

PRIMI RISULTATI SULLO STATUS DI *SALMO TRUTTA MARMORATUS* DELL'ALLEVAMENTO DI GRAUZARIA (E.T.P. FRIULI VENEZIA GIULIA)

Gianni A. Amirante¹, Paolo Bonivento² e Silvia Battistella¹

RIASSUNTO

Nel presente lavoro vengono riportati i primi risultati ottenuti sulla selezione di riproduttori di *Salmo trutta marmoratus* Cuv. dell'allevamento dell'Ente Tutela Pesca del Friuli-Venezia Giulia di Grauzaria (UD), utilizzato per ripopolamenti a larga scala.

La selezione degli esemplari, provenienti dai bacini del Tagliamento e dell'Isonzo, è stata effettuata mediante metodiche biochimiche, genetiche, morfologiche e meristiche effettuate nelle diverse fasi di sviluppo, dall'uovo alla trota adulta.

Dai risultati, analizzati e correlati, si può auspicare che nell'arco di pochi anni sarà possibile ripopolare i bacini del Friuli-Venezia Giulia con marmorate di certa purezza, ripristinando la situazione di presenze originaria e riducendo alla sola casualità naturale la frequenza di ibridi marmorata-fario.

Introduzione

Da una decina di anni è nota la presenza sempre più massiccia di ibridi tra le varie specie di Salmonidi presenti nei corsi d'acqua del Friuli Venezia Giulia. Già nel 1987 avevamo denunciato tale situazione in un lavoro durato due anni su esemplari di marmorata, fario ed eventuali ibridi, prelevati dal fiume Stella (AMIRANTE *et al.*, 1987).

Nel 1991 avevamo proseguito lo studio, con un approccio diverso, analizzando vitellogenine di marmorata e fario, per verificare a un livello di sviluppo precoce la presenza di individui puri e/o ibridi fra le stesse specie (AMIRANTE, 1972; BATTISTELLA E AMIRANTE, 1991).

In questi ultimi anni il problema è stato recepito a livello nazionale da diversi gruppi di studio che in varie Province o Regioni affrontano la stessa problematica con diverse metodiche (GIUFFRÀ *et al.*, 1991).

Una delle metodiche più moderne, che dà in tempi relativamente brevi risposte significative riguardo problemi di dinamica di popolazione, è l'analisi elettroforetica degli allozimi. In tal modo è possibile per alcuni di essi evidenziare vari alleli e/o loci che possano caratterizzare una determinata popolazione, ed essere di estrema utilità nella diagnosi comparativa di più popolazioni para- o allopatriche.

In seguito ai risultati da noi ottenuti in questi anni, l'Ente Tutela Pesca del Friuli Venezia Giulia ha chiesto il nostro intervento in un progetto di selezione di una popolazione pura di trota *Salmo trutta marmoratus* Cuv. da utilizzare per il ripopolamento dei bacini idrici della Regione.

Tale programma prevede un minimo di 5 anni di studio, durante i quali sono state programmate le seguenti fasi di ricerca:

- a) Identificazione mediante dati biometrici, meristici e genetico-biochimici dei riproduttori dell'Allevamento dell'E.T.P.
- b) Selezione dei lotti di uova, ottenuti dai suddetti

1 Dipartimento di Biologia - Università di Trieste

2 Ente Tutela Pesca Friuli Venezia Giulia e Dipartimento di Biologia - Università di Trieste.

riproduttori mediante studi biochimici delle vitellogenine

- c) Selezione dei lotti di avannotti mediante caratterizzazione biochimica delle proteine tissutali
- d) Ulteriore selezione degli stessi lotti di avannotti mediante caratterizzazione di alcuni allozimi.

Tale metodica procederà per alcuni anni allo scopo di ottenere un numero limitato di riproduttori che diano garanzia di purezza e che siano identificati da alcuni loci e/o alleli, ottimi marcatori diagnostici.

In questo lavoro vengono riportati i risultati finora ottenuti

Materiali e metodi

Materiali utilizzati

Sono stati esaminati 359 individui in età fertile provenienti da popolazioni dei bacini del Tagliamento e dell'Isonzo. È stato prelevato 1 ml di sangue di ciascun animale, previa anestesia, dall'arteria branchiale. I sieri così ottenuti sono stati conservati a -20 °C.

Durante la fase di spremitura, sono state prelevate 20-30 uova dalla produzione totale di ciascuna femmina. I campioni sono stati trasportati in laboratorio e divisi in due aliquote, la prima per l'analisi immediata e la seconda per l'archiviazione dei campioni, mantenendo sempre lo stesso numero marcatore.

