



1506  
UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI URBINO  
CARLO BO

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI URBINO  
“CARLO BO”**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMOLECOLARI**

**Corso di laurea magistrale in  
Biologia Molecolare, Sanitaria e della Nutrizione**

---

**RICERCA, GENOTIPIZZAZIONE E RECUPERO  
DELLA TROTA AUTOCTONA  
ALL'INTERNO DEL VERSANTE ROMAGNOLO DEL  
PARCO NAZIONALE DELLE FORESTE CASENTINESI**

*Relatore: Chiar.mo Prof.*

**FRANCESCO PALMA**

*Co-relatore: Dott.*

**ANDREA DE PAOLI**

*Co-relatore: Dott.*

**GIANCARLO TEDALDI**

*Tesi sperimentale di:*

**LORIS CASALI**

---

ANNO ACCADEMICO 2015-2016



# Indice

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| <b>1.</b> | <b>Abstract</b> .....  | 4  |
| <b>2.</b> | <b>Introduzione</b> .....  | 5  |
| 2.1.      | Il problema ecologico .....  | 5  |
| 2.2.      | Caratteri diagnostici fenotipici e genotipici .....                                | 6  |
| 2.3.      | Storico delle ricerche nel Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi ...           | 10 |
| 2.4.      | Brevi cenni sulla geomorfologia ed idrografia del Parco .....                      | 11 |
| 2.5.      | Cenni di biologia di <i>Salmo trutta</i> e sua morfologia all'interno del parco .. | 12 |
| <b>3.</b> | <b>Scopo della tesi</b> .....  | 14 |
| <b>4.</b> | <b>Materiali e metodi</b> .....  | 15 |
| 4.1.      | Censimenti e raccolta dei campioni biologici .....                                 | 15 |
| 4.1.1.    | Censimento .....   | 15 |
| 4.1.2.    | Raccolta campioni e tagging .....  | 17 |
| 4.2.      | Analisi genetiche .....  | 18 |
| 4.2.1.    | Sequenziamento zona di controllo D-loop .....                                      | 19 |
| 4.2.2.    | Analisi PCR-RFLP del gene nucleare LDH-C1* .....                                   | 21 |
| 4.2.3.    | Analisi dei loci nucleari microsatelliti .....                                     | 22 |
| <b>5.</b> | <b>Risultati e discussione</b> .....   | 26 |
| 5.1.      | Censimenti .....   | 26 |
| 5.2.      | Analisi genetiche .....  | 27 |
| 5.2.1.    | Sequenziamento zona di controllo D-loop .....                                      | 28 |
| 5.2.2.    | Analisi PCR-RFLP del gene nucleare LDH-C1* .....                                   | 29 |
| 5.2.3.    | Analisi dei loci nucleari microsatelliti .....                                     | 33 |
| <b>6.</b> | <b>Conclusioni</b> .....   | 36 |
| <b>7.</b> | <b>Ringraziamenti</b> .....  | 38 |
| <b>8.</b> | <b>Bibliografia</b> .....  | 39 |



## 1. Abstract

Il progetto si è posto come obiettivo lo studio di una linea mediterranea residua di trota (*Salmo trutta*) scoperta all'interno del territorio del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, al fine di catturare individui da utilizzare per riproduzione artificiale. La ricerca è stata eseguita tramite una analisi approfondita della popolazione nei suoi parametri ecologici e tramite la genotipizzazione degli individui. I risultati hanno mostrato una popolazione ricca composta da 8 classi d'età ben rappresentate. I risultati genetici hanno mostrato una abbondanza di aplotipi mediterranei pari al 94.5% e di alleli nucleari mediterranei pari al 73.9%. A seguito dell'analisi eseguita sui loci nucleari microsatelliti, la popolazione sembra essere fortemente introgressa. Gli individui per la riproduzione artificiale sono stati selezionati tra coloro che hanno mostrato un genotipo mediterraneo sia per l'aplotipo mitocondriale che per gli alleli nucleari.

## 2. Introduzione

### 2.1. Il problema ecologico

Le attività antropiche, soprattutto degli ultimi decenni, hanno fortemente alterato gli ecosistemi del pianeta. Ciò si è verificato anche nella Penisola Italiana dove varie azioni umane hanno modificato gli habitat provocando profondi cambiamenti all'interno delle comunità animali e vegetali. Tali modificazioni rappresentano ad oggi un grande rischio per la nostra biodiversità. Anche nel caso della Trota fario (*Salmo trutta fario*) molte delle popolazioni naturali della Penisola Italiana hanno visto una riduzione del loro habitat per varie cause come l'inquinamento delle acque, la presenza di captazioni idriche ad uso plurimo, l'alterazione morfologica degli habitat fluviali in seguito alla costruzione di sbarramenti oppure a causa di opere di regimazione idraulica realizzate senza criteri naturalistici. Anche una pressione piscatoria eccessiva in alcuni casi ha contribuito alla rarefazione delle popolazioni naturali di salmonidi [1].

Tali problemi hanno portato alla generale riduzione delle popolazioni naturali di trota e ciò ha richiesto azioni artificiali di ripopolamento per mantenere le stesse in abbondanza numerica in favore della pesca sportiva. Queste procedure il più delle volte non hanno tenuto conto della complessa sistematica e variabilità genetica della trota fario nella Penisola Italiana, la quale ancor oggi resta motivo di forte dibattito e spunto di ricerca. Non vi è ancora infatti, una nomenclatura chiara per definire le varianti morfologiche di *Salmo trutta*, assegnandole al taxa come varianti fenotipiche, sottospecie o buone specie [2,3]. In Italia, ma anche in altre nazioni dell'Europa meridionale, le attività di ripopolamento sono state eseguite perlopiù utilizzando individui appartenenti a ceppi domestici di allevamento provenienti dal nord Europa [4] senza considerare la presenza di popolazioni autoctone e l'impatto che queste attività di ripopolamento potessero avere su queste. Per tale ragione, conseguenza comune derivante dalle attività di ripopolamento è stata l'introggressione di genomi alloctoni all'interno delle linee autoctone presenti nei corsi d'acqua italiani. Il problema derivante dall'introggressione genetica per cause artificiali non riguarda solo la perdita di identità genetica di una particolare realtà evolutiva isolata, ma può portare nel tempo ad un fenomeno di estinzione totale di un ceppo attraverso ibridazione [5]. Questo fenomeno risulta essere particolarmente problematico per specie rare o per unità evolutive relativamente isolate e che non presentino flusso genico come le popolazioni montane di trota. Quando, queste attività di ripopolamento sono protratte nel tempo, la popolazione originaria viene resa progressivamente meno abbondante fino alla sua

totale estinzione e sostituzione con il ceppo alloctono introdotto. Ciò è abbastanza evidente in bacini idrografici nei quali è possibile osservare la presenza di ceppi autoctoni solo su alcuni rami torrentizi, di solito isolati da sbarramenti o cascate invalicabili, e presenza di alloctoni nelle aste principali [6], mostrando una probabile presenza storica di animali autoctoni su tutto il bacino idrografico. Le attività di ripopolamento hanno quindi profondamente eroso la diversità genetica dei ceppi originari di trota e, allo stesso modo, hanno ridotto la biodiversità totale all'interno della penisola italiana. Va inoltre considerato che le attività di ripopolamento sono state spesso mal regolate e mal gestite, eseguite non sulla base di reali dati sulla consistenza e stato delle popolazioni ma più in virtù di interessi di tipo piscatorio. Ciò ha portato ad eseguire ripopolamenti anche in aree non propriamente adatte ai salmonidi pur di aumentarne la diffusione. Comuni sono state anche le pratiche di introduzione illegali all'interno di territori a gestione speciale come all'interno delle aree protette, il tutto evidenziato dall'uso di metodologie molecolari [6]. D'altronde l'aumento delle conoscenze nel settore hanno portato ad una maggior attenzione verso il problema della biodiversità della trota nella Penisola Italiana sia da parte delle gestioni locali che della Comunità Europea. Sono stati infatti avviati diversi progetti finanziati dalla UE [7] o da soggetti locali (come nel caso di questo progetto) [24] per la conservazione e recupero dei ceppi autoctoni di trota. Infatti, un corretto approccio basato su appropriate considerazioni genetiche risulta imprescindibile per la gestione delle popolazioni dei pesci d'acqua dolce. Questo aspetto si presenta in maniera più marcata per la trota fario data la sua altissima variabilità sia fenotipica sia genotipica, essendo uno dei vertebrati in assoluto più polimorfico [8].

## **2.2. Caratteri diagnostici fenotipici e genotipici**

Per poter recuperare e tutelare la trota autoctona, risulta quindi importante avere dei mezzi per diagnosticare con un buon grado di sicurezza l'appartenenza degli individui ad una determinata linea genetica, in modo da poter caratterizzare al meglio le popolazioni attualmente presenti nei vari corsi d'acqua italiani potendo definire la presenza dei vari ceppi e i relativi livelli di introgressione genetica.

Il metodo più ovvio utilizzato per definire l'appartenenza delle trote ad una determinata forma è stato quello dell'analisi dei caratteri fenotipici esteriori, ovvero della livrea. La specie *Salmo trutta* presenta un elevatissimo polimorfismo per quanto riguarda le caratteristiche fenotipiche il che potrebbe far pensare ad una facilità di classificazione sulla base di questa caratteristica.

In realtà le trote assumono un aspetto che tende ad uniformarsi con l'ambiente in cui vivono e individui appartenenti allo stesso ceppo, con stessa età e sesso, cresciuti in condizioni diverse (come per esempio trota coltura e ambiente naturale) tendono solitamente ad assumere fenotipi diversi [9]. Alla base di questo polimorfismo cromatico contribuisce in parte il fenomeno conosciuto come "homing" per il quale gli scambi genetici tra individui di popolazioni presenti in diversi tributari tendono ad essere molto ridotti; inoltre, la specie presenta una naturale predisposizione ad assumere livree mimetiche determinate dall'ambiente di vita [10]. Questa forte plasticità fenotipica, unita ad ulteriori variabili di confondimento dovute alla commistione di caratteri derivanti da processi di ibridazione e introgressione rende l'utilizzo dei caratteri fenotipici non appropriato ad un uso diagnostico per definire l'autoctonia di una popolazione. Queste considerazioni hanno spinto la ricerca ittiologica verso un approccio che consideri variabili molecolari in quanto più conservate e non influenzabili dall'ambiente di vita degli animali. In particolare lo studio si è spostato verso valutazioni della variabilità genetica tramite l'osservazione del corredo cromosomico, degli allozimi ma anche direttamente della sequenza del DNA nucleare e mitocondriale.

Il metodo analitico di base utilizzato per lo studio del corredo cromosomico e definizione del cariotipo prevede il blocco dei processi di divisione cellulare in metafase, ovvero in quel momento in cui i cromosomi sono condensati e perciò ben visibili attraverso l'impiego di coloranti con alta affinità per il DNA. Ciò rende possibile identificare il numero e la forma dei cromosomi che tende ad essere consistente all'interno di una stessa specie; dei polimorfismi possono nascere a seguito di mutazioni cromosomiche non distruttive come nel caso di una ipotetica traslocazione robertsoniana che vede la fusione dei centromeri o la frammentazione di cromosomi metacentrici in acrocentrici. È stato però visto che nella trota fario questi metodi citogenetici di base non sono molto informativi, in quanto il corredo presenta 80 cromosomi in maniera persistente in molte popolazioni della specie [11]. Maggiormente informative si sono dimostrate invece le tecniche di bandeggio che permettono di evidenziare alcune regioni cromosomiche come le NOR (Nucleolus Organizer Regions) che, presentando una variabilità superiore, sono state utilizzate per caratterizzare alcune popolazioni iberiche [12]. Altra tecnica informativa nel caratterizzare le popolazioni è il taglio di una porzione di cromosoma tramite l'uso di enzimi di restrizione [13], ma tale tecnica è stata ormai sorpassata con l'avvento della PCR e l'applicazione di tecniche RFLP e di sequenziamento.

Lo studio degli allozimi (ovvero varianti di enzimi prodotti dallo stesso gene) tramite elettroforesi proteica si è rivelata molto utile nell'identificare dei marker molecolari efficaci che potessero definire lo status genetico delle popolazioni. Oltre all'identificazione e

caratterizzazione di popolazioni, gli allozimi sono in grado di indicare i livelli di ibridazione presenti, potendo definire le frequenze genotipiche degli alleli correlati; ciò permette di capire se una popolazione è formata da unità geneticamente distinte o da un'unica popolazione panmittica. Questa tecnica è stata utilizzata anche in Italia per stabilire gli effetti sulla variabilità genetica derivanti dalle azioni di ripopolamento con trote alloctone [1].

