

Marcatori molecolari e conservazione dell'ittiofauna delle acque dolci

Francesco Nonnis Marzano^{1*}, Milena Maldini¹,
Maurizio Penserini¹, Riccardo Papa^{1,2}, Gilberto Gandolfi¹

¹ Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università degli Studi di Parma, Viale G.P. Usberti 11/a – 43100 Parma

² Department of Animal Science, University of California, Davis (USA)

Referente per la corrispondenza: fax 0521 905657; francesco.nonnismarzano@unipr.it

Riassunto

Gli Autori presentano i risultati di quattro differenti studi, recentemente condotti per fini conservazionistici, sull'applicazione di marcatori molecolari del DNA a differenti specie di Salmonidi e Ciprinidi: (a) evidenza di casi di ibridazione intergenerica tra Ciprinidi Leuciscini (*Leuciscus cephalus* e *Rutilus rubilio*), esaminati mediante sequenziamento diretto di mtDNA; (b) valutazione del grado di introgressione apportato da ceppi atlantici di Trota fario (*Salmo trutta*) in popolazioni mediterranee, esaminata con la tecnica del DNA ricombinante RFLP; (c) analisi dei livelli di variabilità genomica di popolazioni di Salmerino alpino (*Salvelinus alpinus*) caratterizzate da un elevato grado di consanguineità, mediante applicazione di marcatori AFLP; (d) caratterizzazione genetica, per mezzo di sette loci microsatellite, di differenti ecotipi migratori della forma anadroma di Trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*).

L'impiego delle tecniche della biologia molecolare rappresenta un approccio innovativo nello sviluppo di piani d'azione mirati alla riabilitazione delle naturali popolazioni autoctone presenti nei bacini d'acqua dolce. Tali metodi di indagine possono essere utilizzati sia da privati che da Enti gestori quali Parchi, Riserve e Amministrazioni provinciali, come strumento investigativo in ambito ittologico per garantire interventi gestionali applicati alle diverse situazioni ambientali.

PAROLE CHIAVE: AFLP / microsatelliti / citocromo b / RFLP / ripopolamenti

DNA molecular markers for the conservation of freshwater fish fauna

Innovative methodologies are nowadays requested in the management of autochthonous populations of fish. In particular, molecular genetics is a helpful tool for the selection of wild spawners to be used in breeding programs based on artificial insemination. In this paper, four different investigations concerning a molecular approach for the management of Salmonidae and Cyprinidae are presented: (a) intergeneric hybridization between *Leuciscus cephalus* and *Rutilus rubilio* assessed by means of sequencing of mitochondrial gene *cyt b*; (b) introgression between Atlantic and Mediterranean strains of *Salmo trutta* investigated using RFLP on 16S rDNA and LDH-C1; (c) detection of genomic variability and population characterization of highly inbred *Salvelinus alpinus* by means of AFLP markers; (d) characterization of different run-timings of diadromous steelhead *Oncorhynchus mykiss* using polymorphic microsatellite loci.

Results are discussed in relation to their suitability in management programs for the recovery of natural populations ruled by public and private administrations.

KEY WORDS: AFLP / microsatellite / cytochrome b / RFLP / restocking

INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni si è assistito ad un aumento della sensibilità verso i temi della conservazione e del sostegno ad endemismi e ad autoctonie faunistiche, sia nelle zone in qualche modo adibite alla protezione della fauna, sia nei territori dove caccia e pesca rappresentano attività ricreative o commerciali. In campo ittolo-

gico, questa maggiore sensibilità si deve oggi confrontare con evidenti situazioni di degrado che si stanno estendendo sul territorio nazionale a causa dell'introduzione e acclimatazione sempre più frequente di specie alloctone e della conseguente contrazione di areale e di consistenza delle popolazioni autoctone. Questi

elementi, uniti al peggioramento morfologico e qualitativo dei corsi d'acqua, hanno portato alla luce squilibri consistenti con ripercussioni dirette sulla pesca, comportando la necessità da parte dei gestori territoriali di sopperire alla scarsità di ittiofauna con l'introduzione di quantità sempre maggiori di materiale proveniente da allevamenti. Nonostante gli sforzi economici ed organizzativi, tali pratiche raramente consentono di esercitare un'azione efficace di sostegno alle popolazioni compromesse, essendo difficilmente rispettabili gli equilibri instauratisi nei processi di adattamento alle particolari situazioni ambientali. In alcuni casi questo tipo di azioni ha addirittura provocato il collasso delle popolazioni locali, a favore di ceppi o di specie estranee immesse massicciamente.

In una corretta strategia di conservazione dell'ittiofauna d'acqua dolce, deve innanzi tutto essere considerato il ripristino di condizioni ambientali corrette per consentire lo svolgimento di naturali attività riproduttive dei taxa e, di conseguenza, non compromettere le loro potenzialità ecologiche. Gli interventi mirati al recupero delle popolazioni a rischio riguardano pertanto principalmente la gestione dei fiumi e dei laghi per il recupero delle condizioni naturali ed eventuale eradicamento delle specie alloctone, ma anche aspetti normativi e di ricerca applicata, capaci di definire piani di intervento particolareggiati per affrontare su basi scientifiche le diverse situazioni.