Estrazione delle vitellogenine

Per ciascun campione sono state omogenate 2 uova in 1 ml di NaCl 10%; la soluzione così ottenuta è stata centrifugata per 5 minuti a 12000 giri/min. È stato estratto il surnatante che è stato diluito 1:10 in acqua bidistillata, quindi posto in frigorifero a 4 °C per 24 ore, in modo da far precipitare le vitellogenine.

Il flocculato è stato risospeso e la miscela è stata divisa in due aliquote di uguale quantità, quindi centrifugata per 20 minuti a 4500 giri/min.

Il fondello così rimasto è stato disciolto in NaCl (prima aliquota) ed in CaCl₂ (seconda aliquota).

Elettroforesi in SDS-PAGE

20 µl di siero ovvero 15 µl di vitellogenine sono stati posti in uguale quantità di buffer non denaturante e le proteine sono state fatte migrare in gel di poliacc-

lamide al 10% e sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE). Ogni aliquota è stata fatta migrare 15 ore a 3 mA. Gli slab sono stati colorati in Blue Comassie all'1%, in modo da evidenziare le bande indicatrici di ciascuna proteina, ottenendo ferogrammi che indicano con molta chiarezza sia il numero di proteine contenute che il loro peso molecolare.

Elaborazione dei risultati

I ferogrammi così ottenuti sono stati elaborati, sotto forma di schema, per rendere più leggibile la presenza o meno delle bande, quindi per poter discriminare le uova provenienti da trota marmorata e quelle provenienti, invece, da ibridi con trota fario o da trota fario stessa.

Risultati e conclusioni

Le prime analisi sui riproduttori che riguardavano dati morfologici, biometrici e biochimici ci hanno permesso di isolare 257 esemplari in età fertile da una popolazione di 359 individui. Questi esemplari sono stati marcati e utilizzati quali riproduttori per il 1994.

I dati biochimici sono stati estrapolati dall'analisi dell'elettroforesi del siero dei sopraccitati individui. Sono state prese in considerazione solo le bande statisticamente significative (Fig. 1). In tal modo sono stati selezionati gli esemplari che presentavano un pattern elettroforetico tipico di *S. trutta marmoratus* Cuv. (Fig. 2).

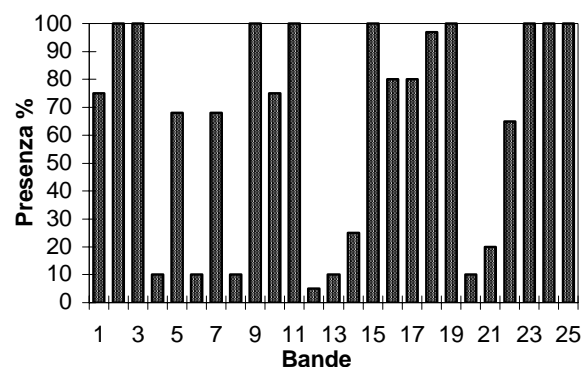


Fig. 1 - Istogramma di significatività delle bande elettroforetiche delle proteine del siero. Vengono considerate significative quelle presenti in una percentuale superiore al 30. In tal modo sono state prese in considerazione solo 17 bande.

