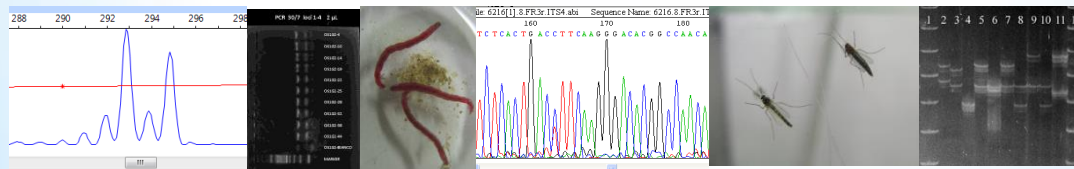


L'ecotossicologia evolutiva come approccio complementare per la stima del rischio: il caso dei PFAS

Fabrizio Stefani

CNR-IRSA Istituto di Ricerca Sulle Acque, Via del Mulino 19, 20861 Brugherio (MB)

E-mail: stefani@irsa.cnr.it



...Biological Diversity or Biodiversity- The variety of life in all its forms, levels and combinations. Includes ecosystem diversity, species diversity, and genetic diversity... (IUCN, UNEP and WWF, 1991).

Gli effetti a livello genetico sono tuttavia non trascurabili (Medina et al., 2007)

Popolazioni

Diversità genetica



Comunità

Diversità specifica

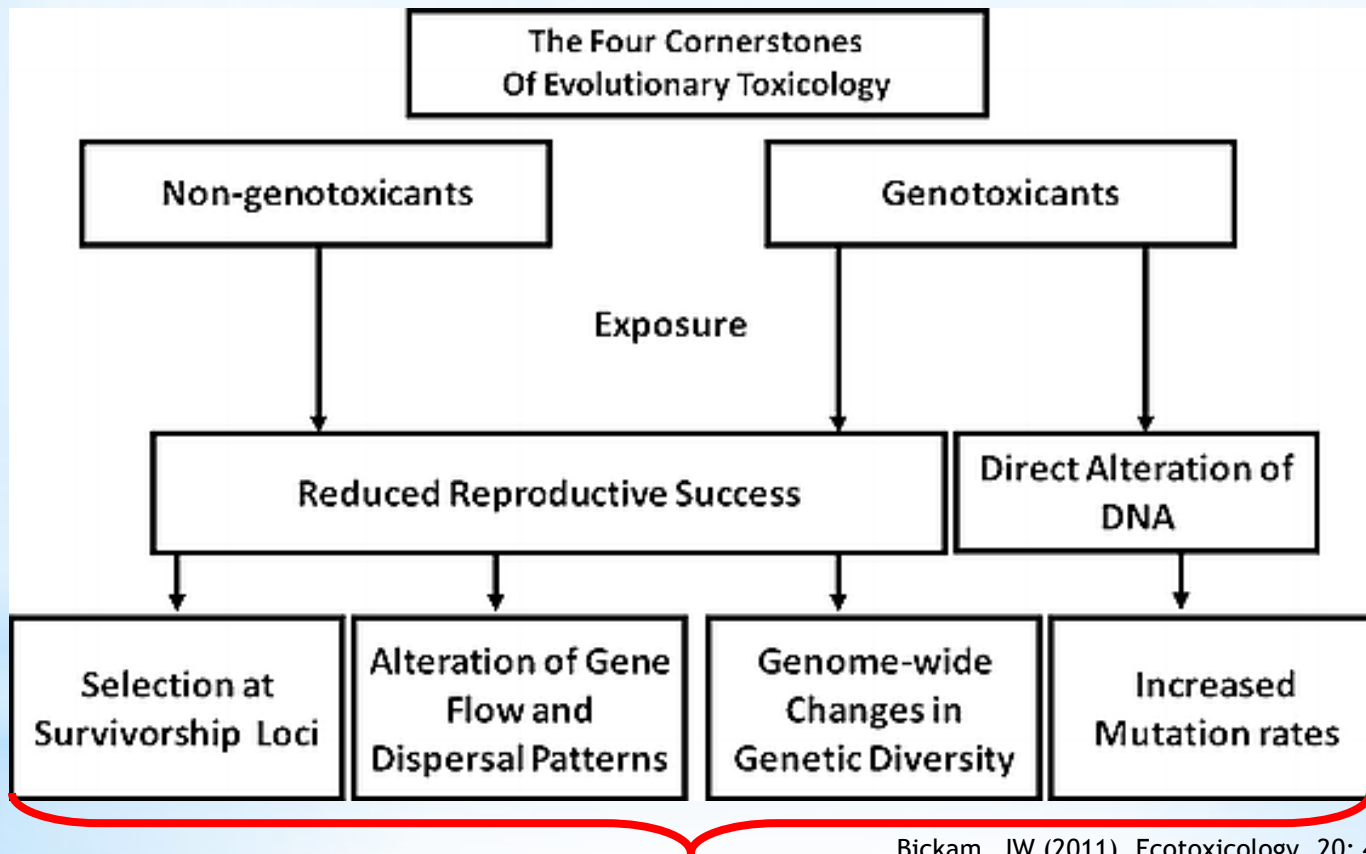


Biomi

Diversità ecosistemica

La stima del rischio ecologico si basa tradizionalmente sugli effetti rilevabili ai livelli superiori di organizzazione biologica

La “Tossicologia Evolutiva” è disciplina ormai consolidata (*Ecotoxicology*, 20, 2011)



Bickam, JW (2011). *Ecotoxicology*, 20: 497-502

Approcci genetici, in grado di evidenziare gli effetti emergenti (ma spesso latenti!) emersi a medio-lungo termine

Ecotoxicology (2011) 20:497–502
DOI 10.1007/s10646-011-0636-y

Ecotoxicology (2011) 20:497–502
DOI 10.1007/s10646-011-0636-y

The four cornerstones of ecotoxicology

Contaminants and Alleles
John W. Bickham



Genetic
An Evaluation

Nico M. van Straa
Vrije Universiteit, L.
De Boelelaan 1085,
1081 HV Amsterdam, The Netherlands
Tel(fax): +31-20-61234567

Available online at www.sciencedirect.com



Chemosphere 67 (2007) 2105–2114

Review

Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress

Matías H. Medina^{a,b,*}, Juan A. Correa^c, Carlos Barata^d

^a CIEN Austral - Centro de Investigación en Nutrición, Tecnología de Alimentos y Sustentabilidad, Universidad Austral de Chile, Campus Puerto Montt, Av. Los Pinos s/n, Balneario Pelluco, Casilla 1327 Puerto Montt, Región de Los Lagos, Chile
^b CIIMAR - Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Laboratório de Ecotoxicologia, Universidade do Porto, Rua dos Bragas 289, 4050-123 Porto, Portugal

