



PROGETTO T.R.O.T.A.

(Tipicizzare e Recuperare le Originarie Trote Autoctone)

ricerca fenotipica e genotipica sulla trota fario indigena
dell'Appennino Tosco-Romagnolo
nel Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi

“Finalmente nel 1440 (omissis), allora gli uomini di Strabatenza, del Poggio alla Lastra, di Valbona e di Ridracoli comprarono dagli ufiziali di Torre di Firenze una parte delle selve dell'Appennino del Bidente, le quali poscia rinunziarono all'opera di Santa Maria del Fiore previo il riservo di potervi pascere il bestiame proprio, di fare in quelle selve doghe d'abeto, e di pescare nelle acque de canali le trote per loro uso, obbligandosi frattanto di pagare all'Opera di Santa Maria del Fiore l'anno censo di lire 228 e libbre 25 di trote per la festa di San Giovanni Battista.”
dal Dizionario Geografico, Fisico e Storico della Toscana di Emanuele Repetti, 1841



Giancarlo Tedaldi, Andrea De Paoli, Loris Casali, Marco Magrini e Davide Mina

Premessa

Testimonianze storiche e ricerche molecolari sul DNA mitocondriale (Zaccanti et al., 2000; Nonnis Marzano et al., 2004) indicano come la trota nell' Appennino Tosco-Romagnolo sia stata una presenza storica certa; con questa ricerca abbiamo voluto scoprire se lo sia ancora.

Introduzione

Al fine di indagare lo status genetico della trota fario all'interno del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi sono stati prelevati campioni di tessuto da salmonidi provenienti da 9 torrenti, appartenenti a 4 sottobacini idrografici (Bidente di Campigna, Bidente di Ridracoli, Bidente di Pietrapazza e Archiano) per un totale di 22 punti-stazione visitati.

Complessivamente sono stati catturati 379 individui e di questi, 134 sono stati caratterizzati geneticamente al fine di stabilirne l'autoctonia o meno (Figura 1; Tabella 1). La ricerca ha riguardato i settori a più alta naturalità del Parco Nazionale (Appennino Tosco-Romagnolo) in zone non interessate da immissioni programmate di salmonidi da almeno 50 anni (Riserve Biogenetiche Statali).

L'indagine è stata ampliata anche ad aree limitrofe a queste ultime e reputate di elevato interesse, poiché nonostante in queste zone non fossero preclusi né i ripopolamenti né l'attività di pesca, in considerazione dell'isolamento dei luoghi, si poteva sospettare della presenza di popolazioni relitte di trota appartenenti al ceppo indigeno (trote di ceppo mediterraneo).

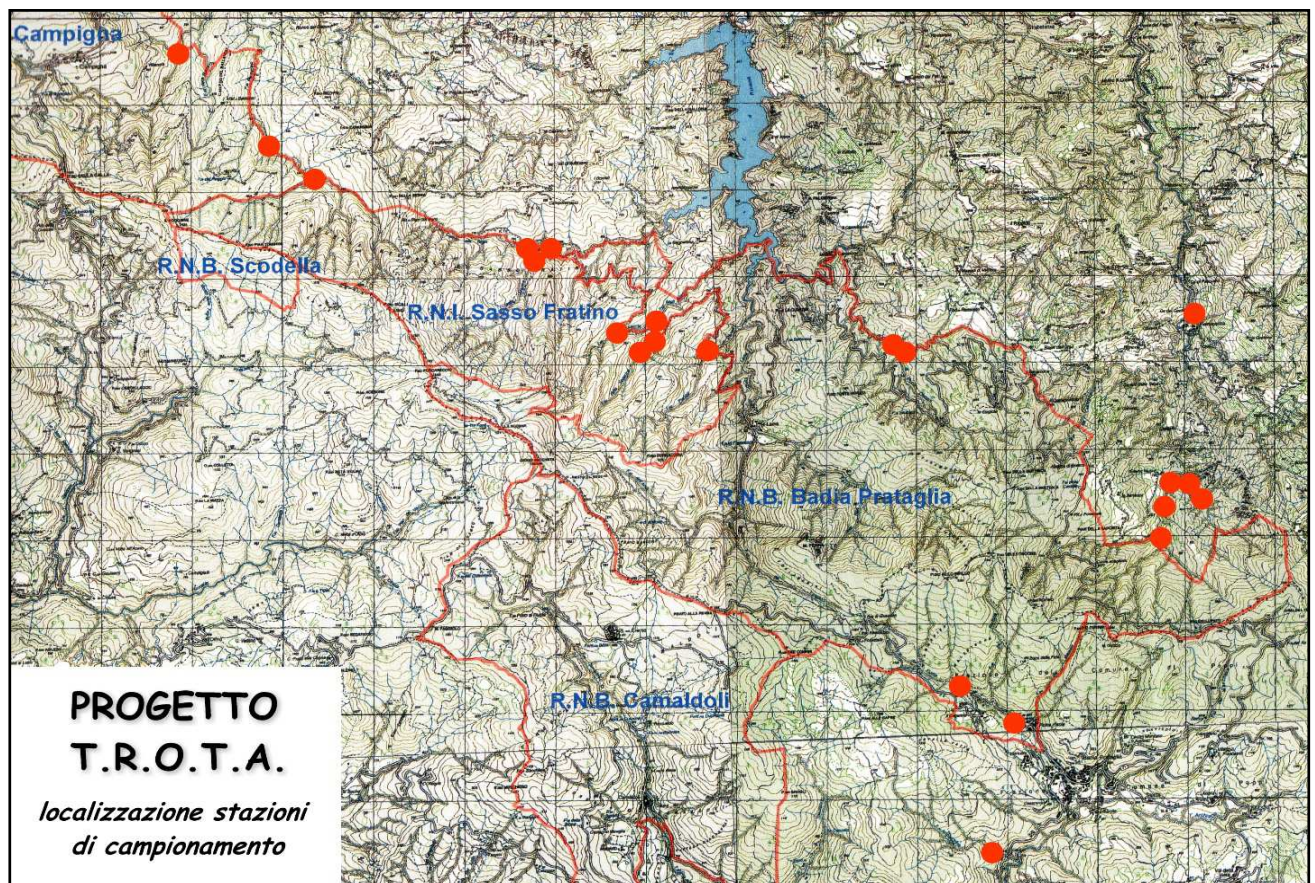


Fig. 1 - Localizzazione delle stazioni di campionamento all'interno del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi (con linea rossa perimetro delle Riserve Biogenetiche Statali gestione U.T.B. Pratovecchio)

Corso d'acqua	Codice stazione	Quota mslm	Data di rilievo	Coordinate UTM (WGS 84 32N)	Presenza di trote	Codice associato alle trote	Numero campioni	Totale catture
Bidente di Pietrapazza, Fosso del Rovino e Fosso delle Ranocchie	Bidente Pietrapazza 01	750	17/09/2015	X 7.32.606 E Y 48.55.844 N	Si	ER11-ER18	8	8
Bidente di Pietrapazza	Bidente Pietrapazza 02	730	12/11/2015	X 7.32.697 E Y 48.56.182 N	Si	EE01-EE09	9	35
Bidente di Pietrapazza	Bidente Pietrapazza 03	700	17/09/2015	X 7.32.756 E Y 48.56.499 N	Si	ER01-ER10	10	10
Fosso della Bocca	Bocca 01	725	12/11/2015	X 7.32.985 E Y 48.56.302 N	No	\	0	0
Fosso della Bocca	Bocca 02	700	12/11/2015	X 7.32.960 E Y 48.56.431 N	Si	UF01-UF10	10	20
Fosso di Ponte Camera	Ponte Camera 01	700	29/10/2015	X 7.29.743 E Y 48.57.978 N	No	\	0	0
Fosso del Romiceto	Romiceto 01	700	29/10/2015	X 7.29.743 E Y 48.57.978 N	Si	TR01-TR10	10	13
Fosso dei Pianelli	Pianelli 01	690	29/10/2015	X 7.27.542 E Y 48.57.883 N	No	\	0	0
Fosso della Bucaccia	Bucaccia 01	780	05/11/2015	X 7.26.589 E Y 48.58.139 N	Si	AB14-AB21	8	18
Fosso degli Altari e Fosso della Bucaccia	Altari - Bucaccia 02	700	05/11/2015	X 7.27.050 E Y 48.58.298 N	Si	AB01-AB13	13	14
Fosso delle Segarine	Segarine 01	750	05/11/2015	X 7.26.860 E Y 48.57.978 N	Si	SG13	1	1
Fosso delle Segarine	Segarine 02	700	05/11/2015	X 7.27.050 E Y 48.58.298 N	Si	SG01-SG12	12	12
Fosso Campo alla Sega	Campo alla Sega 01	700	16/10/2015	X 7.25.533 E Y 48.59.156 N	No	\	0	0
Fosso Campo alla Sega	Campo alla Sega 02	650	16/10/2015	X 7.25.924 E Y 48.59.148 N	Si	PS01-PS16	16	26
Fosso delle Macine	Macine 01	700	16/10/2015	X 7.25.665 E Y 48.59.094 N	No	\	0	0
Fosso di Fiumicino e Fosso di Ricopri	Fiumicino 01	890	22/10/2015	X 7.22.986 E Y 48.59.990 N	Si	FF11-FF20	10	11
Fosso di Fiumicino	Fiumicino 02	775	22/10/2015	X 7.22.749 E Y 48.60.452 N	Si	FF01-FF10	10	24
Bidente di Campigna	Villaneta 01	720	30/09/2015	X 7.21.791 E Y 48.61.474 N	Si	BC01-BC08	8	61
Bidente di Pietrapazza	Bidente di Pietrapazza (stazione di controllo)	560	12/11/2015	X 7.33.016 E Y 48.58.339 N	Si	CC01-CC06	5	6
Fosso Archiano d'Isola	Archiano d'Isola 01	1055	16/11/2015	X 7.30.302 E Y 48.54.160 N	Si	AI01-AI02	2	38
Fosso Archiano d'Isola	Archiano d'Isola 02	910	16/11/2015	X 7.31.052 E Y 48.53.636 N	Si	AI03-AI04	2	82
Fosso dell'Acqua Fredda	Acqua Fredda 01	770	16/11/2015	X 7.30.864 E Y 48.52.156 N	No	\	0	0
Totale	22						134	379