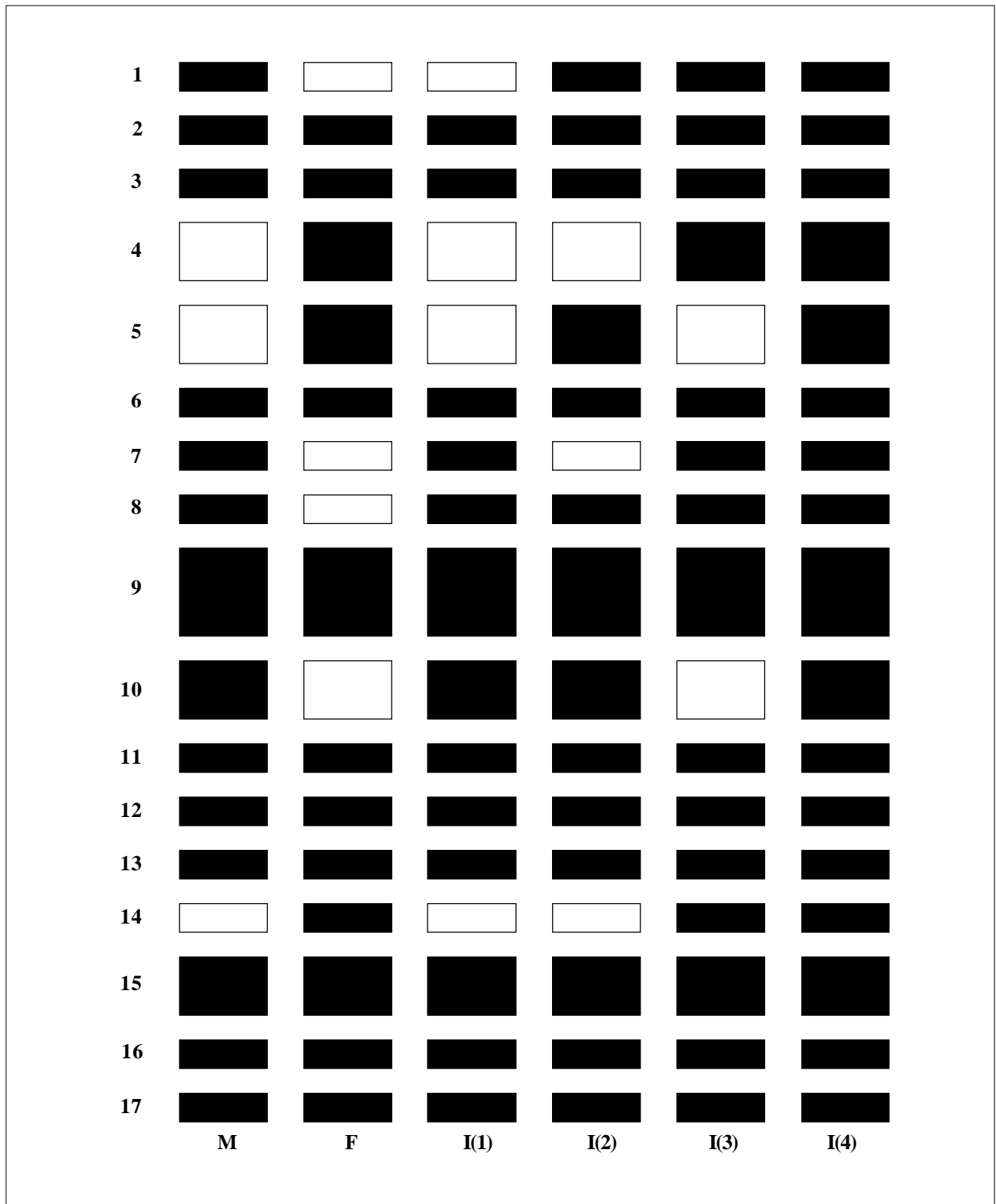


Fig. 2 - Pattern elettroforetici di proteine del siero.

M = *Salmo trutta marmoratus*; F = *Salmo trutta trutta*; I(n)=Ibridi.