^c CASEB - Center for Advanced Studies in Ecology and Biodiversity, Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Alameda 340, 6513677 Santiago, Chile
^d Department of Environmental Chemistry, IIQAB-CSIC, Jordi Girona 18, Barcelona 08034, Spain

Received 16 June 2006; received in revised form 30 November 2006; accepted 8 December 2006
Available online 30 January 2007

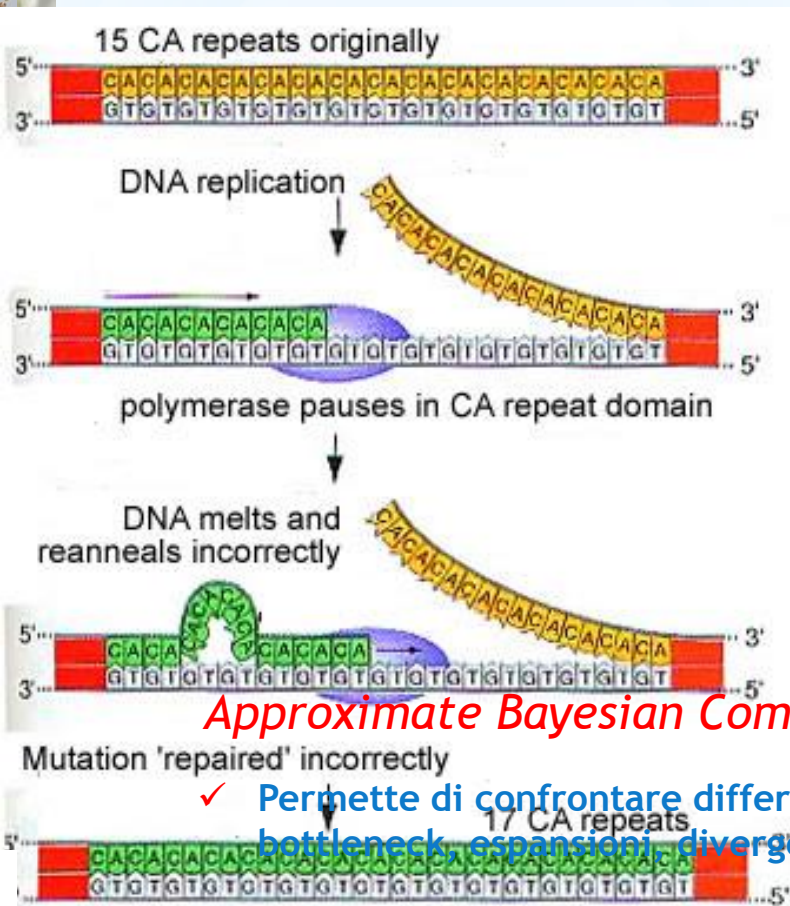
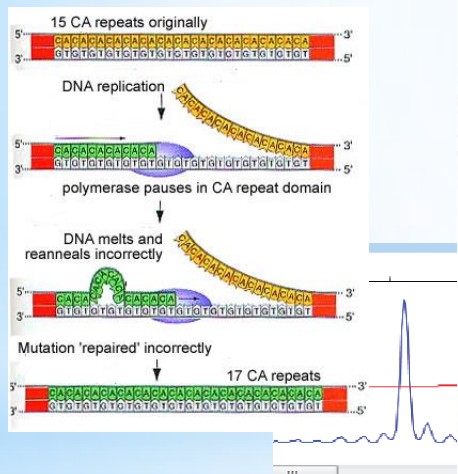
CHEMOSPHERE

www.elsevier.com/locate/chemosphere



Chironomus riparius

- ✓ Organismo test standard in campo ecotossicologico (OECD 218, 219, 233)



rigenerazionale, ha mostrato effetto dei contaminanti (Vogt)

variabili

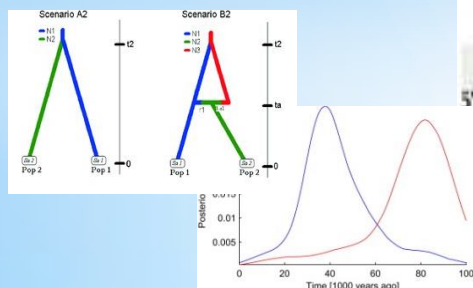
is già impiegati per indagini 2006)

di popolazione piccole, in o, condizioni presenti nel test

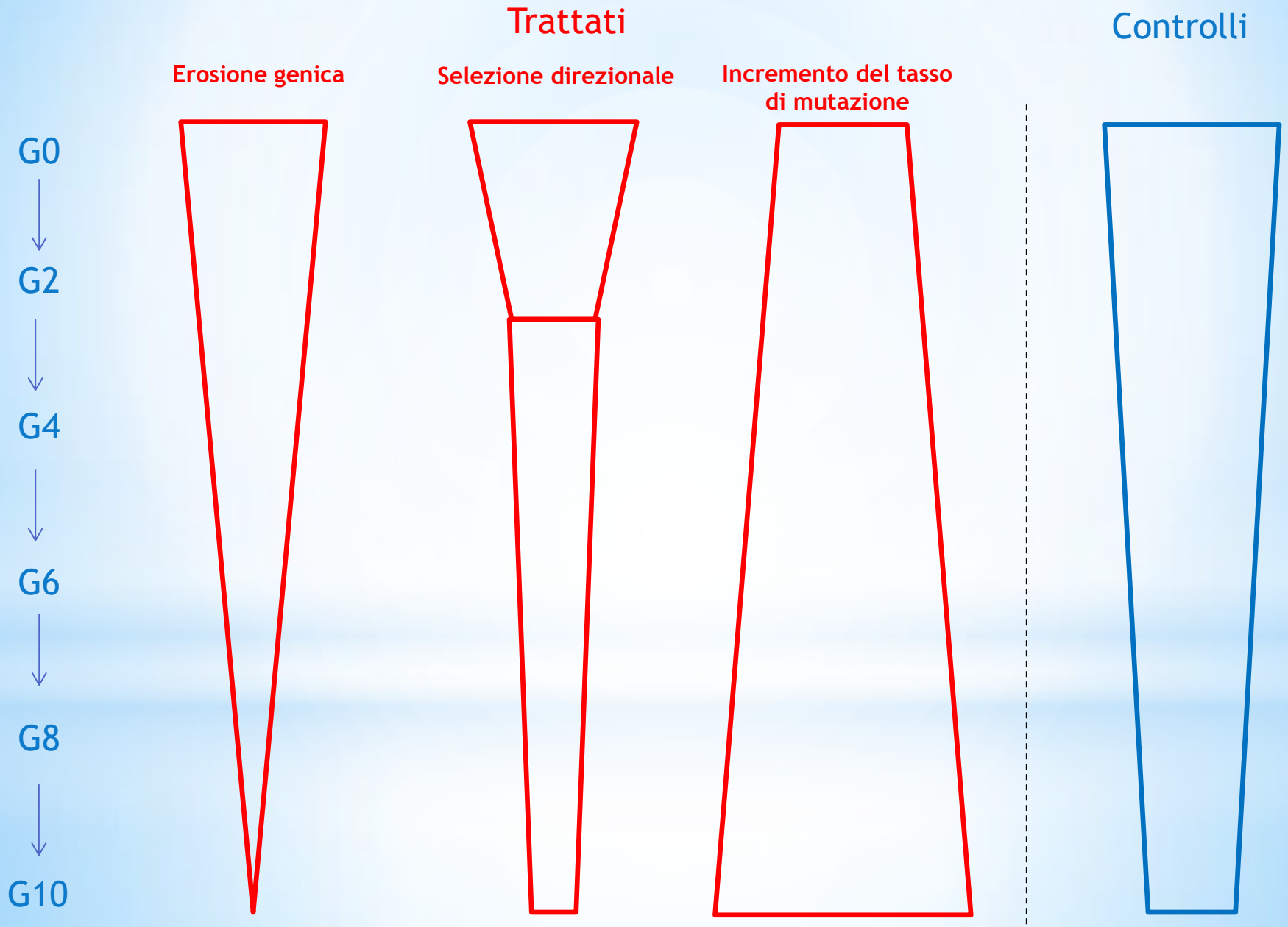
Approximate Bayesian Computation (ABC)

