1.90	
Tarvisio	Tarvisio	32	0.37	0.38	100	2.24	1

Queste due ultime popolazioni sono il risultato dell'unione di individui provenienti da più di una popolazione di origine (o per fondazione o per successive reimmissioni o per scambi naturali con altri nuclei) e questo può in parte spiegare i valori di variabilità relativamente più alti che vi si possono osservare (Biebach and Keller 2012). All'estremo opposto, le popolazioni con la variabilità più bassa risultano essere: Alpi Marittime – Mercantour Est ($He=0.31$; $sNa=1.89$), Oisans ($He=0.31$; $sNa=1.92$), Mercantour Nord-Ouest ($He=0.32$; $sNa=2.01$), Vercors ($He=0.32$; $sNa=1.90$) e Marmarole ($He=0.32$; $sNa=1.91$). Tutte queste popolazioni sono state fondate a partire da un'unica fonte. Molte di esse inoltre sono isolate, cosa che rende impossibile l'immigrazione da altre aree. Nel caso della popolazione Mercantour Nord-Ouest, la variabilità rimane bassa nonostante le operazioni di rinforzo genetico effettuate nel 2005-2006 con animali provenienti da Belledonne, Haute Maurienne e Peisey-Champagny. Bisogna però considerare che la variabilità di partenza della

popolazione era probabilmente simile se non minore di quella della popolazione Alpi Marittime-Mercantour Est quindi sembra esserci stato un leggero aumento. Inoltre, è possibile che il numero di generazioni trascorse dal rinforzo genetico non siano ancora sufficienti per osservarne gli effetti.

Per descrivere la diversità genetica delle popolazioni sono anche stati calcolati i coefficienti di inbreeding di ciascuna. Viene definito inbreeding l'accoppiamento tra individui correlati geneticamente (consanguinei). Il tasso di inbreeding nelle popolazioni attuali di stambecco dipende principalmente dal numero di individui utilizzati per la fondazione della popolazione, dalla composizione del pool di individui usati e dalla dimensione attuale della popolazione (Biebach e Keller 2009). I coefficienti di inbreeding calcolati per le diverse popolazioni (Fig. 5) rispecchiano i risultati presentati in precedenza. La popolazione con il livello di inbreeding più elevato risulta essere quella delle Alpi Marittime-Mercantour Est mentre quella con il livello più basso è quella del Gran Paradiso.