Tecniche più recenti ed attuali per lo studio delle popolazioni di trota si rifanno alla biologia molecolare per lo studio diretto della variabilità del DNA. Tutte queste tecniche si basano sull'analisi di determinati marcatori grazie all'uso della PCR. Una volta identificati i primer specifici è possibile analizzare un grande numero di individui in poco tempo, fornendo dati statisticamente rilevanti in quanto riproducibili e numericamente abbondanti. Di largo utilizzo nella studio della genetica delle trote è il DNA mitocondriale (mtDNA). Il mtDNA è presente in molte copie all'interno delle cellule ed è generalmente omoplasmico; può essere perciò estratto da ogni tessuto e presenta nei vertebrati un tasso di sostituzione nucleotidica più alto rispetto al DNA nucleare (nDNA). Possiede pertanto una buona risoluzione per studi popolazionistici [14]. Inoltre il mtDNA viene trasmesso solo per via materna e non va incontro ad eventi di ricombinazione come il nDNA. Nel caso delle trote la divergenza del mtDNA tra le popolazioni tende ad essere alta a causa della naturale deriva genetica e del basso flusso genico dovuti all'isolamento delle popolazioni, specialmente in determinati bacini idrografici. Quest'ultimo aspetto è ulteriormente rafforzato da interventi di regimazione idraulica umana che frammentano la continuità fluviale attraverso l'edificazione di dighe e briglie insuperabili dai pesci. D'altronde l'intervento umano è paradossalmente causa di flussi genici artificiali tramite le attività di ripopolamento. Il mtDNA viene generalmente analizzato tramite tecniche di sequenziamento della zona di controllo D-loop [7], ma è stato anche studiato tramite tecniche di PCR, unita ad RFLP, nel gene mitocondriale dell'RNA ribosomiale 16S [15]. Le analisi di sequenziamento sono senza dubbio le più utilizzate in quanto molto informative nel discriminare i vari ceppi di trota e ciò rappresenta un importante strumento per la conservazione e la gestione della trota fario. Permette inoltre di discriminare la presenza di diverse linee genetiche all'interno di una popolazione, rendendo possibile la valutazione della diffusione di pesci alloctoni all'interno di popolazioni selvatiche (se ancora esistenti) [16]. Tale analisi è stata eseguita nell'ambito di questo progetto.

L'evoluzione della diversità genetica della trota fario è stata fortemente influenzata dalle fasi glaciali del Pleistocene, in particolare dall'ultima glaciazione Würmiana (18.000-10.000 anni fa). In questo periodo gran parte dell'areale colonizzato dalla specie fu ricoperto da calotte glaciali e ciò provocò l'estinzione locale di numerose popolazioni con la conseguente perdita

di variabilità genetica della specie [16,17]. Dopo il Würm, diverse linee genetiche superstiti ricolonizzarono le aree in precedenza sepolte dai ghiacci. Queste popolazioni sopravvissero all'interno dei cosiddetti rifugi glaciali; la stirpe I si sarebbe mantenuta in aree non investite dalla glaciazione della Bretagna meridionale ed è caratterizzata dalla presenza degli alleli LDH-C\*90 e CK-A1\*100; la stirpe II proveniente dalla penisola iberica nord-occidentale viene identificata dagli alleli LDH-C\*100 e CK-A1\*115; le stirpi III (Mar Nero, Mar Caspio, Mar d'Aral) e IV (bacino Mediterraneo) fissarono invece gli alleli LDH-C\*100 e CK-A1\*100. Queste stirpi furono identificate a seguito di studi che hanno combinato marcatori mitocondriali con nucleari (in particolare allozimi) [9]. La stirpe IV, presente anche in Italia e definita come mediterranea, presenta alti tempi di divergenza evolutiva rispetto all'aplotipo atlantico (circa 1.4M anni) indicando una separazione rispetto alla stirpe atlantica che risale alla fine del Pliocene. Per questo motivo la stirpe IV non sembra aver contribuito alla ricolonizzazione postglaciale dell'Europa e presenta inoltre un'alta differenziazione genetica al suo interno, con almeno quattro aplotipi rappresentati: aplotipo marmorato, macrostigma, mediterraneo e adriatico.

All'interno di questo progetto è stata sfruttata la differente fissazione degli alleli LDH-C\*90 e LDH-C\*100 (variazioni del gene nucleare LDH-C) per discriminare gli individui di trota esotica dagli indigeni. L'allele \*100 presenta in posizione 308 una adenina al posto di una guanina; questa differenza può essere evidenziata attraverso l'uso di una reazione di PCR per amplificare il gene, unita ad una reazione RFLP (con enzima di restrizione BslI). Essendo l'allele \*90 presente solo nell'area nord-europea e nella maggioranza degli allevamenti di trote usate per i ripopolamenti, lo studio di questo marcatore permette di caratterizzare una popolazione individuando individui autoctoni, alloctoni e ibridi [18]. L'unione dei risultati derivanti dall'analisi del gene nucleare LDH-C e della zona di controllo D-loop mitocondriale permette di identificare l'estensione dell'ibridazione e i livelli di introgressione all'interno di una popolazione che ha subito eventi di inquinamento genetico a causa di ripopolamenti con materiale alloctono.

Un recente studio francese [46] ha applicato al problema una soluzione che prevede l'identificazione di 6 SNP (modificazioni a singolo nucleotide) presenti su loci nucleari (Str541INRA, Str591INRA, OMM1105, OMM1154, OMM1164, OMM1172). Come per il gene LDH-C1, tali zone del DNA mostrano una mutazione puntiforme che permette di identificare l'appartenenza al ceppo mediterraneo o atlantico.

Come misura ulteriore di verifica dell'introgressione e per caratterizzare al meglio le popolazioni oggetto di questa ricerca sono stati indagati anche dei loci nucleari ipervariabili,

ovvero i microsatelliti. L'utilizzo dei microsatelliti permette di verificare la presenza o meno di sotto-popolazioni e di come queste interagiscano tra loro a livello riproduttivo. Permettono inoltre di stimare i livelli di flusso genico. Questo è estremamente importante per preservare il più possibile la diversità genetica originaria di una determinata popolazione, specialmente in progetti come quello eseguito nell'ambito di questa tesi in cui sono previste azioni di recupero e salvaguardia di popolazioni a rischio di estinzione [19]. Lo studio delle variazioni dei microsatelliti si è rivelata la più efficiente per valutare le variazioni genetiche in ittiologia applicata. L'analisi viene eseguita tramite l'utilizzo di protocolli di PCR multiplex in modo da ottimizzare l'amplificazione e la lettura di un numero maggiore di loci con il minor dispendio possibile di tempo e risorse [7, 20]. Va infine accennato che l'uso dei microsatelliti unito a determinate analisi di tipo statistico può anche avere un buon potere di risoluzione nel distinguere ceppi autoctoni da alloctoni [24].

### **2.3. Storico delle ricerche nel Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi**

Prima dell'avvio del nostro progetto già due studi avevano indicato la possibile presenza di popolazioni autoctone relitte di *Salmo trutta* nell'appennino romagnolo e in particolare all'interno dei confini del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi.

Il primo [21], risalente al 2000-01, prese in esame diverse popolazioni di trota su vari torrenti appartenenti a diversi bacini idrografici dell'appennino romagnolo identificandone parametri come la struttura di popolazione, l'abbondanza e i tassi di mortalità. All'interno di questa ricerca è stata inoltre eseguita una caratterizzazione di tipo molecolare tramite analisi del gene per l'rRNA 16S mitocondriale su 50 esemplari. Questa indagine ha mostrato la presenza dell'aplotipo mediterraneo in due soli torrenti con una frequenza del 54% all'interno del Fosso Campo la Sega e del 20% all'interno del Torrente Forcone.

A seguito di questo studio, una successiva indagine [15] eseguita nel 2006 ha allargato l'analisi molecolare ad altri corsi d'acqua, ancora attraverso l'analisi del locus 16S del mtDNA. In particolare furono prelevati 47 campioni biologici da tre stazioni di campionamento, di cui due ubicate nel versante toscano dell'Appennino e una sul versante romagnolo. Per quanto riguarda la stazione del versante romagnolo sul Fosso Abetio, fu trovata una percentuale del solo 17% di aplotipi mediterranei. Entrambi questi studi hanno analizzato il solo DNA mitocondriale, in grado di indicare la presenza del ceppo mediterraneo ma non i livelli di ibridazione.

Nel 2015 [6], per completare l'indagine ed estenderla a gran parte del territorio del versante romagnolo del Parco, è stato portato a termine un progetto in cui sono stati analizzati 134 campioni provenienti da 22 siti di campionamento di cui 19 nel bacino idrografico del Bidente e 3 nel bacino dell'Arno (versante toscano del Parco). L'analisi molecolare ha previsto l'esplorazione del locus nucleare LDH-C per avere informazioni riguardanti anche i livelli ibridazione, oltre che la presenza di un potenziale ceppo autoctono. I risultati hanno mostrato una presenza dell'allele mediterraneo pari al 40% nel Fosso Campo la Sega, e del 76% nel Bidente di X (attualmente censurato per motivi di sicurezza). Proprio sul Bidente di X si è concentrato lo sforzo di recupero e genotipizzazione eseguito all'interno di questa tesi.

#### **2.4. Brevi cenni sulla geomorfologia ed idrografia del Parco**

Seppur al di fuori di un discorso puramente molecolare risulta importante definire le caratteristiche geomorfologiche di base per meglio comprendere il contesto territoriale in cui è avvenuto questo studio.

I terreni affioranti nella provincia di Forlì-Cesena hanno tutti un'origine di tipo sedimentario e sono di origine quasi esclusivamente autoctona, ovvero si trovano nelle zone di formazione senza aver subito traslazioni considerevoli a seguito dei vari movimenti orogenetici che ne hanno causato l'emersione e il corrugamento. La presenza di rocce alloctone è sporadica e va a sovrapporsi ed intercalarsi ai terreni autoctoni. La maggior parte della porzione appenninica romagnola è morfologicamente rappresentata da un complesso di rocce Arenacee e Marnose alternate in strati; a tale alternanza viene dato il nome di "Formazione Marnoso-Arenacea-Romagnola" [22]. Tale formazione affiora perlopiù in zone di montagna e di collina caratterizzando il territorio del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi. Le caratteristiche morfologiche sono legate all'andamento degli strati, dove l'alternanza è di tipo orizzontale si avrà una morfologia tipica a scalini in cui sporgono i resistenti strati arenacei e rientrano i friabili strati marnosi. Questa situazione può formare versanti dolci esposti all'erosione delle acque dilavanti ma anche versanti con forti pendenze ma notevole stabilità generale. Sono frequenti le linee di frattura, spesso sede di corsi d'acqua. La morfologia generale presenta una serie di valli parallele in direzione da sud-ovest a nord-est, collegate al crinale centrale che si estende da nord-ovest a sud-est dividendo il versante romagnolo da quello toscano. L'indagine eseguita in questa tesi riguarda il solo versante romagnolo.

Per quanto riguarda l'assetto idrografico due sono i bacini principali all'interno dei confini del Parco: il bacino idrografico del fiume Montone e del suo principale affluente, il torrente Rabbi, e quello del fiume Bidente. Quest'ultimo si divide a sua volta in tre rami principali che in ordine nord-ovest - sud-est prendono il nome di Bidente di Campigna, Bidente di Ridracoli e Bidente di Pietrapazza.

Alcuni di questi rami sono stati sottoposti ad interventi di regimazione idraulica per uso energetico ed idropotabile [23]. Un esempio in tal senso è rappresentato dalla famosa diga di Ridracoli costruita sbarrando artificialmente il corso del Bidente di Ridracoli.

## **2.5. Cenni di biologia di *Salmo trutta* e sua morfologia all'interno del parco**

La specie *Salmo trutta* presenta una discreta valenza ecologica, nel suo areale occupa molti ambienti differenti purché le acque siano limpide e fredde (con temperatura in genere inferiori ai 16-18°C). Benché possa compiere parte del proprio ciclo vitale in mare per ragioni trofiche nell'Europa settentrionale, Mar Caspio e Mar Nero, identificandosi come specie anadroma, nei nostri ambienti è una specie tipicamente d'acqua dolce in quanto il Mar Mediterraneo presenta temperatura e salinità elevate. La trota fario presenta la particolare caratteristica di essere polimorfa, ovvero di modificare il proprio fenotipo in virtù dell'ambiente colonizzato. In particolare trote che occupano ambienti lacustri oligotrofici di medie e grandi dimensioni possono "lacustrizzare" assumendo il cosiddetto fenotipo "lacustre" in cui la colorazione sul dorso diviene tipicamente grigiastra mentre la punteggiatura si riduce a soli punti neri piccoli e conformati ad x. In seguito al cambio di alimentazione che diviene prevalentemente ittiofaga aumentano anche le dimensioni corporee con esemplari in grado di superare il metro di lunghezza e i 20 kg di peso. Queste trote per la riproduzione risalgono i corsi d'acqua immissari mentre tendono a restare negli ambienti lacustri per ragioni trofiche.