- ✓ Permette di confrontare differenti scenari evolutivi (es. bottleneck, espansioni, divergenze, ecc.)

- ✓ Elevata precisione delle stime dei parametri demografici e genetici, grazie a campionamento seriale nel corso delle generazioni



Variabilità genetica: effetti possibili dei contaminanti



Variabilità genetica della popolazione iniziale (G0)

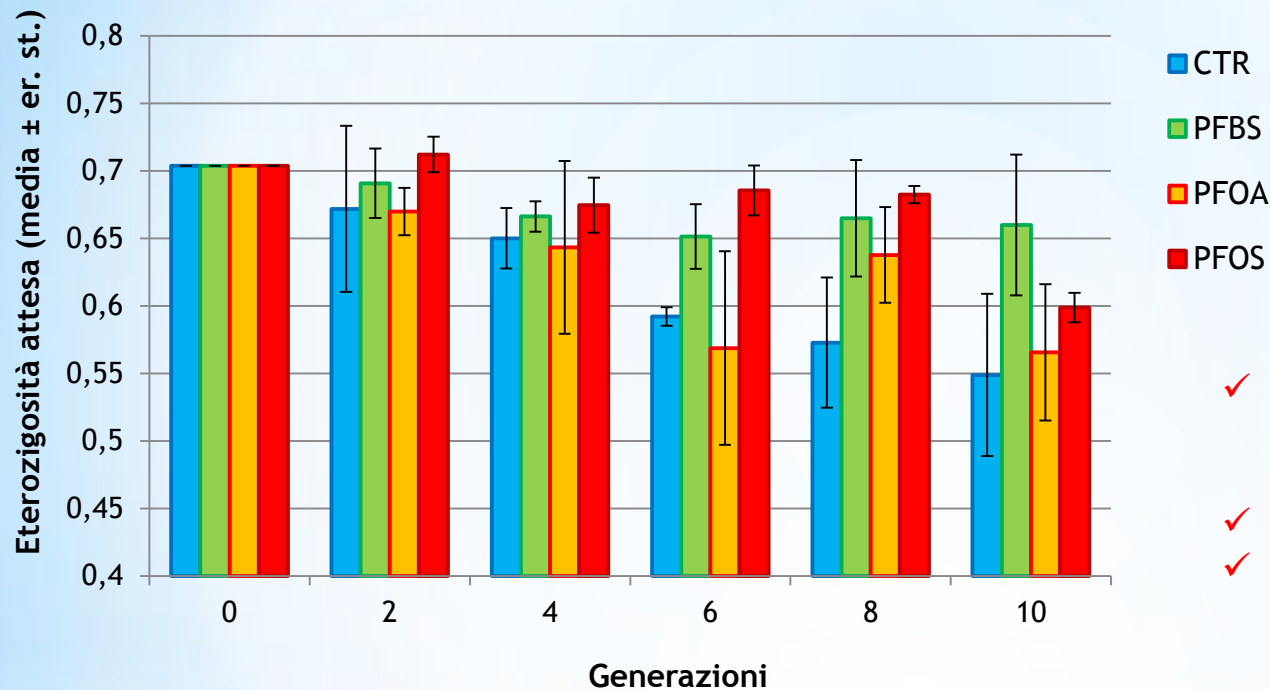
| Locus | T _m (°C) | Motivo | N° alleli | Eterozigosità attesa | Eterozigosità osservata | Range allelico | HW test (p-value) |
|-------|---------------------|----------|-----------|----------------------|-------------------------|----------------|-------------------|
| MSC1 | 63 | CA | 7 | 0.70 | 0.71 | 7 | 0.82 |
| MSC2 | 55 | TAA, T | 9 | 0.82 | 0.82 | 28 | 0.59 |
| MSC3 | 55 | GT, T, T | 5 | 0.73 | 0.71 | 9 | 0.33 |
| MSC4 | 63 | TCA | 3 | 0.42 | 0.35 | 6 | 0.26 |
| MSC5 | 55 | CA, A | 9 | 0.85 | 0.94 | 9 | 0.83 |
| Media | - | - | 6.6 | 0.70 | 0.71 | 11.80 | - |
| d.s. | - | - | 2.1 | 0.17 | 0.22 | 9.15 | - |

- ✓ Assenza di errori di genotyping (alleli nulli,, picchi di stutter, dominanza di alleli corti) verificata tramite Fisher's combined probability test ($p < 0.05$)
- ✓ Assenza di *linkage disequilibrium* fra i 5 loci (Fisher Exact test, $p < 0.05$)
- ✓ Assenza di scostamenti significativi dall'equilibrio di HW ($p < 0.05$)