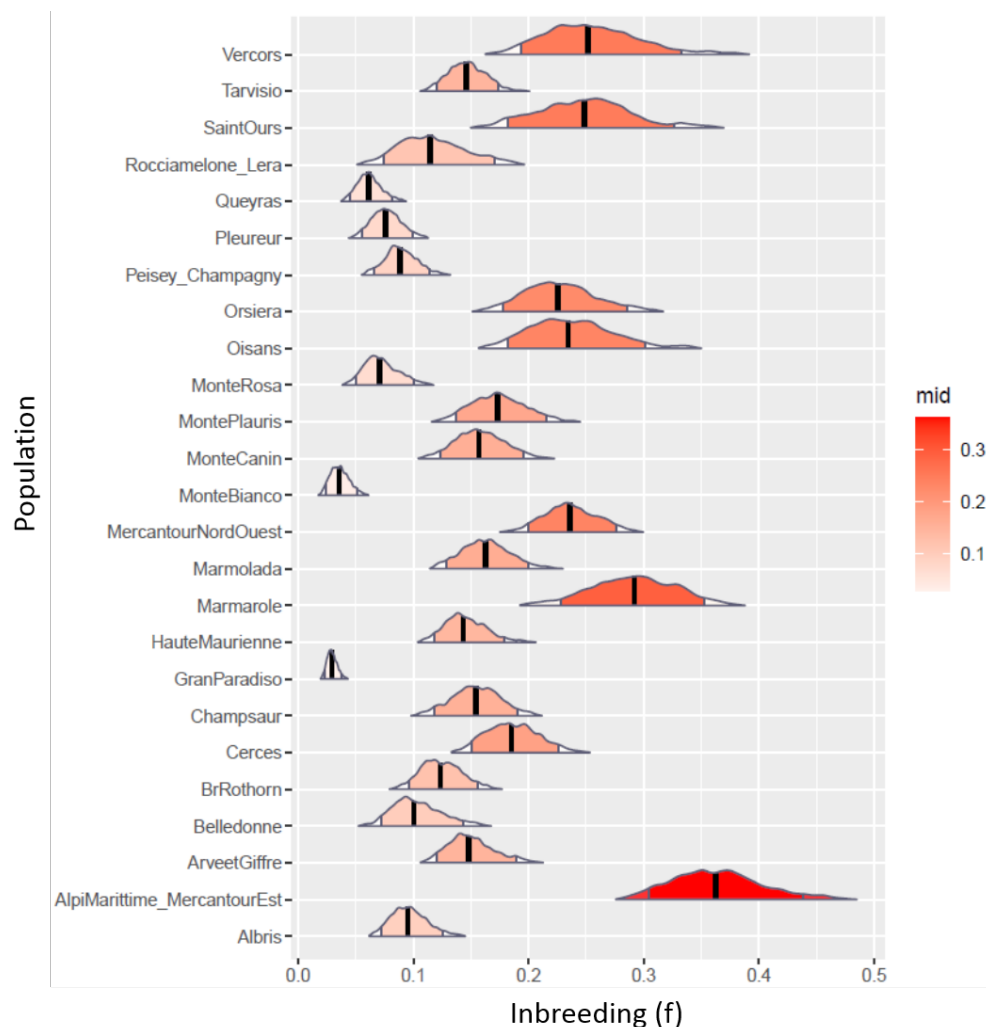


Figura 5: Valori di inbreeding (f) per 25 popolazioni dell'arco alpino stimati mediante 2modx su 37 marcatori microsatellite, si veda Biebach e Keller (2010). L'area intorno ai valori di f rappresenta la distribuzione di probabilità degli stessi. Come riferimento: $f=0.25$ equivale ai livelli di inbreeding che si osservano quando avviene la riproduzione tra fratelli mentre $f=0.125$ equivale ai livelli di inbreeding che si osservano quando avviene la riproduzione tra frateLLastri.

La tabella 3 riporta i valori di pairwise Fst, una misura della distanza genetica tra le diverse popolazioni. Come atteso, valori bassi di Fst (che indicano vicinanza genetica) si osservano tra le popolazioni reintrodotte e le rispettive popolazioni di origine. Risultano geneticamente vicine tra loro anche le popolazioni reintrodotte a partire dalla stessa origine.

Tabella 3. Pairwise Fst tra coppie di popolazioni. Il gradiente di colore delle celle è condizionale ai valori di Fst con le celle più scure che indicano le popolazioni più distanti tra loro.

	Albris	Alpi Maritime Mercant Est	Arve et Giffre	Brienzer Rothorn	Cerces	Champsaur	Gran Paradiso	Haute Maurienne	Marmarole	Marmolada	Mercantour Nord Ouest	Monte Bianco	Monte Canin	Monte Plauris	Monte Rosa	Oisans	Orsiera	Peisey Champagny	Pleureur	Queyras
Albris																				
Alpi Maritime Mercant Est	0.22																			
Arve et Giffre	0.17	0.30																		
Brienzer Rothorn	0.09	0.25	0.13																	
Cerces	0.14	0.27	0.22	0.19																
Champsaur	0.14	0.26	0.19	0.16	0.18															
Gran Paradiso	0.07	0.16	0.11	0.09	0.12	0.08														
Haute Maurienne	0.15	0.26	0.24	0.17	0.21	0.03	0.10													
Marmarole	0.13	0.31	0.24	0.20	0.24	0.24	0.14	0.27												
Marmolada	0.15	0.24	0.19	0.18	0.22	0.17	0.07	0.17	0.18											
Mercantour Nord Ouest	0.20	0.01	0.28	0.23	0.26	0.23	0.14	0.24	0.29	0.22										
Monte Bianco	0.07	0.17	0.10	0.08	0.15	0.09	0.03	0.12	0.14	0.10	0.15									
Monte Canin	0.12	0.13	0.21	0.16	0.21	0.16	0.05	0.17	0.21	0.12	0.12	0.08								
Monte Plauris	0.15	0.26	0.18	0.15	0.25	0.14	0.06	0.16	0.22	0.14	0.23	0.10	0.10							
Monte Rosa	0.10	0.22	0.15	0.12	0.17	0.10	0.02	0.11	0.17	0.06	0.19	0.03	0.10	0.09						
Oisans	0.17	0.29	0.28	0.20	0.26	0.06	0.11	0.04	0.30	0.20	0.27	0.12	0.20	0.19	0.12					
Orsiera	0.20	0.31	0.18	0.19	0.26	0.17	0.10	0.20	0.26	0.20	0.29	0.12	0.20	0.14	0.14	0.22				
Peisey Champagny	0.08	0.20	0.12	0.09	0.13	0.05	0.05	0.07	0.16	0.14	0.18	0.04	0.13	0.12	0.07	0.10	0.15			
Pleureur	0.13	0.24	0.06	0.13	0.16	0.14	0.06	0.18	0.18	0.12	0.21	0.04	0.12	0.14	0.08	0.19	0.18	0.07		
Queyras	0.08	0.18	0.16	0.10	0.15	0.07	0.01	0.07	0.17	0.07	0.16	0.05	0.07	0.08	0.03	0.09	0.12	0.05	0.09	
Tarvisio	0.15	0.26	0.22	0.20	0.21	0.15	0.07	0.18	0.20	0.12	0.25	0.11	0.12	0.16	0.09	0.21	0.19	0.12	0.14	0.08

