

Indagini genetiche di linee riproduttive di Trota marmorata, *Salmo [trutta] marmoratus* Cuvier, 1817, ceppo Isonzo e ceppo Tagliamento ai fini gestionali e di salvaguardia

Silvia BATTISTELLA*, Giulia ZANNI & Chiara VICENTINI

Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Via Giorgieri 10, 34127 Trieste, Italia

*E-mail dell'Autore per la corrispondenza: battiste@units.it

RIASSUNTO - *Indagini genetiche di linee riproduttive di Trota marmorata, Salmo [trutta] marmoratus Cuvier, 1817, ceppo Isonzo e ceppo Tagliamento ai fini gestionali e di salvaguardia* - In questo lavoro vengono presentati i risultati di un'indagine genetica di linee riproduttive di trota marmorata dei ceppi dei due principali bacini del Friuli Venezia Giulia, Isonzo e Tagliamento, mediante analisi di restrizione (RFLP) su amplificati della regione mitocondriale D-loop e del gene nucleare LDH-C1*. Questo approccio ha permesso di definire con maggior sicurezza l'appartenenza all'emispecie, nonché di individuare fenomeni di introgressione con la trota fario, sulla base delle diverse modalità di trasmissione dei due genomi. Inoltre l'applicazione di un indice di ibridazione, proposto da Penserini *et al.* (2006), ma modificato e adattato per questo studio, ci ha permesso di identificare la presenza di ibridi con diverso grado di incrocio sulla base della combinazione degli alleli nucleari con gli aplotipi mitocondriali. In base ai risultati sono stati selezionati 53 individui puri di trota marmorata da avviare alla riproduzione, pari al 71% degli individui totali analizzati. I soggetti ritenuti idonei corrispondono alla combinazione VI dell'indice di ibridazione e pertanto presentano un grado di introgressione genica nullo. Diversamente il restante 30%, che comprende le combinazioni V, IV e III, evidenzia un certo grado di introgressione nel campione analizzato dovuto alla presenza di ibridi in seguito a immissioni massicce di trota fario a scopi alieutici.

SUMMARY - *Genetic investigations of reproductive lineages of marble trout, Salmo [trutta] marmoratus Cuvier, 1817, Isonzo and Tagliamento strains for their management and conservation* - In this study we present the results of a genetic investigation of reproductive lineages of marble trout strains from the Friuli Venezia Giulia main river basins (Isonzo and Tagliamento) by using a restriction analysis (RFLP) on mtDNA control region and nuclear LDH-C1* gene amplicons. These combined analyses give a clearer result on which strain the fish belong to and help defining the different levels of introgression between marble and brown trout. Using an introgression index as proposed by Penserini *et al.* (2006), but modified for this study, based on the combination of mitochondrial haplotypes and nuclear alleles, individuals with different level of hybridization were identified. Pure marmoratus lineage was represented by 71% of the samples analyzed in this study, the remaining being hybrids, quite common because of the massive introduction of non-native brown trout for angling purposes.

Parole chiave: Friuli Venezia Giulia, Trota marmorata, introgressione, analisi nucleare, analisi mitocondriale, gestione
Key words: Friuli Venezia Giulia, marble trout, introgression, nuclear DNA, mitochondrial DNA, management

1. INTRODUZIONE

In Friuli Venezia Giulia, l'ente gestore unico delle acque interne, l'Ente Tutela Pesca, ha avviato già da anni un'attività di produzione in cattività e allevamento di specie autoctone e in particolare di salmonidi, nell'intento di garantire l'attività alieutica e mantenere allo stesso tempo un equilibrio ambientale dei fiumi regionali. Partiva invece quindici anni fa il *Progetto marmorata* in collaborazione con il Dipartimento di Biologia dell'Università di Trieste, con l'intento di risolvere il problema della massiccia presenza di ibridi tra trota marmorata e trota fario e l'obiettivo di delineare le opportune modalità per una corretta gestione e salvaguardia del patrimonio ittico autoctono.

