

## Stima dell'introggressione tra linee autoctone di trota marmorata del bacino del fiume Adige e ceppi introdotti di trota fario mediante marcatori molecolari nucleari e mitocondriali

Francesca BARALDI, Fernando LUNELLI & Andrea GANDOLFI\*

Dipartimento Valorizzazione delle Risorse Naturali, Istituto Agrario di S. Michele all'Adige - Fondazione Edmund Mach, Via E. Mach 1, 38100 San Michele all'Adige (TN), Italia

\*E-mail dell'Autore per la corrispondenza: [andrea.gandolfi@iasma.it](mailto:andrea.gandolfi@iasma.it)

---

**RIASSUNTO** - *Stima dell'introggressione tra linee autoctone di trota marmorata del bacino del fiume Adige e ceppi introdotti di trota fario mediante marcatori molecolari nucleari e mitocondriali* - Il bacino dell'Adige, così come quasi tutto l'areale di distribuzione naturale della trota marmorata (*Salmo trutta marmoratus*), è stato nei passati decenni ed è tuttora oggetto di ripetute ed intensive immissioni con ceppi non autoctoni di trota. Al fine di valutare i livelli di introggressione tra linee alloctone ed autoctone, è stato realizzato uno studio di popolazione basato su marcatori microsatellite nucleari e sul locus mitocondriale D-loop sulle popolazioni dell'intero bacino dell'Adige. Oltre 1000 individui sono stati raccolti in 49 siti di campionamento, in natura o in impianti che producono materiale utilizzato nei programmi di ripopolamento. L'analisi genetica ha evidenziato due distinti raggruppamenti di alleli riconducibili alle linee marmorata e fario, indicando alti livelli di introggressione nella maggior parte delle popolazioni analizzate, indipendentemente dalla posizione geografica e dal relativo grado di isolamento. I programmi di ripopolamento massivo con progenie ottenute da pochi riproduttori di marmorata, seppure 'fenotipicamente puri', sono discussi quali probabili significativi fattori causali di introggressione, da una parte, e di impoverimento genetico delle linee native, dall'altra. La necessità immediata di nuove politiche di immissione e monitoraggio è evidenziata al fine di interrompere la perdita irreversibile dei residui pool genetici indigeni.

**SUMMARY** - *Estimation of introgression between wild marble trout of Adige river basin and introduced brown trout stocks using nuclear and mitochondrial DNA markers* - The Adige basin, as well as almost the entire natural distribution area of the marble trout (*Salmo trutta marmoratus*), has been in the past decades and still is intensively affected by repeated stocking with non-native trout strains. In order to evaluate the levels of introgression between allochthonous and autochthonous lineages, a population study based on nuclear microsatellite and mitochondrial D-loop loci was applied across populations along the entire Adige basin. More than 1000 fish were collected from 49 sampling sites, either in the field or in plants producing material for restocking programmes. Admixture analyses revealed two clear groupings of alleles consisting of the marble and fario lineages, indicating high levels of introgression by non-native brown trout in most of the populations analysed, regardless of their geographical position and relative isolation. Massive restocking practices with progenies obtained by a few though 'phenotypically pure' marble spawners are discussed as a likely major cause of introgression, from one hand, and genetic impoverishment of native lineages, from the other. The immediate need for new policies of stocking and monitoring is highlighted to stop the irreversible loss of the remnant indigenous gene pools.

*Parole chiave:* *Salmo trutta marmoratus*, trota marmorata, introggressione, ibridazione, conservazione, Nord Italia

*Key words:* *Salmo trutta marmoratus*, marble trout, introgression, hybridization, conservation, Northern Italy

---

### 1. INTRODUZIONE

Seppure l'esatta collocazione tassonomica della trota marmorata sia ancora oggi dibattuta, essendo considerata da alcuni Autori come semispecie *S. trutta marmoratus*, (Tortonese 1970; Gandolfi *et al.* 1991) e da altri come buona specie *S. marmoratus* (Bianco 1995; Delling 2002), esistono chiare evidenze, di tipo genetico, filogeografico e fenotipico, di come questo *taxon* rappresenti una linea evolutiva indipendente e ben caratterizzata. Da un punto di vista genetico, la marmorata coincide con una delle cinque linee evolutive principali (Atlantica, Danubiana, Mediterranea, Adriatica e Marmorata) distinte sulla base del DNA

mitocondriale (Bernatchez 2001).

Anche da un punto di vista filogeografico la marmorata risulta ben distinguibile rispetto alle altre linee di *S. trutta*, essendo riconducibile ad un areale di distribuzione abbastanza limitato e definito, compreso tra il versante Sud delle Alpi e i sottobacini dell'alto Adriatico (Nord Italia, ex Jugoslavia e Albania) (Fumagalli *et al.* 2002). Tale distribuzione corrisponde al residuo areale originale costituito dagli affluenti di sinistra del fiume Po, inclusi i fiumi che attualmente sfociano nell'Adriatico: lo scioglimento dei ghiacci dopo l'ultima glaciazione ha determinato la separazione di quest'unico bacino ancestrale in diversi bacini separati, provocando probabilmente un isolamento

delle popolazioni e l'interruzione del flusso genico tra esse (Sommani 1960).

