

## DNA single e multilocus fingerprinting per l'identificazione di riproduttori di trota marmorata (*Salmo trutta marmoratus*) da avviare a pratiche ittiogeniche

Maurizio PENSERINI<sup>1</sup>, Milena MALDINI<sup>1</sup>, Fabiana BILÒ<sup>2</sup>, Elena PALANTI<sup>1</sup>, Francesco NONNIS MARZANO<sup>1\*</sup> & Gilberto GANDOLFI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università degli Studi di Parma, Viale Usberti 11/a, 43100 Parma, Italia

<sup>2</sup> Veneto Agricoltura, Viale dell'Università 14, 35020 Legnaro (PD), Italia

\*E-mail dell'Autore per la corrispondenza: [francesco.nonnismarzano@unipr.it](mailto:francesco.nonnismarzano@unipr.it)

---

**RIASSUNTO** - *DNA single e multilocus fingerprinting per l'identificazione di riproduttori di trota marmorata* (*Salmo trutta marmoratus*) *da avviare a pratiche ittiogeniche* - Tra i principali interventi antropici che influenzano lo sviluppo delle popolazioni naturali, si osservano con sempre maggior frequenza le immissioni di specie ittiche non appartenenti alla fauna originaria e in grado di generare ibridi fertili. Nell'ambito del complesso *Salmo trutta*, la trota marmorata (*Salmo trutta marmoratus*) si trova oggi in condizioni di estesa simpatria con la trota fario (*Salmo trutta trutta*) e soggetta ad evidenti fenomeni di introgressione. In questo lavoro sono stati selezionati parchi riproduttori di trota marmorata, a partire da stock provenienti da quattro centri ittiogenici del nord Italia. L'analisi dei frammenti di restrizione (RFLPs), condotta su regioni di geni mitocondriali (16S, D-loop) e nucleari (LDH-C1\*) ha permesso di individuare aplotipi e alleli specie-specifici in grado di portare un contributo positivo in termini di caratterizzazione tassonomica. L'analisi combinata dei tre marcatori in 369 esemplari di *Salmo trutta marmoratus* ha permesso di selezionarne 199 da sottoporre ad ulteriore analisi genetica basata su marcatori altamente polimorfici AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms). In tal modo sono stati differenziati gruppi di riproduttori provenienti dalle diverse aree geografiche e compatibili con la gestione di attività ittiogeniche condotte su scala di bacino. Tale approccio rappresenta una metodologia innovativa per la caratterizzazione del materiale di allevamento da utilizzare in pratiche conservazionistiche.

**SUMMARY** - *Combined application of DNA multilocus fingerprinting to assess marble trout* (*Salmo trutta marmoratus*) *suitability for restocking practices* - Introduction of non-indigenous taxa by anthropogenic activities may lead to the generation of hybrid forms and cause genetic pollution of native species. Populations of the *Salmo trutta* species complex are threatened by hybridization and introgression caused by allochthonous strains. In particular, *Salmo trutta marmoratus* is sympatric with domestic strains of *Salmo trutta trutta* in most of its native geographical range. To fulfil conservation purposes, an investigation was carried out to assess marble trout characteristics based on DNA single and multilocus fingerprinting. Four hundred samples collected from different hatcheries of Northern Italy were genotyped by RFLP analysis of mitochondrial 16S rDNA and D-loop, and nuclear LDH-C1\*. The combination of the three markers allowed the selection of 199 individuals of *Salmo trutta marmoratus* to be submitted to additional highly polymorphic AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) analyses. Additional benefits of AFLPs over other techniques are referred to their potential power for fish stock identification. The new approach demonstrated a better resolution power to reveal hybridization not detected by classical diagnostic markers.

*Parole chiave:* AFLP, conservazione, introgressione, nord Italia, ripopolamento, RFLP

*Key words:* AFLP, conservation, introgression, Northern Italy, restocking, RFLP

---

### 1. INTRODUZIONE

Nell'ambito dei vertebrati italiani, i pesci d'acqua dolce sono quelli che presentano il maggior numero di endemismi in rapporto al numero complessivo delle specie. Dei 48 taxa considerati autoctoni (Gandolfi *et al.* 1991; Zerunian 2002), circa la metà sono endemiti o subendemiti caratteristici del nostro territorio e originariamente non presenti in altre aree geografiche europee. Tra questi è inclusa la trota marmorata (*Salmo trutta marmoratus*), oggi seriamente minacciata da interventi antropici che ne limitano la distribuzione e la qualità dei popolamenti, tanto da essere inserita nella lista rossa dell'International Union for the Conservation of Nature (IUCN) e nell'Allegato II della