Nella gestione dei popolamenti ittici, particolare interesse viene sempre più rivolto alle tecniche della genetica molecolare, considerate un valido strumento per la caratterizzazione dei ceppi autoctoni da preservare. In tal modo individui selezionati su base genetica possono essere prelevati da ambienti naturali e collocati in strutture apposite per l'allevamento, al fine di costituire stock riproduttivi da impiegare in attività di ripopolamento o reintroduzione (ZERUNIAN, 2003; PENSERINI *et al.*, 2006).

In questo lavoro vengono presentati quattro differenti casi studio nei quali diverse tecniche molecolari sono state scelte per la caratterizzazione di popolamenti ittici, riferiti a specie di Salmonidi e Ciprinidi, in relazione alla problematica ecologica da affrontare. In particolare sono illustrate tecniche di genetica molecolare, quali sequenziamento diretto di mtDNA, applicazione di marcatori AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e microsatelliti (SSR - Simple Sequence Repeat; VNTR - Variable Number of Tandem Repeat), nonché analisi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) su geni nucleari e mitocondriali.

Casi di ibridazione intergenerica tra Ciprinidi Leuciscini (*Leuciscus cephalus* e *Rutilus rubilio*) e livelli di introgressione tra forme diverse della stessa specie,

quali i ceppi atlantico e mediterraneo di *Salmo trutta*, sono stati esaminati rispettivamente mediante sequenziamento diretto di aplotipi mitocondriali del gene citocromo b e applicazione degli RFLP sui geni LDH-C1* (nucleare) e 16S rDNA (mitocondriale) (MALDINI *et al.*, 2006a; PENSERINI *et al.*, 2006). L'analisi contestuale di marcatori nucleari e mitocondriali ha permesso di elaborare un indice di ibridazione da utilizzare nella selezione di riproduttori di trote mediterranee da avviare a pratiche ittiogeniche (PENSERINI *et al.*, 2006).

Al fine di identificare un ceppo idoneo di Salmerino alpino (*Salvelinus alpinus* L. 1758) da utilizzare in progetti di conservazione del popolamento del Lago Santo Parmense (Parco Nazionale dell'Appennino Tosco-Emiliano), sono stati analizzati i livelli di variabilità genomica intraspecifica mediante lo studio dei marcatori AFLP in sei popolazioni provenienti da diverse aree dell'arco alpino (MALDINI e NONNIS MARZANO, 2006). Questo marcatore è stato inizialmente introdotto per lo studio di specie vegetali (ZABEAU e VOS, 1993; VOS *et al.*, 1995) e solo in tempi relativamente recenti è stato applicato anche a taxa animali (AJMONE-MARSAN *et al.*, 1997, GOMEZ-UCHIDA *et al.*, 2003; PAPA *et al.*, 2003; RAZZOLI *et al.*, 2003). Per il suo elevato grado di risoluzione nell'individuazione di profili molecolari (*fingerprinting* o impronta digitale molecolare) individuo-specifici, il metodo è particolarmente indicato nell'analisi di popolazioni caratterizzate da alti livelli di consanguineità.

Infine, nell'ultimo caso presentato, sette loci microsatellite sono stati impiegati per stimare la struttura genetica dei differenti ecotipi migratori (invernali / estivi) della trota Steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) (PAPA *et al.*, 2007), nel fiume Klamath (Nord California, USA).

MATERIALI E METODI

Esemplari analizzati nelle diverse aree di studio

Il reticolo idrografico del Parco Nazionale del Pollino (Basilicata e Calabria) è caratterizzato da tre bacini principali in cui sono presenti popolazioni di Ciprinidi Leuciscini. In particolare, nel fiume Sinni si è sviluppato un popolamento di ibridi intergenerici, definiti su base fenotipica, il cui inquadramento tassonomico è stato eseguito attraverso l'analisi di aplotipi mitocondriali del gene citocromo b. L'analisi è stata condotta su un totale di 45 individui: 30 esemplari del Sinni e, come controlli, 8 Rovelle (*R. rubilio*) reperite nel bacino del Mercure-Lao e 7 Cavedani (*L. cephalus*) del torrente Raganello. È bene sottolineare che i tre bacini considerati sono tra loro separati dal massiccio montuoso del Pollino che funge da spartiacque. Ogni individuo analizzato è stato fotografato in modo da dispor-

re di un'immagine per la valutazione fenotipica. Inoltre sono stati esaminati 3 Cavedani catturati in Provincia di Parma e 2 Rovelle della provincia di Arezzo, utilizzati come ulteriori campioni di riferimento.

Il grado di introggressione, apportato dalla forma alloctona atlantica di *S. trutta*, è stato definito analizzando popolamenti selvatici presenti in zone torrentizie della provincia di Reggio Emilia, entro il Parco Nazionale dell'Appennino Tosco-Emiliano. In tale area sono state esaminate 12 stazioni per un totale di 73 soggetti campionati. Anche in questo caso gli esemplari catturati sono stati fotografati per la caratterizzazione fenotipica. Lo stesso tipo di studio è stato condotto inoltre su 95 individui parentali e appartenenti alla generazione F1, provenienti da un incubatoio di valle della provincia di Pescara.