L'ecotipo "fario" invece è tipico dei corsi d'acqua montani, anche di piccole dimensioni e con basse portate, caratterizzati da una forte velocità della corrente e fondo costituito da massi, ciottoli e ghiaia. Questo ecotipo raggiunge generalmente una lunghezza totale massima di 50 cm e un peso di 1-1,5 Kg. La livrea, ovvero l'aspetto fenotipico esteriore, varia in maniera consistente a seconda dell'ambiente e delle popolazioni nei vari distretti geografici. Dall'analisi fenotipica eseguita nel 2015 sulle trote del Parco [6] è emersa la presenza di una livrea tipica per il Bidente di X, che presenta numerose macchie "parr" in numero di circa 10, una puntinatura spesso poco fitta con punti perlopiù neri alternati a rari punti rossi, mentre è quasi

sempre presente la macchia preopercolare, ben marcata e spesso sdoppiata. Il dorso non presenta quasi mai puntinatura, con un colore molto variabile a seconda del substrato. L'analisi statistica eseguita sulla relazione tra genotipo e fenotipo ha mostrato la mancanza di caratteri di livrea in grado di distinguere trote di ceppo mediterraneo da trote ibride o di ceppo atlantico all'interno dei corsi d'acqua del parco [6].

La trota fario è un pesce ad alimentazione carnivora che può nutrirsi di ogni sorta di invertebrato; la trota caccia a vista e la predazione può avere luogo in tutta la colonna d'acqua ma anche al di sopra di essa, infatti questi animali sono in grado di eseguire rapidi balzi fuori dall'acqua. In ambienti di montagna con caratteristiche particolarmente oligotrofiche, le trote possono nutrirsi spesso di organismi provenienti dagli ecosistemi terrestri come imenotteri e coleotteri. Particolarmente importante a livello conservazionistico è l'impatto che le popolazioni di trota possono avere, tramite predazione, sulle popolazioni di anfibi, dato di particolare interesse qualora si debbano gestire popolazioni interamente alloctone di salmonidi [25]. Le trote possono mostrare alimentazione piscivora in particolare quando raggiungono taglie elevate [26].

L'accrescimento è strettamente dipendente dalle condizioni trofiche e di temperatura; nei corsi d'acqua montani, molto freddi e oligotrofi, tende ad essere piuttosto lento. La maturità sessuale viene raggiunta nei maschi generalmente al 2° anno di età e al 3° anno nelle femmine. Il dimorfismo sessuale è presente solo in periodo riproduttivo in quanto i maschi assumono una colorazione ventrale scura e mostrano il tipico prognatismo mandibolare.

La riproduzione avviene generalmente in inverno, di solito nei mesi di dicembre e gennaio. La deposizione avviene in fondali ghiaiosi con acque poco profonde e velocità media o moderata dove le femmine scavano, a colpi di coda, un nido in cui verranno deposte le uova. Durante la frega, anche più maschi fecondano le uova che vengono poi ricoperte con la ghiaia dalla stessa femmina tramite movimenti della coda in modo da proteggerle dai predatori. Ogni femmina depone circa 1500-2500 uova per chilogrammo di peso corporeo [27].

### **3. Scopo della tesi**

La ricerca oggetto di questa tesi, finanziata dal Parco delle Foreste Casentinesi, e svolta in collaborazione con il Museo di Ecologia del Comune di Meldola, si è posta come obiettivo quello di recuperare la popolazione di trota autoctona ritrovata nel Bidente di X. Ciò ha previsto la genotipizzazione degli individui al fine di poter selezionare riproduttori da usare come fondatori nel "Incubatoio Ittico" del Comune di Premilcuore, altro Ente Pubblico coinvolto nella realizzazione del progetto.

## **4. Materiali e metodi**

### **4.1. Censimenti e raccolta dei campioni biologici**

La prima fase del progetto ha previsto oltre ad una analisi di tipo genetico sugli individui raccolti in 13 siti, anche l'esecuzione di censimenti ittici quantitativi su 8 stazioni di campionamento all'interno del Bidente di X, interessato dalla presenza relitta della trota indigena, in modo da poter caratterizzare la popolazione in maniera completa e poter disporre di dati utili alla programmazione di ricatture selettive di individui puri o poco introgressi da destinare all'allevamento e all'impiego quali fondatori nel Incubatoio del Comune di Premilcuore e del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi.

#### **4.1.1. Censimento**

Le specie ittiche sono state campionate attraverso pesca elettrica, utilizzando l'elettropesca ELT 725 mp, spallabile e con potenza massima fino a 550 watt. L'analisi è stata di tipo quantitativo poiché si è operato mediante passaggi ripetuti in settori del corso d'acqua preventivamente delimitati [30,31,32]. Alla conclusione delle operazioni di campionamento gli esemplari catturati sono stati narcotizzati con olio essenziale di chiodi di garofano e quindi per ogni individuo sono stati rilevati i seguenti parametri biologici:

-Lunghezza totale: con approssimazione  $\pm 1$  mm. misurata dall'apice della bocca al lobo inferiore della pinna caudale;

-Peso: con approssimazione  $\pm 1$  g attraverso l'utilizzo di una bilancia analitica;

-Prelievo di alcune scaglie da un sub-campione di esemplari di trota. Il prelievo è stato effettuato sul lato del corpo mediante una pinzetta e le scaglie, in numero di 2-4 per ogni individuo, sono state conservate in apposite provette numerate, contenenti acqua. Le scaglie sono state utilizzate per determinare l'età dell'esemplare mediante l'osservazione diretta allo stereomicroscopio [33];

-Prelievo di una piccola porzione di pinna adiposa sugli individui di lunghezza maggiore-uguale di 20 cm per l'analisi genetica (paragrafo 4.1.2.);

-Marcatura individuale attraverso VI Alpha Tag, inseriti sottocute in posizione cefalica agli individui a cui veniva asportata parte della pinna adiposa (paragrafo 4.1.2.).

Dopo le operazioni di misurazione i pesci sono stati “risvegliati gradualmente” nelle apposite vasche di accoglienza. Si è infine effettuato il rilascio di ogni individuo nel medesimo punto di prelievo.

Per analizzare qualitativamente il campione prelevato è stata effettuata l'analisi del rapporto lunghezza - peso in accordo alle metodologie assunte da Bagenal [28] utilizzando un modello di regressione logaritmica espressa dall'equazione:

$$W = a * (LT)^b$$

Dove (W) risulta essere il peso espresso in grammi, (LT) la lunghezza totale in millimetri, (a) l'intercetta e (b) il coefficiente di regressione o coefficiente allometrico. Per (b)=3 si avrà una crescita isometrica con presenza di individui regolari, per (b)<3 una crescita allometrica negativa con presenza di animali magri, per (b)>3 una crescita allometrica positiva con presenza di esemplari tozzi e ben nutriti. Lo studio della relazione lunghezza – peso risulta essere importante perché permette di stimare il peso a partire dalla lunghezza, di capire le modalità di realizzazione dell'accrescimento individuale, di valutare lo stato di benessere degli individui ed infine di caratterizzare le componenti dell'ambiente in cui vivono [29].

Le stime di densità sono state ottenute eseguendo 2 passaggi ripetuti. Per assicurare la cattura del novellame (meno sensibile agli effetti dell'elettrostorditore) è stata utilizzata corrente pulsata con frequenza da 60 a 65 impulsi al secondo. Poiché ad ogni passaggio viene prelevata una parte della popolazione, la stima del numero totale N degli individui presenti nel tratto è dato dalla formula di Moran-Zippin [30]:

$$N = \frac{C1^2}{C1 - C2}$$

Dove (C1) rappresenta il numero di catture effettuate al primo passaggio e (C2) quelle effettuate al secondo.

Utilizzando N è possibile calcolare la densità ( $N/m^2$ ). Per analizzare il campione viene inoltre calcolata la biomassa ( $g/m^2$ )

La misura della lunghezza e larghezza del tratto è stata effettuata mediante l'utilizzo di rotella metrica con errore di  $\pm 2.5$  cm.

Le operazioni di censimento sono state eseguite su un totale di 8 stazioni posizionate tra 650 e 820 m.s.l.m.. 4 di queste si trovano sull'asta principale del Bidente di X mentre le altre 4 sui tributari. In totale sono stati censiti 1658 m di torrente e la lunghezza media di ogni stazione di campionamento è stata di circa 207 m.

Inoltre sono stati calcolati sul campione degli indici descrittivi ulteriori tra cui mortalità e tasso di mortalità. In particolare la mortalità è stata calcolata con l'applicazione della seguente formula come indicato da Gulland [47]:

$$Z = \ln(N2) - \ln(N1)$$

Dove (N1) è il numero di individui catturati d'età "N" e (N2) è il numero di individui catturati d'età "N+1".

Mentre il tasso di mortalità percentuale viene calcolato a partire da Z secondo l'equazione [47]:

$$\text{Tasso di mortalità} = (1 - e^{-Z}) * 100$$

#### **4.1.2. Raccolta campioni e tagging**

Durante le operazioni di censimento è stato asportato un pezzo di pinna adiposa agli individui di dimensione uguale o superiore a 20 cm. L'asportazione è avvenuta attraverso l'utilizzo di forbici per eseguire il taglio e pinze in metallo per trasportare il frammento in provetta. Per garantire la sterilità ed evitare problemi di cross-contaminazione, l'attrezzatura in metallo è stata sottoposta prima e dopo l'asportazione a flambaggio con fiamma di butano/propano tramite fornellino da campo per circa 15 secondi. Le pinnette sono state riposte all'interno di provette eppendorf da 1.5 ml, poi riempite fino all'orlo con alcol al 95% v/v. Le fialette con i campioni sono poi state a loro volta riposte all'interno di porta provette i quali, in attesa delle analisi, sono stati tenuti in ambiente refrigerato a  $-5$  °C. Su ogni eppendorf è stata apposta una etichetta indicante il codice del campione. Tale codice è stato poi ulteriormente riportato sul tappo di ogni fialetta utilizzando un pennarello indelebile.

Le trote alle quali è stata asportata parte della pinna adiposa sono state taggate in modo da renderle univocamente riconoscibili applicando piccola etichetta fluorescente con codice alfanumerico (Visible Implant Alpha Tags). Tale procedura di tagging è stata eseguita per associare in maniera univoca a ciascun individuo un codice di riferimento che è stato poi utilizzato sulle provette per indicare ogni campione.

Una VI Alpha Tag (Northwest Marine Technology, Inc., Ben Nevis Loop Rd Shaw Island, WA, USA) è una piccola etichetta fluorescente con codice alfanumerico progettata per identificare singoli animali. Le etichette vengono impiantate internamente al di sotto dell'epidermide nel derma e rimangono esternamente visibili. Hanno il vantaggio di essere di semplice e veloce utilizzo e di avere una lunga stabilità. Il kit contiene un iniettore, etichette in misura standard (1.2 mm x 2.7 mm) o grande (2 mm x 5mm) e una lampada UV per visualizzarle meglio. Dato l'impiego su trote di piccole dimensioni in questo progetto sono state utilizzate le etichette di misura standard. Come area di tagging efficace per i salmonidi è indicato dal costruttore un frammento di tessuto adiposo non pigmentato posizionato posteriormente all'occhio [36]; tale posizione non si è però rivelata efficace su trote di piccole dimensioni come da noi preliminarmente verificato marcando pesci in un allevamento.

È stato quindi necessario sperimentare, su un sub-campione di 21 trote iridee di misura inferiore ai 15 cm mantenute presso un incubatoio, l'inserimento del tagging in posizione cefalica tra gli occhi. A 12 giorni dalla marcatura è stata evidenziata una ritenzione dell'etichetta del 100% con cicatrizzazione totale in tutti gli individui. L'unica problematica riscontrata, legata all'operatore, ha riguardato il circa 5% di letture sbagliate dovute all'inserzione troppo in profondità della tag. La posizione cefalica di marcatura è stata quindi utilizzata nel progetto.