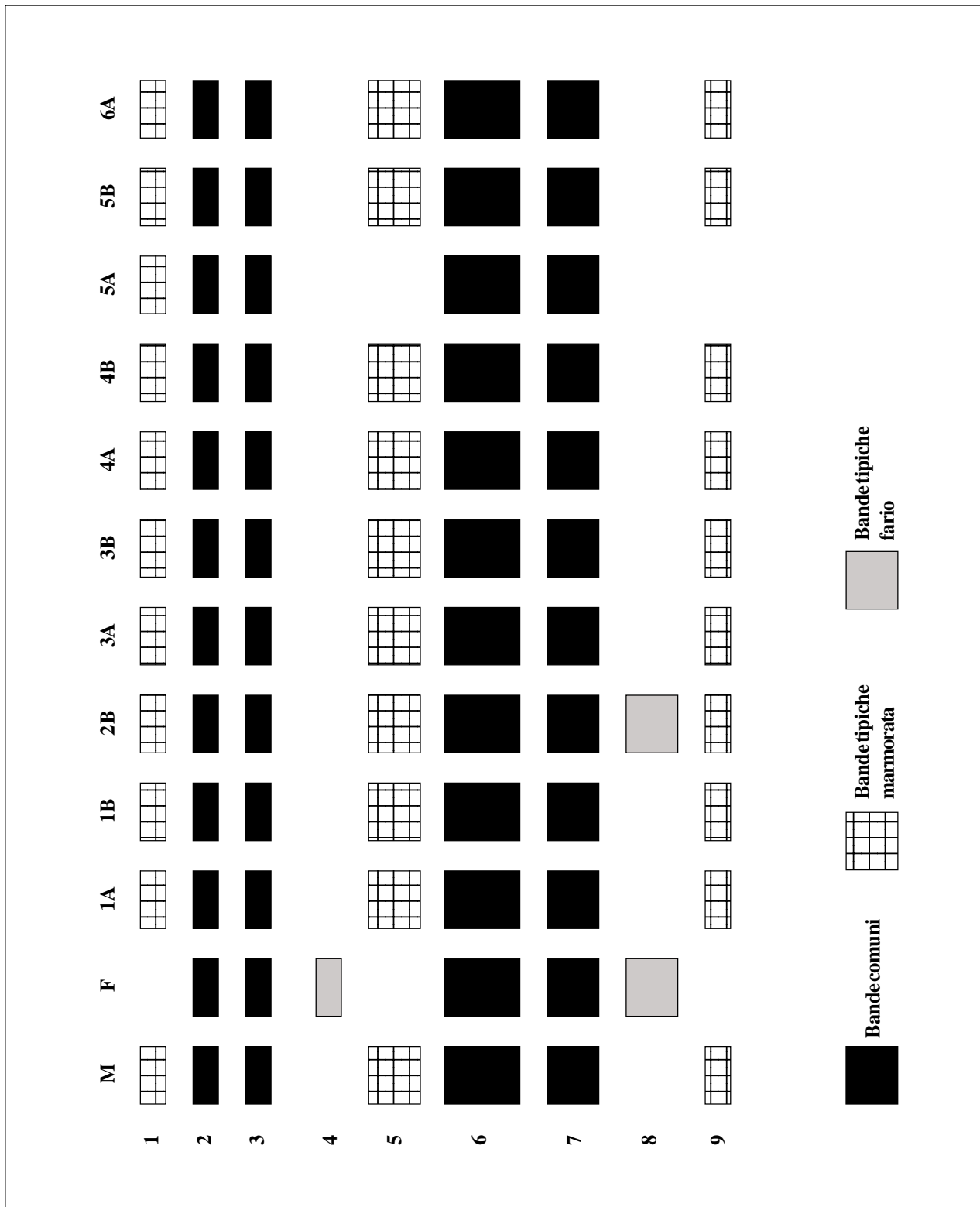


Fig. 3 - Pattern elettroforetici delle vitellogenine. M = *S. t. marmoratus*; F = *S.t. trutta*; 1A, 1B, 2A etc. n° lotti esaminati.

L'esame elettroforetico delle vitellogenine prelevate dai 73 lotti ottenuti attraverso l'incrocio dei riproduttori selezionati (Fig. 3), ci ha permesso di scartare 7 lotti, in quanto hanno rivelato un pattern elettroforetico difforme dallo standard considerato (BATTISTELLA e AMIRANTE, 1991).

Purtroppo dai dati ufficiali o da incontri informali avuti con altri Colleghi, è stata evidenziata la difformità dei parametri e delle metodiche adottate dai vari gruppi e quindi spesso la non comparabilità dei dati ottenuti.

Pertanto è sorta la necessità di uniformare le metodiche, anche in vista del probabile allestimento di una carta genetica dei Salmonidi italiani.

A tale scopo si suggerisce infine anche un approccio genetico a livello di DNA mitocondriale, che ci darebbe una visione più completa delle caratteristiche genetiche delle popolazioni.

Bibliografia

- AMIRANTE G.A. - 1972 - Immunochemical studies on rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) lipovitellin. *Acta Embryol. Exp.*, 373-383.
- AMIRANTE G.A., BATTISTELLA S., DANESE M., SPECCHI M. - 1987 - Studi elettroforetici e immunochimici sulla problematica intraspecifica dei Salmonidi. *Atti 2° Conv. A.I.I.A.D.*, Torino, 17-28.
- BATTISTELLA S. e AMIRANTE G.A. - 1991 - Applicazione della tecnica elettroforetica per uno studio sulle vitellogenine di *Salmo trutta fario* e *Salmo trutta marmoratus*. *Atti IV Conv. A.I.I.A.D.*, Riva del Garda. in stampa.
- GIUFFRÀ E., FORNERIS G. e GUYOMARD R. - 1991 - Polimorfismo genetico e filogenia delle popolazioni di trota del bacino del Po. *Atti IV Conv. A.I.I.A.D.*, Riva del Garda, in stampa.