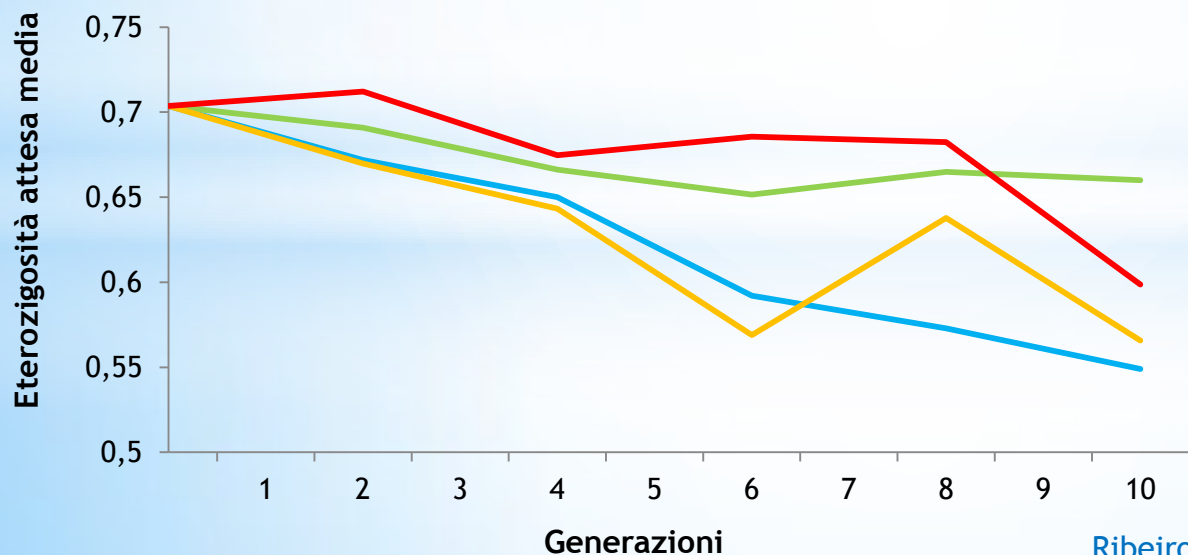



Popolazione panmittica con elevata variabilità genetica

Eterozigosità attesa media



- ✓ Mantenimento della variabilità genetica in PFOS e PFBS
- ✓ Calo costante nel controllo
- ✓ Parametri di *life traits* sostanzialmente peggiori nei trattati rispetto al controllo



- 
- ✓ Incremento del tasso di mutazione (Ribeiro et al, 2013)?
 - ✓ Selezione bilanciata?

Test di scostamento dall'equilibrio di H-W

| | gen. | CT1 | CT2 | BS1 | BS2 | OA1 | OA2 | OS1 | OS2 |
|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| locus 1 | G0 | 0.70 | 0.70 | 0.70 | 0.70 | 0.70 | 0.70 | 0.70 | 0.70 |
| | G2 | 0.66 | 0.72 | 0.68 | 0.71 | 0.74 | 0.76 | 0.83 | 0.68 |
| | G4 | 0.45 | 0.75 | 0.77 | 0.51 | 0.73 | 0.70 | 0.72 | 0.76 |
| | G6 | 0.72 | 0.58 | 0.51 | 0.66 | 0.71 | 0.66 | 0.68 | 0.74 |
| | G8 | 0.69 | 0.54 | 0.75 | 0.68 | 0.64 | 0.76 | 0.79 | 0.74 |
| | G10 | 0.74 | 0.71 | 0.76 | 0.83 | 0.76 | 0.60 | 0.77 | 0.59 |
| locus 2 | | CT1 | CT2 | BS1 | BS2 | OA1 | OA2 | OS1 | OS2 |
| | G0 | 0.82 | 0.82 | 0.82 | 0.82 | 0.82 | 0.82 | 0.82 | 0.82 |
| | G2 | 0.59 | 0.40 | 0.62 | 0.63 | 0.75 | 0.59 | 0.62 | 0.78 |
| | G4 | 0.57 | 0.72 | 0.72 | 0.81 | 0.76 | 0.51 | 0.82 | 0.82 |
| | G6 | 0.52 | 0.52 | 0.63 | 0.52 | 0.68 | 0.46 | 0.74 | 0.58 |
| | G8 | 0.67 | 0.70 | 0.36 | 0.80 | 0.73 | 0.63 | 0.73 | 0.58 |
| G10 | 0.58 | 0.39 | 0.60 | 0.77 | 0.35 | 0.74 | 0.81 | 0.59 | |
| locus 3 | | CT1 | CT2 | BS1 | BS2 | OA1 | OA2 | OS1 | OS2 |
| | G0 | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.73 |
| | G2 | 0.86 | 0.71 | 0.71 | 0.85 | 0.47 | 0.73 | 0.78 | 0.77 |
| | G4 | 0.67 | 0.76 | 0.78 | 0.70 | 0.79 | 0.66 | 0.66 | 0.69 |
| | G6 | 0.75 | 0.62 | 0.71 | 0.68 | 0.82 | 0.36 | 0.62 | 0.66 |
| | G8 | 0.67 | 0.57 | 0.68 | 0.61 | 0.68 | 0.73 | 0.65 | 0.78 |
| G10 | 0.63 | 0.65 | 0.44 | 0.61 | 0.49 | 0.69 | 0.49 | 0.63 | |
| locus 4 | | CT1 | CT2 | BS1 | BS2 | OA1 | OA2 | OS1 | OS2 |
| | G0 | 0.42 | 0.42 | 0.42 | 0.42 | 0.42 | 0.42 | 0.42 | 0.42 |
| | G2 | 0.69 | 0.54 | 0.49 | 0.58 | 0.44 | 0.54 | 0.63 | 0.56 |
| | G4 | 0.63 | 0.36 | 0.31 | 0.42 | 0.41 | 0.28 | 0.36 | 0.49 |
| | G6 | 0.20 | 0.61 | 0.68 | 0.58 | 0.23 | 0.23 | 0.68 | 0.54 |
| | G8 | 0.39 | 0.16 | 0.57 | 0.64 | 0.25 | 0.42 | 0.55 | 0.41 |
| G10 | 0.34 | 0.23 | 0.43 | 0.65 | 0.16 | 0.29 | 0.29 | 0.49 | |
| locus 5 | | CT1 | CT2 | BS1 | BS2 | OA1 | OA2 | OS1 | OS2 |
| | G0 | 0.85 | 0.85 | 0.85 | 0.85 | 0.85 | 0.85 | 0.85 | 0.85 |
| | G2 | 0.87 | 0.69 | 0.83 | 0.82 | 0.86 | 0.81 | 0.64 | 0.84 |
| | G4 | 0.82 | 0.78 | 0.81 | 0.83 | 0.84 | 0.75 | 0.71 | 0.71 |
| | G6 | 0.74 | 0.67 | 0.84 | 0.68 | 0.76 | 0.78 | 0.81 | 0.82 |
| | G8 | 0.68 | 0.65 | 0.75 | 0.80 | 0.72 | 0.83 | 0.72 | 0.87 |
| G10 | 0.75 | 0.47 | 0.82 | 0.71 | 0.81 | 0.76 | 0.58 | 0.75 | |