## **4.2. Analisi genetiche**

Le analisi sono state effettuate su un totale di 103 campioni ed hanno visto l'esplorazione in tutto di 1 locus mitocondriale e 13 loci nucleari (di cui 1 gene e 12 loci microsatelliti). Il DNA genomico di ogni campione è stato estratto dal frammento di pinna adiposa tramite l'utilizzo di kit Nucleo Spin MN per garantire un buon recupero ed una buona purezza del DNA. Il protocollo ha previsto quanto indicato dalla ditta produttrice Macherey-Nagel [48]. Il tessuto è stato estratto dalla provetta ed inserito nella sua integrità in una provetta da centrifuga da 1.5mL. Il peso e la dimensione del tessuto sono stati variabili e dipendenti dalle dimensioni delle trote a cui è stato esportato. Sono stati aggiunti alla provetta 180µl di Buffer T1 e 25µl di protein-

chinasi K, lasciati in incubazione a 56°C fino alla totale lisi del tessuto. Per rimuovere residui la provetta viene fatta poi centrifugare per 5 minuti a 11000g/m; 200µl di surnatante vengono poi trasferiti in un'altra provetta a cui sono aggiunti prima 200µl di Buffer B3 e poi 210µl di etanolo. Il preparato viene posizionato all'interno di una NucleoSpin® Tissue Column poi posizionata su di una provetta di raccolta. Il tutto viene fatto centrifugare per 1' a 11000g/m, va quindi scartata e sostituita la provetta di raccolta. Per lavare la membrana di silice viene eseguito un primo lavaggio con 500µl di Buffer BW centrifugato per 1' a 11000g/m; un secondo lavaggio viene eseguito con 600µl di Buffer B5 centrifugato per 1' a 11000g/m. La membrana viene quindi asciugata, rimuovendo i residui di etanolo con centrifuga per 1' a 11000g/m. Step finale è l'eluizione di DNA ad alta purezza, ponendo la NucleoSpin® Tissue Column in una provetta da 1.5ml; viene fatto incubare con 100µl di Buffer BE a temperatura ambiente per 1', segue centrifuga per 1' a 11000g/m.

#### **4.2.1. Sequenziamento zona di controllo D-loop**

L'analisi della variabilità della zona di controllo D-loop è stata eseguita tramite PCR seguita dal sequenziamento del prodotto amplificato, costruita sulla base delle metodologie applicate da Suarez et al. 2001 [16].

L'amplificazione dell'estremo 5' della regione D-loop è stata condotta con i seguenti primer:

- L15998-PRO: 5' TACCCCAAACCTCCCAAAGCTA 3'

- HDL-C-1: 5' CCTGAAGTAGGAACCCAGATGCCAG 3'

L'amplificazione è stata eseguita con termociclatore A24811 SimpliAmp (Applied Biosystems) in un volume di 50µl. La miscela di reazione utilizzata è la seguente: Buffer 5x 10µl; MgCl<sub>2</sub> 3µl; dNTP's 0.4µl; primer 1 0.2µl; primer 2 0.2µl; Go Taq G2 Promega 0.5 µl, H<sub>2</sub>O 30.7µl, DNA genomico 5µl.

Il profile termico di reazione è stato:

-Attivazione iniziale Taq polimerasi:

- 95 °C – 5'

Amplificazione, 34 cicli:

- 95 °C – 30"

- 52 °C – 45”

- 72 °C – 1’

-Elongazione finale:

- 72 °C – 7’

Il DNA amplificato è stato successivamente sottoposto a sequenziamento automatico con ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), utilizzando il BrilliantDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (NIMAGEN). I prodotti di PCR sono stati visualizzati su gel di agarosio e successivamente purificati tramite l’uso di kit di purificazione PCR BioFab (Bio-Fab Research SRL, Roma, Italia). Il DNA è stato quantificato con Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) e 16ng di DNA sono stati utilizzati per effettuare il sequenziamento.

L’analisi dei cromatogrammi è stata poi eseguita automaticamente tramite l’utilizzo del programma Unipro Ugene (ver. 1.25.0) che ha permesso anche una validazione manuale delle zone più dubbie grazie ad un’interfaccia grafica capace di visualizzare i picchi. Dopo un controllo visivo di qualità del sequenziamento, le sequenze sono state esportate automaticamente in formato FASTA contenente solamente il direct strand.

Come indicato in Lucarda e Forneris 2011 [24] l’analisi del locus mitocondriale D-Loop è stata eseguita usando diversi tool di allineamento per sequenze. L’analisi è avvenuta in due fasi: la prima fase è stata l’allineamento multiplo di sequenze, per individuare le differenze e similarità fra tutti i campioni. L’allineamento multiplo è stato eseguito con l’algoritmo ClustalW tramite il software UGene. La seconda fase è stata l’allineamento di sequenze tramite BLAST, per confrontare le sequenze dei rispettivi campioni con le sequenze presenti nei seguenti database: GenBank, EMBL, DDBJ, PDB e RefSeq. I database contengono in totale, ad oggi, 39663955 sequenze. Una volta eseguiti gli allineamenti di sequenze con BLAST, sono stati confrontati i valori di identità degli individui con i seguenti cinque aplotipi (tra parentesi il numero di accesso di GenBank): atlantico (AF253559.1), marmorato (EF689115.1), mediterraneo (AF253549.1), macrostigma (JN807337.1) e adriatico (JX846932.1). A seconda dei livelli di identità e della natura delle mutazioni ogni aplotipo è stato assegnato al rispettivo ceppo.

#### 4.2.2. Analisi PCR-RFLP del gene nucleare LDH-C1\*

L'analisi è stata costruita in riferimento alle metodologie presentate da McMeel et al. 2001 [18]. Prevede una prima amplificazione tramite utilizzo di PCR su di una zona interna al gene LDH-C1 contenente il polimorfismo e lunga circa 440 bp. L'amplificazione è stata eseguita con l'uso dei seguenti primer:

- LDHXON3F: 5' GGCAGCCTCTTCCTCAAACGCCCAA 3'
- LDHXON4R: 5' CAACCTGCTCTCTCCCTCCTGCTGACGAA 3'

L'amplificazione è stata eseguita con termociclatore A24811 SimpliAmp (Applied Biosystems) in un volume di 50µl. La miscela di reazione utilizzata è la seguente: Buffer 5x 10µl; MgCl<sub>2</sub> 3µl; dNTP's 0.4µl; primer 1 0.2µl; primer 2 0.2µl; Go Taq G2 Promega 0.5 µl, H<sub>2</sub>O 30.7µl, DNA genomico 5µl.

Il profilo termico di reazione è stato:

-Attivazione iniziale Taq polimerasi:

- 95 °C – 5'

-Amplificazione, 34 cicli:

- 95 °C – 1'

- 60 °C – 1'

- 72 °C – 1'

-Elongazione finale:

- 72 °C – 10'

Dopo la procedura di amplificazione è stata eseguita la reazione di restrizione con l'uso di enzima BslI (NEB). La reazione ha previsto una incubazione del DNA genomico amplificato con l'enzima di restrizione in un volume di 50µl con 1xBslI Buffer, 1,5µl di enzima BslI, 7µl di amplificato e H<sub>2</sub>O a volume. Il profilo termico di reazione è stato 55°C per 30'. Utilizzando l'enzima di restrizione BslI è possibile discriminare l'allele atlantico, LDH-C1\*90, da quello mediterraneo, LDH-C1\*100, per la presenza del sito di taglio 5'...CCNNNNN|NNGG...3'. L'analisi del prodotto di PCR digerito è stata effettuata su elettroforesi in gel di agarosio 1,5 % in TBE 0,5X; l'elettroforesi è stata eseguita a 80mV per 1,5h. Dall'analisi dei dati è possibile

evidenziare tre bande, una a 440 bp, una a 360 bp ed una ad 80 bp. Un individuo omozigote mediterraneo non presenta taglio da parte dell'enzima BslI e dà quindi come risultato una singola banda a 440 bp. Un omozigote atlantico presenta invece taglio su entrambi gli alleli e viene visualizzato su gel con la presenza di due bande, una a 360 bp ed un'altra a 80 bp. Un ibrido presenta entrambi gli alleli; per questo metà del genoma viene tagliato mentre l'altra metà resta intatta portando alla visualizzazione di tre bande, una a 440 bp, una a 360 bp ed una ad 80 bp.

I dati sono poi stati analizzati tramite l'applicazione di indici descrittivi e test statistici come indicato da Caputo et al. 2014 [7]. In particolare sono stati calcolati i parametri:  $H_e$ , eterozigosità attesa, calcolabile tramite l'applicazione del principio di Hardy-Weinberg attraverso l'uso delle frequenze alleliche ritrovate nel campione;  $H_o$ , eterozigosità osservata, derivante dal conteggio degli eterozigoti presenti nel campione;  $F_s$ , coefficiente di inbreeding, valori lontani da zero positivi indicano un numero di eterozigoti minore all'atteso e quindi inbreeding, valori lontani da zero negativi indicano invece un eccesso di outbreeding con più eterozigoti dell'atteso. Tramite l'utilizzo del test del  $X^2$  (chi-quadro) è stato verificato se la popolazione presentasse deviazioni rispetto al principio di Hardy-Weinberg. Tali indici e test permettono di identificare se una popolazione sia composta da più sotto-popolazioni riproduttivamente indipendenti o da un'unica popolazione in cui gli individui si riproducono tra loro senza barriere. Nel primo caso verrà evidenziata una deviazione rispetto al principio di Hardy-Weinberg, nel secondo caso, gli indici attesi derivanti dall'applicazione del principio saranno in linea con quelli osservati.

### **4.2.3. Analisi dei loci nucleari microsatelliti**

L'analisi è stata eseguita secondo il protocollo previsto da Lerceteau-Köhler-Weiss [20] che prevede l'amplificazione di 12 loci microsatelliti con due PCR-multiplex, una 4-plex ed una 8-plex. La procedura prevede la marcatura dei primer con uno di tre fluorofori diversi, in particolare Fam (blu), Hex (verde) e Ned (giallo). I loci sono stati divisi nelle due reazioni di PCR-multiplex in modo da renderli distinguibili per range senza aree di sovrapposizione come mostrato in Tab. 1.

Sebbene il protocollo prevedesse l'utilizzo di AmpliTaq, questa non ha dato risultati apprezzabili ed è stato perciò deciso di utilizzare la Qiagen Taq polimerasi. Allo stesso modo

la fase di ottimizzazione ha mostrato una insufficiente intensità di segnale per i loci SsaD190 e SsaD71 ed è stata quindi aumentata la loro concentrazione di primer in modo da renderli visibili.

| PCR    | Locus          | Ripetizione       | Colorante | Range (bp) | Primer  |
|--------|----------------|-------------------|-----------|------------|---|
| 4-plex | SsaD190 [37]   | Tetranucleotidica | Fam       | 115-157    | 5' GGCATTGGAGGTAAG<br>GACAC 3'<br>5' CCAGACCACTGAACT<br>TCTCATC 3'          |
|        | SsaD71 [37]    | Tetranucleotidica | Fam       | 183-239    | 5' AACGTGAAACATAAA<br>TCGATGG 3'<br>5' TTAAGAATGGGTTGC<br>CTATGAG 3'        |
|        | SSsp2213 [38]  | Tetranucleotidica | Hex       | 159-229    | 5' ATGTGGAGGTCAACT<br>AACCAGCGTG 3'<br>5' CATCAATCACAGAGT<br>GAGGCACTCG 3'  |
|        | OMM1064 [39]   | Tetranucleotidica | Ned       | 163-286    | 5' AGAATGCTACTGGTG<br>GCTGTATTGTGA 3'<br>5' TCTGAAAGACAGGTG<br>GATGGTTCC 3' |
| 8-plex | Ssa85 [40]     | Dinucleotidica    | Fam       | 101-113    | 5' AGGTGGGTCCTCCAA<br>GCTAC 3'<br>5' ACCCGCTCCTCACTT<br>AATC* 3'            |
|        | Str73INRA [41] | Dinucleotidica    | Fam       | 138-144    | 5' CCTGGAGATCCTCCA<br>GCAGGA 3'<br>5' CTATTCTGCTTGTAAC<br>TAGACCTA 3'       |
|        | Ssa410Uos [42] | Tetranucleotidica | Fam       | 172-310    | 5' GGAAAATAATCAATG<br>CTGCTGGTT 3'<br>5' CTACAATCTGGACTA<br>TCTTCTTCA 3'    |
|        | Str60INRA [41] | Dinucleotidica    | Hex       | 93-103     | 5' CGGTGTGCTTGTGTCAG<br>GTTTC 3'<br>5' GTCAAGTCAGCAAGC<br>CTCAC 3'          |
|        | SsoSL417 [43]  | Dinucleotidica    | Hex       | 169-195    | 5' TTGTTCAAGTGTATATG<br>TGTCCCAT 3'<br>5' GATCTTCACTGCCAC<br>CTTATGACC 3'   |
|        | Ssa408Uos [42] | Tetranucleotidica | Hex       | 205-305    | 5' AATGGATTACGGGTA<br>CGTTAGACA 3'<br>5' CTCTTGTGCAGGTTCT<br>TCATCTGT 3'    |
|        | SsoSL438 [44]  | Dinucleotidica    | Ned       | 89-109     | 5' GACAACACACAACCA<br>AGGCAC 3'<br>5' ACAATGCATAAAGAC<br>CTACATAA 3'        |
|        | SSsp2216 [38]  | Tetranucleotidica | Ned       | 129-215    | 5' GGCCCAGACAGATAA<br>ACAAACACGC 3'<br>5' GCCAACAGCAGCATC<br>TACACCCAG 3'   |

Tab. 1 – Elenco dei loci microsatelliti amplificati nella reazione di PCR-multiplex con indicato reazione di appartenenza, natura della ripetizione, colorante utilizzato, range in paia di basi e primer utilizzati.