Tab.1 - Sforzo di campionamento espresso in corsi d'acqua visitati, punti stazione, numero di trote catturate e codici identificativi associati

Le quote altimetriche delle stazioni variano da un minimo di 650 mslm di Fosso Campo alla Sega a un massimo di 1055 mslm del Fosso Archiano d'Isola.

La vocazione ittica dei tratti indagati è risultata sempre a salmonidi esclusiva laddove presente fauna ittica.

In soli 2 casi è stato censito anche il Gambero di fiume (Fosso degli Altari e Fosso del Romiceto).

Buona parte dei corsi d'acqua monitorati risultano inoltre siti riproduttivi utilizzati dalla Salamandra pezzata, dalla Salamandrina di Savi e dalla Rana appenninica, rilevate in più di una occasione anche durante lo svolgimento della presente ricerca.

Operazioni di campo



Fig. 2 - Cattura attraverso pesca elettrica – Fosso degli Altari 05.11.2015

Le trote sono state catturate attraverso pesca elettrica, utilizzando l'elettropesca ELT 725 mp, spallabile e con potenza massima fino a 550 watt, su tratti della lunghezza pari ad almeno 200 metri lineari per ogni punto di rilievo (Figura 2). Dopo la cattura, ogni pesce è stato narcotizzato attraverso l'impiego di olio essenziale di chiodi di garofano e misurato in lunghezza. Su di un subcampione, corrispondente generalmente a tutti gli individui rinvenuti di lunghezza totale > di 18-20 cm. si è proceduto alla fotografia del pesce su entrambi i lati e al prelievo di una porzione di pinna adiposa da sottoporre ad analisi genetica. Alla fine delle operazioni tutti i pesci sono stati risvegliati attraverso insufflazione di aria all'interno dei vasconi di accoglienza e rilasciati nel corso d'acqua di provenienza avendo cura di distribuirli uniformemente.

Analisi del genotipo

Per la genotipizzazione è stata utilizzata la tecnica PCR associata ad RFLP. Il metodo si basa sulla presenza di un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) capace di distinguere alleli provenienti dal nord-europa (LDH-C1*90) da quelli provenienti dalla zona mediterranea (LDH-C1*100). L'analisi prevede una prima amplificazione tramite utilizzo di PCR (tecnica di amplificazione del DNA utilizzata

per aumentarne la concentrazione) di una zona interna al gene LDH-C1, contenente il polimorfismo, lunga circa 440bp (paia di basi). Dopo la PCR si applica la tecnica RFLP sull'amplificato che prevede l'uso di un enzima di restrizione (proteina capace di riconoscere una determinata sequenza di DNA e di eseguire un taglio sullo stesso) e la successiva migrazione del DNA risultante tramite l'utilizzo di elettroforesi su gel. L'enzima di restrizione utilizzato (BslI) è in grado di discriminare la sequenza di DNA dell'allele atlantico eseguendo un taglio su di esso e dividendolo in due frammenti, uno da circa 80bp e un altro da circa 360bp; al contrario l'enzima non è in grado di riconoscere la sequenza con polimorfismo presente sull'allele mediterraneo, lasciando un singolo frammento non tagliato da 440bp. Ogni trota presenta due alleli per il gene LDH-C1. Una stessa trota può presentare due alleli mediterranei, due alleli atlantici o un allele mediterraneo e uno atlantico; nei primi due casi gli individui verranno definiti come omozigoti mediterranei (autoctoni) o atlantici (alloctoni), nel terzo caso si parla invece di individui ibridi.

La migrazione del DNA tramite elettroforesi su gel permette di distinguere frammenti di DNA di lunghezza diversa. Il DNA viene caricato su gel, marcato con sonda, e fatto migrare all'interno di un campo elettrico. Il DNA più corto e più piccolo migrerà più velocemente rispetto a frammenti più grandi e pesanti. Il risultato porterà alla visualizzazione di bande indicanti un'alta concentrazione di DNA ad una specifica lunghezza. Nel caso dell'analisi in oggetto è possibile evidenziare tre bande; una a 440bp, una a 360bp e una ad 80bp. Un individuo omozigote mediterraneo non presenta taglio da parte dell'enzima BslI e dà quindi come risultato una singola banda a 440bp. Un omozigote atlantico presenta invece taglio su entrambi gli alleli e viene visualizzato su gel con la presenza di due bande, una a 360bp ed un'altra a 80bp. Un ibrido presenta entrambi gli alleli; per questo metà del genoma viene tagliato mentre l'altra metà resta intatto portando alla visualizzazione di tre bande, una a 440bp, una a 360bp ed una ad 80bp (Figura 3).

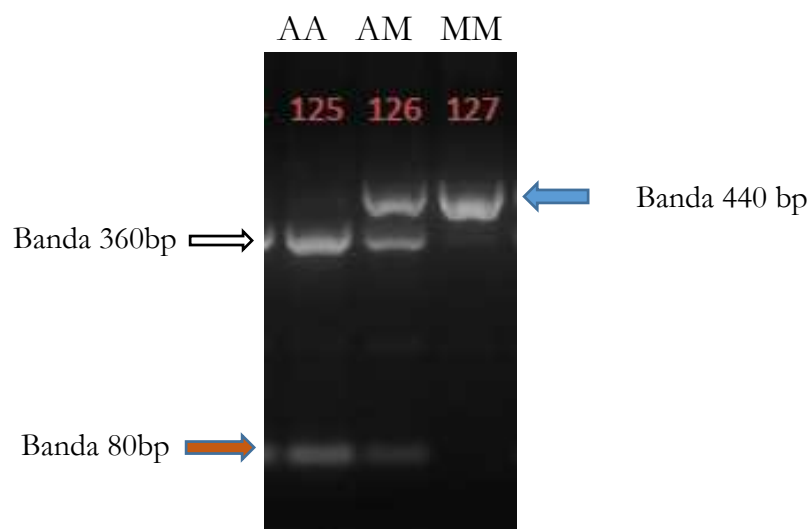


Fig. 3 – Risultato della migrazione elettroforetica con tutti i 3 genotipi rappresentati, omozigote atlantico AA (125), ibrido AM (126) e omozigote mediterraneo MM (127)

Per maggiore chiarezza è stato applicato su di un sub - campione anche il metodo Sanger per eseguire il sequenziamento completo dei frammenti.

Il metodo prevede l'estrazione del DNA proveniente dai frammenti visualizzati su gel, il sequenziamento tramite l'utilizzo di primer "forward" e "reverse" e la registrazione dei segnali di fluorescenza specifici derivanti dal legame dei nucleotidi nell'ampliamento della catena da parte della DNA polimerasi. La procedura restituisce un cromatogramma, la sua interpretazione, eseguita da software o da operatore, permette di risalire alla sequenza del DNA (Figura 4).

