



Borsa di studio attivata ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021

Titolo del progetto: Effetto dell'ibridazione antropogenica sulla popolazione italiana di lupo (*Canis lupus*): approccio integrato tra genomica e comportamento.

La borsa sarà attivata sul seguente corso di dottorato accreditato per il XXXVII ciclo:
BIOLOGIA AMBIENTALE ED EVOLUZIONISTICA

Responsabile scientifico: Prof. Paolo Ciucci

Area per la quale si presenta la richiesta: GREEN

Numero di mensilità da svolgere in azienda: 6

Numero di mensilità da svolgere all'estero: 6 presso University of Copenhagen, Center of Evolutionary Hologenomics

Azienda: NGB Genetics srl

Il Dipartimento è disponibile a cofinanziare per un importo pari a euro: 10.000,00 euro

Dipartimento finanziatore: DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE "CHARLES DARWIN" con delibera del 20/09/2021

Progetto di ricerca:

I predatori apicali esercitano un ruolo chiave tramite il controllo delle popolazioni preda e influenzando struttura e funzionalità dell'intero ecosistema. Diversi studi hanno recentemente evidenziato come la presenza dei predatori apicali corrisponda a maggiori livelli di diversità biologica. Per questo e altri motivi la tutela dei predatori apicali, per quanto complessa e conflittuale possa essere, è fondamentale per la conservazione della biodiversità. In Italia, il lupo (*Canis lupus italicus*) è il predatore apicale più importante e carismatico, sebbene perdita e frammentazione di habitat, bracconaggio e, più recentemente, ibridazione antropogenica con il cane domestico rappresentino i fattori antropici che, più di altri, minacciano il suo stato di conservazione. Dopo essere stato sulla soglia dell'estinzione, a partire dagli anni 80' il lupo ha manifestato una naturale ripresa numerica e spaziale grazie, oltre ai diffusi sforzi di conservazione, alla sua estrema adattabilità ecologica e flessibilità comportamentale. Tale espansione dell'areale ha del resto interessato anche aree fortemente antropizzate, dove sono presenti cani vaganti, con l'accresciuto rischio ibridazione con il cane domestico, fenomeno che rappresenta una minaccia per l'integrità genetica del lupo stesso.

L'ibridazione tra specie selvatiche e domestiche può portare all'introggressione di varianti genetiche selezionate in un contesto artificiale e che minano l'integrità del pool genico del progenitore selvatico. In particolare, l'ibridazione introggressiva con il cane può determinare nel lupo la perdita di adattamenti specifici e l'introduzione di varianti canine selezionate artificialmente; gli effetti attesi non si riscontrano solo a livello morfologico ma anche fisiologico e comportamentale e sono potenzialmente in grado di ridurre la fitness della specie, influenzarne le relazioni ecologiche, o facilitare la sua permanenza in situazioni sinantropiche con il risultato di aumentare ulteriormente i conflitti con le popolazioni locali. Negli ibridi, eventuali modificazioni fisiologiche (p. es. ciclo estrale, fertilità, livello di adrenocorticotropi) e attitudinali potrebbero alterare sia le caratteristiche di base di storia naturale (p. es., età di prima riproduzione, fecondità, rapporto sessi), sia il comportamento, spaziale e di caccia, andando potenzialmente a influenzare la dinamica di popolazione e l'effetto ecologico che il lupo svolge all'interno dell'ecosistema. Anche il rapporto fra lupo e popolazioni umane potrebbe andare a deteriorarsi ulteriormente a causa della presenza di ibridi lupo-cane, secondo l'ipotesi, ancora tutta da valutare, che gli individui ibridi potrebbero mostrarsi più confidenti nei confronti dell'uomo ed essere più pericolosi per il bestiame, per gli animali da compagnia o per l'uomo stesso. In assenza di conoscenze affidabili sulla diffusione del fenomeno dell'ibridazione e sull'effetto che questa può avere su fisiologia, comportamento ed ecologia del lupo, l'obiettivo generale del progetto proposto è quello di indagare

aspetti ed effetti dovuti all'ibridazione tra lupo e cane domestico attraverso un approccio genetico e genomico, distinto in tre fasi: (i) monitoraggio genetico, a partire da diverse matrici biologiche, per il riconoscimento individuale, rilevamento di eventuali individui ibridi e approfondimento del grado di ibridazione, in termini di prevalenza (proporzione di individui introgressi) e di livello di introgressione; (ii) analisi di alcuni geni notoriamente associati nel cane a comportamenti socievoli e confidenti verso l'uomo, per valutare la presenza di specifiche varianti domestiche nel genoma di ibridi lupo-cane; (iii) analisi di associazione fenotipo-genotipo, da condurre su lupi, ibridi lupo-cane e cani domestici, prendendo in considerazione specifici caratteri comportamentali; tale analisi verrà realizzata in collaborazione con la University of Copenhagen.