Conclusioni

Questo lavoro si è occupato di descrivere la variabilità genetica delle popolazioni di stambecco dell'arco alpino occidentale.

Un primo elemento di interesse scaturito da questa indagine è legato alle difficoltà riscontrate nel definire le diverse popolazioni. Secondo la definizione della IUCN già citata le popolazioni (o meglio, le sub-popolazioni) sarebbero definite come: “geographically (or otherwise) distinct groups in the population between which there is little exchange (typically one successful migrant individual or gamete per year or less)”. Le analisi effettuate finora mostrano però come, nel caso dello stambecco, sia difficile identificare le migrazioni a livello genetico, in particolar modo nelle aree in cui si trovano diversi nuclei vicini. Non è infatti possibile distinguere se la similarità genetica tra due nuclei derivi dalla loro storia di fondazione o da flusso genetico in corso. Questo è in parte legato alla bassa variabilità della specie e nel ridotto polimorfismo nei marker genetici finora utilizzati che non hanno sufficiente potere distintivo.

Per indagare il flusso genetico, aspetto molto importante in ottica di conservazione della specie, sembra quindi opportuno utilizzare nuovi strumenti genetici (es. arrays di SNPs) che consentono di avere una risoluzione maggiore. Inoltre, date le caratteristiche ecologiche e comportamentali dello stambecco, sarebbe interessante indagare la diversità genetica non concentrandosi su popolazioni separate ma considerando lo spazio, e gli individui che lo abitano, come un continuum. Questo è possibile grazie agli strumenti offerti dalla “genetica del paesaggio” ed integrando nelle analisi anche i dati ottenuti dagli studi comportamentali (localizzazione degli animali, osservazione degli spostamenti ecc.). Tale approccio sarebbe estremamente interessante per le popolazioni di grandi dimensioni e/o nelle aree con numerosi nuclei confinanti tra i quali è probabile che ci siano scambi di individui. Tali scambi potrebbero infatti non essere sufficienti per comportare un cambio di frequenze alleliche identificabile nella popolazione ma potrebbero avere effetto a livello locale (si vedano ad esempio, in Fig.3, le unità di campionamento di Frontiere, Valle Orco, Valsavarenche e Tersiva).

Per quanto riguarda l'obiettivo principale di questo lavoro e del progetto LEMED-IBEX, e cioè l'analisi delle caratteristiche genetiche delle popolazioni di stambecco dell'arco alpino occidentale, la suddivisione delle popolazioni effettuata si è dimostrata idonea e ci ha consentito di descriverne la variabilità ed individuare quelle più vulnerabili.