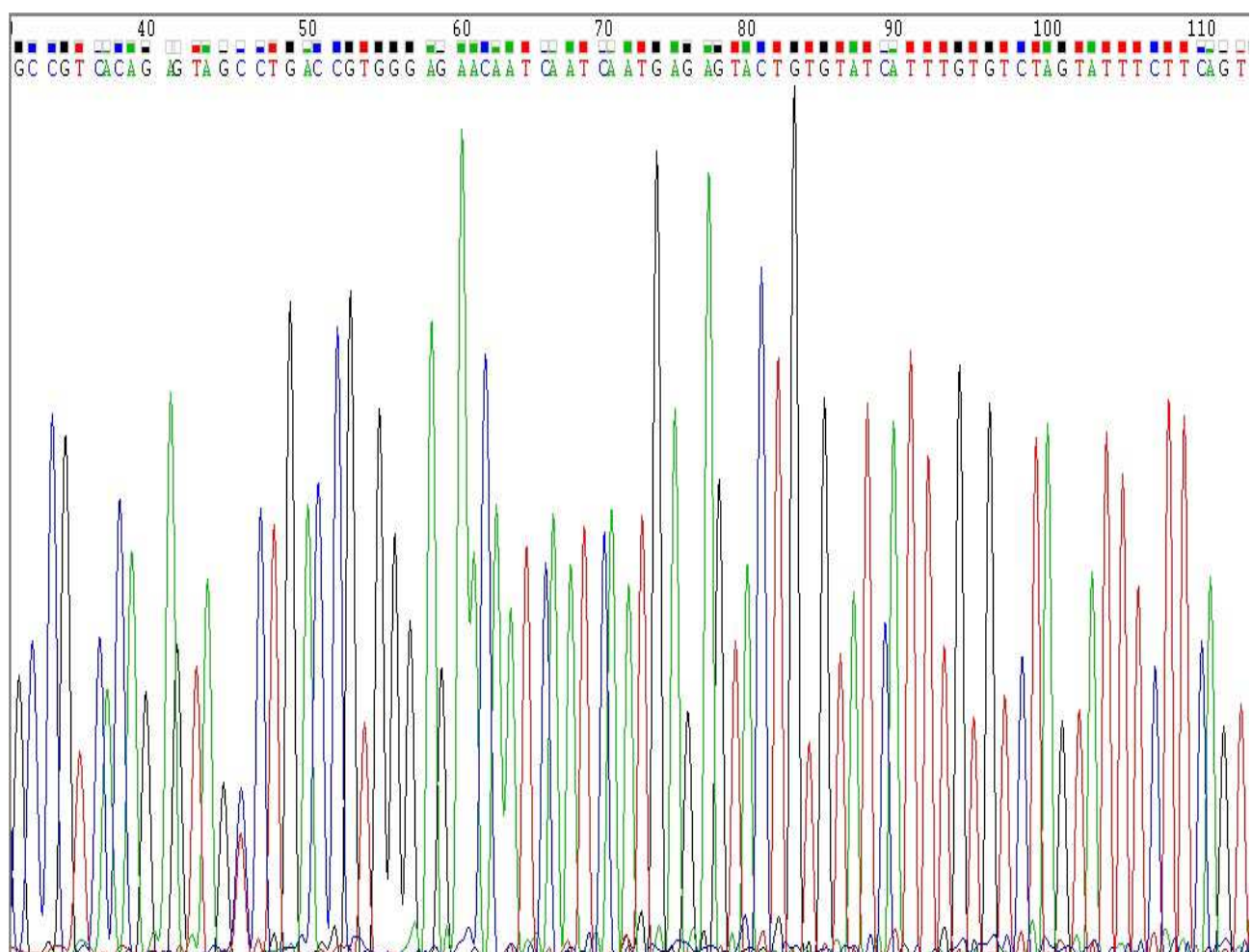


Fig. 4 – Cromatogramma, ogni picco corrisponde ad uno specifico nucleotide e viene indicato dal colore dello stesso.

Analisi statistica dei fenotipi

L'analisi riguardante le differenze fenotipiche fra le trote che all'analisi genetica sono risultate essere omozigoti mediterranee, ibride o omozigoti atlantiche è stata condotta impiegando la foto del lato destro di ogni individuo, dalla quale sono stati valutati un totale di 10 caratteri:

1. numero di macchie parr;
2. presenza di macchie parr sdoppiate;
3. numero di punti neri sul corpo;
4. numero di punti rossi sul corpo;
5. numero di punti neri sulla testa;
6. numero di punti rossi sulla testa;
7. numero di punti totali;
8. numero di punti rossi sulla linea laterale;
9. presenza di ocellatura bianca intorno ai punti rossi;
10. presenza/assenza e eventuale sdoppiamento della macchia pre-opercolare.

Tutti questi caratteri sono stati elaborati attraverso tecniche statistiche non parametriche in quanto la loro distribuzione non è rappresentata da una normale gaussiana. In particolare sono stati utilizzati i valori di mediana, quartili ed estremi per descrivere le variabili quantitative; frequenza modale e rappresentazioni grafiche per le qualitative. Per confrontare tra loro gruppi diversi sono invece stati utilizzati il test di Kruskal-Wallis e il test Rho di Spearman per le variabili quantitative; il test chi-quadro per le variabili qualitative.

Risultati

Dall'insieme dei rilievi effettuati è emersa una distribuzione frammentata della trota sia circa la sua presenza/assenza sia relativamente alla caratterizzazione genotipica come verrà descritto in seguito.

In 6 tratti su un totale di 22, non sono stati infatti censiti pesci e ciò riguarda le parti alte di alcuni torrenti dove invece sono state trovate trote più a valle (Campo alla Sega 01, Macine 01, Pianelli 01, Ponte Camera 01, Bocca 01 e Acquafredda 01). Un simile dato può essere probabilmente correlato ad un'assenza naturale delle trote in queste zone per lo più caratterizzate da elevate pendenze e basse portate. A questo si accompagna il fatto che in alcuni casi le strutture di popolazione non erano correttamente bilanciate. Popolazioni strutturate con buona continuità su almeno le prime 4 classi di età e con novellame presente sono risultate essere quelle di Campo alla Sega 02, Bidente di Pietrapazza 01,

Bidente di Pietrapazza 02, Bidente di Pietrapazza 03, Bucaccia 01, Bocca 02 e Archiano d'Isola 01 e 02. Non ben articolate e con novellame assente o sporadico quelle di Fiumicino 01, Fiumicino 02, Villaneta 01, Segarine 01, Segarine 02, Altari 01 e Romiceto 01; in queste fra l'altro è risultato quasi esclusivo il genotipo esotico.

A livello di genoma l'applicazione della tecnica PCR-RFLP ha dato risultati chiari per la maggior parte dei campioni analizzati:

- i campioni denominati ER04, SG05, PS09, PS14, PS15, PS16, FF01, FF07, FF20 non sono risultati amplificabili in PCR, probabilmente per una bassa concentrazione di DNA nel campione;
- i campioni denominati TR, AB, SG (con l'esclusione di SG13 che presenta genotipo ibrido), FF, BC, AI e provenienti dal Fosso della Bucaccia, Fosso degli Altari, Fosso delle Segarine, Fosso del Romiceto, Fosso di Fiumicino, Bidente di Campigna e Fosso Archiano d'Isola presentano solo individui omozigoti atlantici con chiare bande a 360bp e a 80bp e la totale assenza della banda a 440bp;
- i campioni denominati PS, provenienti dal Fosso Campo alla Sega, presentano genotipo vario con prevalenza di individui ibridi (PS01, PS02, PS03, PS07, PS08, PS11, PS12, PS13), alcuni omozigoti atlantici (PS04, PS05, PS10) e un solo individuo ritenuto "dubbio", possibile omozigote mediterraneo, ma prudenzialmente valutato come ibrido (PS06);
- in tutti i campioni provenienti dall'alto bacino idrografico del Bidente di Pietrapazza (ER, EE, UF, CC) è presente l'allele mediterraneo *100 con la sola eccezione del campione UF08 che presenta genotipo omozigote atlantico. Molti di questi risultano essere però di difficile attribuzione per la presenza di due bande, una a 440bp e una a 360bp. Tutti gli altri campioni, escluso UF08 presentano invece la classica struttura a 3 bande riferibile agli individui ibridi.

La corsa elettroforetica effettuata sui campioni "dubbi" senza eseguire la procedura RFLP ha mostrato la presenza della banda a 360bp, derivante quindi non da taglio enzimatico, ma da amplificazione aspecifica di PCR.

Il sequenziamento eseguito sui frammenti "uncut" (non trattati con enzima di restrizione) del campione a 440bp e a 360bp ha mostrato infatti l'avvenuta amplificazione del gene LDH-C1 per il frammento da 440bp. Tale frammento presenta quasi perfetta identità con le sequenze presenti in database per il gene LDH-C1 verificato tramite BLASTn.

A titolo di esempio, osservando il sito polimorfico sulla sequenza ottenuta tramite primer forward nel cromatogramma riferito alla trota con codice ER01 è possibile osservare un singolo picco in posizione 322 a definire la presenza di una A con la mancanza del picco per la G. Ciò starebbe ad indicare un genotipo *100/*100 (Figura 5).