L'analisi dei Salmerini alpini ha riguardato sette popolazioni naturali e di allevamento provenienti da bacini dell'arco alpino e dell'Appennino settentrionale per un totale di 125 esemplari: 24 dall'allevamento di Morgex (AO), 5 dal Lago di Cavazzo (UD), 19 dal Lago d'Iseo (BS), 5 dal Lago di Tovel (TN), 25 dal Lago Santo Parmense (PR), 10 dal Lago Boden (Germania) e 37 da Lago Sankt Wolfgang (Austria).

Il fiume Klamath negli Stati Uniti segna il confine tra gli Stati della California e dell'Oregon. Nasce dal monte Shasta e sfocia nell'Oceano Pacifico nella California Settentrionale. Nel suo bacino idrografico sono presenti popolazioni di trota Steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) costituite da forme anadrome ed altre stanziali. Sono stati analizzati 220 campioni prelevati, con metodo non invasivo (scaglie), da individui campionati tra gennaio 2000 e settembre 2002 all'interno della Yurok Tribal Fisheries dell'omonima riserva indiana.

Estrazione del DNA

Il DNA totale è stato estratto e purificato mediante l'utilizzo dell'AquaPure Genomic-DNA Kit (Bio-Rad Laboratories). Nelle specie di Salmonidi il tessuto prelevato e conservato in etanolo assoluto, era costituito dalla pinna adiposa o da scaglie, mentre nei Ciprinidi era rappresentato da parti di pinne pelviche, pettorali o caudali. I prelievi non hanno comportato il sacrificio degli animali.

Ciprinidi e sequenziamento dell'mtDNA

Il gene mitocondriale citocromo b è stato sequenziato, utilizzando *primer* specifici per Ciprinidi, che generano un amplicone di 664-pb (BRIOLAY *et al.*, 1998). Il DNA genomico è stato sottoposto a 30 cicli di amplificazione PCR in un volume di reazione di 25 μ L, con una temperatura di *annealing* di 55°C (MALDINI *et al.*, 2006a). Il prodotto dell'amplificazione, valutato mediante elettroforesi su gel d'agarosio (2%), è

stato purificato da banda di gel, utilizzando il GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham-Biosciences).

Il sequenziamento diretto è stato effettuato impiegando il CEQ™ DTCS-Quik Start Kit (Beckman Coulter). In seguito alla reazione, il prodotto ottenuto è stato precipitato per mezzo di alcoli, acetato di sodio e glicogeno e reidratato in formamide per il caricamento sul sequenziatore automatico CEQ 8000 DNA Analysis System (Beckman Coulter). Le sequenze ottenute mediante elettroforesi capillare su gel di acrilamide, sono state analizzate utilizzando alcuni software quali, CLUSTALX, Sequencher e GENEDOC, nonché programmi di ricerca di omologia delle banche dati genomiche BLAST e FASTA.

Trote fario e analisi RFLP

In seguito ad una prima classificazione fenotipica, gli esemplari di *Salmo trutta* sono stati caratterizzati geneticamente mediante la tecnica di identificazione di polimorfismi di restrizione RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) applicata su geni mitocondriali e nucleari. Tale tecnica consente di discriminare il genoma atlantico da quello mediterraneo, utilizzando come marcatore il polimorfismo di restrizione *RsaI*, sul gene mitocondriale 16S rDNA (NONNIS MARZANO *et al.*, 2003) e il polimorfismo di restrizione *BsII*, sul gene nucleare LDH-C1* (MCMEEL *et al.*, 2001), entrambi amplificabili tramite tecnica PCR. Queste endonucleasi producono frammenti di restrizione di differente peso molecolare a seconda del tipo di allele fissato (atlantico o mediterraneo). La visualizzazione ai raggi UV della corsa elettroforetica su gel agarosio, permette quindi di discriminare i due ceppi, identificando il genotipo di appartenenza e la linea di trasmissione materna degli individui esaminati relativamente all'aplotipo mitocondriale. Lo studio combinato dei risultati, ottenuti dall'utilizzo dei due marcatori molecolari, è in grado di definire il differente livello di ibridazione a seconda delle combinazioni fra gli aplotipi mitocondriali e gli alleli nucleari.

Salmerini alpini e AFLP

Negli AFLP il DNA genomico ad alto peso molecolare viene inizialmente sottoposto a restrizione con specifiche endonucleasi (*EcoRI* e *TaqI*), e successivamente ligato ad adattatori sintetici che rappresentano sequenze bersaglio per specifici *primer*. Sfruttando il principio della PCR è quindi possibile amplificare in modo selettivo i frammenti (marcatori AFLP) caratteristici di ogni individuo ed elaborare profili "fingerprinting" ottenuti sulla base di un consistente numero di bande (PAPA *et al.*, 2005; MALDINI *et al.*, 2006b). L'analisi AFLP è stata effettuata sui 125 campioni di

DNA estratto e purificato dagli esemplari di *S. alpinus*. Per ogni esemplare, sono state analizzate 5 differenti "primer combinations" (E32/T32; E32/T33; E33/T32; E33/T37; E40/T37) nell'amplificazione selettiva. Il prodotto di amplificazione è stato successivamente analizzato con sequenziatore automatico per acidi nucleici CEQ8000, unendolo ad una miscela di formamide deionizzata (Baker J. T., Phillipsburg N. J.) e di DNA standard size (CEQ DNA Size standard -600 Beckman-Coulter, Fullerton, CA). I risultati ottenuti dalle analisi dei cromatogrammi, eseguite mediante il "fragment analysis module", sono stati esportati nel software Genographer (vers. 1.6.0, Benham J.J., Montana State University 2001), dal quale si è ricavato un gel di elettroforesi virtuale, in cui le bande sono costruite sulla base dell'altezza del picco, della risoluzione e della mobilità (Fig. 1). La presenza/assenza dei frammenti ha permesso di definire la variabilità genetica intrapopolazione (calcolata in base alla percentuale dei loci polimorfici) e di elaborare indici di similarità BSI (Band Sharing Index) tra le popolazioni analizzate.