La distinzione tra la trota marmorata e le altre linee di *S. trutta* è già evidente sulla base dei soli caratteri cromatici, e comunque ulteriormente apprezzabile sulla base di criteri morfologici, morfometrici e meristici (Delling 2002). Secondo questo Autore, il livello di differenziazione fenotipica della marmorata da *S. trutta* sarebbe addirittura paragonabile a quello rispetto a *S. salar*.

Dal 1996 al 2006, sulla base di due differenti valutazioni successive, l'Unione Internazionale per la Conservazione della Natura e delle Risorse Naturali (IUCN - International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) ha modificato la classificazione dello stato di rischio della trota marmorata da "*Data Deficient*" (DD) a *Least Concern* (LC) (Crivelli 2006). Tale variazione che apparentemente dovrebbe assicurare sullo stato di conservazione del *taxon* è stata determinata in realtà dalla raccolta e pubblicazione di dati relativi a popolazioni quasi esclusivamente slovene. La definizione di 'basso rischio' di estinzione per il *taxon* è dunque forse corretta in riferimento alla sua distribuzione globale o meglio, slovena. Molto più preoccupante è la situazione in Italia, come dimostrato dai pochi studi pubblicati (Meraner *et al.* 2007; 2008) e le numerose indagini effettuate a livello locale da varie Amministrazioni. Sulla base di dati che fanno riferimento a valutazioni nazionali realizzate con i criteri IUCN e ripresi dalla Direttiva Habitat (D'Antoni *et al.* 2003), la trota marmorata viene descritta come endemismo sotto minaccia di estinzione (*Endangered*, EN) (Zerunian 2002).

La trota marmorata è considerata autoctona nel bacino dell'Adige: il principale pericolo evidenziato per la sopravvivenza del *taxon* è rappresentato, come nella maggior parte del suo areale di distribuzione, dalla massiccia e ripetuta immissione di trote fario di allevamento che ne mettono a rischio l'integrità genetica e competono per l'alimentazione e altre risorse. Il fenomeno dell'ibridazione tra la trota fario e la marmorata è stato evidenziato da tempo, e la situazione appare abbastanza compromessa nell'intero bacino dell'Adige. Le Amministrazioni Provinciali di Bolzano, Trento e Verona hanno attuato negli ultimi anni, anche con l'aiuto delle Associazioni dei Pescatori, piani di tutela del *taxon* basati soprattutto sul monitoraggio delle popolazioni presenti e su programmi di ripopolamento massivo. Numerosi sono stati i problemi riscontrati: primo fra tutti, l'utilizzo di pochi esemplari selezionati sulla base della livrea come riproduttori ha portato, da una parte, alla produzione di quantitativi di novellame ritenuti insufficienti, e dall'altra, probabilmente, a favorire fenomeni di introggressione ed impoverimento delle linee native. La determinazione del grado di purezza degli individui, e il conseguente utilizzo degli stessi come riproduttori per la riproduzione e il ripopolamento, è infatti comunemente effettuata esclusivamente su base fenotipica qualitativa. Inoltre, nonostante la continuità naturale e artificiale (mediante traslocazioni) del bacino dell'Adige, non è mai stato proposto un piano di gestione comune a tutte le province interessate, nonostante in ognuna di queste sia stata evidenziata la necessità di nuove politiche che disciplinino le immissioni di trote fario e il ripopolamento in zone idonee di trota marmorata, al fine di interrompere la perdita irreversibile delle attuali popolazioni autoctone relitte.

Nel presente lavoro, l'analisi genetica è stata utiliz-

zata su campioni provenienti dall'intero bacino dell'Adige per valutare sia il livello di introggressione tra le linee marmorata e fario, sia per stimare il grado di diversità tra le eventuali diverse linee di marmorata. Tale approccio potrà rivelarsi utile nella programmazione di un piano di gestione delle popolazioni naturali e di eventuali programmi di allevamento e ripopolamento.

## 2. MATERIALI E METODI

Sono stati campionati 49 siti rappresentativi lungo l'Adige e i suoi affluenti: 10 in provincia di Bolzano, 30 in provincia di Trento e 9 in provincia di Verona. In collaborazione con le province di Bolzano, Trento e Verona e con le Associazioni dei pescatori dilettanti presenti sul territorio, sono stati campionati mediante elettropesca più di 1000 individui (Tab. 1): a ciascuno di essi, dopo opportuna anestesia, e prima del rilascio nell'ambiente, è stato prelevato un frammento di pinna caudale per la successiva analisi genetica. Sulla base di una prima analisi visiva, effettuata in campo ed analoga a quella attualmente utilizzata per la scelta dei riproduttori nelle campagne ittogeniche, gli individui sono stati assegnati in base alla livrea e alle caratteristiche fenotipiche osservate ai gruppi fenotipici marmorata, fario o ibrido.

Al fine di poter utilizzare campioni di riferimento esterni al territorio oggetto di indagine, sono stati inclusi nell'analisi 71 individui provenienti da 4 popolazioni slovene (A. Crivelli, P. Berrebi, L. Fumagalli) e 10 individui provenienti dal Piemonte (F. Nonnis Marzano).

