



*Rapporto di chiusura*

## **Caratterizzazione genetica attuale e storica di popolazioni di trota nei bacini lombardi a sostegno di future pratiche gestionali.**

Antognazza, C.M., Zaccara, S., Crosa, G.

Dipartimento di Scienze Teoriche e Applicate, Università degli Studi dell'Insubria, Via J.H.  
Dunant, 3, 21100 Varese

Autori:

Dott.ssa Antognazza Caterina M.: borsista di studio post-doc

Dott.ssa Serena Zaccara: responsabile scientifico

Prof. Giuseppe Crosa: supervisore scientifico

Varese, febbraio 2023

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>7</b>
1.1	Obiettivi	9
<b>2</b>	<b>OBIETTIVO 1: caratterizzazione genetica attuale</b>	<b>11</b>
2.1	Materiali e metodi	11
2.1.1	Strategia di campionamento	11
2.1.2	Campionamento	11
2.2	Analisi	13
2.2.1	Estrazione del DNA	13
2.2.2	Sequenziamento della regione di controllo D-Loop mtDNA	14
2.2.3	Genotipizzazione del gene nucleare LDH-C1	15
2.3	Risultati per marcatore	16
2.3.1	Sequenziamento marcatore mitocondriale D-Loop	16
2.3.2	Analisi evolutiva	17
2.3.3	Combinazione parentale del gene LDH-C1	20
2.4	Risultati sovrapposti (livello cartografico)	21
<b>3</b>	<b>OBIETTIVO 2: caratterizzazione genetica storica</b>	<b>27</b>
3.1	Materiali e metodi	27
3.1.1	Analisi laboratorio	28
3.1.2	Sequenziamento del marcatore D-Loop mtDNA	30
3.1.3	Analisi dei dati	32
3.2	Risultati	32
3.2.1	Riscontro geografico dei campioni museali	36
<b>4</b>	<b>DISCUSSIONI</b>	<b>37</b>
4.1	Obiettivo 1: caratterizzazione genetica attuale	37
4.2	Obiettivo 2: caratterizzazione genetica storica	38
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Appendice I</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>Appendice II</b>	<b>52</b>

## Indice Tabelle

Tabella 1: Popolazioni campionate dettagliati nome popolazione (ID), bacino e sottobacino idrografico, coordinate geografiche (N-E) e numero individui campionati per popolazione (N). .....	13
Tabella 2: Distribuzione aplotipi, N indica numero di individui analizzati tramite marcatore mitocondriale D-Loop nella popolazione.....	17
Tabella 3: risultati per popolazioni rispetto agli alleli *90 e *100 per il gene LDH-C1 e la rispettiva distribuzione di puro mediterraneo (*100/*100) (MED), puro atlantico (*90/*90) (ATL) e ibrido (*100/*90) (HYB). N indica numero dei campioni analizzati con successo.....	21
Tabella 4: Riepilogo per popolazioni della linea evolutiva di appartenenza rispetto al marcatore mitocondriale D-Loop (Adriatica AD, Atlantica AT, Mediterranea ME, Marmorata MA, Danubiana DA) e rispetto agli alleli *90 e *100 per il gene LDH-C1 e la rispettiva attribuzione di omozigote mediterraneo (*100/*100), omozigote atlantico (*90/*90) e ibrido (*100/*90). Codice della popolazione (Pop), numero di individui analizzati tramite marcatore mitocondriale D-Loop ( $N_{dloop}$ ) e gene LDH-C1 ( $N_{LDH}$ ) sono indicati.....	22
Tabella 5: Riepilogo per bacini della linea evolutiva rispetto al marcatore D-Loop (Adriatica AD, Atlantica AT, Mediterranea ME, Marmorata MA, Danubiana DA) e rispetto agli alleli *90 e *100 per il gene LDH-C1 e la rispettiva attribuzione di omozigote mediterraneo (MED), omozigote atlantico (ATL) e ibrido (HYB). ....	25
Tabella 6: Elenco campioni museali. Indicati il museo di provenienza, la specie di catalogazione, il numero di catalogo dell'esemplare (Cat_Num), liquido di conservazione del campione, luogo di raccolta, località, data e codice delle analisi genetiche (ID).....	29
Tabella 7: Risultato di amplificazione: metodo di amplificazione, frammento completo per amplificazione del frammento mtDNA D-Loop in una reazione, tre frammenti se sono stati amplificati tre frammenti più piccoli sovrapposti di 200-250 bp. Frammento disponibile indicato come completo se sequenza di ~ 400 bp disponibile senza considerare metodo di amplificazione; F1, F2, F3 se amplificazione avvenuta con successo solo per sequenza parziale (cf Figura 7).....	31
Tabella 8: Dettaglio dei primers utilizzati per amplificazione del frammento mtDNA DLoop in più frammenti. Nome del nuovo primer, sequenza, lunghezza del primer, base nucleotidica di inizio e fine considerando il frammento completo (450 bp), temperatura di annealing $T_m$ ), nome del primer con cui si accoppia (Coppia) e lunghezza del prodotto di amplificazione (Prodotto (bp)) sono indicati. (cf Figura 7). ....	31
Tabella 9: Informazioni delle posizioni diagnostiche variabili dei campioni museali comparate con la sequenza di riferimento del genoma completo (codice GenBank AM910409), individuate	