In particolare il protocollo è stato quanto segue:

L'amplificazione 4-PLEX è stata eseguita con termociclatore A24811 SimpliAmp (Applied Biosystems) in un volume di 10.5µl. Il master mix di primer prevede le seguenti concentrazioni di primer: SsaD190-Fam 0.1µl da 100µM; SSsp2213-Hex 0.875µl da 100µM; OMM1064-Ned 0.375µl da 100µM; SsaD71-Fam 0.1µl da 100µM. La miscela di reazione utilizzata è stata la seguente: primer mix 1.25µl, 2xQuiagen Mastermix 4µl, H<sub>2</sub>O 4.25µl, DNA genomico 1µl.

L'amplificazione 8-PLEX è stata eseguita con termociclatore A24811 SimpliAmp (Applied Biosystems) in un volume di 10.5µl. Il master mix di primer prevede le seguenti concentrazioni di primer: SsoSL438-Ned 0.2µl da 100µM; Str60INRA-Hex 0,15µl da 100µM; Ssa85-Fam 0.1µl da 100µM; Str73INRA-Fam 0.2µl da 100µM; SsoSL417-Hex 0.4µl da 100µM; SSsp2216-Ned 0.05µl da 100µM; Ssa410Uos-Fam 0.1µl da 100µM; Ssa408Uos-Hex 0.75µl da 100µM. La miscela di reazione utilizzata è stata la seguente: primer mix 1.25µl, 2xQuiagen Mastermix 4µl, H<sub>2</sub>O 4.25µl, DNA genomico 1µl.

Il profilo termico di reazione è stato:

-Attivazione iniziale Taq polimerasi:

- 94 °C – 15'

Amplificazione, 34 cicli:

- 94 °C – 45"

- 57 °C – 1'30"

- 65 °C – 1'

-Elongazione finale:

- 60 °C – 30'

L'analisi della lunghezza dei frammenti è stata eseguita a seguito di diluizione 1:50 con l'uso di ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), utilizzando GeneScan 600Liz Size Standard.

I risultati sono stati forniti sotto forma di plot (elettroferogramma) con l'intensità di segnale sull'asse delle ordinate e la lunghezza del frammento sull'asse delle ascisse. Ad ogni plot sono stati associati due file, un FSA ed un TXT. Tali file presentano all'interno l'indicazione di ogni picco con un codice di riferimento, l'intensità di segnale e il colorante associato.

Per analizzare i dati, è stato sviluppato un programma ad-hoc (script) il cui obiettivo è stato facilitare l'interpretazione biologica dei dati. I dati sono stati forniti in un formato tabulare, in cui ogni campione è composto da due tabelle: la tabella dei risultati del processing 4-plex e la

tabella dei risultati del processing 8-plex. Il compito dello script è quello di associare ad ogni campione il set di loci definito dalla pubblicazione di Lerceteau-Köhler-Weiss [20], in cui ogni locus è caratterizzato da due parametri: la lunghezza e il colore usato durante il processing 4-plex/8-plex. Questa associazione è chiamata algoritmo di mapping, e permette di individuare con precisione quali picchi cromatografici corrispondano ad un determinato locus. Prima di eseguire l'associazione, i dati sono stati "trattati" con le seguenti modalità:

-tutti i picchi la cui lunghezza è risultata minore di 50 sono stati eliminati;

-tutti i picchi 4-plex di intensità minore di 2500 sono stati eliminati (limite definito sulla base di una analisi visiva dei dati);

-tutti i picchi 8-plex di intensità minore di 600 sono stati eliminati (limite definito sulla base di una analisi visiva dei dati).

Grazie a questa scrematura, l'algoritmo di mapping ha permesso di individuare i loci con chiarezza. I risultati sono stati controllati a mano, campione per campione, per risolvere alcuni conflitti legati al fatto che picchi multipli sono stati associati allo stesso locus, oltre che per assegnare alcuni picchi al di fuori dei range di lunghezza impostati. Lo script è stato scritto in R con librerie standard per la parte di processing, e con la libreria xlsx per la scrittura dell'output su file. L'output è un file excel in cui ogni tab contiene i risultati (quali picchi sono stati associati a quali loci).

I risultati sono stati ordinati per colore e per lunghezza, sempre allo scopo di facilitare la validazione biologica manuale.

I dati finali validati, ovvero due valori di lunghezza (uguali o diversi) per ogni locus sono poi stati organizzati in una tabella contenente tutti i campioni analizzati.

L'analisi statistica finale è stata eseguita in maniera analoga al gene LDH-C1 prendendo a riferimento Caputo et al. 2014 [7]. Ovvero sono stati calcolati diversi indici descrittivi come He, Ho e Fs. Ogni locus è stato inoltre testato per l'eventuale presenza di variazioni rispetto ai principi di Hardy-Weinberg tramite l'utilizzo del test statistico del  $X^2$ . Sulla base dei dati finali tabulati, per ogni locus è stata inoltre calcolata la moda e le frequenze modali per ogni lunghezza rilevata. Attraverso l'uso di questi indici sono stati disegnati degli istogrammi delle frequenze modali per mostrare le distribuzioni delle lunghezze in ogni locus.

## 5. Risultati e discussione

### 5.1. Censimenti

Sono stati catturati 752 individui, con un totale stimato, a seguito dell'applicazione della formula di Moran-Zippin [30], di 838 individui potenzialmente presenti nel totale dei corsi d'acqua esplorati.

Nella valutazione complessiva delle stazioni indagate è possibile evidenziare un gruppo di 4 di queste, aventi parametri demografici e abbondanze molto simili e tendenti all'ottimale in relazione alla tipologia ambientale monitorata. Questi tratti sono localizzati tutti nella parte alta del bacino e compresi tra una quota di 820 e di 730 m.s.l.m.. Gli altri siti di indagine localizzati più in basso, pur essendo privi di evidenti perturbazioni antropiche come del resto quelli superiori e pur mantenendo vocazione a salmonidi esclusiva, presentano popolazioni ridotte soprattutto in termini quantitativi.

Utilizzando i soli dati delle 4 stazioni in cui la trota assume valori demografici ottimali si ottiene il grafico della Figura 1 che rappresenta la perfetta struttura di popolazione che la trota possiede nella parte alta del torrente in virtù di una articolazione in ben 7 classi di età con i relativi rapporti numerici correttamente bilanciati. È anche presente un vecchio esemplare di 10 anni di vita.

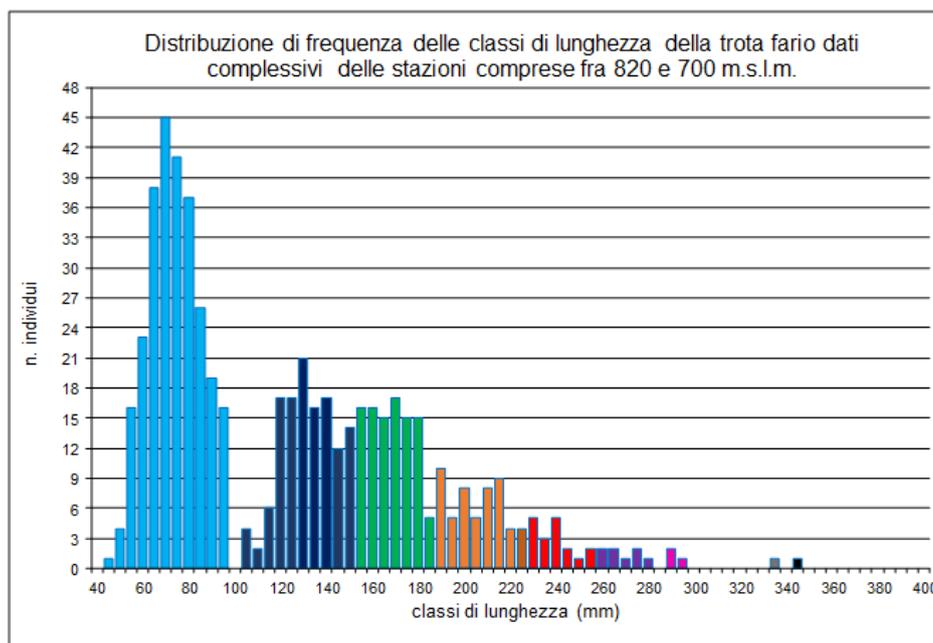


Fig. 1 – Struttura di popolazione della trota fario nella porzione alta del Bidente di X; ad ogni colore corrisponde una classe d'età come indicato in Tab. 2.

In Tab. 2 vengono proposti invece i valori reali di accrescimento in lunghezza in relazione all'età espressa in mesi e i tassi di mortalità fra le diverse classi. L'accrescimento in lunghezza vede un primo tasso più elevato nel passaggio dalla classe 0+ di settembre alla 1+ dello stesso mese in cui gli individui crescono mediamente circa 6 cm. Oltre alla classe 1+ la velocità di crescita sembra uniformarsi fra le varie coorti attestandosi sui 3,5 cm/anno.

| Colore | Età (mesi) | N° campione | LT min (mm) | LT max (mm) | Media (mm) | Z (mortalità) | Tasso di mortalità (%) | anni | N° individui (%) |
|--------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|---------------|------------------------|------|------------------|
|        | 7          | 266         | 45          | 95          | 73,7       |               |                        | 0-1  | 100              |
|        | 19         | 126         | 105         | 150         | 131,8      | 0,747         | 52,6                   | 1-2  | 47               |
|        | 31         | 113         | 150         | 185         | 166,0      | 0,109         | 10,3                   | 2-3  | 42               |
|        | 43         | 54          | 180         | 220         | 204,0      | 0,738         | 52,2                   | 3-4  | 20               |
|        | 55         | 22          | 225         | 255         | 234,2      | 0,898         | 59,3                   | 4-5  | 8                |
|        | 67         | 8           | 260         | 280         | 268,8      | 1,012         | 63,6                   | 5-6  | 3                |
|        | 79         | 3           | 290         | 295         | 291,6      | 0,981         | 62,5                   | 6-7  | 1                |
|        | 91         | 1           | 335         | 335         | 335        |               |                        | 7-8  | <1               |
|        | 100+       | 1           | 345         | 345         | 345        |               |                        | >8   | <1               |
| Totale |            | 594         |             |             |            |               |                        |      |                  |

Tab. 2 – Valori di accrescimento lunghezza/età e tassi mortalità percentuale fra le varie classi di età.

La popolazione risulta essere quindi molto ben strutturata con tutte le coorti rappresentate. I giovani sono numericamente preponderanti e il tasso di mortalità fra le varie classi si attesta costantemente a poco più del 50%, tranne che nella transizione tra gli individui 1+ e 2+ in cui è possibile evidenziare una mortalità del solo 10%.

Inoltre le popolazioni delle quattro stazioni presentano una densità media di  $0.35 \pm 0.10$  ind/m<sup>2</sup> ed una biomassa media di  $11.53 \pm 0.94$  g/m<sup>2</sup>. Valori che denotano una popolazione in ottima salute.

## 5.2. Analisi genetiche

In totale sono stati raccolti 103 campioni. Nell'analisi sono stati esclusi i risultati derivanti da 9 campioni raccolti nelle stazioni più a valle in quanto non sarebbero successivamente state interessate dalle operazioni di ricattura dei riproduttori. Inoltre queste stazioni sono separate da quelle più a monte da ostacoli invalicabili e sono state interessate da attività di ripopolamento con animali di allevamento in tempi recenti. Costituiscono perciò una popolazione verosimilmente separata rispetto a quella presente nelle stazioni a monte, che si trovano invece in uno stato di continuità fluviale tra loro. Sono stati inoltre rimossi 3 campioni per i quali non

è stato possibile amplificare il DNA. In totale i risultati sono quindi stati analizzati per 91 campioni. Tale analisi è mostrata nei paragrafi successivi. L'alcol puro si è prestato bene alla conservazione dei campioni per analisi genetiche in quanto disidratando il campione ha garantito una migliore preservazione del DNA. L'azione distruttiva dell'alcol sulla morfologia cellulare non si è rivelata un problema in quanto non sono state eseguite analisi di tipo istologico.