Le analisi confermano che la specie ha una variabilità ridotta e tassi di inbreeding elevati. Nonostante l'inbreeding sia mediamente alto in tutte le popolazioni, ve ne sono alcune con livelli particolarmente elevati che potrebbero essere più vulnerabili in caso di cambiamenti nell'ambiente o di insorgenza di patologie. Era già noto, ad esempio, che la popolazione Alpi Marittime-Mercantour Est avesse un inbreeding molto alto; questo studio dimostra però che vi sono anche altri nuclei che meritano attenzione da questo punto di vista.

L'azione più efficace per ridurre l'inbreeding è l'incrocio tra gli individui *inbred* ed individui appartenenti ad un'altra popolazione non geneticamente correlata e possibilmente non soggetta ad inbreeding (Frankham et al., 2002; Frankham, 2015). Nel caso dello stambecco, ciò potrebbe essere ottenuto mediante immissione di individui provenienti da altre popolazioni, geneticamente distanti e, possibilmente, con variabilità genetica maggiore. La riduzione dell'inbreeding dipende infatti dalle caratteristiche genetiche degli individui utilizzati per il ripopolamento, dal loro numero in

relazione alle dimensioni della popolazione target e dal loro successo riproduttivo una volta translocati (Frankham et al., 2002). Simulazioni effettuate per la popolazione Alpi Marittime-Mercantour Est hanno mostrato che, per ridurre l'inbreeding di questa popolazione è importante immettere un numero elevato di individui. La provenienza degli individui non sembra invece avere grande importanza. Le stesse analisi effettuate su una popolazione svizzera (Hustock, Iris Biebach comunicazione personale) hanno invece mostrato che, in quel caso, la riduzione dell'inbreeding dipendeva dal numero di popolazioni sorgente utilizzate per le immissioni. Queste differenze mostrano che la riduzione dell'inbreeding può non avvenire allo stesso modo in tutte le popolazioni a causa delle loro intrinseche differenze (livello di inbreeding di partenza, dimensioni della popolazione ecc). Ciascuna operazione di rinforzo genetico va quindi attentamente pianificata in base alle caratteristiche della popolazione.

Questo lavoro contribuisce al raggiungimento di uno degli obiettivi del progetto LEMED-IBEX. Per proseguire con il progetto ed approfondire le conoscenze sugli effetti che la diversità genetica questa può avere sulla conservazione della specie, è ora necessario indagare le relazioni tra la variabilità genetica e la resistenza alle malattie.

Appendice: dettaglio dei metodi utilizzati

- *Diversità genetica*

Le seguenti misure di diversità genetica: Observed Heterozygosity (H_o); Expected Heterozygosity (H_e); Standardized number of alleles (sNa); Pairwise fixation index (pairwise F_{st}); F_{is} , Hardy-Weinberg Equilibrium tests (HWE) sono state calcolate mediante il pacchetto R *diversity* (Keenan et al., 2013).

- *Structure*

L'assegnazione delle diverse popolazioni ai cluster genetici è stata effettuata utilizzando il software *Structure* 2.3.4 (Pritchard et al., 2003).

I parametri utilizzati per le analisi sono i seguenti:

Running length: Length of Burnin Period: 10,000; Number of MCMC reps after Burnin: 100,000;

Ancestry model: Admixture model; infer Alpha (initial value: 1.0, max value: 10.0);

Frequency model: Allele frequencies correlated among populations (assume different values of F_{st} for different Subpopulations).

Le analisi sono state effettuate su diversi set di dati: inizialmente sono state effettuate analisi separate per le aree nelle quali l'assegnazione delle unità di campionamento alle diverse popolazioni era più problematica. Poi, in seguito all'assegnazione delle unità di campionamento alle rispettive popolazioni (effettuata in base ai risultati delle analisi precedenti e alle misure di diversità genetica), è stata effettuata l'analisi su tutte le popolazioni delle Alpi per le quali sono disponibili genotipi.

In ciascuna analisi, sono state effettuate 20 ripetizioni per ciascun valore di k (k compreso tra 3 e 10). La scelta del valore di k che meglio rappresentasse la ripartizione in cluster è stata effettuata con il tool online *Structure Harvester* (Earl, 2012) che utilizza il metodo di Evanno. Utilizzando gli output delle 20 ripetizioni, il valore medio di appartenenza di ciascuna popolazione ai diversi cluster genetici è stato calcolato con *Clumpak*: Cluster Markov Packager Across K (Kopelman et al., 2015).