- ✓ Deficit diffusi nel *locus 2*, con lieve prevalenza nelle popolazioni trattate
- ✓ Assenza di deviazioni significative in G10

- ✓ La distribuzione delle deviazioni significative non evidenzia tuttavia alcuna chiara associazione con l'esposizione agli PFAS



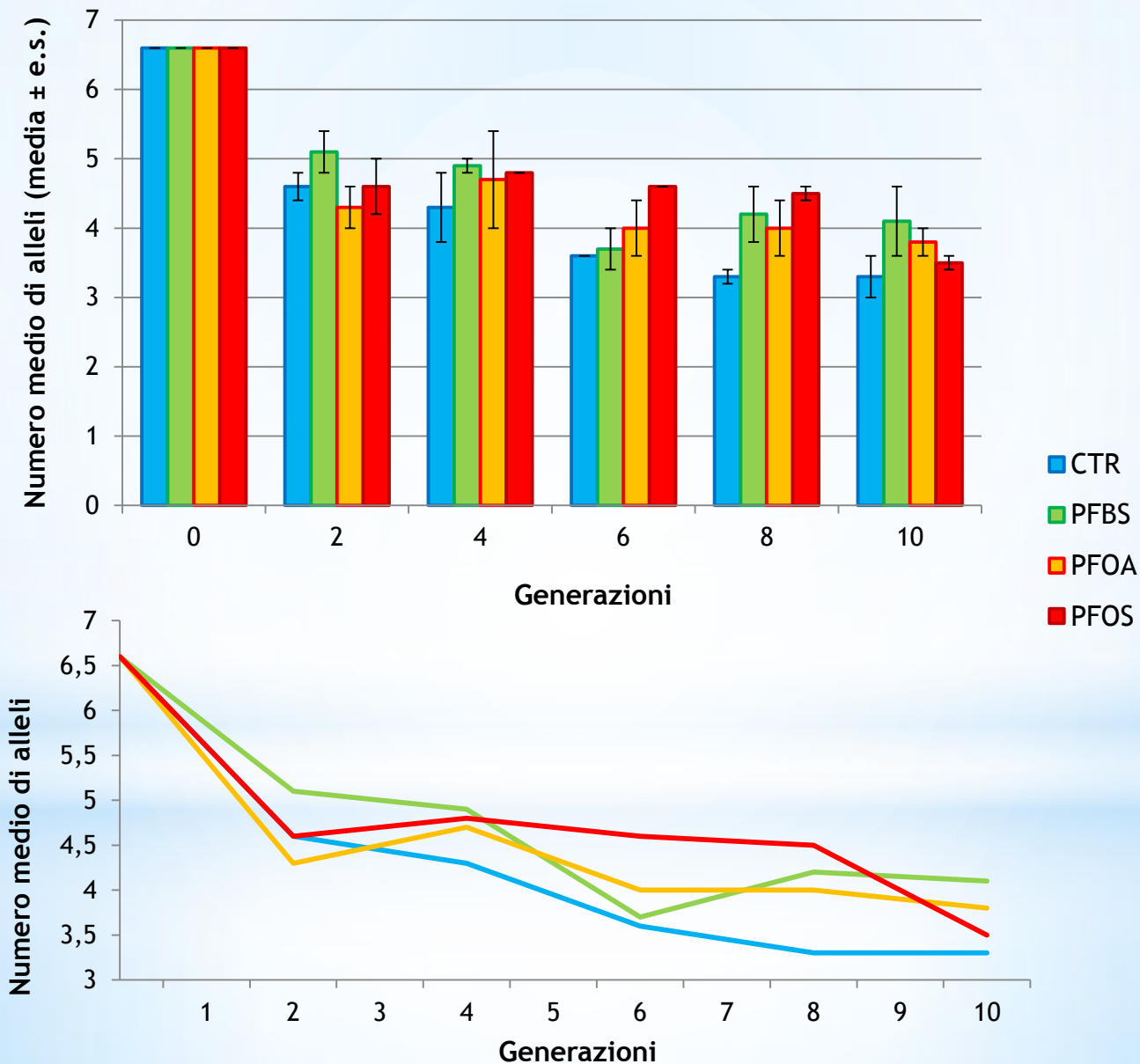
- ✓ Selezione bilanciata non supportata
- ✓ Assenza di effetti locus specifici legati all'esposizione agli PFAS

Deficit di eterozigosi ($p < 0.05$)

Eccesso di eterozigosi ($p < 0.05$)