Siccome in questo progetto le trote campionate sono state rilasciate nel punto di cattura e non portate in incubatoio, trovare un metodo efficiente di riconoscimento tramite tagging è stato essenziale.

### **5.2.1. Sequenziamento zona di controllo D-loop**

I risultati derivanti dal sequenziamento hanno mostrato una qualità alta con basso rumore e assenza di doppi picchi o elementi di confondimento in zone con polimorfismi. Solo per un campione sono stati risolti, tramite osservazione diretta del cromatogramma, dei conflitti dovuti probabilmente a contaminazione. Tale contaminazione è stata provocata quasi certamente da un errore umano in fase di raccolta dei campioni.

3 dei 103 campioni (11, 35 e 73) sono stati esclusi dall'analisi perché non ritenuti adeguati a causa di sequenze molto rumorose e indecifrabili dovute probabilmente ad un problema in fase di espansione del DNA. L'eliminazione di questi campioni ha permesso di eseguire gli allineamenti e le analisi nel modo più preciso possibile.

A seguito dell'esportazione delle sequenze in formato FASTA è stato eseguito l'allineamento multiplo tramite l'utilizzo del software ClustalW. Questo ha mostrato la presenza di solamente due aplotipi all'interno di tutta la popolazione. Altri due aplotipi sono stati ritrovati su due individui della parte più a valle del torrente, probabilmente derivanti dalle attività di ripopolamento eseguite in tempi recenti.

Una volta confermata la presenza di solamente due varianti della sequenza è stata eseguita la ricerca, sequenza per sequenza, con BLASTn. Per ogni sequenza è poi stato definito un valore di identità ed il numero e natura delle mutazioni presenti tra le sequenze del campione e quelle presenti in database.

In Tab. 3 è possibile vedere i risultati derivanti dal confronto dei due aplotipi con le cinque sequenze prese come riferimento. Per ogni sequenza di riferimento è indicato il nome della entry di GenBank.

| Aplotipo | AF253549.1<br>(mediterraneo) |      | AF253559.1<br>(atlantico) |      | JN807337.1<br>(macrostigma) |      | EF689115.1<br>(marmorato) |      | JX846932.1<br>(adriatico) |      |
|----------|------------------------------|------|---------------------------|------|-----------------------------|------|---------------------------|------|---------------------------|------|
|          | Id.                          | Mut. | Id.                       | Mut. | Id.                         | Mut. | Id.                       | Mut. | Id.                       | Mut. |
| 1        | 99%                          | 1    | 98%                       | 7    | 99%                         | 4    | 99%                       | 6    | 99%                       | 5    |
| 2        | 98%                          | 7    | 99%                       | 1    | 98%                         | 8    | 99%                       | 1    | 99%                       | 5    |

Tab. 3 – Valori di identità e numero di mutazioni dei due aplotipi presenti nel campione rispetto alle cinque sequenze di riferimento selezionate dal database GenBank.

Sulla base di questi risultati è stato definito l'aplotipo 1 come mediterraneo, “variante bidentina”, e l'aplotipo 2 come atlantico.

Per quanto riguarda l'aplotipo 1, questo mostra una quasi totale identità con l'aplotipo mediterraneo ed un numero di mutazioni sostanzialmente più alto rispetto a tutti gli altri aplotipi. Risulta quindi essere riferibile alla linea mediterranea. Va sottolineato come sia stata identificata una transizione con presenza di una C al posto di una T rispetto alla sequenza di riferimento. Infatti, la sequenza non risulta essere presente all'interno di alcun database esplorato ed è perciò stata definita come “variante bidentina”. Tale sequenza andrebbe esplorata con tecniche di sequenziamento Sanger per validare definitivamente la variante.

L'aplotipo 2 presenta invece identità quasi assoluta sia con l'aplotipo atlantico che con quello marmorato, con la presenza di una sola mutazione rispetto ad entrambi. La mutazione presente rispetto all'aplotipo atlantico di riferimento è una transizione di una C con una T, mentre la mutazione rispetto all'aplotipo marmorato è una indel. L'aplotipo è stato perciò assegnato al ceppo atlantico.

L'analisi ha permesso di classificare ogni individuo assegnandone l'appartenenza ad uno dei due ceppi. In particolare nel campione di 91 esemplari, 86 sono risultati con aplotipo mediterraneo e 5 con aplotipo atlantico. La popolazione presenta quindi una percentuale di individui con aplotipo mediterraneo autoctono pari al 94.5%.

Al suo interno la popolazione ha mostrato una variabilità nulla in quanto tutte le sequenze mediterranee riscontrate sono risultate uguali. Allo stesso modo le cinque sequenze atlantiche sono risultate uguali tra loro.

### 5.2.2. Analisi PCR-RFLP del gene nucleare LDH-C1\*

Nell'interpretazione dei dati tramite osservazione diretta del gel è stata applicata la correzione eseguita nel precedente studio del 2015 per risolvere conflitti interpretativi legati alla presenza di un aspecifico di PCR [6].

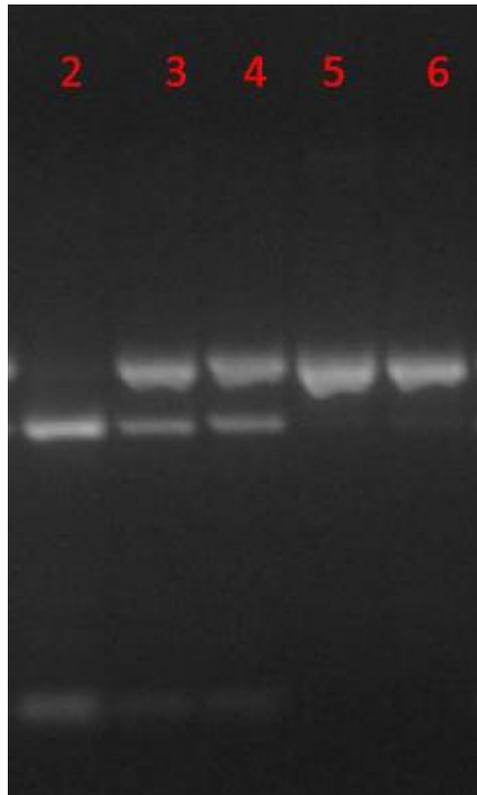


Fig. 2 – Foto di gel di agarosio con rappresentati tutti e 3 i genotipi; il campione 2 risulta puro atlantico, i campioni 3 e 4 ibridi mentre i campioni 5 e 6 marciano come puri mediterranei.

I dati sono poi stati tabulati assegnando ad ogni campione il genotipo corrispondente. I genotipi di tipo AA indicano individui atlantici per entrambi gli alleli, AM sono invece gli ibridi, mentre MM sono i genotipi omozigoti mediterranei (in Figura 2 è possibile vedere tutte e tre le combinazioni su gel di agarosio). Sulla base di questa tabella è stata calcolata la frequenza allelica delle due varianti. In particolare sono stati ritrovati 50 individui con genotipo MM, 33 con genotipo AM e 7 con genotipo AA; è stata quindi calcolata una frequenza allelica del 73.9% per il genotipo mediterraneo e del 26.1% per quello atlantico. Tali percentuali sono in linea con quelle ritrovate nello studio del 2015 [6].

Sulla base delle frequenze alleliche è stata calcolata una eterozigosità attesa del 38.6%, l'eterozigosità osservata è del 36.7%. A seguito dell'applicazione del test del X<sup>2</sup> è risultato che la popolazione rispetta il principio di Hardy-Weinberg per il locus LDH-C1 con un valore di  $p=0.710$  (l'ipotesi nulla, ovvero il rispetto del principio HW sarebbe scartata solo per valori di  $p<0.05$ ). La popolazione sembra quindi essere panmittica, con un riassortimento libero del patrimonio genetico atlantico e mediterraneo ad ogni ciclo riproduttivo. Il coefficiente di inbreeding è pari a 0.049 indicando un numero di eterozigoti minore all'atteso e una potenziale presenza di inbreeding.

I dati derivanti dall'analisi eseguita sul locus LDH-C1\* sono stati combinati coi dati derivanti dall'analisi della zona di controllo D-loop mitocondriale. È stato applicato l'indice di ibridazione utilizzato da Penserini [45]. Tale indice associa ad ogni trota un livello qualitativo da I (massimo potenziale di ibridazione) a VI (nullo potenziale di ibridazione); l'indice descrive il grado di presenza di alleli alloctoni nei soggetti studiati e del potenziale di introgressione che questi individui apportano in caso di incontro con una popolazione autoctona.

In Tab. 4 sono visualizzati tutti i risultati con indicato il genotipo e l'indice relativo ad ogni trota campionata.

| Num. | Aplotipo mitocondriale D-loop | Nucleare LDH-C1 | Indice di ibridazione |
|------|-------------------------------|-----------------|-----------------------|
| 10   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 12   | ME/Bid                        | AM              | IV                    |
| 13   | ME/Bid                        | AM              | IV                    |
| 14   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 15   | ME/Bid                        | AM              | IV                    |
| 16   | ME/Bid                        | AM              | IV                    |
| 17   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 18   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 19   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 20   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 21   | ME/Bid                        | AM              | IV                    |
| 22   | ME/Bid                        | AM              | IV                    |
| 23   | ME/Bid                        | AM              | IV                    |
| 24   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 25   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 26   | ME/Bid                        | AA              | II                    |
| 27   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 28   | AT                            | AM              | III                   |
| 29   | ME/Bid                        | AM              | IV                    |
| 30   | ME/Bid                        | AA              | II                    |
| 31   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 32   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 33   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 34   | ME/Bid                        | AM              | IV                    |
| 36   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 37   | ME/Bid                        | AM              | IV                    |
| 38   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 39   | ME/Bid                        | AA              | II                    |
| 40   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 41   | AT                            | MM              | V                     |
| 42   | AT                            | MM              | V                     |
| 43   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 44   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 45   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 46   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 47   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 48   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 49   | ME/Bid                        | AM              | IV                    |
| 50   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 51   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 52   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |
| 53   | ME/Bid                        | MM              | VI                    |

|     |        |     |     |
|-----|--------|-----|-----|
| 54  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 55  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 56  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 57  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 58  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 59  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 60  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 61  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 62  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 63  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 64  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 65  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 66  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 67  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 68  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 69  | ME/Bid | AA  | II  |
| 70  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 71  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 72  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 74  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 75  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 76  | AT     | ??? | ??? |
| 77  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 78  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 79  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 80  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 81  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 82  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 83  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 84  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 85  | AT     | AA  | I   |
| 86  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 87  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 88  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 89  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 90  | ME/Bid | AA  | II  |
| 91  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 92  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 93  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 94  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 95  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 96  | ME/Bid | AA  | II  |
| 97  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 98  | ME/Bid | MM  | VI  |
| 99  | ME/Bid | AM  | IV  |
| 100 | ME/Bid | MM  | VI  |
| 101 | ME/Bid | AM  | IV  |
| 102 | ME/Bid | AM  | IV  |
| 103 | ME/Bid | AM  | IV  |

Tab. 4 – Risultati genetici e indice di ibridazione per ogni campione.

In totale sono stati ritrovati 48 esemplari di classe VI, 2 esemplari di classe V, 32 esemplari di classe IV, 1 esemplare di classe III, 6 esemplari di classe II e 1 esemplare di classe I. È evidente

la preponderanza delle classi IV e VI, si può inoltre notare la presenza di molti esemplari nelle classi intermedie indicando una introgressione genetica in atto con molti individui ibridi.

Sulla base di questi risultati sono poi stati scelti i riproduttori, appartenenti alla VI classe, che sono stati ricatturati e portati in incubatoio per le operazioni di fecondazione artificiale.

### 5.2.3. Analisi dei loci nucleari microsatelliti

A seguito dell'applicazione dell'algoritmo di mapping i dati sono stati validati manualmente ad uno ad uno, questo si è rivelato necessario in quanto la procedura ha prodotto dati rumorosi e spesso gli alleli si trovavano al di fuori dei range indicati dallo studio di Lerceteau-Köhler-Weiss [20]. Tramite l'osservazione e la scrematura manuale è stato possibile individuare una coppia di valori veri per ogni locus.

Durante le operazioni di lettura sono stati scartati i due loci SsoSL438 e SSsp2216 nella 8-plex per assenza di picchi evidenti in tutti i campioni. Allo stesso modo il locus Ssa410Uos è stato escluso in quanto non presenta picchi chiari e si è rivelato di difficile interpretazione. L'analisi finale è stata quindi eseguita sui 9 loci restanti.