Trote Steelhead e microsatelliti

La variabilità genetica delle popolazioni di trote Steelhead del fiume Klamath, appartenenti a due differenti fasi migratorie (estivo ed invernale) (BUBSI *et al.*, 1996) è stata stimata mediante l'analisi di sette loci microsatellite. Dei 21 loci utilizzati durante lo screening, i sette prescelti (*OtsG85*, *OtsG253c*, *OtsG83b*, *OtsG249b*, *Omy1101*, *Omm1082*, *Omm1087*), sulla base del loro grado di variabilità, sono stati impiegati per l'analisi di 220 campioni appartenenti a tre differenti stagioni riproduttive (2000, 2001 e 2002).

I marcatori polimorfici sono stati analizzati su gel di poliaccrilamide mediante Molecular Dynamics 595 FluorImager (RODZEN *et al.*, 1998; PAPA *et al.*, 2007). I dati ottenuti sono stati elaborati utilizzando software bioinformatici quali ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 1992), FSTAT (GOUDET *et al.*, 1996; GOUDET, 2001), TFP-GA (MILLER, 1997), GDA (LEWIS e ZAYKIN, 2002), GENETIX (BELKHIR *et al.*, 2000) e GENEPOP (RAYMOND e ROUSSET, 1995).

RISULTATI

Ciprinidi e sequenziamento dell'mtDNA

L'analisi del gene mitocondriale citocromo b è stata condotta sugli esemplari puri di Rovella (10) e di Cavedano (10) utilizzati come riferimento. L'allineamento dei due aplotipi mitocondriali ha rivelato una percentuale di similarità tra le due specie pari all'89% con soli 66 nucleotidi variabili su un totale di 600 bp (534 paia basi in comune). All'interno della stessa specie non è stata rivelata alcuna variabilità (100% di

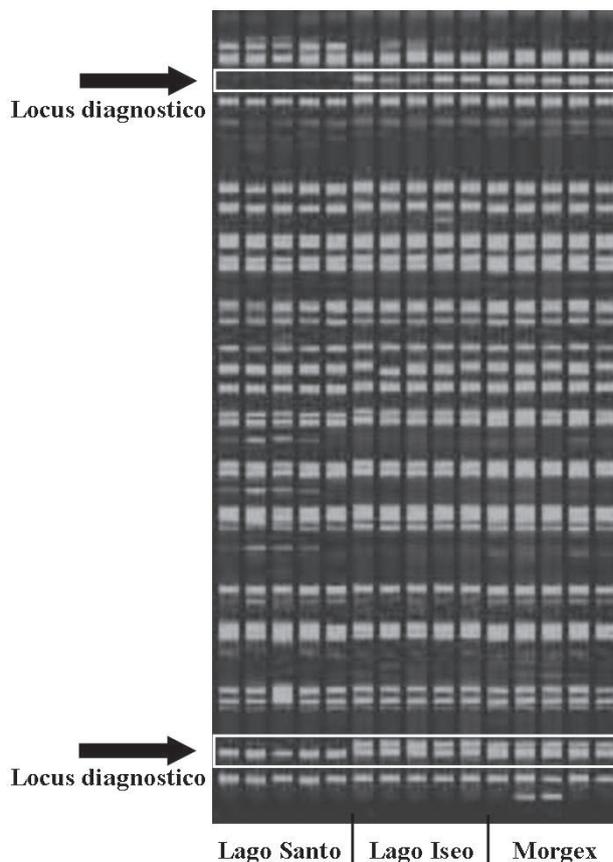


Fig. 1. Immagine di gel di elettroforesi virtuale derivante dalla conversione dei dati a fluorescenza ottenuti dalle analisi AFLP. Sono evidenziati i loci diagnostici che distinguono le differenti popolazioni di *Salvelinus alpinus*. In questo caso si noti la maggior affinità tra i Salmerini del Lago d'Iseo e di Morgex rispetto a quelli del Lago Santo sulla base della condivisione di loci diagnostici.

identità).

Successivamente sono state analizzate le 30 sequenze nucleotidiche del popolamento di ibridi del fiume Senni. L'elaborazione delle sequenze e il loro allineamento hanno permesso di ricondurre le regioni esaminate alle due tipologie monomorfiche, ognuna specifica per la specie di Ciprinidi considerata come riferimento (Cavedano o Rovella). Le sequenze nucleotidiche degli ibridi sono risultate pertanto corrispondere a uno dei due aplotipi fissati (17 aplotipo Rovella e 13 Cavedano), presentando un contributo genetico a trasmissione matrilineare prossimo al 50% per entrambe le specie di Ciprinidi.