Il DNA totale è stato estratto in laboratorio dal tessuto conservato in etanolo 95% mediante il kit "PURE-GENE DNA purification system" (Gentra System, Inc.). Per ciascun individuo è stata realizzata, secondo il metodo diagnostico proposto da Apostolidis *et al.* (2007), una multiplex-PCR selettiva della regione D-loop del DNA mitocondriale in grado di discriminare polimorfismi di singola base caratteristici delle cinque principali linee evolutive di *S. trutta*, consentendo quindi l'assegnazione di ciascun individuo a una di queste linee. Ogni individuo è stato dunque sottoposto all'analisi di dieci marcatori microsatellite (5 dinucleotidici e 5 tetranucleotidici) (Tab. 2). La reazione di PCR è stata effettuata con un thermal-cycler Geneamp PCR System 9700 (Applied Biosystems) in un volume totale di 12,5 µl contenente 0,2 µl di estratto, 0,1 µM di dNTP, 1X Buffer, 1,5 µM MgCl<sub>2</sub>, 0,02 U/µl Ampli Taq GOLD DNA Polymerase e X mM ciascun *primer* (vedi Tab. 2), utilizzando il seguente profilo termico: 95 °C per 5 min, 35 cicli a 95 °C per 30 sec, X °C (vedi Tab. 2) per 1 min, 72 °C per 30 sec, e infine 72 °C per 7 min. La concentrazione e la temperatura di *annealing* utilizzate per i due *primer*, di cui uno marcato con un fluoroforo (HEX o FAM), di ciascun marcatore sono riportati in Tabella 2. Gli amplificati ottenuti sono stati separati mediante corsa elettroforetica capillare sul sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems), utilizzando il "Genescan 500 ROX Size Standard" (Applied Biosystems) come standard di riferimento per la definizione delle taglie alleliche. I dati ottenuti sono stati letti utilizzando i software Genescan e Genotyper (Applied Biosystems) e corretti manualmente.

Al fine di valutare i livelli di introggressione tra marmorata e fario ed evidenziare una eventuale strutturazione

Tab. 1 - Campioni analizzati: sono indicati la data di campionamento, il sito e il codice dello stesso. Per ciascun sito sono riportati il numero di individui assegnati alle classi fenotipiche marmorata (fM), ibrida (fI) e fario (fF), il totale degli individui analizzati, e il numero di individui assegnati al gruppo genotipico marmorata (gM). \*: campioni forniti da F. Nonnis Marzano; #: campioni forniti da P. Berrebi.  
 Tab. 1 - Samples analysed: sampling dates, sampling sites and codes are reported. For each site, the number of individuals assigned to the marmorata (fM), hybrid (fI) and fario (fF) phenotypic classes, the total number of individuals analysed and the number of individuals assigned to the genotypic marmorata (gM) group are reported. \*: samples courtesy of F. Nonnis Marzano; #: samples courtesy of P. Berrebi.

data	località	fM	fI	fF	Tot	gM	data	località	fM	fI	fF	Tot	gM
10/05/2007	Malles (MAL)	3	24	4	31	4	16/11/2006	Lavis (LAV)	4	7	2	13	8
10/05/2007	Coldrano (COL)	4	9	4	17	3	07/03/2006	S. Lorenzo (LOR)	1	0	4	5	1
07/05/2007	Rifiano (RIF)	11	14	7	32	5	26/06/2007	Fersina Corona (FeC)	0	5	11	16	0
07/05/2007	Terlano (TER)	8	5	1	14	2	26/06/2007	Ponte Alto (PoA)	5	26	10	41	24
15/05/2007	Gais (GAI)	2	14	7	23	3	07/03/2006	Matterello (MAT)	1	2	3	6	2
15/05/2007	Vandoies (VAN)	2	10	5	17	3	09/03/2006	Villa Lagarina (VLA)	4	7	2	13	6
09/05/2007	Vipiteno (VIP)	4	19	5	28	2	11/06/2007	Trambileno (LET)	0	19	5	24	13
09/05/2007	Bressanone (BRE)	4	10	5	19	4	23/11/2006	Leno Rovereto (LER)	6	28	1	35	22
09/05/2007	Campodazzo (CAM)	3	27	5	35	6	13/12/2007	Rovereto (ROV)	43	0	0	43	35
07/05/2007	Egna (EGN)	8	14	0	22	4	15/03/2006	Leno basso (LEB)	1	21	6	28	13
07/03/2006	Cacciatore (CAC)	2	0	5	7	2	17/03/2006	Adige Rov. APDV (APD)	8	11	5	24	16
29/11/2006	IASMA (IAS)	10	0	0	10	3	17/03/2006	Serravalle (SER)	3	9	7	19	6
22/03/2006	Vermigliana bassa (VER)	0	3	8	11	1	15/03/2006	Ponte del Vo (PdV)	6	10	8	24	9
22/03/2006	Commezadura (COM)	2	8	7	17	2	22/11/2006	Brentino Belluno (BBE)	10	9	3	22	6
23/03/2006	Pracorno (PRA)	4	26	2	32	18	21/03/2007	Muroloongo (MUR)	0	11	0	11	8
23/03/2006	Cavizzana (CAV)	4	8	7	19	5	21/03/2007	Ossenigo (OSS)	2	18	0	20	18
30/10/2006	Cavizzana impianto (CA)	16	0	0	16	12	22/11/2006	Rio Molino (RMO)	11	14	3	28	19
09/11/2006	Pescara (PES)	5	21	1	27	12	22/03/2007	Ceraino (CER)	0	3	6	9	0
09/11/2006	Novella (NOV)	0	2	8	10	0	22/03/2007	Volargne (VOL)	0	0	8	8	0
11/06/2007	Tassullo (TAS)	1	5	8	14	5	30/09/2006	Op. presa AgroVR (OpA)	2	2	8	12	1
11/06/2007	Denno (DEN)	5	10	4	19	12	02/10/2006	Sava (SAV)	20	6	7	33	10
18/05/2006	Mezzocorona (MEZ)	26	11	4	41	23	03/10/2006	Milani (MIL)	0	3	5	8	1
09/08/2006	Zambana (ZAM)	8	10	5	23	14	*	Piemonte (PDM)	5	4	0	9	5
15/11/2006	Predazzo (PRE)	9	1	0	10	8	#	Zakojska (ZAK)	9	0	0	9	9
13/11/2006	Cavalese (CAL)	3	0	8	11	3	#	Zadlascica (ZAD)	20	0	0	20	20
18/06/2007	Masi di Val Florianiana (MdV)	8	21	5	34	15	#	Studenc (STU)	11	0	0	11	10
18/06/2007	Piazzo Prà (PiP)	2	26	2	30	22	#	Lipovscek (LIP)	17	0	0	17	15