Tuttavia questa è una situazione generalizzata a tutto il bacino padano-veneto dove la trota marmorata è residente e da anni si ibrida con la trota fario di ceppo atlantico a causa di erronee immissioni a scopo alieutico. D'altra

parte gli unici allevamenti certificati da un punto di vista sanitario erano quelli d'oltralpe ed era prassi comune, venti anni fa o più, acquistare trote fario atlantiche non tenendo in considerazione il fatto che questo ceppo ha periodi riproduttivi che si sovrappongono parzialmente a quelli della marmorata; nonostante i pesci fossero immessi nei fiumi come pronto pesca, non tutto il materiale ittico veniva recuperato, ma una parte di esso diventava residente dei bacini regionali con le conseguenze ben note. Tre impianti di montagna vennero destinati all'allevamento e riproduzione di trote marmorate, catturate nei due principali bacini regionali: Tagliamento e Isonzo. La prima selezione, su 600 individui catturati, fu su base morfologica e meristica (marmorizzazione omogenea, assenza di punti rossi lungo la linea laterale e denti del vomere posti in un'unica fila); in seguito, si passò ad analisi biochimiche e genetiche (proteine totali, RAPD-PCR) (Battistella & Pizzul 2002; Specchi *et al.* 2004; Jordan *et al.* 2006).

A quindici anni dall'avvio di tale progetto, si è reso necessario selezionare nuovi individui sia su base morfologica che genetica, poiché il pool di riproduttori ha subito nel corso degli anni una progressiva riduzione numerica, dovuta alla mortalità naturale in condizioni di cattività e ad un naturale invecchiamento degli individui non più idonei per la riproduzione. Perciò è sorta l'esigenza di rinsanguare con nuovi esemplari puri gli allevamenti di riproduttori, dai quali ottenere avannotti e novellame da immettere in aree a marmorata, per non incorrere in fenomeni di *inbreeding* o di riduzione della variabilità genetica.

L'approccio genetico scelto per questo lavoro ha avuto lo scopo di valutare il grado di purezza degli esemplari di trota marmorata ed è stato affiancato all'analisi morfologica, da sola non sufficiente per discriminare un individuo puro da un ibrido di trota marmorata X trota fario, data la grande plasticità morfologica che presentano gli ibridi e la specie, in generale.

L'analisi genetica è stata eseguita utilizzando la tecnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) sul locus LDH-C1* del DNA nucleare, che consente di discriminare il ceppo atlantico dalle altre linee evolutive di *Salmo trutta* (McMeel *et al.* 2001); nel caso specifico, assumendo la presenza nell'area di studio delle sole linee atlantica, di immissione, e marmorata, naturalmente presente, è stato possibile discriminare gli alleli della fario atlantica da quelli della marmorata. Parallelamente, l'analisi RFLP è stata estesa alla regione di controllo D-loop del DNA mitocondriale, che permette di diagnosticare la presenza di aplotipi della linea mitocondriale Marmoratus (M), discriminandoli dalla linea Adriatica (Ad) e Atlantica/Danubiana/Mediterranea (A/D/M) (Dovč *et al.* 2004). Con questo doppio controllo, già utilizzato per studi analoghi legati alla gestione del patrimonio ittico, è possibile stabilire se ogni singolo esemplare sottoposto ad analisi sia geneticamente puro per questi due marcatori molecolari e destinabile alla riproduzione (Snoj *et al.* 2000; Dovč *et al.* 2004; Penserini *et al.* 2006, Marić *et al.* 2006).

2. AREA DI STUDIO

L'indagine genetica è stata condotta su campioni di allevamento e selvatici. Le operazioni di recupero di individui selvatici, utilizzati come campioni di riferimento per questo studio, sono state effettuate mediante elettrostoridore nel Bacino del Tagliamento; le trote così catturate sono state portate all'incubatoio dell'Ente Tutela Pesca del F.V.G., sito in località Amaro, mentre i soggetti di allevamento provengono dall'incubatoio regionale di Grauzaria (Moggio Udinese). Il lavoro ha previsto la rigorosa selezione fenotipica di 82 esemplari di trote marmorate riconducibili a due distinte popolazioni, secondo il bacino di provenienza: Isonzo (37 individui) e Tagliamento (45 individui).