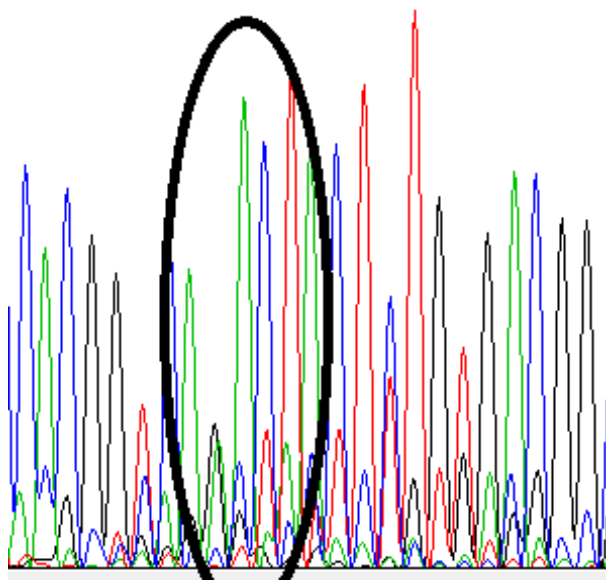
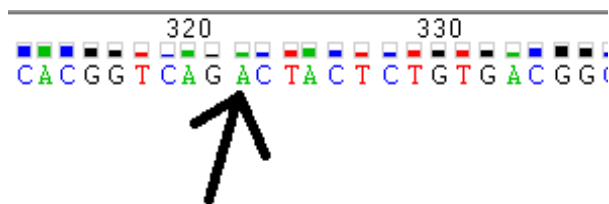


Fig. 5 – Trota ER01 - Cromatogramma ottenuto da primer forward in posizione 322, presenza di un solo picco per A.

Ma osservando lo stesso sito polimorfico ottenuto con primer reverse è possibile osservare due picchi per C e T nella posizione 46 ad indicare un genotipo di tipo *90/*100 (Figura 6).

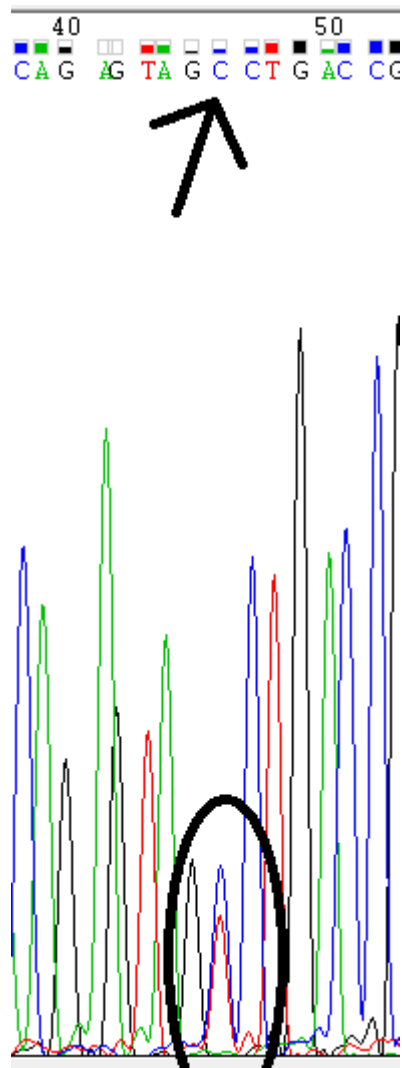


Fig. 6 – Cromatogramma ottenuto da primer reverse in posizione 46, presenza di due picchi per T e C.

La trota in questione è pertanto da ritenersi ibrida.

Il frammento a 360bp è risultato invece essere un aspecifico con una buona identità per una zona a microsatelliti del genoma di trota.

L'analisi di omologia eseguita tra le sequenze non ha dato alcun risultato affermando una totale mancanza di correlazione tra i due frammenti.

Sulla base di queste considerazioni è stato possibile associare ad ogni trota analizzata il genotipo corrispondente (Tabella 2).

sottobacino idrografico	stazione	Popolazione strutturata si/no	n. campioni analizzati	genotipo		genotipo	
				n. trote mediterranee	n. trote ibride	n. trote atlantiche	n. trote indeterminate
Bidente di Campigna	Villaneta 01	no	8	0	0	8	0
	Fiumicino 01	no	10	0	0	9	1
	Fiumicino 02	no	10	0	0	8	2
Bidente di Ridracoli	Campo alla Sega 01	assenza di pesci	0				
	Campo alla Sega 02	si	16	0	9	3	4
	Macine 01	assenza di pesci	0				
	Altari-Bucaccia 02	no	13	0	0	13	0
	Bucaccia 01	si	8	0	0	8	0
	Segarine 01	no	1	0	1	0	0
	Segarine 02	no	12	0	0	11	1
	Pianelli 01	assenza di pesci	0				
	Romiceto 01	no	10	0	0	10	0
	Ponte Camera 01	assenza di pesci	0				
	Bidente di Pietrapazza	Bidente Pietrapazza 01	si	8	5	3	0
Bidente Pietrapazza 02		si	9	5	4	0	0
Bidente Pietrapazza 03		si	10	7	2	0	1
Bidente di Pietrapazza stazione di controllo			5	3	2	0	0
Bocca 01		assenza di pesci	0				
Bocca 02		si	10	4	5	1	0
Archiano d'Isola	Archiano d'Isola 01	si	2	0	0	2	0
	Archiano d'Isola 02	si	2	0	0	2	0
	Acqua Fredda 01	assenza di pesci	0				
Totale			134	24	26	75	9

Tab. 2 - Associazione del genotipo alle trote catturate suddivise per sottobacino idrografico e corso d'acqua di provenienza; trote con genotipo indigeno colore azzurro, ibride colore giallo e alloctone arancio.

Dalla Tabella 2 appare chiaro come le uniche trote indigene siano presenti nella porzione alta del Torrente Bidente di Pietrapazza e suoi affluenti. Corsi d'acqua o tratti di essi, inclusi o confinanti con la Riserva Integrale di Sasso Fratino, nella quale risultano interdetti i ripopolamenti con trotelle di origine zootecnica fin dal 1956 sono, a sorpresa, abitati da popolazioni costituite in via esclusiva o prevalente da trote alloctone. Anche altri torrenti inseriti in Riserve Biogenetiche e di difficile accessibilità come la

parte alta del Fosso del Fiumicino e il Torrente Bidente di Campigna sono risultati occupati dalla trota alloctona così come, sul versante toscano, il Fosso Archiano d'Isola.

A livello fenotipico il test di Kruskal-Wallis è stato applicato su tutte le trote dopo averle divise in gruppi differenti sulla base del genotipo ottenuto attraverso le analisi genetiche. Questo test restituisce come risultato un valore di p, detto p-value, che indica la probabilità che le due popolazioni siano le stesse. Con un p-value minore di 0.05 l'ipotesi di uguaglianza tra le popolazioni viene rigettata con un rischio di falso positivo del 5%, e viene evidenziata una differenza per il carattere esplorato.

Il test di Kruskal-Wallis è stato inoltre eseguito prendendo in considerazione le sole trote del Bidente di Pietrapazza e quelle della stazione di controllo (quest'ultima però, presentando soli 5 individui, risente di una bassa attendibilità statistica).

Nella tabella seguente (Tabella 3) sono rappresentati i p-value ottenuti tramite l'applicazione del test di Kruskal-Wallis.

Test di Kruskal-Wallis			
Carattere	Gruppo 1	Gruppo 2	p-value
N° macchie parr	MM	AM	0.37
	MM	AA	0.00076
	AM	AA	0.197
	MM(PP)	AM(PP)	0.199
	MM(PP)	CC	0.034
N° punti totali	MM	AM	0.919
	MM	AA	0.281
	AM	AA	0.339
	MM(PP)	AM(PP)	0.125
	MM(PP)	CC	0.01
N° punti rossi sul corpo	MM	AM	0.625
	MM	AA	0.089
	AM	AA	0.0075
	MM(PP)	AM(PP)	0.225
	MM(PP)	CC	0.0024
N° punti neri sul corpo	MM	AM	0.982
	MM	AA	0.106
	AM	AA	0.346
	MM(PP)	AM(PP)	0.129
	MM(PP)	CC	0.016
N° punti rossi sulla testa	MM	AM	1
	MM	AA	1
	AM	AA	1

	MM(PP)	AM(PP)	1
	MM(PP)	CC	1
N° punti neri sulla testa	MM	AM	0.322
	MM	AA	0.0002
	AM	AA	0.021
	MM(PP)	AM(PP)	0.068
	MM(PP)	CC	0.296
N° punti rossi sulla linea laterale	MM	AM	0.991
	MM	AA	0.33
	AM	AA	0.262
	MM(PP)	AM(PP)	0.507
	MM(PP)	CC	0.042

Tab. 3 – p-value dei test eseguiti. MM=omozigoti mediterranei. AM=ibridi. AA=omozigoti atlantici. MM(PP)=omozigoti mediterranee di Pietrapazza. AM(PP)=ibridi di Pietrapazza. CC=stazione di controllo.

Il test Rho di Spearman è stato utilizzato per verificare una eventuale correlazione tra il numero di punti rossi e numero di punti neri presenti sul corpo in ogni gruppo.