A conferma dei dati ottenuti, sono state prese in considerazione sequenze parziali del citocromo b depositate nelle banche dati genomiche e riferibili a specie filogeneticamente vicine (congeneriche) a quelle prese in esame. I nuovi allineamenti ottenuti con CLU-

STALX sono stati elaborati in alberi NJ (Neighbour Joining) visualizzati su TreeView. Anche in questo caso l'inquadramento tassonomico degli ibridi è risultato concorde con quello ottenuto in precedenza (Fig. 2).

Trote fario e analisi RFLP

La valutazione fenotipica delle trote esaminate in ambiente naturale non è risultata in accordo con i dati ottenuti dall'analisi dei marcatori LDH-C1* e 16S rDNA. Il fenotipo attribuito alla maggior parte degli esemplari è risultato infatti quello mediterraneo (74%), mentre i dati RFLP hanno rivelato una percentuale del ceppo autoctono pari al 21% (Tab. I), in netta divergenza rispetto alla precedente analisi fenotipica. La maggioranza degli esemplari, classificati come puri su base morfologica, si è rivelata in realtà appartenere al gruppo degli ibridi (64%) in cui i due genomi sono differen-

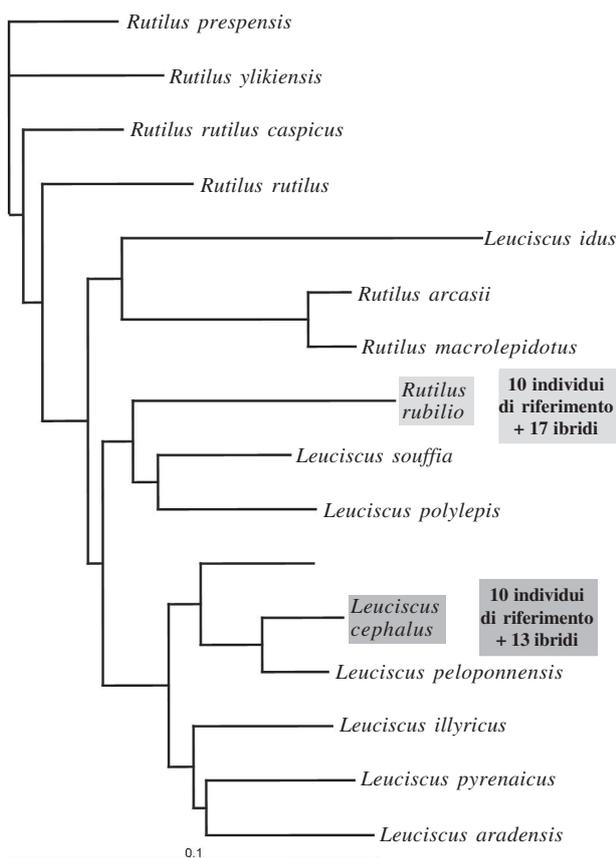


Fig. 2. Albero NJ visibile con il software TreeView costruito sulla base degli allineamenti CLUSTALX del gene Cyt b. Le specie di ciprinidi sono state scelte in base alla loro vicinanza filogenetica. Si può notare come il popolamento degli ibridi si distribuisca con gli aplotipi di *L. cephalus* (13 esemplari) e *R. rubilio* (17 esemplari).

temente combinati (Tab. I).

L'analisi combinata degli aplotipi mitocondriali e degli alleli nucleari permette di ottenere un indice di ibridazione per descrivere il grado di introgressione del genoma alloctono in una popolazione mediterranea (Tab. II). L'allele nucleare atlantico è indicato con *90, mentre l'allele nucleare mediterraneo è riportato come *100. Gli aplotipi 16S sono stati indicati A e M rispettivamente per la forma atlantica e quella mediterranea. Le combinazioni I e VI corrispondono alle due linee pure Atlantica (quindi con grado di ibridazione massimo) e Mediterranea (ibridazione nulla). Per quanto riguarda gli ibridi il differente grado di introgressione è descritto dalle combinazioni II, III, IV e V (ibridazione crescente passando dalla combinazione II alla V).

I dati ottenuti dalla sperimentazione in ambiente naturale hanno permesso di rilevare una importante presenza di soggetti ibridi che stanno sostituendo le popolazioni autoctone (alto grado di introgressione). Alla luce di ciò, l'approccio metodologico si presenta particolarmente adeguato in campo gestionale per la caratterizzazione di trote autoctone ad elevato grado di purezza, da utilizzare come novellame da ripopolamento. La tecnica infatti è stata applicata nella selezione di parchi trote della forma mediterranea da avviare alla carriera riproduttiva in un incubatoio della Provincia di Pescara arrivando alla selezione di un congruo numero di riproduttori appartenenti alla combinazione VI.

Tab. I. Percentuale di esemplari di Trota fario appartenenti ai diversi ceppi sulla base dell'analisi fenotipica o dell'analisi genetica. È evidente la netta discordanza dei due approcci.

Ceppo di appartenenza	Analisi genetica	Analisi fenotipica
Atlantico	15%	5%
Ibrido	64%	21%
Mediterraneo	21%	74%

Tab. II. Indice di ibridazione ottenuto dall'analisi combinata degli aplotipi mitocondriali con gli alleli dell'LDH-C1. La combinazione I ha indice di ibridazione massimo definito dalla presenza di soli alleli atlantici, la combinazione VI ha indice di ibridazione nullo per la presenza di soli alleli mediterranei.