Direttiva Habitat dell'Unione Europea che individua specie di particolare interesse comunitario per le quali risulta necessaria la costituzione di aree di protezione speciale ai fini della conservazione. Questo taxon endemico delle regioni comprese tra il bacino padano e quello Adriatico fino alla Slovenia, Croazia ed Albania (Povz 1995; Povz *et al.* 1996; Fumagalli *et al.* 2002), presenta molte popolazioni la cui originalità è compromessa dall'introggressione di genoma alloctono, conseguente all'ibridazione con esemplari di trota fario atlantica (*Salmo trutta trutta*) (Povz 1995; Berrebi *et al.* 2000; Delling *et al.* 2000). Nel genere *Salmo* l'ibridazione e l'introggressione sono eventi frequenti derivanti dalle estese pratiche di ripopolamento nell'ambito della pesca sportiva (Scribner *et al.* 2000; Allendorf *et al.* 2001). A tal

Tab. 1 - Elenco degli esemplari di *Salmo trutta marmoratus* e di *Salmo trutta trutta* (forma atlantica) esaminati. È riportato il numero dei campioni e la loro provenienza geografica.

Tab. 1 - List of analysed specimens of *Salmo trutta marmoratus* and *Salmo trutta trutta* (atlantic strain) and their geographical origin.

Stock	N Esemplari	Bacino	Sigla	Centro ittigenico
1-2-3-4	131	Adige	Ad	Valdastico (VI)
5-6-7	85	Brenta	Br	Valdastico (VI)
8	48	Piave	Bbl	Bolzano-Bellunese (BL)
9-10-11	52	Piave	Bva	Valdastico (VI)
12	13	Piave	Ce	Cellarda (BL)
13	40	Stura	Cn	Centallo (CN)
Outgroup	10	ND	At	Nord Italia

riguardo, fin dall'inizio del ventesimo secolo, la trota fario proveniente da diversi centri ittigenici è stata introdotta nell'areale della trota marmorata, causando inquinamento genetico delle forme native, con lo sviluppo di ibridi fertili tra le due forme (Berrebi *et al.* 2000; Fumagalli *et al.* 2002; Jug *et al.* 2005; Meldgaard *et al.* 2007).

In questo lavoro, individui raccolti in differenti impianti ittigenici sono stati sottoposti ad indagine genetica attraverso analisi di specifici polimorfismi di restrizione e l'applicazione di marcatori molecolari che interessano il genoma totale. In particolare analisi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) sono state condotte su regioni mitocondriali del 16S rDNA, della D-loop (regione di controllo) e sul gene nucleare LDH-C1\*. Queste tecniche hanno permesso di identificare aplotipi e alleli tipici delle forme mediterranea, atlantica e marmorata (Bernatchez *et al.* 1992; Patarnello *et al.* 1994; McMeel *et al.* 2001). La combinazione dei tre marcatori ha consentito inoltre di selezionare esemplari di *Salmo trutta marmoratus* caratterizzati da genoma puro. Gruppi di tali individui sono stati sottoposti ad indagini di secondo livello mediante l'applicazione dei marcatori AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Questa tecnica consente di identificare polimorfismi specie-specifici e popolazione-specifici, capaci di differenziare gruppi diversi di riproduttori di trota marmorata appartenenti a differenti aree dell'arco alpino. La metodologia applicata viene considerata pertanto uno strumento utile per differenziare popolazioni di allevamento da impiegare in attività di ripopolamento.

## 2. AREA DI STUDIO E RACCOLTA DEI CAMPIONI

Sono stati esaminati 369 esemplari di *Salmo trutta marmoratus* e 10 di *Salmo trutta trutta* (forma atlantica), provenienti da quattro differenti centri di ittiocoltura dell'Italia settentrionale. In tabella 1 è riportato il quadro completo dei campioni con le sigle di riferimento.

## 3. MATERIALI E METODI

Il DNA genomico è stato estratto e purificato a partire da frammenti di pinna adiposa, mantenuti a -20 C° in

etanolo assoluto, mediante l'utilizzo del Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega). Ogni esemplare dopo il prelievo del tessuto è stato dotato di un microchip (pit-tag), mediante iniezione intramuscolare, per la successiva identificazione in allevamento.

### 3.1. RFLP

Regioni mitocondriali (16S e D-loop) e il gene nucleare LDH-C1\* sono stati analizzati mediante amplificazione PCR e analisi dei polimorfismi di restrizione (RFLP).