Tab. 2 - Sommario dei loci microsatellite utilizzati in questo studio e delle loro specifiche condizioni di utilizzo: temperatura di annealing e concentrazione dei primer.

Tab. 2 - Summary of the microsatellite loci analysed in this study and of their specific reaction conditions: annealing temperature and primers concentration.

Marcatore	Ref.	Primer (da 5' a 3')	T °C	Conc. (mM)	Fluorocromo	Motivo ripetizione
BFRO002	Snoj et al. 2000	ATGTTTTGACTGCACTATGTATTG GGAGATAAGAGTCAACGAGGC	60	0,6 0,3	HEX	(GT) <sub>n</sub>
BFRO003	Snoj et al. 2000	GTGAATGTGTAATAACAAAAACGG GTTTGAATGAGCCCATCTGC	60	0,6 0,3	FAM	(TG) <sub>n</sub> (GT) <sub>m</sub>
SSA197	O'Really 1996	GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG TGGCAGGGATTTGACATAAC	55	0,8 0,8	HEX	(GT) <sub>n</sub> C(TG) <sub>m</sub> TC (TG) <sub>o</sub> A(GTGA) <sub>p</sub>
T3-13	Estoup et al. 1998	CCAGTTAGGGTTCAATTGTCC CGTTACACCTCTCAACAGATG	54	0,8 0,8	FAM	(TG) <sub>n</sub> CG(TG) <sub>m</sub>
SSA408	Cairney et al. 2000	AATGGATTACGGGTACGTTAGACA CTCTTGTCAGGTTCTTCATCTGT	57	0,5 0,5	HEX	(GACA) <sub>n</sub>
SSA410	Cairney et al. 2000	GGAAAATAATCAATGCTGCTGGTT CTACAATCTGGACTATCTTCTCA	57	0,5 0,5	HEX	(GACA) <sub>n</sub>
OMM1064	Rexroad et al. 2002	AGAATGCTACTGGTGGCTGTATTGTGA TCTGAAAGACAGGTGGATGGTTCC	57	0,5 0,5	HEX	(GATA) <sub>n</sub>
SsaD71	King et al. 2005	AACGTGAAACATAAATCGATGG TTAAGAATGGTTGCCATGAG	57	0,8 0,8	HEX	(TAGA) <sub>n</sub>
MST85	Presa & Guyomard 1996	GGAAAATCAATACTAACAA GGAAGGAAGGGAGAAAGGT	55	0,8 0,8	FAM	(CT) <sub>n</sub>
Sfo1	Angers et al. 1995.	ACCATAACCCCCACCAC GTCCCTCCGTGGCAGATT	65	0,8 0,8	HEX	(CT) <sub>n</sub>

entro la linea marmorata, è stata effettuata un'analisi di *clustering* bayesiano, in due fasi successive, utilizzando il programma STRUCTURE (v. 2.2) (Pritchard *et al.* 2000). Il programma, utilizzando un approccio bayesiano basato su simulazioni di tipo Markov chain Monte Carlo (MCMC) è in grado di ripartire gli individui di un campione in gruppi, offrendo inoltre la possibilità di stimare il numero di gruppi più probabile e la probabilità di ogni singolo individuo di appartenere a ciascuno di questi. In una prima fase, è stato stimato il numero di raggruppamenti (K) più probabile, utilizzando l'informazione genetica relativa a tutti gli individui analizzati con marcatori microsatellite. Il valore K più probabile è stato stimato secondo il metodo suggerito da Evanno *et al.* (2005), utilizzando 20 iterazioni per ciascun K testato, con valori di K da 1 a 10, *Burning Period* di 10.000 e Numero di repliche MCMC di 100.000, secondo il modello 'Admixture' (ipotizzando quindi la probabile esistenza di fenomeni di introgressione). Per ogni individuo è stato quindi calcolato il coefficiente di introgressione (q), calcolato come valore medio dei singoli valori ottenuti per ciascuna delle 20 ripetizioni, utilizzando il software CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg 2007).

Al fine di individuare una possibile strutturazione all'interno della linea marmorata, l'analisi è stata infine ripetuta, utilizzando le stesse impostazioni, ma limitatamente agli individui ritenuti, sulla base della precedente analisi, appartenenti alla linea marmorata con valori di q > 0,95 (ossia con probabilità superiore al 95% di essere puri, ovvero con valori di introgressione inferiori al 5%).