Combinaz. n°	16s rDNA	LDH-C1	Indice
I	A	*90/*90	massimo
II	M	*90/*90	elevato
III	A	*90/*100	alto
IV	M	*90/*100	medio
V	A	*100/*100	basso
VI	M	*100/*100	nullo

Salmerini alpini e AFLP

La percentuale di loci polimorfici (loci variabili sul totale di bande esaminate) risultante dall'analisi AFLP, ha rivelato una bassa variabilità genetica nella popolazione di *S. alpinus*, presente nel Lago Santo Parmense (P=10%). I pochi riferimenti bibliografici su altre specie di Teleostei attestano i livelli di variabilità AFLP tra il 13% e il 62% in base alle caratteristiche ecologiche delle diverse specie.

Gli indici di similarità (BSI), ottenuti dal numero di marcatori condivisi con le altre sei popolazioni analizzate, hanno permesso di identificare i gruppi da impiegare in attività di ripopolamento per la conservazione del popolamento originario. In figura 1 è possibile osservare come alcuni marcatori altamente diagnostici consentano di verificare la maggiore affinità di un gruppo all'altro. In questo studio la popolazione tedesca e quella dell'allevamento di Cavazzo (UD) hanno rivelato bassi livelli di identità genetica con i Salmerini del Lago Santo. Una similarità del 62% inoltre ha permesso di escludere il popolamento del Lago d'Iseo come possibile ceppo di provenienza. Anche i Salmerini austriaci, per quanto presentino una maggiore identità genetica (85%) rispetto a quelli di Morgex (69%) ed Iseo, non sono tuttavia da ritenersi idonei per la reintroduzione. L'unica popolazione risultata compatibile con quella del Lago Santo Parmense, sulla base di parametri di similarità, è quella del lago di Tovel in Trentino. Purtroppo lo scarso numero di esemplari

provenienti da Tovel non ha consentito l'elaborazione di indici di similarità; tuttavia la condivisione di loci altamente diagnostici ha evidenziato una certa compatibilità tra le due popolazioni. La tecnica si è quindi rivelata efficiente anche alla luce dello scarso numero di esemplari disponibili.

Trote Steelhead e microsattelliti

L'analisi dei sette loci microsattellite condotta sulle trote Steelhead ha rivelato alti livelli di polimorfismo: da un minimo di 16 alleli per il locus *Omm1082* a un massimo di 25 per i loci *Ots85* e *Ots253c*, con una media di 21 alleli per locus. I range dei valori dell'eterozigosi attesa e osservata sono risultati rispettivamente 0,83-0,94 e 0,62-0,97.

I risultati sulla variabilità genetica hanno evidenziato una significativa differenziazione dei due gruppi caratterizzati da diversa stagionalità migratoria (estiva ed invernale). La determinazione di indici di distanza genetica, quali la distanza di Nei (1978) e i valori *Fst*, sono in accordo tra loro e compresi tra 0,0016 e 0,0271. Per quanto il grado di differenziamento tra i due gruppi non sia elevato, la separazione è risultata statisticamente significativa ($P < 0,001$), come peraltro è emerso dalla costruzione di alberi filogenetici UPGMA. In figura 3 è illustrato l'albero filogenetico in cui si individuano due differenti *cluster*, supportati dai valori di *bootstrapping*, con raggruppamenti migratori estivi ed invernali di diverse annate.