Il 16S rDNA è stato amplificato utilizzando primers universali (Sar and Sbr) (Patarnello *et al.*, 1994) e sottoposto a restrizione mediante l'enzima AfaI (*RsaI*) (GE Healthcare), (Nonnis Marzano *et al.* 2003). In particolare AfaI riconosce la palindrome di restrizione nell'aplotipo atlantico, generando due frammenti di differente peso molecolare.

La regione di controllo D-loop è stata esaminata impiegando i primers L19 e H17 (Bernatchez *et al.*, 1992). I frammenti, ottenuti dalla digestione di *AluI* (GE Healthcare) a 37 °C per 2 ore, sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2,5%. Le bande esaminate permettono di distinguere l'aplotipo *marmoratus* da quelli adriatico e atlantico/mediterraneo.

L'analisi dei genotipi è stata condotta sul gene LDH-C1\* mediante l'utilizzo di specifici primers (Ldhxon3F and Ldhxon4R) secondo il protocollo di McMeel *et al.* (2001). L'azione dell'endonucleasi *BsII* (Biolabs) differenzia individui omozigoti atlantici o mediterranei da esemplari ibridi (eterozigoti) delle due forme.

### 3.2. AFLP

Il genoma di 58 individui di *Salmo trutta marmoratus*, risultati puri alle precedenti analisi di loci diagnostici, è stato sottoposto ad analisi AFLP secondo il protocollo descritto da Maldini *et al.* (2006).

Un'aliquota di prodotto dei frammenti amplificati, combinata a formammide deionizzata (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) e ad un marcatore di peso molecolare (CEQ DNA Size standard-600 Beckman-Coulter, Fullerton, CA), è stata analizzata mediante elettroforesi capillare a fluorescenza mediante sequenziatore automatico per acidi nucleici

Tab. 2 - Percentuali di aplotipi mitocondriali e alleli LDH-C1\* ottenuti dalle analisi dei polimorfismi di restrizione (RFLP). A (Atlantico); Me (Mediterraneo); Ad (Adriatico); E (Eterozigote).

Tab. 2 - Frequency of mitochondrial haplotypes and LDH-C1\* alleles obtained by means of RFLP analysis. A (Atlantic); Me (Mediterranean); Ad (Adriatic); E (Heterozygote).

Stock	N Esemplari (sigla)	16SrDNA		D-loop			LDH-C1*		
		A	Me	A/Me	Ma	Ad	A	Me	E
1-2-3-4	131 (Ad)	50	50	50	50	0	9	41	50
5-6-7	85 (Br)	0	100	0	100	0	0	81	19
8	48 (Bbl)	4	96	4	96	0	0	92	8
9-10-11	52 (Bva)	12	88	12	88	0	4	73	23
12	13 (Ce)	38	62	38	62	0	15	85	0
13	40 (Cn)	50	50	50	50	0	0	43	57
outgroup	10 (At)	100	0	100	0	0	100	0	0

CEQ 8000 (Beckman Coulter). L'analisi dei pattern elettroforetici AFLP è stata effettuata mediante il software Genographer (Montana State University, 1998) (Papa *et al.* 2005). Gli indici di distanza genetica e la variabilità intra e interpopolazione sono stati definiti dal software Genetix, con cui è stato possibile visualizzare anche un grafico tridimensionale dell'analisi fattoriale delle corrispondenze (AFC).

#### 4. RISULTATI

##### 4.1. RFLP

L'analisi dei frammenti di restrizione (RFPL) condotta sul gene 16S rDNA ha permesso di rilevare gli aplotipi atlantico e mediterraneo (quest'ultimo considerato indicativo di *marmoratus*), mentre dall'esame del D-loop si sono identificate le tre forme atlantico/mediterranea, *marmoratus* e adriatica. A livello nucleare, genotipi omozigoti ed esemplari ibridi delle forme atlantica e *marmoratus* sono stati individuati dal polimorfismo presente nel gene LDH-C1\*. In Tabella 2 sono riportate le percentuali degli aplotipi ottenuti.

La combinazione dei marcatori mitocondriali e nucleari identifica differenti livelli di introgressione riferibili all'indice di ibridazione messo a punto dal nostro gruppo di ricerca (Penserini *et al.* 2006). Questo indice descrive l'introgressione, del genoma atlantico nelle forme pure di trota marmorata in seguito a fenomeni di ibridazione tra le due semi-specie. La massima introgressione, identificata in un esemplare atlantico è espressa dalla combinazione I, mentre gli individui puri *marmoratus* sono riconducibili al livello VI. Le categorie intermedie II, III, IV e V caratterizzano individui con diverso grado di introgressione. L'applicazione dell'indice di ibridazione ha riferito il 54% degli esemplari totali analizzati alla specie *Salmo trutta marmoratus*, contro il 42% di individui ibridi e un 4% rappresentato da forme atlantiche pure (Fig. 1).