Il test restituisce un valore denominato indice di Spearman.

Tale valore può ritrovarsi in un intervallo compreso tra -1 e 1, più si avvicina agli estremi, più i dati si trovano in correlazione tra loro. Un valore di 0 indica una totale mancanza di correlazione.

I valori ottenuti mostrano che fra numero di punti rossi e numero di punti neri non vi è correlazione significativa all'interno di ogni gruppo (Tabella 4).

Test Rho di Spearman			
Caratteri	Gruppo	Indice di Spearman	p-value
N° di punti rossi e N° di punti neri	MM	0.382	0.0793
	AM	0.323	0.1333
	AA	-0.305	0.0078

Tab. 4 – Valori degli indici. MM=omozigoti mediteranei. AM=ibridi. AA=omozigoti atlantici.

Il test del chi-quadro per il confronto fra gruppi restituisce, analogamente al test di Kruskal-Wallis, un p-value che indica la presenza di una differenza statisticamente rilevante nei caratteri analizzati. Nella tabella seguente si riportano i p-value calcolati per i diversi caratteri.

Anche in questo caso il chi-quadro è stato inoltre eseguito prendendo in considerazione le sole trote dell'alto Bidente di Pietrapazza e quelle della stazione di controllo (Tabella 5).

Test del chi-quadro			
Carattere	Gruppo 1	Gruppo 2	p-value
Macchie parr sdoppiate	MM	AM	0.9031
	MM	AA	0.4865
	AM	AA	0.3910
	MM(PP)	AM(PP)	0.4857
	MM(PP)	CC	0.0912
Ocellatura bianca	MM	AM	0.3957
	MM	AA	0.0014
	AM	AA	0.0479
	MM(PP)	AM(PP)	0.8695
	MM(PP)	CC	0.0176
Macchia pre-opercolare	MM	AM	0.0360
	MM	AA	0.000017
	AM	AA	0.2072
	MM(PP)	AM(PP)	0.4074
	MM(PP)	CC	0.0212

Tab. 5 – p-value dei test eseguiti. MM=omozigoti mediterranei. AM=ibridi. AA=omozigoti atlantici. MM(PP)=omozigoti mediterranee dell'alto Pietrapazza. AM(PP)=ibridi dell'alto Pietrapazza. CC=stazione di controllo (Bidente di Pietrapazza quota 560 mslm).

I caratteri analizzati che mostrano una omogeneità su tutti i tre genotipi rinvenuti sono:

1. la sdoppiatura delle macchie parr
2. il numero di punti rossi sulla linea laterale
3. la totale assenza di macchie rosse sulla testa
4. il numero di macchie nere sul corpo
5. il numero di macchie nere totali

Nel nostro caso pertanto tali caratteri non risultano essere buoni indicatori del genotipo associato.

Statisticamente rilevante è risultato invece il carattere **numero di macchie/punti rossi presenti sul corpo** confrontando le trote ibride con le atlantiche ($p=0.0075$); mentre è risultato un valore borderline nel confronto tra soggetti mediterranei e soggetti atlantici ($p=0.089$). Tale differenza si presenta sottoforma di una minore abbondanza di macchie rosse sul corpo nelle popolazioni ibride e mediterranee rispetto alle popolazioni atlantiche (Figura 7); dato che sorprende in quanto in bibliografia è generalmente riportato l'esatto contrario.

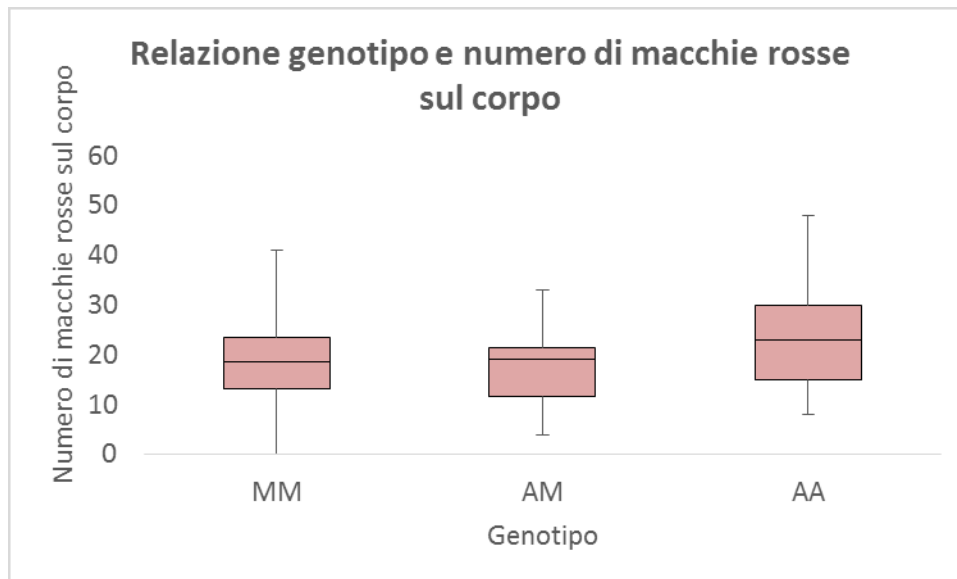


Fig. 7 – Relazione tra il genotipo e il numero di punti rossi presenti sul corpo

Altra differenza significativa è stata ritrovata nel **numero di macchie parr** tra le trote atlantiche e mediterranee ($p=0.00076$). Le mediterranee presentano generalmente un numero più alto di macchie parr rispetto alle atlantiche (Figura 8); tale differenza non risulta però statisticamente rilevante in relazione agli ibridi.

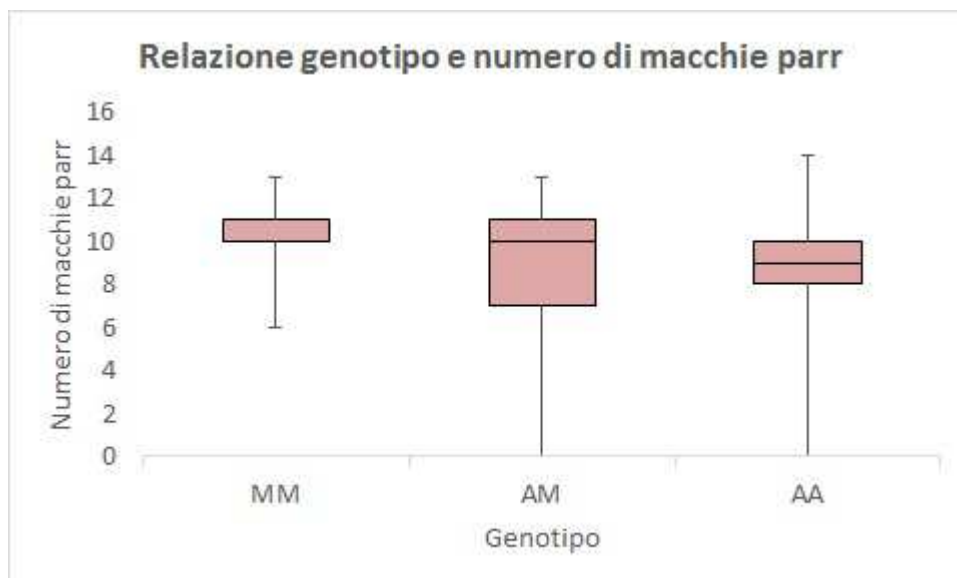


Fig. 8 – Relazione tra genotipo ed il numero di macchie parr

Il numero di macchie/punti neri sulla testa presenta un valore di p molto basso tra le popolazioni mediterranee e atlantiche ($p=0.0002$) e anche per le popolazioni ibride e atlantiche ($P=0.021$).

Le atlantiche presentano un numero di punti significativamente minore rispetto agli altri due genotipi (Figura 9).

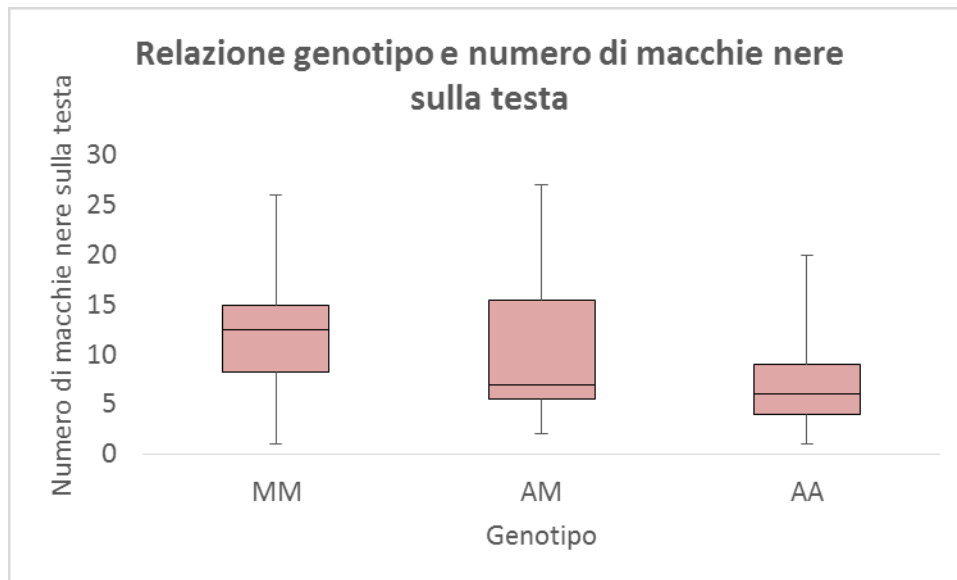


Fig. 9 –Relazione tra il genotipo ed il numero di punti neri sulla testa

Fra le variabili qualitative **l'ocellatura bianca attorno ai punti rossi** è significativamente meno presente nelle trote mediterranee ($p=0.0014$) e ibride ($p=0.0479$) rispetto alle atlantiche.