### 3. RISULTATI

Dei 1136 individui analizzati, 59 sono stati esclusi poiché presentavano dati mancanti per più di tre marcatori microsatellite o poiché mostravano, per uno o più marcatori, pattern riconducibili a poliploidia (più di due alleli per marcatore).

I 1077 individui considerati per le analisi dei dati, sono stati suddivisi sulla base della prima classificazione visiva in 343 soggetti appartenenti al gruppo fenotipico marmorata (*fM*), 221 riferibili al gruppo fario (*fF*) e 513 al gruppo ibrido (*fI*).

L'analisi del D-loop mitocondriale ha permesso di

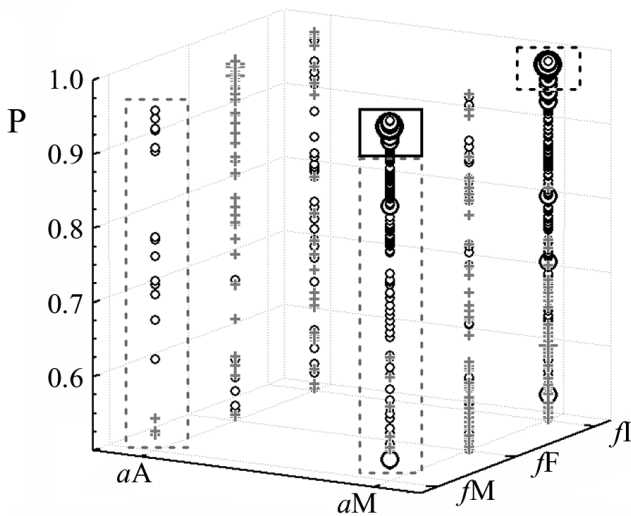


Fig. 1 - Probabilità (P) di ciascun individuo di appartenere al gruppo genotipico marmorata (gM) (cerchio nero) o fario (gF) (croce grigia), in rapporto all'appartenenza al gruppo fenotipico marmorata (fM), fario (fF) o ibrido (fI) e al gruppo aplotipico marmorata (aM) o atlantico (aA). Solo la probabilità maggiore ( $P > 0,5$ ) è mostrata per ciascun individuo. La dimensione dei simboli utilizzati è proporzionale al numero di individui con un particolare valore di probabilità. Il box nero con linea continua include le marmorate pure correttamente identificate come tali su base fenotipica; il box nero tratteggiato include le marmorate pure erroneamente classificate come ibridi su base fenotipica; i box grigi tratteggiati includono gli individui geneticamente ibridi, erroneamente classificati come marmorate pure su base fenotipica.

Fig. 1 - Probability (P) for each individual to belong to either the marble (gM) (black circle) or the fario (gF) genotypic group (gray cross), in relation to its belonging to the marble (fM), the fario (fF) or the hybrid (fI) phenotypic group and to either the marble (aM) or the atlantic (aA) haplotypic group. Only the highest probability ( $P > 0,5$ ) is shown for each individual. The size of the symbols is proportional to the number of individuals with a particular probability value. The black box includes the pure marble individuals correctly identified according to phenotype analysis; the black dotted box includes the pure marble individuals erroneously identified as hybrids according to phenotype analysis; the gray dotted boxes include the genetically hybrid individuals erroneously identified as pure marble ones according to phenotype analysis.

assegnare 842 individui al gruppo aplotipico Marmoratus (aM) e 191 a quello Atlantico (aA); nessun individuo è risultato appartenere ai gruppi mitocondriali Mediterraneo, Adriatico e Danubiano mentre per 44 individui non è stato possibile determinare il gruppo di appartenenza.

Il numero di raggruppamenti più probabile a cui i 1077 individui analizzati possono essere assegnati secondo l'approccio di *clustering* bayesiano sulla base dei dati microsatellite è risultato essere pari a due. Senza quindi utilizzare l'informazione a priori di appartenenza a un gruppo aplotipico o fenotipico e di provenienza da uno specifico sito di campionamento, ogni individuo è stato assegnato con probabilità q a uno dei due *cluster*, riferibili così come inizialmente atteso, e confermato dai risultati dell'analisi del marcatore mitocondriale a gruppi genotipici marmorata (gM) e fario (gF). Il confronto dei dati genotipici con quelli

aplotipici e fenotipici (Fig. 1) evidenzia alcune nette discrepanze nell'assegnazione su base genetica o fenotipica al gruppo marmorata. Numerosi individui che risultano essere con probabilità significativa marmorate geneticamente pure, con un valore  $q = P(gM) > 0,95$  e aplotipo mitocondriale Marmoratus (aM), sono assegnate al gruppo fenotipico degli ibridi (fI). Al contrario, un consistente numero di individui ibridi da un punto di vista genetico, con  $q = P(gM) < 0,95$  e/o aplotipo Atlantico (aA), sono stati valutati come marmorate pure all'analisi del fenotipo.

Il numero più probabile di *cluster* a cui i 470 individui con  $P(gM) > 0,95$  possono essere assegnati è risultato essere pari a tre. Il primo *cluster* di genotipi (gMa) è risultato essere costituito da tutti gli individui provenienti dalle quattro popolazioni di origine slovena (N= 54), riferibili a questo gruppo con probabilità  $P(gMa)$  comprese tra 0,89 e 0,99. Due soli individui di origine italiana, provenienti dalle stazioni di campionamento di Sette Querce (Terlano) (TER) e Sava (SAV) hanno elevate probabilità di appartenenza a questo gruppo, con  $P(gMa)$  di 0,95 e di 0,84 rispettivamente.