3. METODI

I soggetti di *Salmo [trutta] marmoratus* (Cuvier, 1817) reputati dal punto di vista morfologico idonei per le analisi, sono stati marchiati, mediante *chip* sottocutaneo con codice identificativo. Il giorno del prelievo tutti gli esemplari sono stati anestetizzati, fotografati, pesati, misurati, così

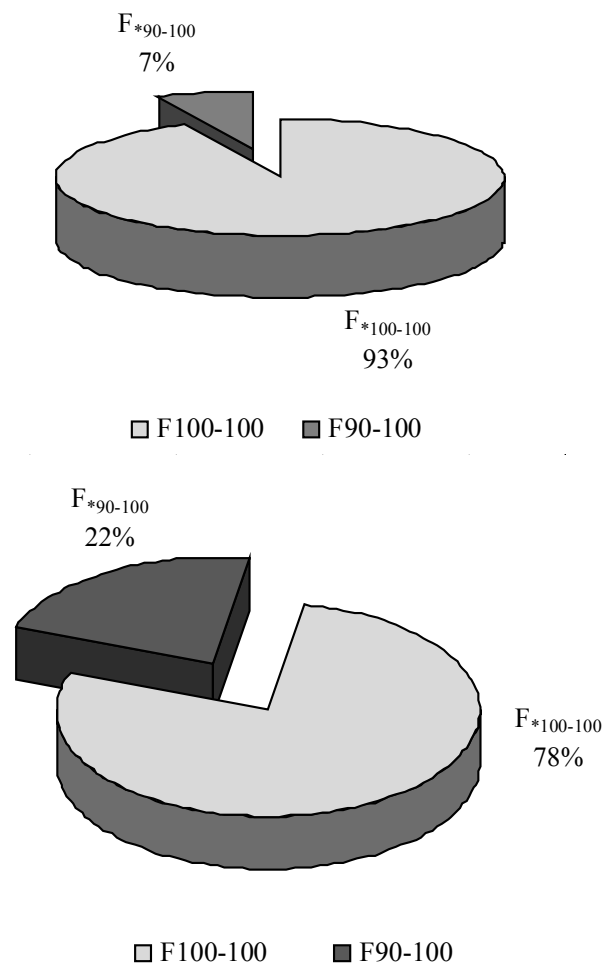


Fig. 1 - Frequenze genotipiche al marcatore LDH-C1* nel gruppo Tagliamento (a) e Isonzo (b).

Fig 1 - Genotype frequencies at the LDH-C1* marker in the Tagliamento (a) and Isonzo (b) groups.

da poter abbinare i dati genetici al fenotipo di appartenenza. Tutti gli esemplari sono stati sottoposti al prelievo di circa 30 μ l di sangue dall'arteria caudale o da quella branchiale, conservato in soluzione anticoagulante.

L'operazione di estrazione del DNA è stata effettuata mediante un protocollo Fenolo/Cloroformio a cui è seguita la verifica della purezza e dell'integrità del DNA e la sua quantificazione con il metodo di diffusione in agarosio.

Tutti gli individui raccolti sono stati sottoposti all'analisi del polimorfismo nella lunghezza dei frammenti di restrizione RFLP del locus genico della lattato deidrogenasi (LDH-C1*), utilizzando come endonucleasi *BseI* (Fermentas). Per il protocollo e i cicli di amplificazione si è fatto riferimento al lavoro di McMeel *et al.* (2001). Questo marcatore nucleare ha permesso di discriminare l'allele diagnostico per le popolazioni dell'Europa nord-occidentale o atlantiche (LDH-C1*90) dall'allele mediterraneo (LDH-C1*100) e di caratterizzare gli individui come omozigoti o eterozigoti.