Numero medio di alleli

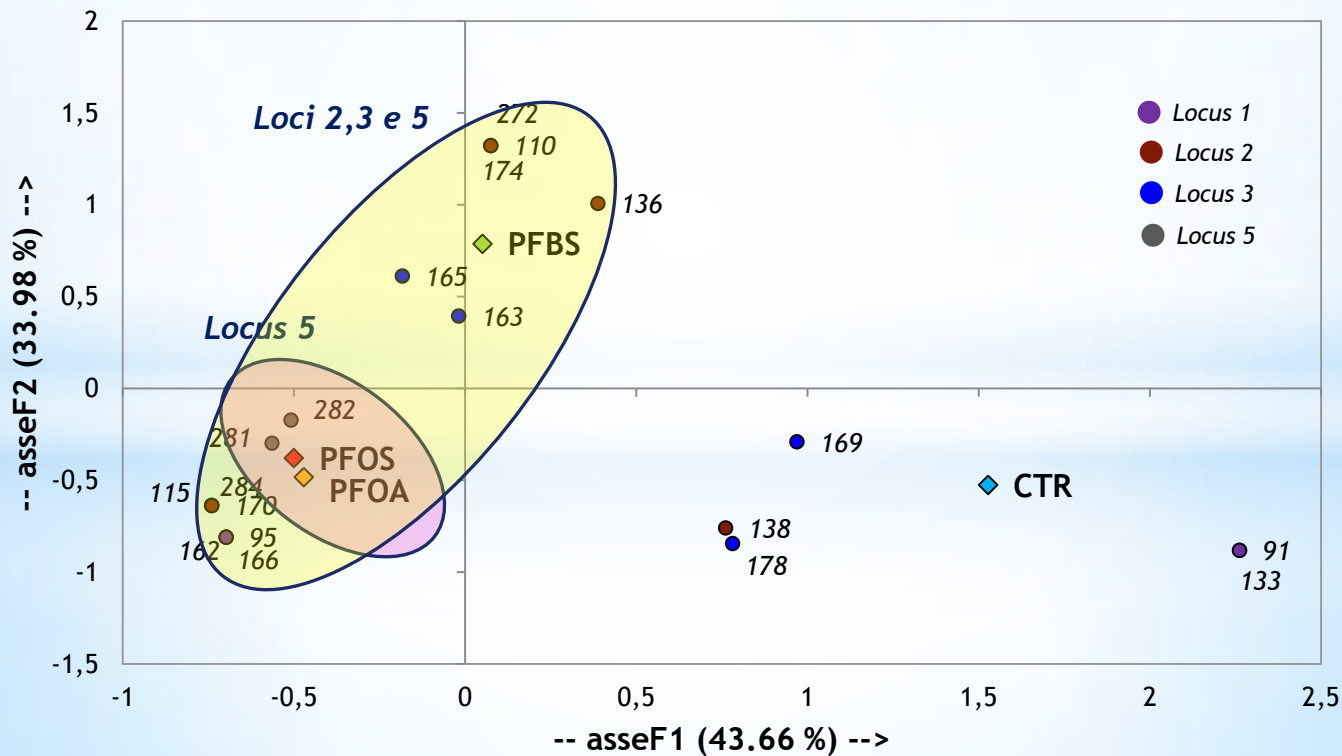
n = 2 repliche per trattamento



✓ Numero complessivo degli alleli privati

| CT1 | CT2 | PFBS1 | PFBS2 | PFOA1 | PFOA2 | PFOS1 | PFOS2 |
|-----|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 3 | 6 | 8 | 9 | 7 | 4 | 6 | 8 |
| 9 | | 17 | | 11 | | 14 | |

✓ Frequenze degli alleli privati nei 5 loci
(analisi fattoriale delle corrispondenze)



| | Locus | prob | log10(PO) | qval | α | Fst |
|---------|-------|-------|-----------|-------|----------|-------|
| Gen. 2 | 1 | 0.367 | -0.237 | 0.335 | -0.355 | 0.089 |
| | 2 | 0.080 | -1.063 | 0.656 | -0.047 | 0.113 |
| | 3 | 0.214 | -0.564 | 0.485 | -0.192 | 0.101 |
| | 4 | 0.094 | -0.982 | 0.590 | -0.069 | 0.111 |
| | 5 | 0.963 | 1.415 | 0.037 | -1.160 | 0.044 |
| Gen. 4 | 1 | 0.242 | -0.495 | 0.257 | -0.204 | 0.108 |
| | 2 | 0.065 | -1.159 | 0.393 | -0.029 | 0.123 |
| | 3 | 0.931 | 1.133 | 0.069 | -1.226 | 0.047 |
| | 4 | 0.910 | 1.003 | 0.080 | -1.396 | 0.043 |
| | 5 | 0.889 | 0.905 | 0.090 | -0.952 | 0.057 |
| Gen. 6 | 1 | 0.810 | 0.630 | 0.190 | -0.904 | 0.098 |
| | 2 | 0.071 | -1.115 | 0.592 | 0.031 | 0.197 |
| | 3 | 0.669 | 0.306 | 0.260 | -0.726 | 0.115 |
| | 4 | 0.056 | -1.230 | 0.663 | -0.016 | 0.190 |
| | 5 | 0.080 | -1.063 | 0.480 | -0.034 | 0.187 |
| Gen. 8 | 1 | 0.090 | -1.007 | 0.887 | -0.049 | 0.196 |
| | 2 | 0.108 | -0.916 | 0.876 | 0.056 | 0.212 |
| | 3 | 0.140 | -0.787 | 0.860 | -0.092 | 0.190 |
| | 4 | 0.047 | -1.305 | 0.912 | 0.006 | 0.203 |
| | 5 | 0.054 | -1.245 | 0.902 | -0.017 | 0.200 |
| Gen. 10 | 1 | 0.610 | 0.194 | 0.390 | -0.547 | 0.165 |
| | 2 | 0.039 | -1.389 | 0.802 | -0.003 | 0.240 |
| | 3 | 0.036 | -1.433 | 0.834 | 0.004 | 0.242 |
| | 4 | 0.099 | -0.959 | 0.646 | 0.063 | 0.253 |
| | 5 | 0.044 | -1.339 | 0.749 | -0.014 | 0.238 |

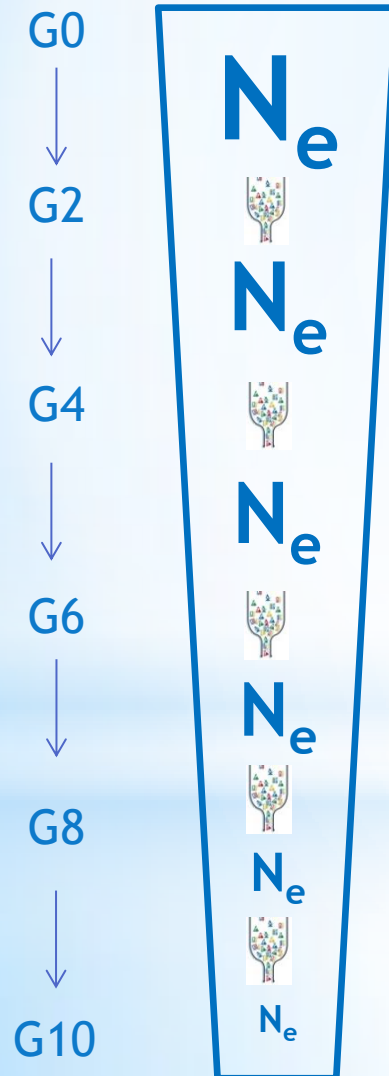
L'indice di divergenza $Fst_{(i,j)}$ è scomposto come combinazione lineare di due parametri a_i e b_j , corrispondenti ad un effetto locus ed ad un effetto popolazione, rispettivamente. Un valore di $\log_{10}(BF)$ di 0.5 è stato usato come soglia di significatività