Un secondo *cluster* (gMb) è costituito da almeno 160 individui provenienti dal bacino dell'Adige con  $P(gMb) > 0,80$ .

Il terzo *cluster* (gMc) è costituito da almeno 149 individui provenienti dal bacino dell'Adige con  $P(gMb) > 0,80$ .

I rimanenti 105 individui presentano valori di probabilità di appartenenza a uno dei tre ceppi mai superiori a 0,80 e sono quindi interpretabili come probabili incroci tra i diversi ceppi, con una prevalenza di incroci tra gMb e gMc. Solamente 21 individui (provenienti da CAC LEB MEZ LER LET (TN) e da EGN RIF BRE VIP MAL COL VAN GAI (BZ)) mostrano probabilità  $P(gMa)$  comprese tra 0,20 e 0,67, e sono quindi interpretabili come potenziali incroci tra il ceppo gMa e uno degli altri due ceppi gMb (7 individui con  $P(gMb)$  tra 0,28 e 0,67) gMc (14 individui con  $P(gMc)$  tra 0,51 e 0,58). I campioni originari del Piemonte mostrano una più alta probabilità di appartenenza a  $P(gMb)$ , con probabilità  $P(gMb)$  tuttavia comprese tra 0,54 e 0,80, evidenziando dunque significativi livelli di incrocio con altri gruppi, con  $P(gMa)$  tra 0,16 e 0,30 e con  $P(gMc)$  tra 0,03 e 0,13.

I siti di campionamento che presentano una prevalenza di individui appartenenti a gMb sono localizzati nell'alto Trentino mentre quelli caratterizzati dalla presenza di individui prevalentemente appartenenti a gMc sono situati nel basso Trentino e nel Veronese; in tutta la provincia di Bolzano, così come in alcuni siti di campionamento lungo tutta l'asta dell'Adige prevalgono individui originati dall'incrocio tra gMb e gMc (Fig. 2).

#### 4. DISCUSSIONE

Degli oltre 1000 individui presi in considerazione nel presente studio, 440 risultano essere marmorate geneticamente pure, ovvero appartenenti al gruppo aM e con una probabilità di appartenere al gruppo gM superiore al 95% e pertanto significativa. Altri nove individui hanno presentato  $P(gM) > 0,95$ , tuttavia devono essere considerati ibridi poiché appartenenti al gruppo aA. Tale apparente discordanza tra il dato genotipico e quello aplotipico è spiegabile come effetto di almeno due fattori: l'introggressione di caratteri dovuta ad un vecchio evento di ibridazione ed il limitato

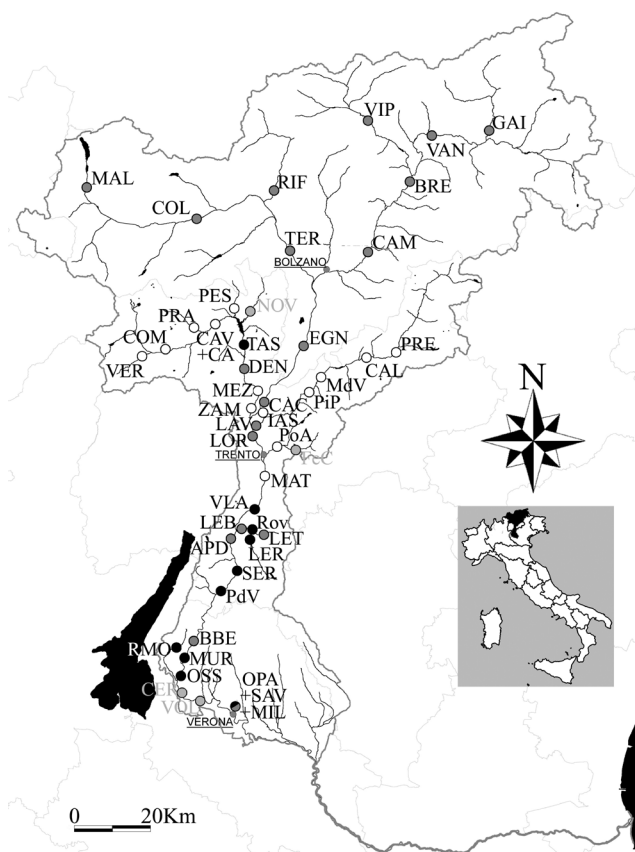


Fig. 2 - Distribuzione dei siti di campionamento nell'area di studio e prevalenza di marmorate pure appartenenti ai due diversi ceppi rilevati nel bacino dell'Adige (cerchi bianchi e neri) o di una mescolanza dei due ceppi (cerchi grigio scuro). I cerchi (e i codici) in grigio chiaro indicano i siti in cui nessuna marmorata pura è stata rinvenuta.