##### 4.2. AFLP

Per le analisi AFLP sono stati scelti esemplari appartenenti a 7 diversi stock esaminati, per un totale di 58 individui (55 esemplari di *Salmo trutta marmoratus* e 3

di *Salmo trutta trutta*, forma atlantica, utilizzati come outgroup). Tutti i campioni sono stati analizzati mediante 8 differenti combinazioni dei primer *Eco* e *Taq* (E32/T32, E32/T33, E33/T33, E33/T37, E33/T40, E40/T40, E40/T33, E40/T37). Tra le combinazioni testate, le E32/T33, E33/T37, E40/T37 non sono state prese in considerazione in quanto non presentavano un pattern elettroforetico a elevata risoluzione, considerando il numero totale delle bande e la percentuale di loci polimorfici, rispetto alle altre cinque ritenute invece altamente informative. I marcatori compresi tra 50 e 600 bp sono stati esaminati mediante il software Genographer secondo il metodo proposto da Papa *et al.* 2005. Per ogni singolo gel elettroforetico si sono considerati circa 70 loci (frammenti), comprensivi di bande monomorfe e polimorfiche, per un totale di 350 marcatori AFLP. I loci polimorfici sono risultati in media il 35% (125 bande) con una variabilità compresa tra il 31 e il 40%, nelle diverse primer combinations. Per l'analisi fattoriale delle corrispondenze (AFC), effettuata mediante il software Genetix, sono stati presi in esame solo i marcatori polimorfici (Figg. 2, 3), da cui si sono ottenuti anche il Gst di Nei (1978), l'eterozigosi attesa (Hexp) (Tab. 3) e la matrice di distanza genetica (Tab. 4). Il grafico tridimensionale dell'AFC riportato in figura 2 dimostra che negli stock di riproduttori di *Salmo trutta marmoratus* si differenzia-

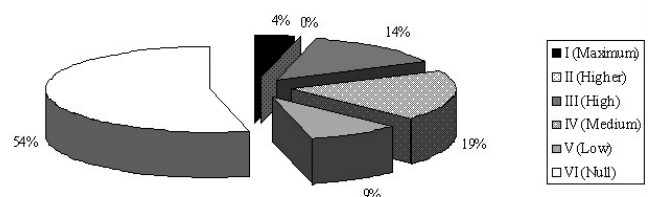


Fig. 1 - Distribuzione percentuale degli esemplari di *Salmo trutta marmoratus* nelle diverse categorie dell'indice di ibridazione (I – ibridazione massima; VI – ibridazione nulla).

Fig. 1 - Percentage of *S. t. marmoratus* specimens in different classes of the hybridization index (I – maximum hybridization; VI – hybridization absent).

Tab. 3 - Indice di eterozigosi attesa ( $H_{exp}$ ) nei diversi lotti analizzati e valore di  $Gst$  medio calcolato tra i gruppi di riproduttori mediante elaborazione dei profili AFLP con software Genetix.

Tab. 3 - Expected heterozygosity in different stocks and average  $Gst$  calculated analyzing AFLP profiles with Genetix.

Ad (14)	0,2878
Bva (11)	0,2726
Br (5)	0,1208
Bbl-a (9)	0,2539
Bbl-b (8)	0,1485
Cn (8)	0,1167
At (3)	0,0644
Gst medio	
0,54	

no 2 gruppi principali riconducibili ai settori orientale e occidentale delle Alpi (Veneto e Piemonte), unitamente all'outgroup rappresentato da esemplari di *Salmo trutta trutta* (ceppo atlantico). In particolare si evidenzia come il gruppo di marmorate piemontesi mostri una maggiore similarità agli esemplari di fario atlantica (distanza genetica 21%) rispetto alle marmorate del Veneto. In figura 3 è riportata in dettaglio l'AFC degli stock dell'Italia nord-orientale (Veneto). Nell'ambito di tale area geografica di distinguono 5 gruppi principali ascrivibili ai diversi centri di allevamento. Interessante è la suddivisione dello stock Piave (Bbl) dell'impianto di Bolzano Bellunese in due gruppi nettamente separati (0,342 distanza di Nei 1978): uno con livrea tipica delle marmorate (Bbl-a, livrea *marmoratus*) e l'altro con una particolare punteggiatura rossa lungo la linea laterale (Bbl-b, punti rossi). Da notare è anche l'affinità riscontrata tra il gruppo di marmorate Bbl-a (Piave, fenotipo marmoreggiato) e il gruppo Ad, Adige (distanza genetica 0.052). Lo stock dell'Adige infatti si inserisce in posizione intermedia tra i riproduttori del Piave siglati Bbl-a e quelli con sigla Bva, presenti nell'impianto di Valdastico.

## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In condizioni naturali, l'ibridazione tra specie ittiche è considerato un fenomeno piuttosto comune e si sviluppa a diversi livelli tra specie sia congeneriche che di genere differente (Jansson *et al.* 1991; Unverand & Erk'Akan 2005; Wyatt *et al.* 2006; Mallet 2007). A tal riguardo, nel panorama zoogeografico europeo, la trota marmorata (*Salmo trutta marmoratus*) è considerata una specie di particolare interesse per la sua storia filogenetica e filogeografica e per il grave stato di compromissione dei popolamenti presenti nelle acque italiane a causa dell'ibridazione con la trota fario.

È stato quindi sviluppato un progetto basato sull'utilizzo di tecnologie innovative per definire il miglior approccio conservazionistico sia a livello generale tassonomico, sia a livello delle singole popolazioni appartenenti ai bacini idrografici Adige, Brenta, Piave e Stura.

L'analisi combinata dei polimorfismi di restrizione (RFLP) su geni mitocondriali e nucleari, ha permesso di selezionare esemplari puri da avviare a pratiche ittiogeniche. In particolare dei 369 esemplari analizzati, 199 sono risultati puri (54%) e avviati alla carriera riproduttiva. Per verificare la validità della metodologia sono state fatte ulteriori analisi sulla progenie F1 ottenuta dai riproduttori puri del lotto Adige (24% dei totali analizzati). I discendenti 0+ sono risultati tutti con massimo grado di purezza (categoria VI dell'indice di ibridazione).

Le ulteriori analisi genetiche basate sui marcatori AFLP sono servite all'identificazione di differenze stock-specifiche nell'ambito dei gruppi di marmorate pure. L'analisi AFC riportata in figura 2 mostra la stretta similarità genetica (79%) dell'outgroup rappresentato da *Salmo trutta trutta* (ceppo atlantico) con il gruppo delle piemontesi, quasi ad indicare un passato evento di ibridazione con forme atlantiche non identificabile mediante polimorfismi di restrizione, ma presente sotto forma di introgresione nel genoma dei riproduttori di marmorate dello Stura. Una maggiore distanza genetica è presente invece negli stock del Veneto rispetto a quello piemontese e all'outgroup, a testimonianza di una maggior purezza dei riproduttori delle Alpi orientali rispetto ai campioni delle Alpi occidentali. L'analisi dettagliata dei riproduttori del Veneto (Fig. 3) evidenzia una netta separazione (34% di distanza genetica) di

Tab. 4 - Matrice delle distanze genetiche di Nei (1978) calcolata sui riproduttori e l'outgroup mediante elaborazione dei profili AFLP con software Genetix.

Tab. 4 - Matrix of Nei (1978) genetic distances calculated with Genetix software and referred to AFLP analysis of breeders and the outgroup.

	Ad (14)	Bva (11)	Br (5)	Bbl-a (9)	Bbl-b (8)	Cn (8)	At (3)
Ad (14)	0,000	0,109	0,188	0,052	0,217	0,390	0,578
Bva (11)	0,109	0,000	0,134	0,116	0,240	0,469	0,589
Br (5)	0,188	0,134	0,000	0,217	0,288	0,429	0,575
Bbl-a (9)	0,052	0,116	0,217	0,000	0,253	0,568	0,654
Bbl-b (8)	0,217	0,240	0,288	0,253	0,000	0,552	0,669
Cn (8)	0,390	0,469	0,429	0,568	0,552	0,000	0,212
At (3)	0,578	0,589	0,575	0,654	0,669	0,212	0,000