Gli stessi individui sono stati analizzati anche mediante analisi RFLP del locus mitocondriale D-loop. L'analisi di restrizione di questa regione, mediante l'uso dell'en-

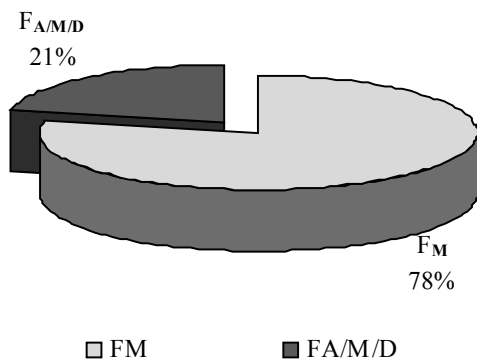


Fig. 2 - Frequenze aplotipiche al marcatore D-loop mitocondriale.
Fig. 2 - Haplotype frequencies at the mtDNA D-loop.

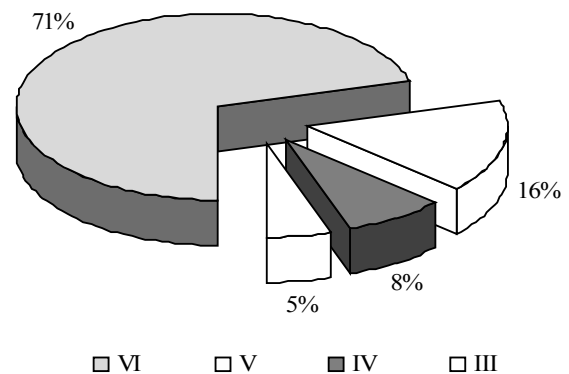


Fig. 3 - Frequenza delle combinazioni genotipo/aplotipo ai marcatori molecolari LDH-C1* e mtDNA D-loop.
Fig. 3 - Frequencies of genotype/haplotype combinations at the LDH-C1* and mtDNA D-loop molecular markers.

zima *AluI*, fornisce un semplice metodo diagnostico per la discriminazione tra gli aplotipi riferibili al gruppo Atlantica/Danubiana/Mediterranea (A/D/M), alla linea Adriatica (Ad) e a quella Marmoratus (M) (Dovč *et al.* 2004). L'analisi elettroforetica della regione di controllo, dopo amplificazione con i primer LN20 e HN20 secondo i protocolli di Suárez *et al.* (2001) e digestione over-night con l'enzima di restrizione *AluI* (Fermentas), rende ben evidente il polimorfismo genico, permettendo di ottenere i seguenti frammenti: 480, 300 e 260 bp per individui di origine A/M/D; 570 e 480 bp per individui di origine Ad; e infine 570 e 410 bp per individui appartenenti alla linea M (Dovč *et al.* 2004).

La caratterizzazione mitocondriale, essendo tuttavia informativa solamente riguardo l'origine materna dei soggetti analizzati, non consente di identificare da sola, con certezza, il ceppo di appartenenza ed è proprio per questo motivo che viene affiancata all'analisi del DNA nucleare. In relazione a ciò, l'analisi combinata tra genoma nucleare e mitocondriale permette di caratterizzare il genotipo di appartenenza e la linea di trasmissione materna. Lo studio dei due marcatori molecolari è in grado di identificare anche un livello d'ibridazione differente, secondo le combinazioni degli aplotipi mitocondriali e degli alleli nucleari e soprattutto il grado di introgressione che gli stessi apporterebbero in una popolazione pura autoctona, se avvenisse l'incontro tra i genomi (Penserini *et al.* 2006). L'indice di ibridazione usato in questo lavoro differisce da quello proposto da Penserini *et al.* (2006), per quanto riguarda il marcatore mitocondriale utilizzato, il D-loop, scelto perché specifico all'individuazione dell'aplotipo marmoratus all'interno di *Salmo trutta*. Tale indice che permette di rilevare all'interno di una popolazione individui ibridi a vario grado di introgressione, dovrà comunque essere migliorato, utilizzando marcatori aggiuntivi.

4. RISULTATI

L'analisi dei frammenti di restrizione del gene nucleare LDH-C1* ci ha permesso di individuare, sugli 82 campioni analizzati, due genotipi dei tre rivelabili: eterozigoti *90/100 (non-atlantico x atlantico) e omozigoti *100/100 (individui puri di ceppo non-atlantico).