Fig. 2 - Sampling sites distribution in the study area and prevalence of pure marmorata individuals belonging to one of the two marmorata strains observed in the Adige basin (black and white circles) or made up of a mix of the two (dark gray circles). The light gray circles (and codes) indicate the sites where no pure marble trout was found.

potere discriminante dell'analisi genetica dovuta al numero contenuto di marcatori nucleari utilizzato. Mentre la quantità di alleli introgressi nel genoma può infatti diminuire nel tempo per effetto di reincontro, in generazioni successive, con individui puri, ciò non può accadere con l'aplotipo, che verrà trasmesso tal quale nelle progenie per via materna e continuerà quindi ad essere eventualmente di origine 'alloctona'. È ovvio che anche nel DNA nucleare il segnale del passato evento di ibridazione continuerà in realtà ad essere percepibile ma solo utilizzando un numero via via maggiore di marcatori, in grado di individuare minime percentuali di alleli 'alloctoni'. La presenza di questi nove individui con genotipo marmorata ma aplotipo Atlantico evidenzia dunque come il fenomeno dell'ibridazione tra marmorata e fario non sia certamente un fenomeno particolarmente recente sul territorio oggetto di studio.

Dei 440 individui che possiamo considerare marmorate pure sulla base dell'informazione genetica mitocondriale e nucleare, meno della metà, ovvero solo 215, sono state

riconosciute come tali mediante il metodo di riconoscimento fenotipico comunemente usato per la selezione dei riproduttori. Le rimanenti marmorate geneticamente pure sono state assegnate su base fenotipica ai gruppi *fF* ( $N=6$ ) e *fI* ( $N=219$ ). Oltre la metà quindi delle marmorate pure sarebbe stata scartata in un processo di selezione di riproduttori effettuata secondo i criteri attualmente utilizzati nel corso delle campagne di ripopolamento. Ciò può comportare una perdita di diversità genetica naturale della trota marmorata ad ogni ciclo di riproduzione artificiale, e un conseguente calo esponenziale in generazioni successive, ingenerando probabili fenomeni di depressione da inincrocio o comunque, in generale, determinando una riduzione del potenziale adattativo.

Duecento individui considerati marmorate pure all'analisi del fenotipo si sono invece rivelati come probabili ibridi all'analisi genetica. In questo caso, l'inclusione di tali individui nei programmi di riproduzione artificiale e ripopolamento, comporterebbe l'introggressione di alleli alloctoni nella trota marmorata. È addirittura possibile ipotizzare che, a causa di un'errata assegnazione di ibridi al gruppo marmorata puro, sia proprio la pratica di riproduzione artificiale più che la riproduzione in ambiente naturale ad accrescere il fenomeno dell'ibridazione.

Sulla base dei dati microsatellite relativi alle marmorate geneticamente pure è stato possibile evidenziare che due ceppi di marmorata, potenzialmente autoctoni, sono presenti nel bacino dell'Adige: un ceppo quasi esclusivamente distribuito nei sottobacini del Noce, dell'Avisio e del Fersina, i principali affluenti dell'Adige in territorio Trentino; un secondo ceppo distribuito prevalentemente lungo l'Adige stesso, ma solo nel suo tratto inferiore, dal basso Trentino al Veronese. Le rimanenti stazioni di campionamento sono caratterizzate dalla presenza di individui che presentano caratteristiche intermedie tra i due ceppi, e quindi probabilmente originate dalla mescolanza degli stessi. In particolare ciò è evidente su tutto il territorio di Bolzano, dove è minore il numero di individui risultati puri e dove questi stessi presentano appunto genotipi misti dei due ceppi.

L'interpretazione più semplice per spiegare la similarità degli individui del ceppo distribuito nel basso corso dell'Adige con gli individui di riferimento provenienti dal Piemonte è quella di considerare la possibilità che gli stessi campioni piemontesi abbiano in realtà origine trentina. Questa ipotesi rimane da dimostrare, ma sarebbe comunque in accordo con i numerosi dati storici di vendita e traslocazione di materiale ittico dal Trentino-Alto Adige ad altre regioni del Nord Italia. In tutti i casi, un'attenta ricostruzione degli eventi di traslocazione di trota marmorata entro il bacino dell'Adige e tra i sottobacini dei suoi affluenti potrà certamente contribuire a meglio interpretare e comprendere le evidenze risultanti dall'indagine genetica.

Infine, è opportuno *evidenziare* come l'analisi del DNA mitocondriale non abbia evidenziato la presenza di aplotipi appartenenti al gruppo mediterraneo o adriatico e quindi riferibili a trote fario potenzialmente autoctone.

## 5. CONCLUSIONI

Una corretta e moderna gestione della trota marmorata non può più prescindere dall'informazione che le

analisi genetiche sono in grado di fornire ormai con costi e tempi più che ragionevoli. È possibile che il fenomeno dell'ibridazione con la trota fario, che sempre più sottopone a rischio di estinzione la trota marmorata, possa autonomamente ridimensionarsi qualora cessasse l'indiscriminata immissione di trote fario di chiara e dimostrata origine alloctona operata da parte delle Associazioni di pesca e con il benessere degli Enti Amministrativi delegati alla gestione della fauna ittica.

Le attività ittogeniche e di ripopolamento a sostegno della marmorata devono essere considerate una misura straordinaria per il ripristino di popolazioni che dovrebbero, nell'ottica di una gestione sostenibile, raggiungere una capacità di autosostentamento, fatte salve opportune misure di protezione e regolamentazione delle attività alieutiche sulle popolazioni stesse. Affinché tali campagne ittogeniche non si rivelino controproducenti, abbattendo la diversità esistente e favorendo l'introgresione, il supporto della genetica dovrebbe essere considerato indispensabile.