Tramite il calcolo delle frequenze di ogni allele ritrovato in ogni locus è stato possibile calcolare l'eterozigosità attesa. In Tab. 5 sono presentati i risultati derivanti dall'analisi eseguita su ogni locus.

|                   |                 |                 |                |                 |             |
|-------------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------|
|                   | SsaD190 (4bp)   | SsaD71 (4bp)    | SSsp2213 (4bp) | OMM1064 (4bp)   | Ssa85 (2bp) |
| He                | 0.565867        | 0.785679        | 0.654205       | 0.237041        | 0.403673    |
| Ho                | 0.576087        | 0.811111        | 0.709302       | 0.128571        | 0.345679    |
| X <sup>2</sup> -p | 0.843223        | 0.556558        | 0.282701       | <b>0.032843</b> | 0.287408    |
| Fs                | -0.01806        | -0.03237        | -0.08422       | 0.457598        | 0.143666    |
| Moda              | 122             | 246             | 198            | 166             | 106         |
|                   | Str73INRA (2bp) | Str60INRA (2bp) | SsoSL417 (2bp) | Ssa408Uos (4bp) |             |
| He                | 0.434666        | 0.02597         | 0.645086       | 0.72897         |             |
| Ho                | 0.357143        | 0.026316        | 0.73494        | 0.707317        |             |
| X <sup>2</sup> -p | 0.151771        | 0.984857        | 0.087115       | 0.659126        |             |
| Fs                | 0.17835         | -0.01333        | -0.13929       | 0.029703        |             |
| Moda              | 148             | 92              | 196            | 245             |             |

Tab. 5 – Risultati dell'analisi eseguita su 9 loci microsatelliti.

L'analisi mostra risultati in linea con quanto atteso a seguito dell'analisi nucleare, ovvero per 8 loci su 9 risulta rispettato il principio di Hardy-Weinberg. Solo il locus OMM1064 mostra una

deviazione rispetto al principio con una percentuale osservata di eterozigoti minore a quella attesa ( $p=0.033$ ) e alto coefficiente di inbreeding. La popolazione si identifica anche qui come panmittica. Non sembrano perciò esserci barriere riproduttive tra gli individui che pertanto appartengono ad una singola popolazione. Alla luce di ciò, le due linee genetiche, autoctona e alloctona, originariamente separate, sembrano essere in uno stato di completa commistione con un livello di introgressione presente su ogni individuo.

I coefficienti di inbreeding sono positivi per i loci OMM1064, Ssa85, Str73INRA e Ssa408Uos, indicando un leggero livello di inbreeding. Al contrario i loci SsaD190, SsaD71, SSsp2213, Str60INRA e SsoSL417 mostrano valori negativi dell'indice, in ogni caso sempre vicini a 0.

In Figura 3 sono invece mostrate le distribuzioni delle frequenze alleliche per ogni locus.

È possibile notare come le distribuzioni seguano due tipi di andamenti, uno bimodale ed uno unimodale. In particolare i loci SsaD190, SSsp2213, Str73INRA, SsoSL417 e Ssa408Uos presentano un andamento riferibile ad una distribuzione bimodale, con due picchi. Uno dei due picchi è sempre più consistente e porta al suo interno la moda, mentre il picco secondario tende ad una forma più allargata con frequenze alleliche sensibilmente più basse.

I loci OMM1064, Ssa85 e Str60INRA presentano invece un andamento unimodale a singolo picco. Più complesso è il locus SsaD71 in cui non è possibile definire una distribuzione chiara. Sono presenti infatti 4 picchi di cui uno maggiore contenente la moda. Inoltre questi picchi si trovano a lunghezze piuttosto lontane tra loro identificando la possibile provenienza da più popolazioni.

È difficile fare considerazioni in merito all'autoctonia o meno di un certo range di lunghezze. Può sembrare verosimile assegnare i picchi maggiori al ceppo autoctono in quanto aventi frequenze modali in linea con la frequenza dell'allele LDH-C1\*100, ma non avendo riferimenti chiari di popolazioni limitrofe interamente pure non è possibile assegnare il range con sicurezza. Allo stesso modo non si conoscono i profili microsatelliti delle popolazioni alloctone introdotte con i ripopolamenti.

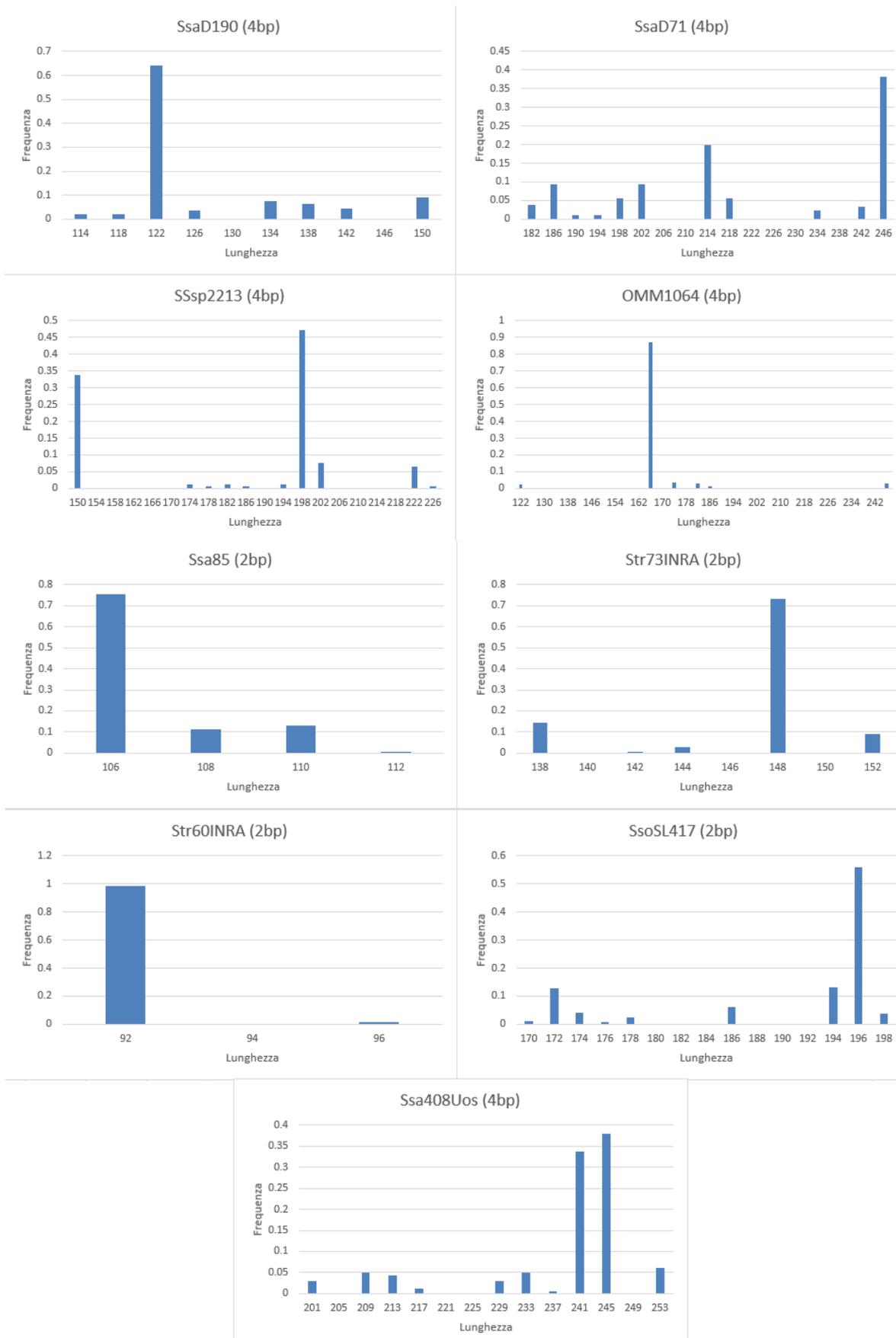


Fig. 3 – Distribuzioni delle frequenze alleliche dei 9 loci microsatelliti.

## 6. Conclusioni

I dati riportati in questa tesi hanno permesso di caratterizzare in maniera esaustiva e soddisfacente la popolazione autoctona relitta identificata nello studio del 2015 [6]. L'applicazione di tecniche ecologiche e molecolari hanno permesso di ottenere delle basi solide su cui costruire delle efficaci azioni di recupero e salvaguardia.

A partire dai dati ecologici rilevati tramite i censimenti è apparso come la popolazione di trote sia sana e capace di autosostenersi, con tutte le classi d'età rappresentate. Per le attività di recupero erano state valutate due opzioni differenti di intervento. La prima, logisticamente più complicata, prevedeva la raccolta di uova e seme direttamente sul torrente. Questa opzione è però estremamente complicata in quanto il periodo riproduttivo della trota cambia a seconda dell'ambiente in cui si trova [27], per cui il momento esatto di maturazione delle gonadi, in particolare delle uova, è incognito. Sulla base dei risultati derivanti dalle operazioni di censimento si è deciso di applicare la seconda opzione di intervento che prevede la cattura dei riproduttori dal torrente e il trasporto degli stessi in incubatoio. Questa modalità, seppur più impattante, in quanto prevede la rimozione completa di individui riproduttori geneticamente autoctoni dal torrente, è sicuramente più efficace per le necessità di allevamento. Permette infatti di verificare i livelli di maturazione direttamente in incubatoio procedendo alla "spremitura" (ovvero l'induzione manuale del rilascio di sperma e uova) nel momento più opportuno. Alla ricattura degli individui geneticamente autoctoni è stata affiancata comunque la rimozione di individui ibridi e/o alloctoni in modo da preservare, per quanto possibile, le frequenze alleliche ritrovate in origine. Alcuni individui puri autoctoni sono inoltre stati lasciati nel torrente.

La selezione degli individui riproduttori è stata eseguita sulla base della Tab. 4, includendo nel prelievo solamente gli individui in classe VI.

Geneticamente la popolazione ha mostrato delle frequenze di genoma autoctono piuttosto alte con il 94.5% di aplotipi mediterranei. A questo valore va affiancato il 73.9% di frequenza per l'allele autoctono LDH-C1\*100, anch'esso soddisfacente. La combinazione di questi marcatori restituisce il 53.3% di individui puri per entrambi i loci. Purtroppo però le analisi statistiche eseguite sul locus LDH-C1 e sui 9 loci microsatelliti hanno mostrato una introgressione più o meno alta su tutti gli individui studiati. Ovvero non è possibile distinguere geneticamente due popolazioni separate ma si identifica una singola popolazione panmittica. Questo fa intuire che l'evento di inquinamento genetico sia avvenuto molto tempo fa e le due popolazioni, originariamente separate, abbiano avuto il tempo di ibridarsi nell'arco di molte generazioni.

Durante i processi di ibridazione, gli eventi di ricombinazione genetica provocano uno scambio irreversibile di porzioni di genoma, in questo caso porzioni di genoma di trota atlantica hanno irrimediabilmente inquinato il genoma mediterraneo autoctono [5]. Ragion per cui la popolazione risulta essere irrimediabilmente e integralmente introgressa ed è probabile che anche individui con indice di ibridazione VI portino con sé frammenti di genoma atlantico alloctono.

Va comunque considerato che la frequenza dell'allele LDH-C1\*100 è piuttosto alta. È perciò verosimile che il genoma mediterraneo, seppur inquinato, sia ancora debitamente e ampiamente rappresentato. L'attività di recupero assume perciò una importanza fondamentale nel conservare ciò che è rimasto della originale popolazione del Bidente di X. A questa andrà affiancata una operazione capillare di rimozione del ceppo alloctono, seguita da ripopolamenti laddove la trota autoctona era storicamente presente.

Di particolare importanza sarà anche la tutela dell'ambiente in cui si trova attualmente la popolazione autoctona relitta. Tale zona potrà infatti servire in futuro da potenziale sorgente di riproduttori per aumentare la variabilità genetica in incubatoio.

Questo studio indica inoltre la necessità di condurre studi futuri. È infatti consigliabile ampliare l'indagine sia a torrenti in cui è già stata ritrovata presenza di genoma autoctono [6,15,21] sia a torrenti ancora inesplorati appartenenti ai bacini idrografici di Bidente, Rabbi e Montone. Il ritrovamento di altre popolazioni autoctone permetterebbe di ridurre il collo di bottiglia genetico e ampliare ulteriormente la variabilità genetica in incubatoio.

## 7. Ringraziamenti

Desidero ringraziare l'ente Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi per aver finanziato ed aver creduto nel progetto oggetto di questa tesi, in particolare Nevio Agostini e Davide Alberti che si sono interessati in prima persona alla progettazione e allo sviluppo dell'impresa.