- ✓ Significatività nelle generazioni 2 e 4 nei *loci* 3, 4 ed in particolare 5, con valori di α negativi ad indicare potenziale selezione bilanciata o negativa.
- ✓ Assenza di un trend temporale persistente
- ✓ Incongruenza con i dati del test di scostamento da H-W, che non indicano eccessi di eterozigotità ripetuti



Potenziati effetti legati all'adattamento alle condizioni del test nelle prime generazioni

3.0×10^6 simulazioni

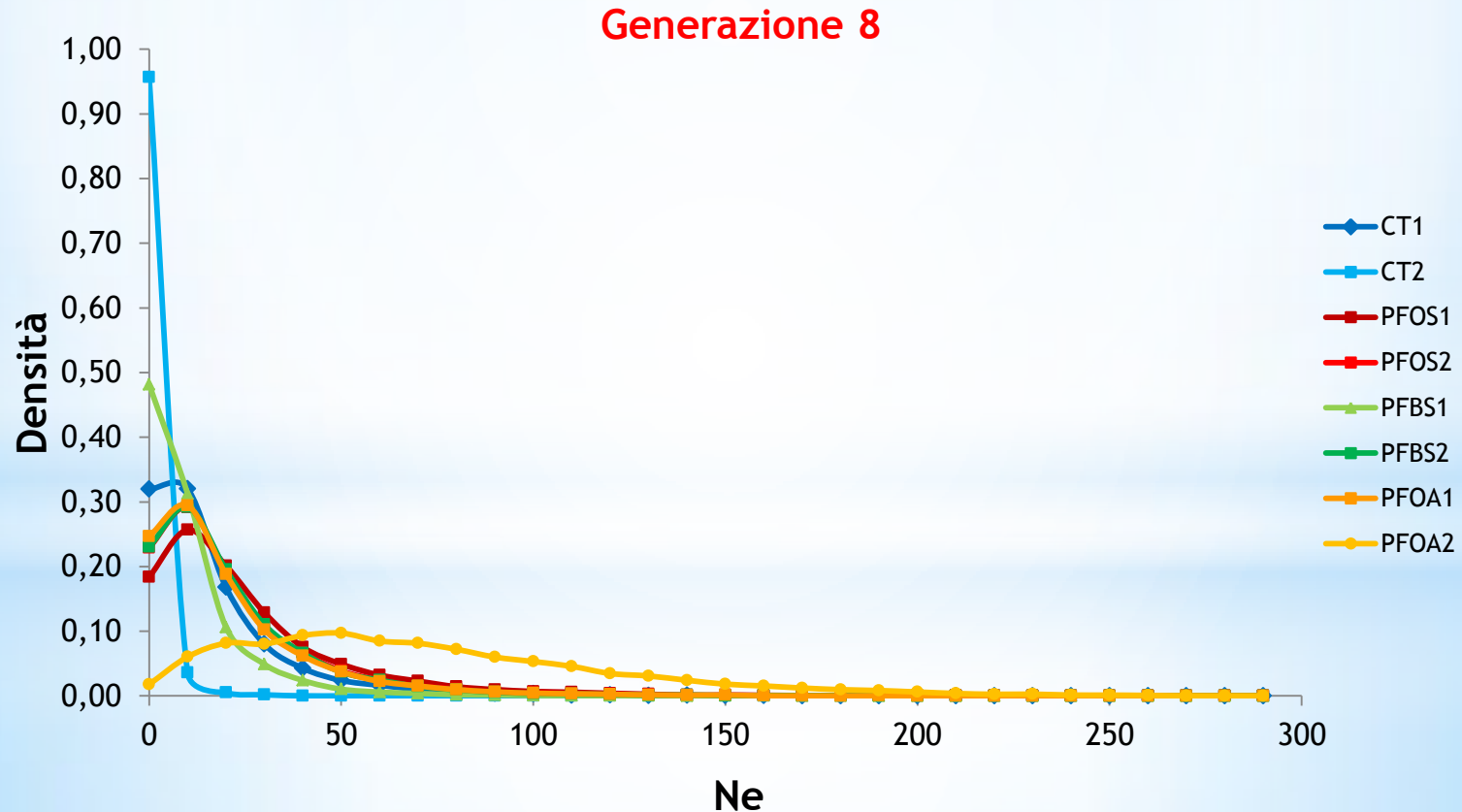


✓ Per tutte le repliche viene sempre indicato come più probabile (*logistic regression*) il modello che prevede ripetuti *bottleneck* durante le generazioni