Per il bacino del Tagliamento, su 44 esemplari 41 sono interpretabili come marmorate pure (omozigoti *100/100) e tre come ibridi marmoratus x atlantico (eterozigoti *90/100); il genotipo *100/100 è presente nel 93% dei casi analizzati (Fig. 1a). Per il bacino dell'Isonzo, 25 individui sono interpretabili come marmorate pure e 7 come ibridi; il genotipo *100/100 è presente nel 78% dei casi (Fig. 1b). Complessivamente l'allele LDH-C1 *100 è presente nel 93% dei casi nei due gruppi di campioni analizzati.

Gli stessi campioni sono stati sottoposti all'indagine mitocondriale della regione D-loop, che ha rivelato l'appartenenza degli individui o all'aplotipo Marmoratus o all'aplotipo che caratterizza l'origine A/M/D (Dovč *et al.* 2004). In particolare, nel bacino del Tagliamento 31 su 43 individui appartengono all'aplotipo M e 12 all'aplotipo A/M/D. Per quanto riguarda il bacino dell'Isonzo 28 individui su 32 si sono rivelati marmorate mentre, 4 individui sono di origine A/M/D. La frequenza complessiva dell'aplotipo Marmoratus dei due campioni analizzati (Tagliamento e Isonzo) è stata del 78% (Fig. 2). I risultati ottenuti dalla combinazione delle due analisi genetiche, evidenziati dall'applicazione dell'indice di ibridazione, hanno dato nel 71% dei casi un grado di introgressione nullo corrispondente alla combinazione VI, nel 16% dei casi un grado di introgressione basso (combinazione V), nel 8% dei casi grado di introgressione medio-alto (combinazione IV) ed infine nel 5% dei casi un grado di introgressione alto (combinazione III) (Fig. 3).

5. DISCUSSIONE

La tecnica RFLP per lo studio della regione di controllo del mtDNA abbinata allo studio del gene nucleare LDH-C1* si è rivelato uno strumento metodologico adeguato alla caratterizzazione e selezione di trote da destinare all'allevamento. L'applicazione di tale approccio analitico ha portato alla selezione di 53 esemplari d'allevamento e selvatici su un totale di 82 analizzati. Essi corrispondono alla combinazione VI dell'indice d'ibridazione proposta da Penserini *et al.* (2006) e presentano un genotipo nucleare *100/100 (ceppo mediterraneo non-atlantico, qui interpretabile come marmoratus) e un aplotipo mitocondriale M (linea Marmoratus) (Tab. 1); pertanto risultano idonei a co-

Tab. 1 - Indice di ibridazione secondo Penserini *et al.* 2006.
 Tab. 1 - Hybridization index according to Penserini *et al.* 2006.

Combinazione	D-loop	LDH-C1*	Indice
I	A/M/D	90/90	Massimo
II	M	90/90	Elevato
III	A/M/D	90/100	Alto
IV	M	90/100	Medio alto
V	A/M/D	100/100	Basso
VI	M	100/100	Nullo

stituire il pool di riproduttori necessari al rinsanguamento degli allevamenti, dai quali ottenere materiale ittico da destinare in seguito all'ambiente naturale.

Dagli stessi risultati è stato possibile rilevare il grado di purezza all'interno delle due popolazioni provenienti dal bacino dell'Isonzo e da quello del Tagliamento. Nella popolazione Isonzo il 75% degli individui corrisponde alla combinazione VI (indice di ibridazione nullo), il 3% di individui corrisponde alla combinazione V (indice di ibridazione basso), il 13% di individui corrisponde alla combinazione IV (indice di ibridazione medio-alto) e il 9% di individui corrisponde alla combinazione III (indice di ibridazione alto). Nella popolazione Tagliamento il 66% di individui corrisponde alla combinazione VI (indice di ibridazione nullo), il 25% di individui corrisponde alla combinazione V (indice di ibridazione basso), il 5% di individui corrisponde alla combinazione IV (indice di ibridazione medio-alto), il 2% di individui corrisponde alla combinazione III (indice di ibridazione alto) e il restante 2% rappresenta il campione che non ha dato esito per il D-loop.