allineandole con sequenze del complesso *S. trutta* appartenenti alle linee evolutive atlantica, mediterranea, adriatica e marmorata. (/ Posizione nucleotidica non rilevata dovuta all'amplificazione mancata del frammento di D-Loop completo; . posizione nucleotidica identica alla sequenza di riferimento; - presenza di un gap). \*Aplotipi unici. .... 35

## Indice figure

Figure 1: Mappa dei siti campionati in questo studio. Punti di campionamento sono identificati con un ID di popolazione (cf Tabella 1).....	12
Figure 2: Albero evolutivo di <i>Salmo trutta</i> basato sul frammento di 408 bp del marcatore mitocondriale D-Loop. L'albero è risultante dall'integrazione dei metodi di Inferenza Bayesiana (BI), Neighbouring Joining (NJ) e Maximum Likelihood (ML). Ai nodi significativi ( $\geq 70\%$ ) vengono riportati i valori di probabilità a posteriori e bootstrap.....	18
Figure 3: Network parsimonioso ottenuto dall'allineamento multiplo del frammento di 408 bp di D-Loop mtDNA unitamente alle sequenze della banca genetica (Tabella S1). Ogni cerchio rappresenta un aplotipo la cui dimensione è proporzionale alla sua frequenza (cf Tabella 2 e Tabella S1). I cerchi più piccoli non colorati rappresentano ipotetici aplotipi mancanti (passaggio mutazionali). *Hap_16 e Hap_21 (Splendiani et al., 2021). ....	20
Figure 4: Distribuzione delle linee evolutive e dei risultati degli alleli *90 e *100 per il gene LDH-C1. Codice identificativo popolazioni (cf. Tabella 1).....	24
Figure 5: Distribuzione delle linee evolutive e dei risultati degli alleli *90 e *100 per il gene LDH-C1 divisa per bacini idrografici (cf. Tabella 1).....	26
Figure 6: Mappa delle località di origine dei campioni museali (cf Tabella 6).....	28
Figure 7: Disegno schematico rappresentante le tre coppie di primer disegnati in questo studio per amplificare tre frammenti più piccoli sovrapponibili per ottenere la sequenza completa del marcatore D-Loop (cf Tabella 8).....	30
Figure 8: Albero evolutivo di Inferenza Bayesiana (BI) di <i>Salmo trutta</i> basato sul frammento di 328 bp del marcatore mitocondriale D-Loop. Ai nodi significativi ( $\geq 70\%$ ) vengono riportati i valori di probabilità a posteriori. ....	33
Figure 9: Rappresentazione grafica dei siti diagnostici utili all'assegnazione della linea evolutiva adriatica dei quattro campioni con sequenza inferiore a 300 bp (SZ04, SZ04, SZ15 e SZ19). Il box blu del frammento incompleto indica la zona del frammento che non presenta siti diagnostici (Splendiani et al., 2017). Evidenziati sono le posizioni dei siti diagnostici discriminanti la linea adriatica AD (cf Tabella 9). Il box bianco indica il frammento di sequenza mancante nei campioni considerati. ....	34
Figure 10: Rappresentazione delle popolazioni analizzate data dall'integrazione del riconoscimento delle linee evolutive (marcatore D-Loop) e della combinazione parentale (gene LDH-C1): in blu sono gli individui 'puri atlantici', in verde gli individui 'puri mediterranei' e in arancione gli individui 'ibridi', espressi in percentuale (cf Tabella S2). I campioni dettagliati "introgressi" in tabella S2 sono stati qui rappresentati come 'ibridi'. ....	38