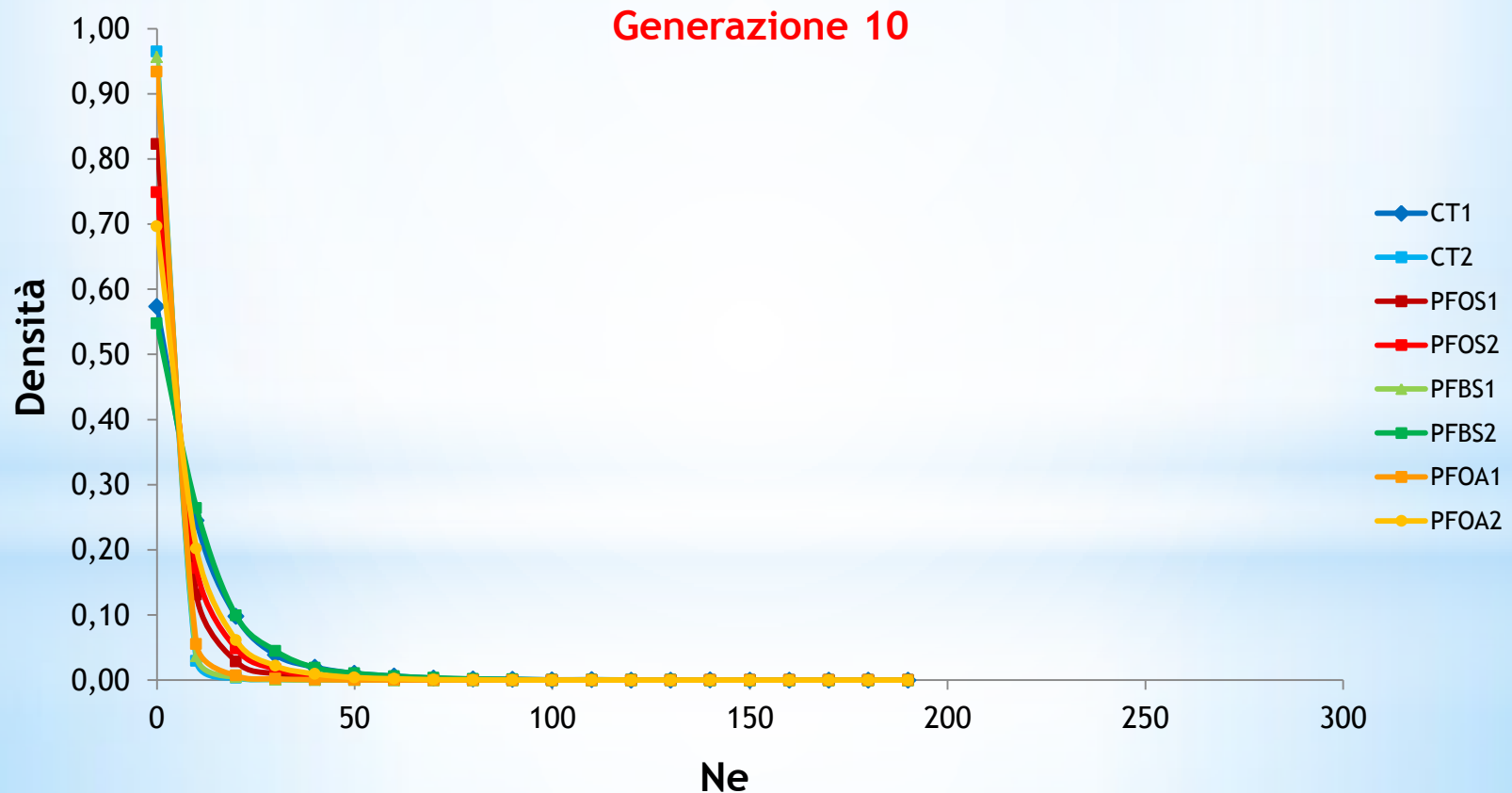


Effetto comune di deriva genica legato alle condizioni del test (es. assenza di flusso genico, numero riproduttori, ecc.)

- ✓ Le distribuzioni di probabilità *a posteriori* del parametro N_e calcolate nelle varie generazioni mostrano delle differenze fra i trattati ed il controllo a partire dalla 6^o generazione



- ✓ Le distribuzioni di probabilità *a posteriori* del parametro N_e calcolate nelle varie generazioni mostrano delle differenze fra i trattati ed il controllo a partire dalla 6^o generazione

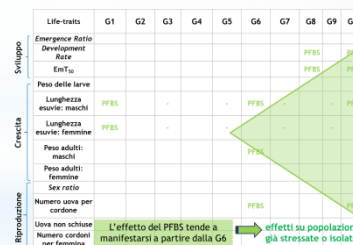
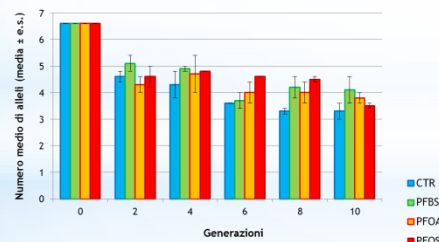


- ✓ Effetto di deriva genica dato dal test visibile fino alla 6° generazione con influenza su entrambe le tipologie di parametri
- ✓ Si conferma la tossicità del PFOS. I dati dei *life traits* suggeriscono un potenziale adattamento agli effetti del PFOS, ma i dati genetici non evidenziano selezione (i microsatelliti sono però neutrali). Viene però indicato un potenziale effetto di incremento del tasso di mutazione



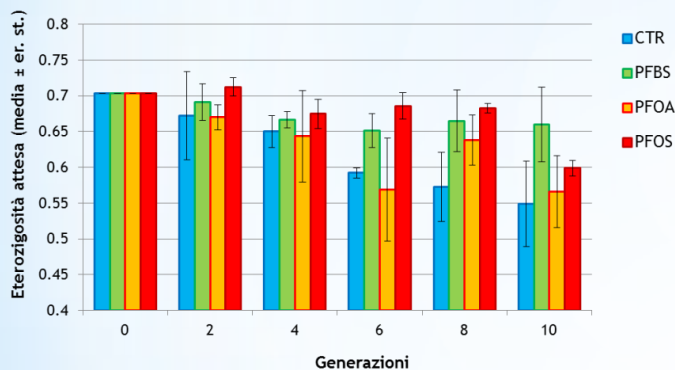
E' in corso un test sulla resistenza acquisita

- ✓ Il PFBS mostra effetti man mano più evidenti nelle generazioni sui *life traits*, ed i dati genetici evidenziano un potenziale incremento del tasso di mutazione con comparsa di nuovi alleli



Mutational load, che determina per deriva genica l'incremento in frequenza di mutazioni leggermente deleterie

- ✓ Il PFOA mostra effetti sui *life traits* sempre presenti nel corso delle generazioni, ma apparentemente effetti meno rilevanti di tipo genetico



| Life-traits | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | G7 | G8 | G9 | G10 |
|----------------------------|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Sviluppo | Emergence Ratio | PFOA | PFOA | | | | | | | PFOA |
| | Development Rate | | | | | | | | | |
| Crescita | EmT ₅₀ | PFOA | | | PFOA | | | | | PFOA |
| | Peso delle larve | | | | | | | | | |
| | Lunghezza esuvie: maschi | PFOA | PFOA | - | | PFOA | - | | - | PFOA |
| | Lunghezza esuvie: femmine | PFOA | | - | PFOA | - | PFOA | - | PFOA | - |
| Riproduzione | Peso adulti: maschi | | | PFOA | | PFOA | PFOA | | | PFOA |
| | Peso adulti: femmine | | | | PFOA | PFOA | PFOA | | | PFOA |
| | Sex ratio | | | | PFOA | | | | | |
| Numero uova per cordone | | | | | | PFOA | | PFOA | | PFOA |
| Uova non schiuse | L'effetto del PFOA si mantiene in tutte le generazioni | | | | | | | | | |
| Numero cordoni per femmina | risposta fisiologica? | | | | | | | | | |

Risposta fisiologica e non adattativa → **Test in corso**

- ✓ Il test multigenerazionale indica una elevata variabilità nelle risposte degli organismi nel corso delle generazioni (specialmente le prime)

Forte influenza delle condizioni d'allevamento nei test a singola generazione (Tassou & Schulz., 2012)

Si ringraziano Federica Rosignoli, Alessio Fumagalli, Marianna Rusconi, Simone Bardine, Emiliano Veronesi per l'aiuto in tutte le fasi del test e durante le attività di laboratorio

Grazie anche a tutti voi!!