Nonostante ciò l'assenza dell'ocellatura bianca resta un carattere piuttosto raro con frequenza modale massima del 23% nelle mediterranee (Figura 10).

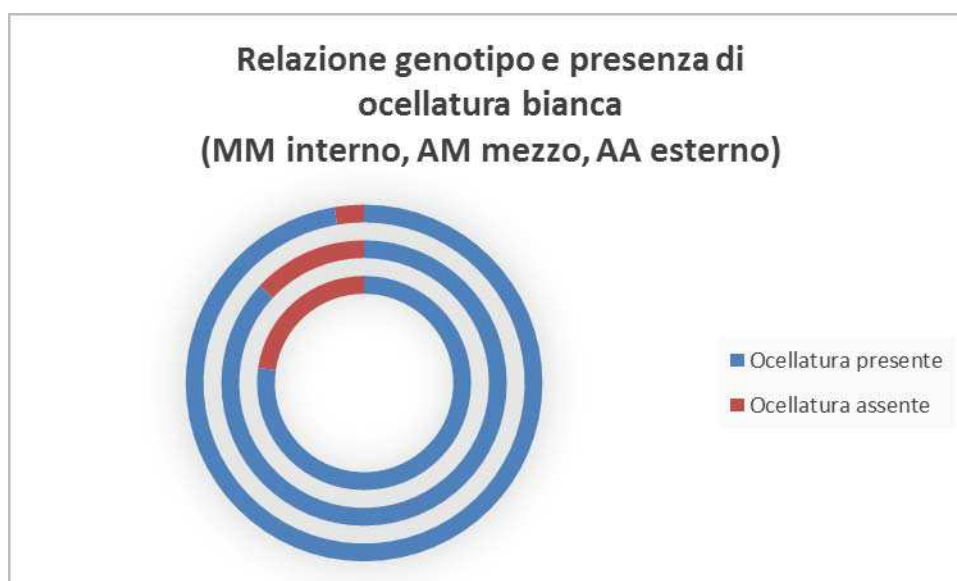


Fig. 10 – Relazione tra genotipo e presenza di ocellatura bianca attorno ai punti rossi; il cerchio interno rappresenta il genotipo mediterraneo, il centrale l'ibrido e l'esterno l'atlantico.

Ultima caratteristica che ha mostrato una differenza statisticamente significativa è **la presenza/assenza della macchia pre-opercolare** tra le “mediterranee” e le “atlantiche” ($p=0.000017$) e “mediterranee” e “ibride” ($p=0.0360$). Risulta essere l'unico carattere possibilmente distintivo tra popolazione ibrida e omozigote mediterranea. Le trote mediterranee hanno sempre la macchia pre-opercolare e questa risulta essere sdoppiata con una frequenza del 59%. Nelle trote ibride tale sdoppiamento si ritrova con frequenza del solo 26% (Figura 11); i test eseguiti sulla sola popolazione del Bidente di Pietrapazza non hanno però mostrato una differenza rilevante ($p=0.4074$).

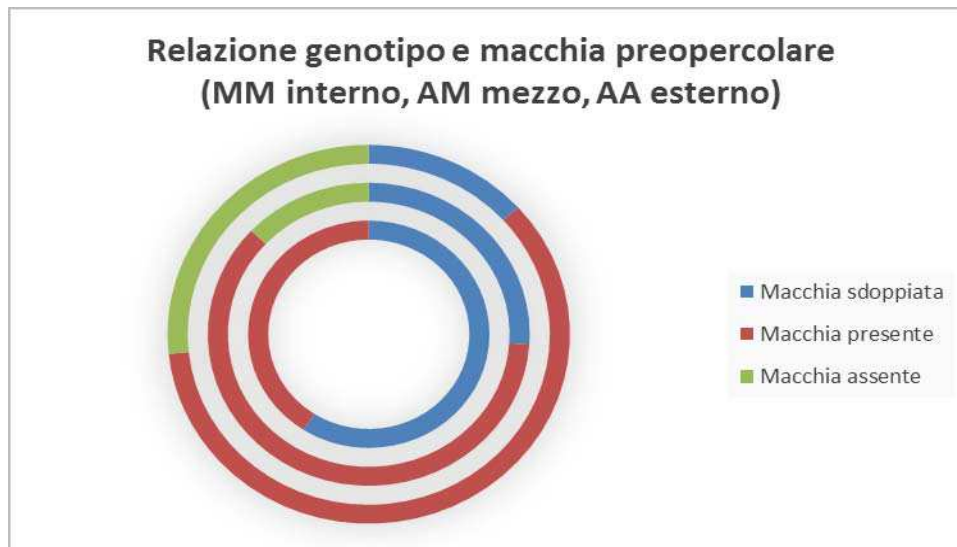


Fig. 11 – Relazione fra genotipo e presenza e sdoppiamento della macchia preopercolare. Il cerchio interno rappresenta il genotipo mediterraneo, il centrale l'ibrido e l'esterno l'atlantico.

I test eseguiti sulla popolazione di omozigoti mediterranee e di ibride del Bidente di Pietrapazza non hanno mostrato per nessuna caratteristica un p -value inferiore a 0.05 con un solo valore borderline $p=0.068$ per il numero di macchie nere presenti sulla testa.

Il confronto tra le trote mediterranee trovate sul Bidente di Pietrapazza alto (Bidente di Pietrapazza 01,02,03 e Fosso della Bocca) con le trote mediterranee trovate nella stazione di controllo mostrano invece due popolazioni molto diverse per ben 8 caratteri indicando una evidente differenza fenotipica tra questi due ceppi. E' bene ricordare al proposito come queste ultime, catturate nella stazione di controllo (Bidente di Pietrapazza, quota 560), provengano probabilmente da un allevamento di Reggio-Emilia che produce trote mediterranee che vengono acquistate dalla Provincia di Forlì-Cesena e liberate nei corsi d'acqua vocati anche all'interno del Parco Nazionale. Tali trote, pur essendo mediterranee, presenterebbero grandi differenze fenotipiche e probabilmente genotipiche con le trote indigene locali. I ripopolamenti con trote di ceppo mediterraneo di provenienza zootecnica, a parte 3 singoli casi esterni ai confini del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, hanno interessato l'area protetta

solamente a partire dal 2014: tutte le aree indagate nella presente ricerca non risultano comunque interessate da questi recenti ripopolamenti.

In sintesi i caratteri che mostrano differenze significative fra genotipi mediterranei e atlantici sono:

1. numero di punti rossi presenti sul corpo (minori nelle mediterranee)
2. numero di macchie parr (maggiori nelle mediterranee)
3. numero di punti neri sulla testa (maggiori nelle mediterranee)
4. ocellatura bianca attorno ai punti rossi (assente o poco marcata nelle mediterranee)
5. presenza della macchia preopercolare (sempre presente nelle mediterranee, spesso sdoppiata)

Nelle figure dalla n. 12 alla n. 25 vengono proposti alcuni individui, fotografati distesi e addormentati sul foglio di misura, correlati al genotipo di appartenenza.