Allo stesso modo, le attività di gestione dovrebbero considerare la sottostrutturazione della marmorata in due ceppi principali ed evitare traslocazioni tra bacini e sottobacini che non tengano conto della distribuzione geografica attuale degli stessi.

## RINGRAZIAMENTI

Gli Autori ringraziano J. Tagliavini, i cui commenti in fase di revisione hanno contribuito a migliorare il manoscritto. Il presente lavoro è svolto nell'ambito del progetto GAME – 'Gestione sostenibile della trota marmorata (*S. t. marmoratus*) nel Bacino dell'Adige: caratterizzazione genetica, fenotipica ed ecologica finalizzate alla conservazione', finanziato dall'Autorità di Bacino del Fiume Adige, e realizzato con la collaborazione degli uffici competenti delle Province di Bolzano, Trento e Verona.

## BIBLIOGRAFIA

- Angers B., Bernatchez L., Angers A. & Desgroseillers L., 1995 - Specific microsatellite loci for brook charr reveal strong population subdivision on a microgeographic scale. *J. Fish Biol.*, 47 (Supplement A): 177-185.
- Apostolidis A.P., Apostolou P.K., Georgiadis A. & Sandalopoulos R., 2007 - Rapid identification of *Salmo trutta* lineages by multiplex PCR utilizing primers tailored to discriminate single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the mitochondrial control region. *Conserv. Genet.*, 8: 1025-1028.
- Bernatchez L., 2001 - The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution*, 55/2: 351-379.
- Bianco P.G., 1995 - Mediterranean endemic freshwater fishes of Italy. *Biol. Conserv.*, 72: 159-170.
- Cairney M., Taggart J.B. & Hoyheim B., 2000 - Characterization of minisatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and cross-species amplification in other salmonids. *Mol. Ecol.*, 9: 2155-2234.
- Crivelli A.J., 2006. *Salmo marmoratus*. In: IUCN 2007. 2007 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 15 July 2008.
- D'Antoni S., Duprè E., La Posta S. & Verrucci P., (eds.), 2003 - *Guida alla fauna d'interesse comunitario*. Direttiva Habitat 92/43/CEE. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Direzione per la protezione della Natura.
- Delling B., 2002 - Morphological distinction of marble trout, *Salmo marmoratus*, in comparison to marbled *Salmo trutta* from river Otra, Norway. *Cybium*, 26: 283-300.
- Estoup A., Rousset F., Michalakis Y., Cornuet J.M., Adriamanga M. & Guyomard R., 1998 - Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Mol. Ecol.*, 7: 339-353.
- Evanno G., Regnaut S. & Goudet J., 2005 - Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.*, 14: 2611-2620.
- Fumagalli L., Snoj A., Jesensek D., Balloux F., Jug T., Duron O., Brossier F., Crivelli A.J. & Berrebi P., 2002 - Extreme genetic differentiation among the remnant populations of marble trout (*Salmo marmoratus*) in Slovenia. *Mol. Ecol.*, 11/12: 2711-2716.
- Gandolfi G., Zerunian S., Torricelli P. & Marconato A., 1991 - *I pesci delle acque interne italiane*. Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma, 617 pp.
- Jakobsson M. & Rosenberg N.A., 2007 - Clump: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23/14: 1801-1806.
- King T.L., Eackles M.S. & Letcher B.H., 2005 - Microsatellite DNA markers for the study of Atlantic salmon (*Salmo salar*) kinship, population structure, and mixed-fishery analyses. *Mol. Ecol. Notes*, 5: 130-132.
- Meraner A., Baric S. & Dalla Via J., 2008 - The selection of the wild: a combined molecular approach for the identification of pure indigenous fish from hybridised populations. *Comp. Biochem. Phys. D*, 3: 36-42.
- Meraner A., Baric S., Pelster B. & Dalla Via J., 2007 - Trout (*Salmo trutta*) mitochondrial DNA polymorphism in the centre of the marble trout distribution area. *Hydrobiologia*, 579: 337-349.
- O'Really P.T., Hamilton L.C., McConnell S.K. & Wright J.M., 1996 - Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 2292-2298.
- Presa P. & Guyomard R., 1996 - Conservation of microsatellites in three species of salmonids. *J. Fish Biol.*, 49: 1326-1329.
- Pritchard J., Stephens M. & Donnelly P., 2000 - Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Rexroad C.E. III, Coleman R.L., Hershberg W.K. & Killefer J., 2002 - Thirty-eight polymorphic microsatellite markers for mapping in rainbow trout. *J. Anim. Sci.*, 80: 541-542.
- Snoj A., Jug T., Melkic E., Susnik S., Pohar J. & Dovc P., 2000 - Mitochondrial and microsatellite DNA analysis of marble trout in Slovenia. *Quaderni ETP*, 29: 5-11.
- Sommani E., 1960 - Il *Salmo marmoratus* Cuv.: sua origine e distribuzione nell'Italia settentrionale. *Bollettino di Pesca, Piscicoltura e Idrobiologia*, 15: 40-47.
- Tortonese E., 1970 - *Osteichthyes, parte I, Fauna d'Italia*. Vol. X, Edizioni Calderini, Bologna, 545 pp.
- Zerunian S., 2002 - *Condannati all'estinzione? Biodiversità, biologia, minacce e strategie di conservazione dei Pesci d'acqua dolce indigeni in Italia*. Edagricole. Bologna, 220 pp.