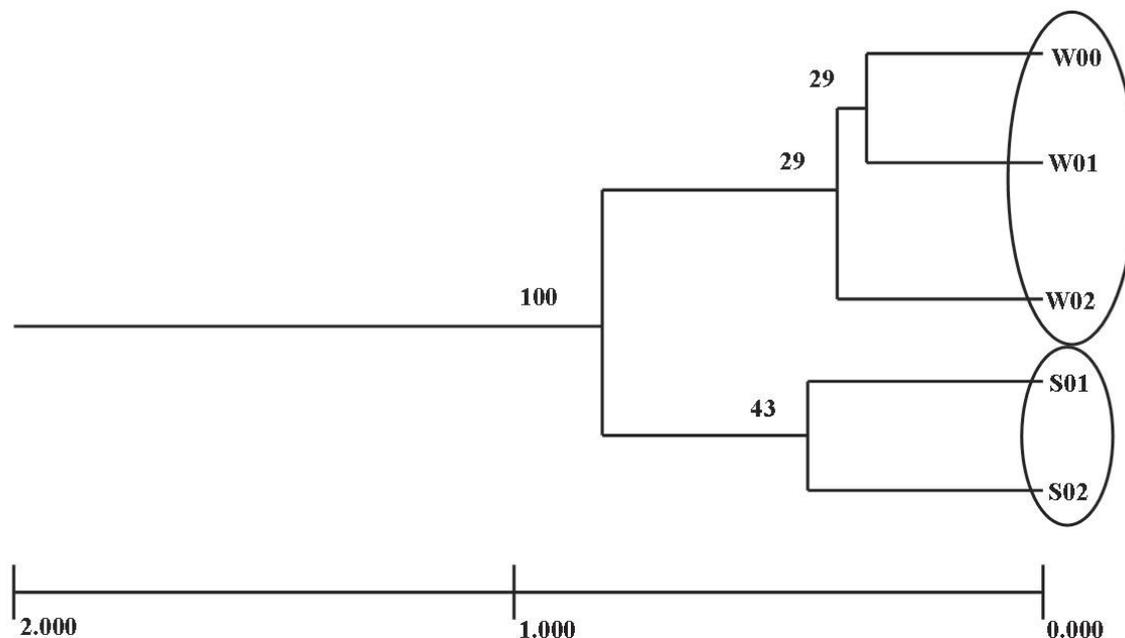


Fig. 3. Indici di distanza genetica (*Fst* e *Nei*) tra i due gruppi di trote Steelhead (*Onchorynchus mykiss*) caratterizzati da flussi migratori estivo (S) ed invernale (W), di diverse annate (2000, 2001, 2002). La separazione tra i due *run-timing* è identificata dal nodo supportato da un valore di *bootstrap* altamente significativo (100).

CONCLUSIONI

Le tecniche della biologia molecolare utilizzate nei quattro casi presi in esame si sono rivelate efficaci ai fini della gestione di differenti popolamenti ittici.

Nel Parco Nazionale del Pollino, la caratterizzazione genetica di un popolamento di Ciprindi del fiume Sinni, inizialmente attribuiti ad esemplari ibridi di non facile classificazione, ha consentito di rilevare la presenza di aplotipi del gene mitocondriale citocromo b appartenenti alle specie Cavedano e Rovella (*L. cepahalus* e *R. rubilio*). Circa metà degli esemplari ibridi campionati sono stati tipizzati geneticamente come appartenenti all'aplotipo Cavedano e l'altra metà all'aplotipo Rovella. Ciò presuppone che il popolamento sia presente da diversi anni, a conferma di quanto osservato da BIANCO e TARABORELLI (1985), che segnalavano un popolamento di presunti ibridi tra Cavedano e Rovella, nell'Italia meridionale, già negli anni '80.

Lo studio condotto sulle trote (*S. trutta*) in ambiente naturale, ha permesso di rilevare una importante presenza di soggetti ibridi che stanno sostituendo le popolazioni autoctone nell'alto Appennino reggiano. La forte introgressione emersa dall'analisi combinata dei due marcatori RFLP (LDH-C1* e 16S rDNA) può essere attribuita al fatto che i corsi d'acqua vengono continuamente ripopolati con avannotti provenienti da incubatoi di valle che utilizzano riproduttori ibridi o alloctoni. I risultati hanno consentito di elaborare un indice di introgressione, da impiegare nell'ambito di progetti gestionali mirati alla riabilitazione delle naturali popolazioni di trota mediterranea. L'applicazione di questo nuovo approccio metodologico potrà servire come strumento di indagine e

caratterizzazione di trote autoctone ad elevato grado di purezza nella selezione di parchi riproduttori da avviare a pratiche ittogeniche.

L'analisi AFLP effettuata sui Salmerini alpini (*S. alpinus*) del Lago Santo Parmense ha rivelato una bassa variabilità genetica. Questo risultato deve essere interpretato in relazione alle caratteristiche ecologiche della popolazione e in modo particolare a due aspetti fondamentali: il ridotto numero di esemplari che costituiscono il popolamento e la totale assenza di flusso genico per isolamento riproduttivo. Per ovviare a tale problema si è voluto impostare un programma di ripopolamento attraverso l'identificazione del ceppo geneticamente più compatibile con quello del Lago Santo sulla base della condivisione di marcatori AFLP. Alla luce dei dati ottenuti, sarà avviato un ciclo completo di produzione presso l'impianto ittogenico del lago utilizzando, insieme ai riproduttori locali, anche esemplari del Lago di Tovel.

L'applicazione di marcatori microsatellite per lo studio delle popolazioni di trote Steelhead appartenenti allo stesso bacino idrografico (fiume Klamath, California, USA) ha consentito di identificare un certo livello di differenziamento genetico tra due principali flussi migratori. In particolare gli individui catturati in tre annate successive e caratterizzati da migrazione estiva ed invernale sono risultati significativamente separati sulla base dell'elaborazione di indici di distanza genetica. Anche in questo gruppo sistematico l'analisi dei marcatori molecolari del DNA si è rivelata un utile strumento per la definizione di caratteristiche ecologiche su scala microgeografica da considerare nella programmazione di piani gestionali.