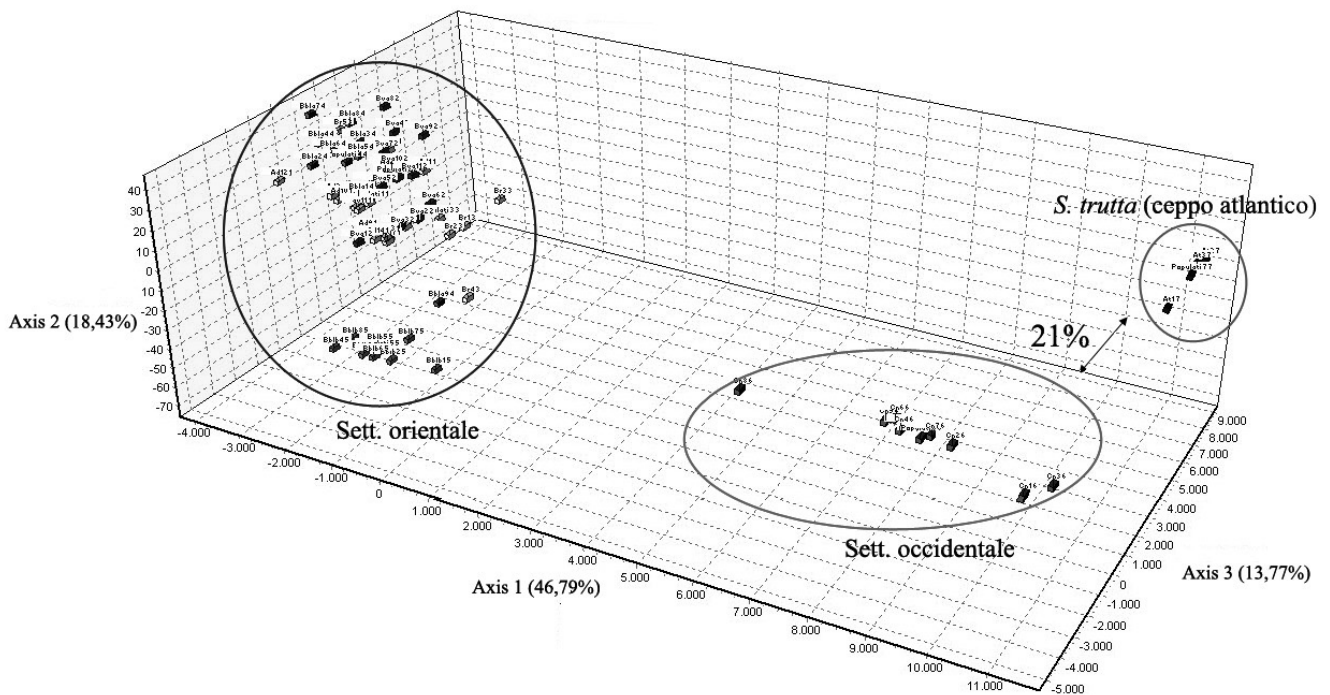


Fig. 2 - L'Analisi Fattoriale delle Corrispondenze (AFC) evidenzia 3 gruppi principali di riproduttori riconducibili ai settori orientale e occidentale delle Alpi (Veneto e Piemonte), unitamente all'outgroup rappresentato da esemplari di *Salmo trutta trutta* (ceppo atlantico).  
 Fig. 2 - Factorial Correspondence Analysis (FCA) discriminates 3 different groups of breeders corresponding to eastern and western Alps (Veneto and Piemonte).