Fig. 12 - Trota risultata di genotipo omozigote mediterraneo per il locus nucleare LDH-C1 - Bidente di Pietrapazza, stazione di controllo quota 560 (probabile provenienza dall'allevamento di trota fario mediterranea di Reggio-Emilia)



Fig. 13 - Trota risultata di genotipo omozigote mediterraneo per il locus nucleare LDH-C1 - Bidente di Pietrapazza 01



Fig.14 - Trota risultata di genotipo omozigote mediterraneo per il locus nucleare LDH-C1 - Bidente di Pietrapazza 01

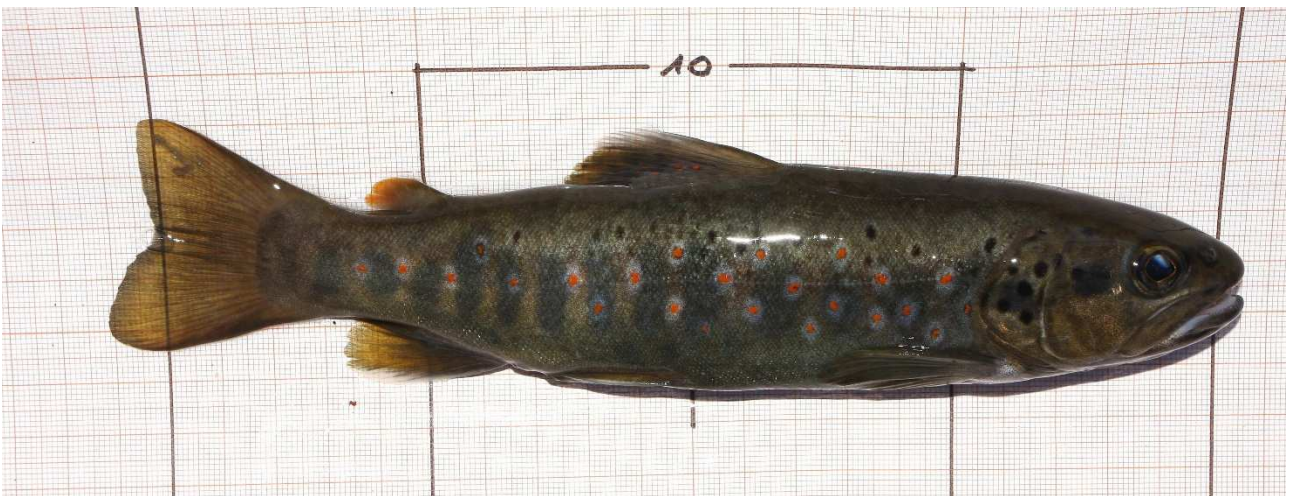


Fig.15 - Trota risultata di genotipo ibrido per il locus nucleare LDH-C1 - Bidente di Pietrapazza 02

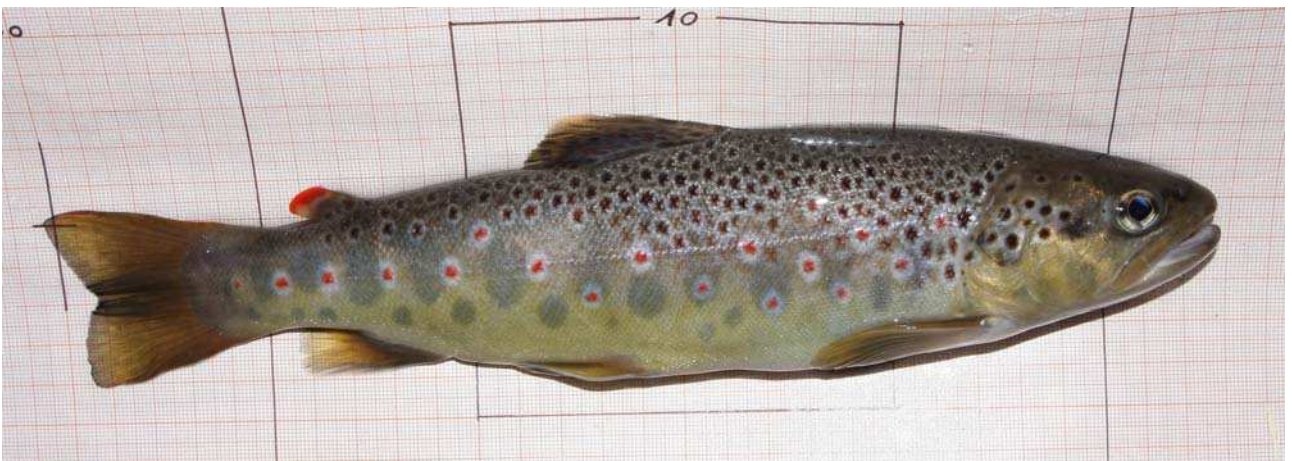


Fig. 16 - Trota risultata di genotipo omozigote atlantico per il locus nucleare LDH-C1 - Fosso del Romiceto



Fig.17 - Trota risultata di genotipo omozigote mediterraneo per il locus nucleare LDH-C1 - Bidente di Pietrapazza 01



Fig. 18 - Trota risultata di genotipo omozigote mediterraneo per il locus nucleare LDH-C1 - Bidente di Pietrapazza 02



Fig. 19 - Trota risultata di genotipo omozigote mediterraneo per il locus nucleare LDH-C1 - Bidente di Pietrapazza 03



Fig. 20 - Trota risultata di genotipo ibrido per il locus nucleare LDH-C1 – Fosso della Bocca



Fig. 21 - Trota risultata di genotipo ibrido per il locus nucleare LDH-C1 – Fosso della Bocca



Fig. 22 - Trota risultata di genotipo ibrido per il locus nucleare LDH-C1 – Fosso Campo alla Sega



Fig. 23 - Trota risultata di genotipo omozigote atlantico per il locus nucleare LDH-C1 - Fosso degli Altari



Fig. 24 - Trota risultata di genotipo omozigote atlantico per il locus nucleare LDH-C1 - Fosso di Fiumicino



Fig. 25 - Trota risultata di genotipo omozigote atlantico per il locus nucleare LDH-C1 – Bidente di Campigna

Discussione

A livello molecolare tutti i risultati che indicano genotipi riferibili a omozigoti atlantici non lasciano spazio a dubbi; allo stesso modo l'identificazione degli ibridi con presenza di tre bande risulta essere piuttosto chiara. Le situazioni a due bande, 440bp e 360bp, risultano invece essere dubbie e necessitano di interpretazione.

L'esecuzione della migrazione "uncut" e il successivo sequenziamento hanno provato la presenza a 360bp di una banda aspecifica derivante da amplificazione di PCR. Questo, unito alla valutazione dell'intensità di segnale nel confronto fra ibridi a tre bande e situazioni a due bande atipiche che è maggiore nei secondi a 440bp (Figura 26), porta a classificare le situazioni a due bande atipiche come individui omozigoti mediterranei in cui la banda a 360bp è costituita dall'aspecifico di PCR e la mancanza della banda a 80bp è dovuta al non avvenuto taglio enzimatico.

La riduzione di intensità di segnale sugli individui ibridi si ipotizza dovuta alla minore concentrazione di DNA nella banda a 440bp, poichè distribuita anche sulle bande a 360bp e 80bp.

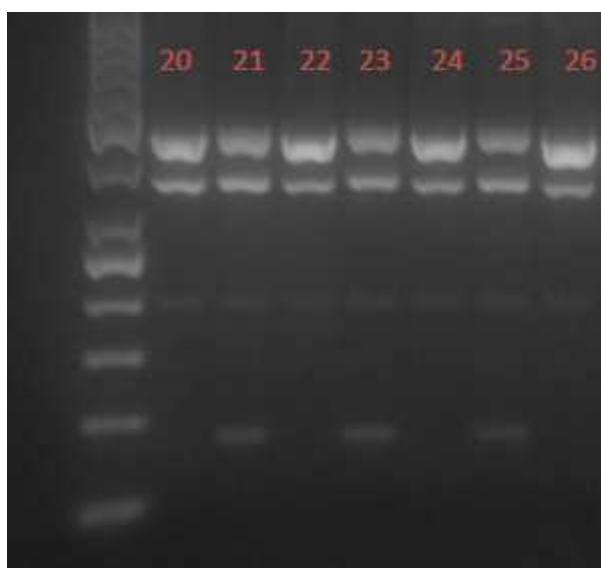


Fig. 26 – Maggiore intensità di segnale a 440bp per le situazioni a due bande atipiche (20-22-24-26) rispetto agli ibridi a 3 bande (21-23-25)

Tale ipotesi può essere ulteriormente validata dall'applicazione del principio di Hardy-Weinberg che stabilisce la frequenza di genotipi omozigoti e ibridi sulla base delle frequenze alleliche.

Prendendo come riferimento i campioni ER11-18 ed EE01-09 (stazioni quasi contigue, denominate Pietrapazza 01 e Pietrapazza 02), prelevati da aree ecologicamente connesse, senza flusso genico proveniente da monte e senza mutevoli pressioni selettive e interpretando la situazione a due bande atipiche come omozigoti mediterranei, possiamo evidenziare la presenza di 10 individui omozigoti mediterranei, il 58%, e di 7 individui ibridi, il 41%.

Definendo $q^2=0.58$, ovvero la frequenza di genotipo omozigote mediterraneo, ed applicando il principio, otteniamo delle abbondanze teoriche del 36% per il genotipo ibrido e del 5% per il genotipo omozigote atlantico, corrispondenti con buona approssimazione ai risultati sperimentali, con frequenza allelica ipotizzata del 76% per l'allele mediterraneo e del 24% per l'allele atlantico.