- *Coefficienti di inbreeding*

I coefficienti di inbreeding per le diverse popolazioni sono stati calcolati utilizzando una versione modificata (2modx) del software 2mod (descritto in Ciofi et al., 1999). 2modx utilizza le frequenze alleliche delle singole popolazioni e si avvale di modelli di teoria coalescente e simulazioni MCMC per stimare il grado di deriva genetica che ogni popolazione ha subito a partire dalla sua fondazione.

Bibliografia

- Acevedo-Whitehouse, K., & Cunningham, A. A. 2006. Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? *Trends in Ecology & Evolution*, 21(8), 433-438.
- Allendorf, F.W., and R.F. Leary. 1986. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. In: *Conservation Biology: the Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates, Inc., New York.
- Ammerdorffer, A., Roest, H. I. J., Dinkla, A., Post, J., Schoffelen, T., van Deuren, M., ... Rebel, J. M. 2014. The effect of *C. burnetii* infection on the cytokine response of PBMCs from pregnant goats. *PloS one*, 9(10).
- Bernatchez, L., & Landry, C. 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years?. *Journal of evolutionary biology*, 16(3), 363-377.
- Biebach, I., and L. F. Keller. 2009. A strong genetic footprint of the re-introduction history of Alpine ibex (*Capra ibex ibex*). *Mol. Ecol.* 18: 5046-5058.
- Biebach, I., and L. F. Keller. 2010. Inbreeding in reintroduced populations: the effects of early reintroduction history and contemporary processes. *Conserv. Genet.* 11: 527-538.
- Biebach, I., and L. F. Keller. 2012. Genetic variation depends more on admixture than number of founders in reintroduced Alpine ibex populations. *Biol. Conserv.* 147: 197-203.
- Bozzuto, C., Biebach, I., Muff, S., Ives, A. R., Keller, L. F. 2019. Inbreeding reduces long-term growth of Alpine ibex populations. *Nature ecology & evolution*, 3(9), 1359-1364.
- Brambilla, A., Biebach, I., Bassano, B., Bogliani, G., von Hardenberg, A. 2015. Direct and indirect causal effects of heterozygosity on fitness-related traits in Alpine ibex. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1798), 20141873.
- Brambilla, A. von Hardenberg, A., Nelli, L. Bassano, B. 2020. Distribution, status and recent population dynamics of Alpine ibex *Capra ibex* in Europe. *Mammal Review*.
- Ciofi C, Beaumont MA, Swingland IR, Bruford MW. 1999. Genetic divergence and units for conservation in the Komodo dragon *Varanus komodoensis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 266:2269–2274.
- Cooper, M. D., Alder, M. N. 2006. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, 124(4), 815-822.
- Charlesworth, D., and J.H. Willis. 2009. The genetic of inbreeding depression. *Nature* 10: 783-796.
- Crnokrak, P., and D.A. Roff. 1999. Inbreeding depression in the wild. *Heredity* 83: 260-270.
- Earl, D. A. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359-361.
- Ewing, S. R., Nager, R. G., Nicoll, M. A., Aumjaud, A., Jones, C. G., & Keller, L. F. (2008). Inbreeding and loss of genetic variation in a reintroduced population of Mauritius kestrel. *Conservation Biology*, 22(2), 395-404.
- Frankham, R., Ballou, J.D. and D.A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Frankham, R., Bradshaw, C. J., Brook, B. W. 2014. Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation*, 170, 56-63.
- Frankham, R. 2015. Genetic rescue of small inbred populations: Meta-analysis reveals large and consistent benefits of gene flow. *Molecular ecology*, 24(11), 2610-2618.
- Grodinsky C, Stüwe M 1987. With lots of help alpine ibex return to their mountains. *Smithsonian* 18:68-77.
- Grossen, C., Guillaume, F., Keller, L. F., & Croll, D. 2020. Purging of highly deleterious mutations through severe bottlenecks in Alpine ibex. *Nature communications*, 11(1), 1-12.
- Hedrick, P. W., Kalinowski, S. T. 2000. Inbreeding depression in conservation biology. *Annual review of ecology and systematics*, 31(1), 139-162.
- Hoelzel, A.R. 1999. Impact of population bottlenecks on genetic variation and the importance of life-history: a case study of the northern elephant seal. *Biol. J. Linn. Soc.* 68: 23-39.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and M.J. Shlomchik. 2001. The major histocompatibility complex and its functions. In: *The Immune System in Health and Disease*, Immunobiology 5th ed. Garland Science, New York.
- Keller, L.F., Arcese, P., Smith, J.N.M., Hochachka, W.M., and S.C. Stearns. 1994. Selection against inbred song sparrow during a natural population bottleneck. *Nature* 372: 356-357.
- Keller, L. and P. Waller. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol. Evol.* 17: 230-241.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular ecology resources*, 15(5), 1179-1191.
- Madsen, T., Stille, B., & Shine, R. 1996. Inbreeding depression in an isolated population of adders *Vipera berus*. *Biological conservation*, 75(2), 113-118.
- Maudet, C., Miller, C., Bassano, B., Breitenmoser-Würsten, C., Gauthier, D., Obexer-Ruff, G., Michallet, J., Taberlet, P., and G. Luikart. 2002. Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex *Capra ibex* (ibex). *Mol. Ecol.* 11: 421-436.
- Parmesan, C. 2006. Ecological and evolutionary responses to recent climate changes. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37: 637-669.
- Pasare, C., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes and infection*, 6(15), 1382-1387.
- Passerin d'Entrèves, P. 2000. *Le Chasses Royales in Valle d'Aosta (1850-1919)*. Umberto Allemandi, Torino.
- Pritchard, J. K., Wen, W., & Falush, D. 2003. Documentation for STRUCTURE software: Vers 2.
- Quéméré, E., Rossi, S., Petit, E., Marchand, P., Merlet, J., Game, Y. ..., Gilot-Fromont, E. 2020. Genetic epidemiology of the Alpine ibex reservoir of persistent and virulent brucellosis outbreak. *Scientific reports*, 10(1), 1-10.