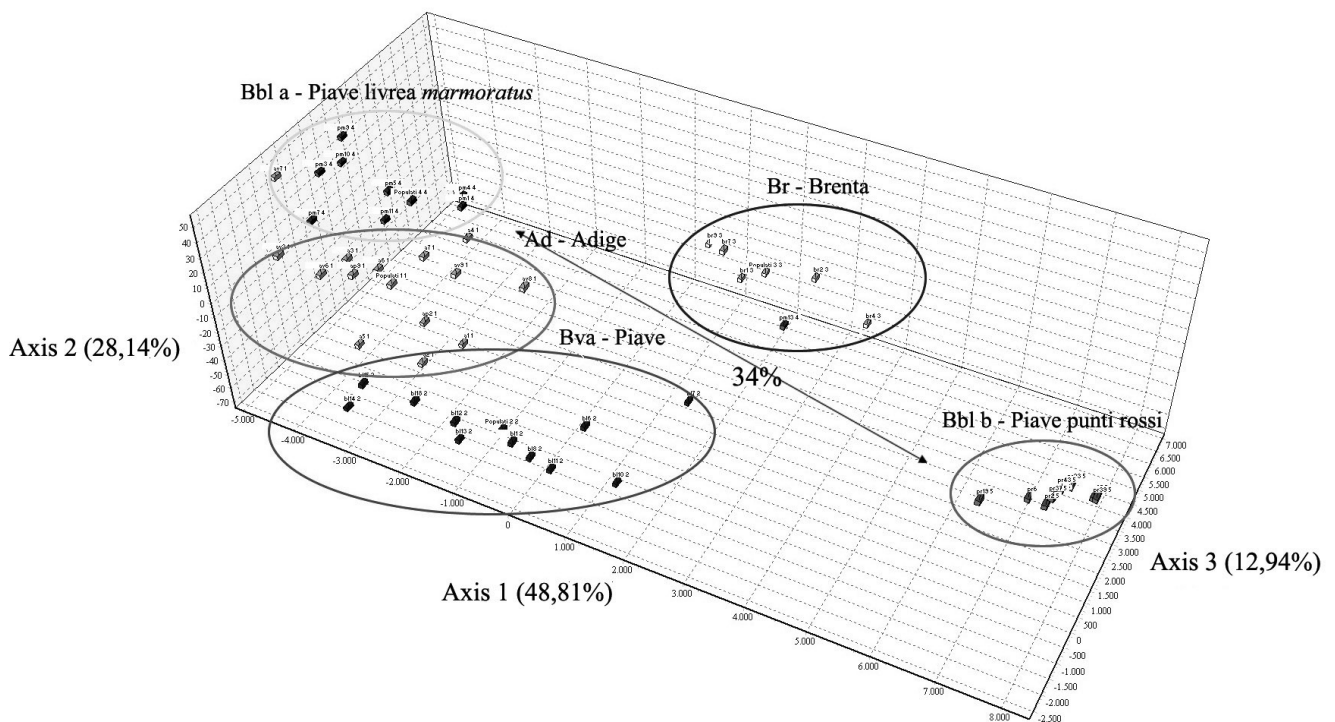


Fig. 3 - L'Analisi Fattoriale delle Corrispondenze (AFC) eseguita sui lotti Veneti evidenzia la suddivisione in 5 gruppi riconducibili ai differenti bacini e centri di allevamento. In particolare il gruppo dei Bbl si separa in due linee genetiche (Bbl-a e Bbl-b) corrispondenti rispettivamente ai fenotipi livrea marmorata e a punti rossi.  
 Fig. 3 - Factorial Correspondence Analysis (FCA) carried out on Veneto samples discriminates 5 different groups linked to different water basins and hatcheries. In particular, the Bbl group is split in 2 different genetic strains (Bbl-a and Bbl-b) corresponding to the marble phenotype and the one with red spots.

due linee genetiche nel lotto Bbl. Un gruppo definito da una livrea marmorata (Bbl-a) e l'altro caratterizzato da un fenotipo a punti rossi (Bbl-b), attribuibile ad un ipotetico ceppo isontino. L'affinità maggiore inoltre tra il gruppo di marmorate del Piave (Bbl-a) e il gruppo dell'Adige (Ad) fa presupporre un'origine comune dei due stock o comunque eventi di introgressione di una linea genetica nell'altra. In termini pratici, o a Bolzano Bellunese sono presenti marmorate provenienti dal bacino del fiume Adige oppure quest'ultimo è caratterizzato da trote di provenienza veneta.

La tecnica AFLP si presenta pertanto come una tra le più indicate per il differenziamento dei diversi stock a livello di bacino (popolazione) anche per l'eventuale ricerca di potenziali metapopolazioni definite su scala microgeografica da particolari situazioni ecologiche o ambientali.

A tal riguardo è bene precisare che lo studio non pretende di essere risolutivo per quanto riguarda la soluzione delle problematiche tassonomiche connesse alla trota marmorata ma propone alcuni strumenti di indagine e pone alcune solide basi sulle quali operare in futuro per una corretta gestione delle popolazioni naturali.

#### RINGRAZIAMENTI

La ricerca è stata svolta nell'ambito del progetto dell'Azienda Regionale Veneto Agricoltura "Mantenimento dello stock e selezione genetica della specie autoctona *Salmo trutta marmoratus*" finanziato dalla Regione Veneto Agricoltura. Gli autori desiderano ringraziare inoltre il Dott. M. Zanetti e il Dott. L. Fariano per aver fornito alcuni campioni di marmorate e il Dott. F. Borghesan per la collaborazione fornita nelle operazioni di marcatura dei pesci.