Ipotizzando invece la situazione a due bande atipiche come genotipo ibrido, il campione sarebbe formato dal 100% di individui ibridi; il principio di Hardy-Weinburg afferma che una situazione a massima ibridazione presenti un 50% di ibridi e un 25% per ogni omozigote: tale risultato sarebbe altamente al di fuori del modello teorico e altamente improbabile.

Va comunque considerata la possibilità che alcuni dei risultati a due bande atipiche potrebbero essere situazioni ibride a tre bande in cui la banda a 80bp è andata persa o in cui questa si trovi a bassissima intensità di segnale.

A livello fenotipico i dati derivati dall'analisi statistica mostrano come sia difficile identificare le trote di ceppo atlantico e mediterraneo attraverso la sola analisi differenziale di più caratteri della livrea.

Va sottolineato infatti come nessuno dei caratteri presi in considerazione sia risultato esclusivo di un ceppo piuttosto che di un altro e che le aree di sovrapposizione fra questi siano molte; la sola analisi fenotipica non sembra pertanto in alcun modo poter definire con certezza il genotipo che necessita quindi di essere identificato tramite metodi molecolari.

Inoltre le trote ibride risultano essere per tutti i caratteri sovrapponibili alle trote omozigoti mediterranee rendendo estremamente complesso il differenziamento di questi due "ceppi".

Conclusioni

L'allele mediterraneo è presente in soli 2 corsi d'acqua da noi indagati (escludendo l'unico esemplare ibrido rinvenuto in Segarine 01): nel Fosso Campo alla Sega e nella porzione alta del Bidente di Pietrapazza, all'interno dei quali risiedono, fra l'altro, popolazioni ben strutturate di Trota di torrente.

Applicando il principio di Hardy-Weinberg per il Fosso Campo alla Sega viene calcolata una frequenza allelica teorizzata del 40% per l'allele mediterraneo contro il 76% del Bidente di Pietrapazza.

Anche a livello fenotipico è possibile discriminare le trote del bacino dell'alto Bidente di Pietrapazza (Fosso del Rovino/Campanacce e Fosso delle Ranocchie) da tutte le altre presenti nei diversi corsi d'acqua da noi visitati e che inoltre sono risultate differire nei caratteri della livrea anche dalle "mediterranee" di probabile origine zootecnica provenienti da un allevamento di Reggio-Emilia e riscontrate nella "stazione di controllo".

In definitiva la parte alta del Bidente di Pietrapazza risulta essere, rispetto a tutti i corsi d'acqua indagati, la porzione meno alterata dalle passate pratiche di ripopolamento con trote di origine atlantica e al momento si candida come l'unico tratto potenzialmente idoneo per essere impiegato in eventuali azioni

di conservazione da mettere in campo al fine di recuperare la trota nativa dell'Appennino Tosco-Romagnolo o per meglio dire ciò che ne rimane.

Tuttavia è da considerare che tale popolazione a salmonidi non si trovi in “purezza” e che, anche le trote risultate omozigoti mediterranee per il locus LDH-C1 possano essere introgresse dal genoma atlantico su altri loci.

Per accertare ciò, occorrerebbe eseguire ulteriori analisi, che coinvolgano anche il DNA mitocondriale e più locus nucleari, cosiccome effettuato recentemente in altri studi sulle trote appenniniche.

Simili verifiche si rendono necessarie ad esempio per la scelta dei riproduttori da cui ottenere progenie indigene per eventuali progetti di ripopolamento da sviluppare in ambito locale.

Ipotesi operative per il prossimo futuro

Secondo le attuali conoscenze negli Appennini centro-settentrionali le stazioni di naturale insediamento della Trota fario di ceppo mediterraneo sono localizzate molto più a nord (Appennino Emiliano Modenese-Parmense) e molto più a sud (monti Sibillini), pertanto la salvaguardia del nucleo disgiunto dell'alto Bidente assume un elevato significato conservazionistico e sicuramente aggiunge un contributo notevole al mantenimento della biodiversità ittica del nostro Paese.

A seguito della eccezionale scoperta di questo endemita e della rilevanza scientifica connessa alla presenza di una popolazione relitta sufficientemente articolata e strutturata, accertata nell'alto corso del Bidente di Pietrapazza e suoi affluenti (fosso della Bocca, fosso del Rovino/Campanacce e fosso delle Ranocchie), si propongono di seguito alcune azioni da intraprendere al fine di acquisire maggiori e ulteriori informazioni biologiche, ecologiche e genetiche sulla comunità superstite di Trota fario indigena nell'intento di attuare specifiche e mirate azioni di potenziamento e di incremento numerico di questo salmonide e di protezione del suo habitat elettivo e riproduttivo.

- Istituire un divieto di pesca assoluto (es. Z.P.I.) nell'area considerata (alto Bidente di Pietrapazza e suoi affluenti) almeno a partire (da valle quindi) dalla cascata naturale sul Bidente di Pietrapazza e localizzata presso Eremo nuovo, poche decine di metri a monte del ponticello pedonale su sentiero n° 205 (coord. UTM WGS 84 32N: 7.32.885 est; 48.56.634 nord).
- Vietare ogni intervento di immissione/ripopolamento, anche se condotto con trote di ceppo mediterraneo, nel tratto interessato dalla naturale presenza della popolazione relitta e quindi, in via precauzionale, nell'alto Bidente di Pietrapazza (e suoi affluenti) a partire dalla sezione fluviale coincidente con i ruderi di Campo della Sega (coord.. UTM WGS 84 32N: 7.32.689 est; 48.57.564 nord) e verso monte.
- Rilevare la struttura di popolazione ittica del tratto interessato (alto Bidente di Pietrapazza) mediante stazioni di campionamento riferite all'asta principale e ai suoi affluenti (fosso della Bocca, fosso del Rovino/Campanacce, fosso delle Ranocchie, fosso dei Segoni).

- Mappare la continuità ecologica dell'alto Bidente di Pietrapazza e suoi affluenti (fosso della Bocca, fosso del Rovino/Campanacce, fosso delle Ranocchie, fosso dei Segoni).
- Effettuare un campionamento genetico di almeno 50 soggetti (limitatamente all'alto Bidente di Pietrapazza e suoi affluenti) non solo per il DNA nucleare riferito al locus LDH-C1, ma anche per il DNA mitocondriale e per altri loci altamente significativi per verificare o meno la possibile introgressione della popolazione relitta.
- Provvedere alla rimozione dei soggetti risultati palesemente riconducibili al ceppo atlantico: previo elettropesca verrebbero identificati gli esemplari già ascritti all'uno o all'altro genotipo così come accertato dal primo screening oggetto della presente report.

Bibliografia essenziale

- M. Baratti, F. Nonnis Marzano, S. Fratini, A. Piccinini, T. Patarnello, F. Dessi-Fulgheri, Gilberto Gandolfi: Caratterizzazione genetica delle popolazioni di Trota fario del Parco delle Foreste Casentinesi. *Biologia Ambientale* – 2006, 20 (1): 237-240. Atti 10° Convegno Nazionale A.I.I.A.D., Montesilvano (PE), 2-3 aprile 2004.
- I. Borroni, S. Trasforini, M. Bardazzi, G. Gentili: Caratterizzazione fenotipica e genetica delle popolazioni di trota del Rio Baracca (bacino dell'Orba).
- V. Caputo: Ricerche sulla biodiversità della trota fario (*Salmo trutta* L., 1758) nella Provincia di Pesaro e Urbino e nelle Marche. *Quaderni dell'Ambiente* n.15/2003. Provincia di Pesaro e Urbino.
- P. Gibertoni, M. Penserini: Studi ittologici, caratterizzazione genetica, selezione di parco riproduttori e produzione di novellame autoctono per le acque di Lunigiana (MS) e media valle Serchio (LU). *Fishery' Science Journal*. Anno 1 N. 0 – novembre 2010.
- E. Marconato, V. Ketmaier, M.A. Riva, T. Busatto, G. Maio, S. Salviati, F. Recchia, A. Cataloni, A. Basilavecchia, P. Difelice: Identificazione, conservazione e recupero del popolamento autoctono di trota di torrente nella Provincia di Pescara. *Biologia Ambientale* – 2006, 20 (1): 109 - 115. Atti 10° Convegno Nazionale A.I.I.A.D., Montesilvano (PE), 2-3 aprile 2004.
- M. Penserini, F. Nonnis Marzano, G. Gandolfi, M. Maldini, E. Marconato, P. Gibertoni: Fenotipi della trota mediterranea: metodologia molecolare combinata a selezione morfologica per l'identificazione di esemplari autoctoni. *Quaderni ETP* | 34 | 2006 |.
- Zaccanti et al.: Struttura, dinamica e genetica di popolazioni di trota di torrente, *Salmo trutta trutta*, nelle acque di categoria D della Provincia di Forlì-Cesena, 1999 -2000. *Tutela degli ambienti acquatici e della fauna ittica: i progetti finalizzati delle Province dal 1996 al 2000*. Ed. Greentime. Regione Emilia-Romagna.

Meldola, 31 dicembre 2015