Figure 11: Rappresentazione grafica cronologica dell'informazione genetica storica della trota su territorio lombardo grazie ai campioni museali disponibili. Nello specifico, rappresentate sono le linee evolutive note con corrispondenza geografica nel a) periodo storico più antico disponibile (1821), b) nel periodo pre-stocking, e c) agli inizi del 1900. .... 40

## 1 INTRODUZIONE

Il complesso *Salmo trutta* (del quale la trota mediterranea *Salmo ghigii* fa parte) è composto da numerose e distinte varianti ecologiche (Blanc, 1971) e presenta un'estrema diversità fenotipica, in relazione al ciclo vitale e a diverse specializzazioni ambientali. Infatti, a causa della elevata **plasticità fenotipica** del complesso *Salmo trutta* è stata valutata 'non affidabile' la discriminazione tassonomica gerarchica basata esclusivamente sulla descrizione morfologica (Allendorf et al., 1987).

Per fornire strumenti di analisi tassonomica agli inizi degli anni '80 sono state sviluppate tecniche genetiche grazie alle quali è stato possibile indagare la storia evolutiva (**analisi filogenetica**) del complesso *Salmo trutta* su scala Europea (Bernatchez et al., 1992). Sono stati evidenziati 5 gruppi filogenetici associati anche ad una storia biogeografica: i) linea atlantica (AT) nel Nord Europa; ii) linea danubiana (DA) nell'Europa orientale; iii-iv) linea adriatica (AD) e linea mediterranea (ME) nei bacini dell'Europa meridionale e v) linea marmorata nei fiumi del nord Adriatico (MA) (Bernatchez et al., 1992). Questo studio, caposaldo per l'analisi evolutiva del complesso *Salmo trutta*, ha però anche messo in luce come su tutto il territorio europeo la struttura biogeografica sia stata anche alterata da pratiche di stocking non controllato (Bernatchez et al., 1992).

Inoltre, la ricostruzione biogeografica risulta non esaustiva in quanto sussistono ancora aree e bacini fluviali europei per cui non sono disponibili dati genetici utili ad avere una visione completa e capillare della storia biogeografica del complesso *Salmo trutta*. Questo è il caso della regione Lombardia, per la quale ad oggi non è stata indagata in modo approfondito la struttura genetica delle popolazioni di trote. Infatti, i dati disponibili sono esigui e riguardano in modo generico il bacino del Po in cui la presenza della linea atlantica (AT) è stata osservata nelle forme ibride con le tre forme native *Salmo marmoratus*, *Salmo carpio* e *Salmo fario* (Giuffra et al., 1994). Per quanto riguarda quest'ultima sono state rilevate popolazioni 'morfologicamente indistinguibili', ma geneticamente differenziate, rivelando la presenza anche della linea mediterranea (ME) nel bacino padano (Giuffra et al., 1994) e nel dettaglio anche in affluenti emiliani del Po (Nonnis Marzano et al., 2003).