- Réale, D. Mc Adam A.G., Boutin, S. and D. Berteaux. 2003. Genetic and plastic responses of a northern mammal to climate change. *Proc. R. Soc. B.* 270: 591-596.
- Ruiz-López, M. J., Ganan, N., Godoy, J. A., Del Olmo, A., Garde, J., Espeso, G., Vargas, A., Martinez, F., Ròldan, E. R. S., and M. Gomendio. 2012. Heterozygosity-Fitness Correlations and inbreeding depression in two critically endangered mammals. *Conserv. Biol.* 6: 1121-1129.
- Saccheri, I., Kuussaari, M., Kankare, M., Vikman, P., Fortelius, W., and I. Hanski. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392: 491-494.
- Scillitani, L., Sturaro, E., Menzano, A., Rossi, L., Viale, C., & Ramanzin, M. 2012. Post-release spatial and social behaviour of translocated male Alpine ibexes (*Capra ibex ibex*) in the eastern Italian Alps. *European Journal of Wildlife Research*, 58(2), 461-472.
- Tschirren, B., Andersson, M., Scherman, K., Westerdahl, H., Mittl, P. R., Råberg, L. 2013. Polymorphisms at the innate immune receptor TLR2 are associated with *Borrelia* infection in a wild rodent population. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1759), 20130364.
- Slate, J., Kruuk, L.E.B., Marshall, T.C., Pemberton, J.M., and T.H. Clutton-Brock. 2000. Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). *Proc. R. Soc. Lond.* 267: 1657-1662.
- Spielman, D., Brook, B.W., Briscoe, D.A., and R. Frankham. 2004. Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease disease resistance? *Cons. Genet.* 5: 439-448.
- Stüwe M, Nievergelt B. 1991. Recovery of alpine ibex from near extinction: the result of effective protection, captive breeding, and reintroductions. *Appl Anim Behav Sci* 29(1-4):379-387
- Whitehouse, A.M., and E.H. Harley. 2001. Post-bottleneck genetic diversity of elephant populations in South Africa, revealed using microsatellite analysis. 10: 2139–214.
- Wilfert, L., Schmid-Hempel, P. 2008. The genetic architecture of susceptibility to parasites. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 187.
- Willi, Y., van Buskirk, J., A.A. Hoffmann. 2006. Limits to the adaptive potential of small populations. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37: 433-458.