#### BIBLIOGRAFIA

- Allendorf F.W., Leary R.F., Spruell P. & Wenburg J.K., 2001 - The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.*, 16: 613-622.
- Bernatchez L., Guyomard R. & Bonhomme F., 1992 - DNA variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Mol. Ecol.*, 1: 161-173.
- Berrebi P., Povz M., Jesenšek D., Cattaneo-Berrebi G. & Crivelli A.J., 2000 - The genetic diversity of native, stocked and hybrid populations of marble trout in the Soca river, Slovenia. *Heredity*, 85: 277-287.
- Delling B., Crivelli A.J., Rubin J.F. & Berrebi P., 2000 - Morphological variation in hybrids between *Salmo marmoratus* and alien *Salmo* species in the Volarja stream, Soca River basin, Slovenia. *J. Fish Biol.*, 57: 1199-1212.
- Fumagalli L., Snoj A., Jesenšek 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: 2711-2716.
- Gandolfi G., Zerunian S., Torricelli P. & Marconato A., 1991 - *I pesci delle acque interne italiane*. Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Rome, 620 pp.
- Jansson H., Holmgren I., Wedin K. & Anderson T., 1991 - High frequency of natural hybrids between Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and brown trout, *S. trutta* L., in a Swedish river. *J. Fish Biol.*, 39: 343.
- Jug T., Berrebi P. & Snoj A., 2005 - Distribution of nonnative trout in Slovenia and their introgression with native trout populations as observed through microsatellite DNA analysis. *Biol. Cons.*, 123: 381-388.
- Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Paddo S., Villablanca F.X. & Wilson A.C., 1989 - Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 86: 6196-6200.
- Maldini M., Nonnis Marzano F., Gonzales Fortes G., Papa R. & Gandolfi G., 2006 - Fish and seafood traceability based on AFLP markers: elaboration of a species database. *Aquaculture*, 261: 487-494.
- Mallet J., 2007 - Hybrid speciation. *Nature*, 446: 279-283.
- McMeel O.M., Hoey E.M. & Ferguson A., 2001 - Partial nucleotide sequences, and routine typing by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, of the brown trout (*Salmo trutta*) lactate dehydrogenase, LDH-C1 \*90 and \*100 alleles. *Mol. Ecol.*, 10: 29-34.
- Meldgaard T., Crivelli A., Jesenšek D., Poizat G., Rubin J.F. & Berrebi P., 2007 - Hybridization mechanism between the endangered marble trout (*Salmo marmoratus*) and the brown trout (*Salmo trutta*) as revealed by in-strea experiments. *Biol. Cons.*, 136: 602-611.
- Nonnis Marzano F., Corradi N., Papa R., Tagliavini J. & Gandolfi G., 2003 - Molecular evidence for introgression and loss of genetic variability in *Salmo* (trutta) macrostigma as a result of massive restocking of Apennine population (Northern and Central Italy). *Environ. Biol. Fishes*, 68: 349-356.
- Patarnello T., Bargelloni L., Caldara F. & Colombo L., 1994 - Cytochrome b and 16S rRNA sequence variation in the *Salmo trutta* (Salmonidae, Teleostei) species complex. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 3: 69-74.
- Penserini M., Nonnis Marzano F., Gandolfi G. & Maldini M., 2006 - Fenotipi della trota mediterranea: indagine molecolare combinata e selezione morfologica per l'identificazione di esemplari autoctoni. *J. Fresh. Biol.*, quaderni ETP, 34: 69-75.
- Povz M., 1995 - Status of freshwater fishes in the Adriatic catchment of Slovenia. *Biol. Cons.*, 72: 171-177.
- Povz M., Jesenšek D., Berrebi P. & Crivelli A.J., 1996 - *The Marble Trout, Salmo trutta marmoratus, Cuvier 1817 in the Soca River Basin, Slovenia*. La Tour du Valat Publication. Le Sambuc, France, 65 pp.
- Scribner K.T., Page K.S. & Bartron M.L., 2000 - Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 10: 293-323.
- Unverand B. & Erk'akan F., 2005 - A natural hybrid of *Leuciscus cephalus* (L.) and *Chalcalburnus chalcoides* (Guldenstadt) (Osteichthyes-Cyprinidae) from Lake Todurge (Sivas, Turkey). *J. Fish Biol.*, 66: 899-910.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijmans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. & *et al.*, 1995 - AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23: 4407-4414.
- Wyatt P.M.W., Pitts C.S. & Butlin R.K., 2006 - A molecular approach to detect hybridization between bream *Abramis brama*, roach *Rutilus rutilus* and rudd *Scardinius erythrophthalmus*. *J. Fish Biol.*, 69: 52-71.
- Zerunian S., 2002 - *Condannati all'estinzione? Biodiversità, biologia, minacce e strategie di conservazione dei Pesci d'acqua dolce indigeni in Italia*. Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio, Rome, 220 pp.