La prima fase inizierà con un campionamento condotto in zone antropizzate e vocate alle attività zootecniche in aree protette dell'Appennino Centrale, dove è presente un network di collaborazioni attive per monitorare le dinamiche di popolazione del lupo e il fenomeno dell'ibridazione. In particolare verranno prelevati: campioni non-invasivi, mediante l'uso di tamponi fecali; campioni invasivi, mediante l'uso di tamponi salivari su cani domestici campionati nell'area di studio e in specifici centri di educazione cinofila; campioni di tessuto e di sangue prelevati da eventuali carcasse. Verrà analizzato un numero minimo di 100 campioni non-invasivi e 50 campioni invasivi. Il DNA verrà estratto, amplificato e analizzato seguendo uno specifico protocollo sviluppato presso l'Area per la Genetica della Conservazione di ISPRA. I marcatori genetici analizzati saranno: 12 (per campioni non-invasivi) o 39 (per campioni invasivi) loci microsatellite nucleari autosomici e il gene Amelogenina, per definire profili multilocus e sesso degli individui campionati; 4 loci microsatellite localizzati sul cromosoma Y e un frammento della regione di controllo del DNA mitocondriale per valutare la presenza di tracce di introgressione nelle linee parentali; una delezione dominante di 3 bp (denominata KB) al gene CBD103, correlata al mantello nero e probabilmente di origine canina. I genotipi multilocus ottenuti saranno analizzati utilizzando procedure di assegnazione Bayesiana per definirne le probabilità di assegnazione alle popolazioni di riferimento (lupo o cane). I genotipi non-invasivi con assegnazioni incerte verranno verificati utilizzando un pannello ridotto di 93 SNPs, rigorosamente sviluppato per questo scopo.

La seconda fase verrà condotta sia sui campioni affidabili della prima fase, sia sui campioni di cani domestici provenienti da specifici centri di educazione cinofila, nonché su campioni di lupi e ibridi lupo-cane precedentemente genotipizzati da ISPRA negli ultimi 10 anni. Su questi si analizzeranno, tramite tecniche di minisequenziamento, cinque geni del comportamento (DRD4, OXTR, COMT, SEZ6L e ARVCF), i cui polimorfismi sono già stati associati nei cani domestici a fenotipi comportamentali quali confidenza e socievolezza verso gli esseri umani. I fenotipi comportamentali dei cani domestici dei centri di educazione cinofila saranno caratterizzati mediante l'uso di etogrammi da parte di collaboratori esperti ed usati poi come base di raffronto con lupi ed ibridi lupo-cane.

La terza fase si baserà sull'uso di un pannello di 170.000 SNP (170K SNP) per effettuare associazioni fenotipo-genotipo e identificare varianti alla base di possibili correlazioni tra fenotipi comportamentali e regioni genomiche. Le associazioni verranno condotte sul dataset utilizzato nella seconda fase ma con l'esclusione dei campioni non-invasivi. I genotipi ottenuti con 170K SNP e con i polimorfismi analizzati nei geni del comportamento saranno associati ai fenotipi comportamentali dei cani domestici selezionati, precedentemente caratterizzati, per identificare possibili differenze tra lupi, ibridi lupo-cane e cani domestici. In caso di disponibilità di dati spaziali ottenuti da lupi radiocollari, si effettuerà anche l'associazione tra il comportamento spaziale e i dati genomici di lupi e ibridi lupo-cane.

A partire dagli output genomici dei campioni analizzati, il beneficiario della borsa condurrà 6 mesi di attività di ricerca presso un'azienda, la NGB Genetics srl (<https://www.ngbgenetics.com/>), dove verrà messo a punto un pannello ridotto e diagnostico di SNP, funzionale per l'identificazione immediata di varianti domestiche o selvatiche in lupi, ibridi lupo-cane e cani domestici. Sono molteplici gli aspetti innovativi e applicativi di questo pannello:

- la rapida individuazione di lupi selvatici potenzialmente confidenti durante futuri progetti di monitoraggio, gestione e conservazione;
- il riconoscimento di varianti selvatiche nei cani domestici oggetto di procedimenti penali, sottoposti a test di parentela ENCI o alla verifica dei pedigree dichiarati;
- la fruibilità, da parte del personale di Aree protette e delle Amministrazioni Pubbliche, di uno strumento per risolvere situazioni critiche o ambigue, relative a Canidi selvatici e domestici.