Un dovuto ringraziamento va inoltre al Museo di Ecologia di Meldola, rappresentato dal Dott. Giancarlo Tedaldi, correlatore di questa tesi. Il suo contributo è stato vitale ed instancabile in tutte le fasi organizzative ed operative.

Sono inoltre grato al Dott. Francesco Palma, relatore di questa tesi, per essersi interessato ed essersi preso la responsabilità di sostenermi nello sviluppo di questo progetto a carattere ecologico.

Desidero ancora ringraziare il Dott. Andrea De Paoli, correlatore della tesi, per avermi coinvolto nel progetto di ricerca. Il suo aiuto continuo in tutte le fasi del progetto è stato critico nel successo dello stesso.

Per la sua enorme disponibilità ed il suo preciso e impeccabile lavoro nella fase operativa e di progettazione delle analisi genetiche vorrei ringraziare la Dott.ssa Giada Galleazzi ed il laboratorio Bio-Fab Research SRL.

Un importante contributo per la stesura è stato fornito del Dott. Federico Taverna, che ha curato la parte bioinformatica, dando un aiuto determinante nell'analisi dei dati.

È inoltre opportuno ricordare Marco Magrini ed il Dott. Davide Mina per il loro instancabile aiuto nelle fasi operative del progetto.

Infine un ringraziamento dovuto a tutti coloro che hanno aiutato a vario titolo nel progetto ed alla mia famiglia, per il sostegno continuo fornito in tutti questi mesi, senza il quale non sarebbe stato possibile completare questo lavoro.

## 8. Bibliografia

- [1] – F.N. Marzano, N. Corradi, R. Papa, J. Tagliavinia, G. Gandolfi, Molecular evidence for introgression and loss of genetic variability in *Salmo (trutta) macrostigma* as a result of massive restocking of Apennine populations (Northern and Central Italy), *Environmental Biology of Fishes* 68 (2003) 349–356.
- [2] – G. Gandolfi, S. Zerunian, P. Torricelli, A. Marconato, Salmonidi (Salmonids), in: *I pesci delle acque interne italiane (Italian freshwater fishes)*, Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma, 1991, pp. 280-309.
- [3] – S. Zerunian, *Condannati all'estinzione? Biodiversità, biologia, minacce e strategie di conservazione dei Pesci d'acqua dolce indigeni in Italia*, Edagricole, Bologna, 2002.
- [4] – J.L. Horreo, D. Abad, E. Dopico, M. Oberlin, E. Garcia-Vazquez, Expansion of Non-Native Brown Trout in South Europe May Be Inadvertently Driven by Stocking: Molecular and Social Survey in the North Iberian Narcea River, *Int. J. Mol. Sci.* 16, (2015), 15546-15559.
- [5] – J.M. Rhymer, D. Simberloff, Extinction by hybridization and introgression, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27 (1996), 83-109.
- [6] – G. Tedaldi, L. Casali, D. Mina, M. Magrini, A. De Paoli, *Ricerca fenotipica e genotipica della trota fario indigena nel Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi*, Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, unpublished paper (2015).
- [7] – V. Caputo, M. Giovannotti, A. Splendiani, Practical recommendation on the fittest approach to perform the captive breeding and restocking action on macrostigma trout – Part 1, *Life+ Trota, Natura* 2000 (2014).
- [8] – A. Ferguson, J.B. Taggart, Genetic differentiation among the sympatric brown trout (*Salmo trutta*) populations of Lough Melvin, Ireland, *Biological Journal of the Linnean Society*, Volume 43, Issue 3 (1991) 221-237.

- [9] – V. Caputo, M. Giovannotti, A. Splendiani, P.N. Cerioni, M.L. Caniglia, La struttura genetica di *Salmo trutta* nelle Marche, in: V. Caputo, Ricerche sulla biodiversità delle trota fario (*Salmo trutta* L., 1758) nella Provincia di Pesaro e Urbino e nelle Marche, Provincia di Pesaro e Urbino Gestione e Tutela delle Acque Interne, Pesaro-Urbino, 2003, pp. 23-30.
- [10] – W. Donnely, L. Dill, Evidence for crypsis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* Walbaum, parr: substrate colour preference and achromatic reflectance, *J. Fish Biol.* 25 (1984) 183-195.
- [11] – M. Klinkhardt, M. Tesche, H. Greven, Database of Fish Chromosomes, *Zoosystematics and Evolution*, Volume 73, Issue 1 (1997) 183-184.
- [12] – J. Castro, S. Rodriguez, J. Arias, L. Sanchez, P. Martinez, A population analysis of Robertsonian and Ag-NOR polymorphism in brown trout (*Salmo trutta*), *Theor. Appl. Genet.* 89 (1994) 105-111.
- [13] – L. Sanchez, P. Martinez, C. Bouza, A. Vinas, Chromosomal heterochromatin differentiation in *Salmo trutta* with restriction enzymes, *Heredity* 66 (1991) 241-249.
- [14] – C. Moritz, T.E. Dowling, W.M. Brown, Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics, *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18 (1987) 269-292.
- [15] – M. Baratti, F. N. Marzano, S. Fratini, A. Piccinini, T. Patarnello, F. Dessì-Fulgheri, G. Gandolfi, Caratterizzazione genetica delle popolazioni di Trota fario del Parco delle Foreste Casentinesi, *Biologia Ambientale* 20 (2006) 237-240.
- [16] – J. Suárez, J.M. Bautista, A. Almodóvar, A. Machordom, Evolution of the mitochondrial control region in Palearctic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula, *Heredity* 87 (2001) 198-206.
- [17] – J.L. Garcia-Marin, F.M. Utter, C. Pla, Postglacial colonization of brown trout in Europe based on distribution of allozyme variants, *Heredity* 82 (1999) 46-56.

- [18] – O.M. McMeel, E.M. Hoey, A. Ferguson, 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, *Molecular Ecology* 10 (2001) 29-34.
- [19] – B.L. Pilgrim, R.C. Perry, D.G. Keefe, E.A. Perry, H.D. Marshall, Microsatellite variation and genetic structure of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) populations in Labrador and neighboring Atlantic Canada: evidence for ongoing gene flow and dual routes of post-Wisconsinan colonization, *Ecol. Evol.* 2(5) (2012) 885-898.
- [20] – E. Lerceteau-Köhler, S. Weiss, Development of a multiplex PCR microsatellite assay in brown trout *Salmo trutta*, and its potential application for the genus, *Aquaculture* 258 (2006) 641-645.
- [21] – F. Zaccanti, R. Falconi, G. Rossi, R. Dall’Olio, E. Boschieri, Struttura, dinamica e genetica di popolazione di trota di torrente, *Salmo (trutta) trutta*, nelle acque di categoria “D” della Provincia di Forlì-Cesena, Provincia di Forlì-Cesena, unpublished paper (2001).
- [22] – P. Venturini, Aspetti geologici dell’Appennino Romagnolo, in: O. Bandini, G. Casadei, G. Merenda, L’altro Bidente e le sue valli, Maggioli Editore, Rimini, 1988, pp. 21-26.
- [23] - Diga di Ridracoli, <http://www.ridracoli.it/>, 2016.
- [24] – A.N. Lucarda, G. Forneris, Indagine sull’origine della trota fario di fenotipo mediterraneo (ceppo “francese”) in Piemonte, Regione Piemonte - Direzione Agricoltura Settore Tutela e gestione della Fauna Selvatica e Acquatica, unpublished paper (2011).
- [25] – G. Tedaldi, A. Suzzi Valli, S. Casali, D. Santi, G. Busignani, Situazione generale delle specie, in: Anfibi e Rettili della Repubblica di San Marino, Centro Naturalistico Sammarinese, San Marino, 2014, pp. 92-94
- [26] – H. Jensen, M. Kiljunen, P.A. Amundsen, Dietary ontogeny and niche shift to piscivory in lacustrine brown trout *Salmo trutta* revealed by stomach content and stable isotope analyses, *Journal of Fish Biology* 80(7) (2012) 2448-2462.

- [27] – S. Zerunian, Trota fario e Trota lacustre, in: Pesci delle acque interne d'Italia, Quad. Cons. Natura 20, Min. Ambiente – Ist. Naz. Fauna Selvatica, Savignano sul Panaro, 2004, pp. 124-125.
- [28] - T.B. Bagenal, F.W. Tesch, Age and growth, in: T.B. Bagenal, (ed) Methods for assessment of fish production in freshwater, 3rd edition, Blackwell Scientific Publication, Oxford, UK, 1978, pp. 101–136.
- [29] – M. Lorenzoni, A.J. Martin Dörr, R. Erra, G. Giovinazzo, M. Mearelli, S. Selvi, Growth and reproduction of largemouth bass (*Micropterus salmoides* Lacépède, 1802) in Lake Trasimeno (Umbria, Italy), Fisheries Research 56 (2002) 89-95.
- [30] – C. Zippin, The removal method of population estimation, Journal of wildlife management 22 (1958) 82-90.
- [31] – G.A.F. Seber, E.D. Le Cren, Estimating population parameters from catches large relative to the population, Journal of Animal Ecology 36 (1967) 631-643.
- [32] – P.A. Moran, A mathematical theory of animal trapping, Biometrika 38 (1951) 644-658.
- [33] – A. Berg, E. Grimaldi, A critical interpretation of the scales structures used for determination of annuli in fish growth studies, Mem. Ist. Ital. Idrobiol. 21 (1967) 225-239.
- [34] – W.F. Siegler, J.W. Siegler, Electricity in Fisheries, from Recreational Fisheries. Management, Theory and Application, University of Nevada Press, Reno, 1990, pp. 217-258.
- [35] – G. Gentili, S. Porrini, Provincia di Varese, piano ittico provinciale, Assessorato gestione faunistica, Varese, 2009, pp. 35-47.
- [36] – NMT INC Northwest Marine Technology, <http://www.nmt.us/products/via/via.shtml>, Ben Nevis Loop Rd Shaw Island, USA, 2016.

- [37] – T.L. King, M.S. Eackles, B.H. Letcher, Microsatellite DNA markers for the study of Atlantic salmon (*Salmo salar*) kinship, population structure, and mixed-fishery analyses, *Molecular Ecology Notes* 5 (2005) 130-132.
- [38] – S. Paterson, S.B. Piertney, D. Knox, J. Gilbey, E. Verspoor, Characterization and PCR multiplexing of novel highly variable tetranucleotide Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellites, *Molecular Ecology Notes* 4 (2004), 160-162.
- [39] – C. E. Rexroad, R.L. Coleman, W.K. Hershberger, J. Killefer, Rapid communication: Thirty-eight polymorphic microsatellite markers for mapping in rainbow trout, *J. Anim. Sci.* 80 (2002) 541-542.
- [40] – P.T. O'Reilly, L.C. Hamilton, S.K. McConnell, J.M. Wright, Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites, *Can. J. Fish. Aquat. Sci* 53 (1996) 2292-2298.
- [41] – A. Estoup, P. Presa, F. Krieg, D. Vaiman, R. Guyomard, (CT) and (GT) microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout), *Heredity* 71 (1993) 488-496.
- [42] – M. Cairney, J.B. Taggart, B. Høyheim, Characterization of microsatellite and minisatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and cross-species amplification in other salmonids, *Molecular Ecology* 9 (2000), 2175-2178.
- [43] – A. Slettan, I. Olsaker, Ø. Lie, Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311, SSOSL417 loci, *Animal Genetics* 26 (1995), 281-282.
- [44] – NCBI, Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/Z49134>, S.salar DNA for STS (SSOSL438), sequence tagged site, 2006.
- [45] – M. Penserini, F.N. Marzano, G. Gandolfi, M. Maldini, Genotypes and phenotypes of mediterranean brown trout: molecular investigation combined to morphological characterization for identification of autochthonous specimens, *Quaderni ETP* 34 (2006), 69-75.

[46] - Fédération de Pêche et de Protection du Milieu Aquatique de la Loire, identification de la diversité génétique et programme de sauvegarde des populations de truites du département de la Loire, projet commun interfédéral (départements :03, 38, 42, 43, 63, 69, 73, 74) de recherche collaborative pour mieux localiser, identifier et gérer la diversité génétique chez la truite commune (*Salmo trutta*) à des échelles spatiales cohérentes - 2012 – 2015 (2016) pp. 47-48.

[47] – J.A. Gulland, Manual of Methods for fish stock assessment. Part 1. Fish population analysis, FAO Man. Fish. Sci. 4 (1969) 154.

[48] – Macherey-Nagel, Genomic DNA from tissue, User manual, NucleoSpin® Tissue, [http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM\\_gDNATissue.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM_gDNATissue.pdf), 2016.