BIBLIOGRAFIA

- AJMONE-MARSAN P., VALENTINI A., CASSANDRO M., VECCHIOTTI-ANTALDI G., BERTONI G., KUIPER M., 1997. AFLP(TM) markers for DNA fingerprinting cattle. *Animal Genetics*, **28**: 418-426.
- BELKHIR K., BORSA P., CHIKNI L., RAUFASTE N., BONHOMME F., 2000. *Genetix 4.0, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations*. Laboratoire Genome, Population, Interactions, CNRS UMR 5000, University of Montpellier II, Montpellier.
- BIANCO P.G., TABORELLI T., 1985. Contributo alla conoscenza del genere *Rutilus* Rafinesque in Italia e nei Balcani occidentali (Pisces, Cyprinidae). *Bollettino Museo Regionale Scienze Naturali Torino* **3**: 131-172.
- BRIOLAY J., GALTIER N., BRITO R.M., BOUVET Y., 1998. Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome b DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **9** (1): 100-108.
- BUBSI P.J., WAINWRIGHT T.C., BRYANT G.J., LIERHEIMER L.J., WAPLES R.S., WAKNITZ F.W., LAGOMARSINO I.L., 1996. *Status review of West Coast Steelhead from Washington, Idaho, Oregon, and California National Marine Fisheries*. Technical Memorandum NMFS-NWFSC-27, Seattle WA.
- EXCOFFIER L., SMOUSE P., QUATTRO J., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**: 479-491.
- GOMEZ-UCHIDA D., WEETMAN D., LORENZ H., GALLEGUILLOS R., RETAMAL M., 2003. Allozyme and AFLP analyses of genetic population structure in the hairy edile crab cancer setosus from the Chilean coast. *Journal of Crustacean Biology*, **23** (2): 486-494.
- GOUDET J., 2001. *FSTAT, a program to estimate and test gene*

- diversities and fixation indices (Version 2.9.3)*. Disponibile su: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- GOUDET J., RAJMOND M., DE MEEUES T., ROUSSET F., 1996. Testing differentiation of the bullhead *Cottus gobio*, across watersheds in Central Europe: evidence for two taxa. *Heredity*, **80**: 110-117.
- LEWIS P.O., ZAYKIN D., 2002. *Genetic data analysis: Computer program for the analysis of allelic data, Version 1.1*. Disponibile su: <http://www.lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.com>
- MALDINI M., NONNIS MARZANO F., 2006. *Il Salmerino alpino del Lago Santo Parmense*. Provincia di Parma, Regione Emilia Romagna, 64 pp.
- MALDINI M., VAGHI M., NONNIS MARZANO F., GANDOLFI G., PRIGIONI C., PERCUDANI R., 2006a. Ibridazione intergenerica tra i ciprinidi *Rutilus rubilio* e *Leuciscus cephalus* valutata mediante l'analisi di aplotipi mitocondriali. *Journal of Freshwater Biology – Quaderni ETP*, **34**: 63-67.
- MALDINI M., NONNIS MARZANO F., GONZÁLEZ FORTES G., PAPA R., GANDOLFI G., 2006b. Fish and seafood traceability based on AFLP markers: elaboration of a species database. *Aquaculture*, **261**: 487-494.
- McMEEL O.M., HOEY E.M., FERGUSON A., 2001. Partial nucleotide sequences, and routine typing by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, of the brown trout (*Salmo trutta*) lactate dehydrogenase, LDH-C1 *90 and *100 alleles. *Molecular Ecology*, **10**: 29-34.
- MILLER P.M., 1997. *Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: a Windows™ program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data*. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University. Flagstaff, Az. (disponibile al sito <http://marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>)
- NEI M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583-590.
- NONNIS MARZANO F., CORRADI N., PAPA R., TAGLIAVINI J., GANDOLFI G., 2003. Molecular evidence for introgression and loss of genetic variability in *Salmo (trutta) macrostigma* as a result of massive restocking of Apennine population (Northern and Central Italy). *Environmental Biology of Fishes*, **68**: 349-356.
- PAPA R., NONNIS MARZANO F., ROSSI V., GANDOLFI G., 2003. Genetic diversity and adaptability of two species of Mugilidae (Teleostei: Perciformes) of the Po river delta lagoons. *Oceanologica Acta*, **26** (1): 121-128.
- PAPA R., TROGGIO M., AJMONE-MARSAN P., NONNIS MARZANO F., 2005. An improved protocol for the production of AFLP markers in complex genomes by means of capillary electrophoresis. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, **122**: 62-68.
- PAPA R., ISRAEL J.A., NONNIS MARZANO F., MAY B., 2007. Assessment of genetic variation between reproductive ecotypes of Klamath River Steelhead reveals differentiation associated with different run-timings. *Journal Applied Ichthyology*, **23**: 142-146.
- PENSERINI M., NONNIS MARZANO F., GANDOLFI G., MALDINI M., 2006. Genotipi e fenotipi della trota mediterranea: metodologia di indagine molecolare combinata e selezione morfologica per l'identificazione di esemplari autoctoni. *Journal of Freshwater Biology – Quaderni ETP*, **34**: 69-75.
- RAYMOND M., ROUSSET F., 1995. GenePop (version 1.2): population genetic software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity*, **86**: 248-249.
- RAZZOLI M., PAPA R., VALSECCHI P., NONNIS MARZANO F., 2003. AFLP to assess genetic variation in laboratory gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Heredity*, **94** (6): 507-11.
- RODZEN J.A., AGRESTI J.J., TRANAH G., MAY B., 1998. Agarose overlay allow simplified staining of polyacrylamide gels. *Biotechnology*, **25**: 584.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRITERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23** (21): 4407-4414.
- ZABEAU M., P. Vos. 1993. *Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting*. European Patent Publication 92402629 (Publication no. EP0534858A1).
- ZERUNIAN S., 2003. *Piano d'azione generale per la conservazione dei pesci d'acqua dolce italiani*. Quaderni di Conservazione della Natura, 17. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica "Alessandro Ghigi", 126 pp.