6. CONCLUSIONI

L'applicazione contemporanea delle due tecniche mitocondriale e nucleare, abbinata anche alla selezione fenotipica, si è rivelata un metodo particolarmente adatto perchè relativamente semplice, di veloce attuazione e certamente più informativa del singolo utilizzo di ciascuno di questi approcci. È un ottimo strumento di certificazione nella caratterizzazione sistematica di singoli individui e quindi utile per la gestione e conservazione di popolazioni di pesci sia selvatici che di allevamento. Nello specifico dall'applicazione dell'Indice di Ibridazione, il 71% delle trote sono risultate pure con grado di introgressione nullo. Del rimanente, il 16% presenta, comunque, un indice di ibridazione basso, pertanto ai fini della conservazione dell'endemismo marmorata anche individui ibridi a basso indice devono essere salvaguardati (Fig. 3).

Alla luce dei risultati ottenuti ci si propone di ampliare questo studio, anche ad altri bacini regionali e su un campione di individui più cospicuo, selezionare ulteriori

individui per accrescere il pool di riproduttori con indice di ibridazione nullo, nell'ottica di una buona gestione del patrimonio ittico a salmonidi, anche se va ricordato che l'allevamento ai fini del ripopolamento delle popolazioni naturali, deve essere considerato una misura straordinaria per la conservazione di popolazioni a rischio.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano il sig. Gian Maria Sigalotti, Mauro Zanier, il dr. Damiano Berton, Daniele, Primo e tutti coloro che hanno collaborato nelle fasi di campionamento.

BIBLIOGRAFIA

- Battistella S. & Pizzul E., 2002. Indagini genetiche su *Salmo [trutta] marmoratus* (Cuvier, 1817) a supporto delle popolazioni naturali: risultati sulla distribuzione nel Friuli-Venezia Giulia. In: Betti L. (eds), *Atti Convegno Salmonidi Alpini*. Rovereto, Trento, 19 ottobre 2002: 47-56.
- Dovč, P., Susnik, S. & Snoj, A., 2004 - Experience from Lipizan horse and salmonid species endemic to the Adriatic river system: examples for the application of molecular markers for preservation of biodiversity and management of animal genetic resources. *J. Biotechnol.*, 113: 43-53.
- Jordan F., Pizzul E. & Battistella S., 2006 - Indagini di genetica molecolare su popolazioni selvatiche e di allevamento di *Salmo [trutta] marmoratus* (Cuvier, 1817) per la gestione e la conservazione dei ceppi autoctoni del Friuli Venezia Giulia. *Biologia Ambientale*, 20/1: 19-24.
- Marić S., Snoj A., Nikolić, V. & Simonović, P., 2006 - Genetic differentiation of trout (*Salmo* spp.) populations in Serbia ascertained using RFLP technique on PCR amplified control region of mitochondrial DNA. *Acta Veterinaria* (Beograd), 56/5-6: 423-430.
- McMeel O.M., Hoey M.E. & Ferguson A., 2001 - Partial nucleotide sequences, and routine typing by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, on the brown trout (*Salmo trutta*) lactate dehydrogenase, LDH-C1*90 and *100 alleles. *Mol. Ecol.* 10: 29-34.
- Penserini M., Nonnis Marzano F., Gandolfi G., Maldini M., Marconato E. & Gibertoni P., 2006 - Fenotipi della trota mediterranea: metodologia di indagine molecolare combinata e selezione morfologica per l'identificazione degli esemplari autoctoni. *J. Freshwat. Biol.*, (Quaderni ETP) 34: 69-75.
- Snoj A., Jug T., Melkič E., Sušnik S., Jesenšek D., Budihna N., Pohar J. & Dovč P., 2000 - Mitochondrial and microsatellite DNA analysis of marble trout in Slovenia. *J. Freshwat. Biol.* (Quaderni ETP) 29: 5-11.
- Specchi M., Battistella S., Amirante G.A., Sigalotti G.M., Tibaldi E. & Pizzul E., 2004 - *Il recupero della trota marmorata nel Friuli Venezia Giulia*. Sintesi di 10 anni di studi e ricerche. E.T.P., Udine, 57 pp.
- Suárez J., Bautista J.M., Almodóvar A. & Machordom A. 2001 - Evolution of the mitochondrial control region in Palaearctic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula. *Heredity*, 87: 198-206.