Questo progetto permetterà inoltre di fornire informazioni per applicare misure gestionali atte alla prevenzione del randagismo canino e del rischio di ibridazione antropogenica, nonché incentivare la tutela del lupo e del suo ruolo ecologico anche ai fini della conservazione della biodiversità degli ecosistemi in cui la specie vive. Le tematiche affrontate si prestano a pubblicazioni scientifiche su journal internazionali di elevato impatto. ISPRA e il Dipartimento proponente, così come l'Università di Copenhagen, sono enti di ricerca affermati, da anni attivi nello studio e nella conservazione della biodiversità. L'azienda NGB Genetics srl è specializzata nel settore umano, veterinario, agroalimentare ed ambientale e ha mantenuto anche una forte vocazione per la ricerca svolgendo attività scientifica in collaborazione con numerose Università, Centri di Ricerca, Cliniche Mediche italiane ed internazionali e partecipando a svariati progetti europei. Oltre ai prodotti scientifici di ricerca, particolare attenzione verrà posta agli aspetti di comunicazione e di diffusione dei risultati ottenuti, attività che verrà garantita dal ruolo istituzionale di ISPRA e dagli specifici uffici stampa sia di ISPRA che dell'Università di Roma La Sapienza.

Titolo del progetto (inglese): From genes to behavior: an integrate genomic and behavioural approach to investigate the effect of anthropogenic hybridization on the Italian wolf (*Canis lupus*) population

Progetto di ricerca (inglese):

Apex predators have a key ecosystem role within trophic networks, limiting the abundance of prey's populations and affecting structure and functionality of the entire ecosystem. Many studies highlighted that occurrence of top predators corresponds to higher levels of biodiversity. For these reasons the protection of apex predators is fundamental for the conservation of biodiversity. The Italian wolf (*Canis lupus italicus*) is the most important and charismatic top predator in the Peninsula, although habitat loss and fragmentation, poaching and, more recently, anthropogenic hybridization with dogs represent some major anthropic factors that threaten its survival. After being on the verge of extinction, from the '80s the Italian wolf re-colonized its former range, thanks to the accorded legal protection (1973), as well as its remarkable ecological adaptability and behavioral flexibility. In particular, such numerical and range expansion has affected and is still affecting heavily anthropized areas; here, the large number of stray dogs increase the risk of hybridization with the wolf, threatening the genetic integrity of the species.

Hybridization between wild and domestic species can lead to introgression of genetic variants artificially selected which can undermine the integrity of gene pool of the wild ancestor. In particular, introgressive hybridization with dogs can lead to loss of specific adaptations and the introduction of canine variants in the wolf; the expected effects might result not only at morphological but also at physiological and behavioral levels and could potentially reduce the fitness of the species, influencing its ecological relations, or facilitating its presence in synanthropic situations further increasing conflicts with humans. In wolf-dog hybrids, physiological (e.g., estrus cycle, fertility, adrenocorticotrophic level) and attitudinal changes could alter both life history traits (e.g., age of first reproduction, fecundity, sex ratio), and spatial and hunting behaviour, potentially affecting population dynamics and ecological cascades within the ecosystem. Conflictual wolf-human relationships can also worsen due to the occurrence of wolf-dog hybrids, according to the untested hypothesis that wolf-dog hybrids could be more confident towards humans, being more incline to kill livestock, pets or attack humans themselves.

In absence of reliable knowledge on hybridization and its effect on wolf physiology, behavior and ecology, the general objective of this project is to investigate through a genetic and genomic approach effects in the wolf due to anthropogenic wolf-dog hybridization. The project will be scheduled according to three distinct phases: (i) genetic monitoring, using samples of different nature, for individual identification, hybrid detection and assessment of hybridization rates, both in terms of prevalence (i.e., proportion of introgressed individuals in the population) and level of introgression (i.e., proportion of individual genome of dog origin); (ii) analysis of genes known in dogs to be associated with sociable and confident behaviors towards humans, in order to assess presence of specific domestic variants in the genome of wolves and wolf-dog hybrids; (iii) phenotype-genotype association analyses, to be carried out on wolves, wolf-dog hybrids and domestic dogs, considering specific behavioral traits; this analysis will be carried out in collaboration with the University of Copenhagen.

The first step will include sampling activities conducted in anthropized zones within protected areas of the Central Apennines, based on a network of collaborations with local operators to monitor wolf population dynamics and the phenomenon of hybridization. In particular, activities will include: non-invasive sample collection, through the use of fecal swabs; invasive sample collection, through the use of salivary swabs on domestic dogs sampled in the study area and in specific dog education centers; tissue and blood sample collection from carcasses. A minimum number of 100 non-invasive and 50 invasive samples will be analyzed. DNA will be extracted, amplified and analyzed following a specific protocol developed at the ISPRA Conservation Genetics Unit. Applied genetic markers will be: 12 (for non-invasive samples) or 39 (for invasive samples) autosomal nuclear microsatellite loci and the Amelogenin gene, to define multilocus profiles and gender of individuals; 4 microsatellite loci located on the Y chromosome and a fragment of the control region of the mitochondrial DNA to evaluate introgression traces in uni-parental markers; a dominant deletion of 3 bp (called KB) in CBD103 gene, related to black coat and likely of canine origin. Multilocus genotypes will be analyzed using Bayesian assignment procedures to define the probability of assignment to the reference populations (wolf or dog). Non-invasive genotypes with uncertain assignment probabilities will be checked using a reduced 93 SNP panel, developed for this purpose.

The second step will be conducted on reliable samples from the first step, samples of domestic dogs from specific dog education centers, and samples of wolves and wolf-dog hybrids, previously genotyped at ISPRA in the last 10 years. Five behavioral genes (DRD4, OXTR, COMT, SEZ6L and ARVCF), whose polymorphisms have already been associated in domestic dogs with behavioral phenotypes such as confidence and sociability towards humans, will be analyzed through mini-sequencing techniques. Behavioral phenotypes of domestic dogs in canine education centers will be characterized using ethograms by expert collaborators that will be fundamental as a comparative basis with wolves and wolf-dog hybrids.

The third step will be based on the use of a 170,000 SNP panel (170K SNP) to perform phenotype-genotype associations and identify variants underlying possible correlations between behavioral phenotypes and genomic regions. Associations will be conducted on the dataset used in the second step but excluding non-invasive samples. Genotypes at 170K SNP and polymorphisms analyzed in behavioral genes will be associated with behavioral phenotypes of the selected domestic dogs, previously characterized, to identify differences among wolves, wolf-dog hybrids and domestic dogs. In case of availability of spatial data obtained from radio-tracked animals, associations between wolf and wolf-dog hybrid spatial behavior and genomic data will be performed too.

Starting from the above specified genomic outputs, the PhD candidate will conduct a 6-month research period at NGB Genetics (<https://www.ngbgenetics.com/>), where a reduced and diagnostic SNP panel will be developed, useful for the identification of domestic or wild variants in wolves, wolf-dog hybrids, and domestic dogs. This panel will provide many innovative and practical applications:

- it will allow the rapid identification of potentially confident wild wolves during future monitoring, management and conservation projects;
- it will allow the identification of wild variants in domestic dogs subject to criminal proceedings, subjected to ENCI parentage tests or verification of declared pedigrees;
- it can be used by the personnel of Protected Areas and Public Administrations to resolve critical or ambiguous situations relating to wild and domestic Canids.

In addition, this project will provide information useful to design management measures aimed at preventing stray dog presence and the risk of anthropogenic hybridization with wolves, as well as encouraging practical wolf conservation to ensure its ecological role to sustain biodiversity within ecosystems.

The topics addressed by this project are all suitable for scientific publications in high-impact academic journals. ISPRA and the proposing Department, as well as the University of Copenhagen, are research organizations that have been active for years in the study and conservation of biodiversity. NGB Genetics is specialized in human, veterinary, agri-food and environmental sectors but has also a strong vocation for research by carrying out scientific activities in collaboration with numerous Universities, Research Centers, Italian and international Medical Clinics and participating in various European projects. Among the projects activities, and in addition to scientific publications, pay particular attention will also be paid towards communication and dissemination of results among competent authorities, interests

groups, and the general public; public communication will be ensured by the institutional role of ISPRA and by the press offices of both ISPRA and the University of Rome La Sapienza.