I principali riferimenti scientifici legati alla **caratterizzazione attuale e storica** della presenza di trote nella penisola italiana sono riscontrabili in due studi distinti. La **caratterizzazione attuale** è stata analizzata nello studio di Splendiani et al. (2016), nel quale è stato mostrato come l'influenza antropica, ambientale, climatica ed evolutiva abbiano modellato la struttura genetica, biogeografica del complesso *Salmo trutta*, portando a fenomeni di ibridazione. Nello studio, che è stato condotto su 161 popolazioni di trote provenienti da molti bacini della penisola italiana (Splendiani et al., 2016), non rientrano però popolazioni di trota provenienti da affluenti del Po all'interno della Regione Lombardia. Questo non consente pertanto di inquadrare una caratterizzazione genetica attuale per questi popolamenti e bacini.

La **caratterizzazione storica** è stata analizzata in un unico studio scientifico basato sulla ricostruzione genetica del DNA prelevato da campioni storici museali del genere *Salmo* risalenti al periodo compreso tra il 1872 e il 1900 e rinvenuti nei bacini della penisola italiana, Sardegna e Corsica (Splendiani et al., 2017). Lo studio è stato condotto per fornire chiari riferimenti di associazione evolutiva e geografica tra le popolazioni di trote e i bacini italiani antecedenti le manipolazioni antropiche che hanno interessato tutto il territorio italiano. Tra i 17 campioni analizzati, tutti appartenenti alla raccolta della Sezione Zoologica "La Specola" del Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze (MZUF), sono stati geneticamente caratterizzati solo due esemplari provenienti da siti all'interno della Regione Lombardia: un esemplare proveniente dal Lago Maggiore (8111, datato 1879) e l'altro dal Lago di Garda (8112, datato 1877) (Splendiani et al., 2017). Attraverso un'accurata analisi molecolare (*cf sequenziamento del marcatore mitocondriale D-Loop*) entrambi i campioni sono risultati essere trote appartenenti alla linea Adriatica AD (Splendiani et al., 2017).

Nonostante i campioni analizzati non rientrino nell'era pre-stocking, iniziata nel 1859 (ISPRA, 2021, 10 Dicembre), è stata riscontrata la linea evolutiva adriatica (AD) (Splendiani et al., 2017), dimostrando la presenza di trote adriatiche AD nei grandi laghi subalpini (Lago di Garda e Lago Maggiore) già nel 1877. Il risultato affianca l'ipotesi per cui le trote di linea adriatica AD possano essere sopravvissute durante le glaciazioni del Pleistocene in pochi rifugi entro le Alpi meridionali (Splendiani et al., 2017; Stefani et al., 2019), tra cui anche nei grandi laghi subalpini. L'ipotesi della sopravvivenza di trote



AD (linea adriatica) nei bacini subalpini durante il Pleistocene è anche supportata dal ritrovamento nel bacino dell'Adige dello stesso aplotipo museale AD analizzato da (Splendiani et al., 2017) (Meraner et al., 2013). L'ipotesi della sopravvivenza di trote AD (linea adriatica) nei bacini subalpini lombardi viene avvalorata dai risultati di uno studio di caratterizzazione genetica recente, condotto su una popolazione remota di trota all'interno del bacino del Lago di Garda, più precisamente il fiume Vesta (Lombardia) (Stefani et al., 2019). In questo fiume, diretto tributario del fiume Toscolano, immissario del Lago di Garda (fino alla costruzione della diga Valvestino nel 1962) sono stati infatti rinvenute trote appartenenti alla linea adriatica AD (Stefani et al., 2019).

## 1.1 Obiettivi

Il numero esiguo di dati genetici disponibili sul territorio lombardo, sia legati alla caratterizzazione attuale che alla caratterizzazione storica (pre-stocking), fino ad oggi ha reso difficile stabilire la naturale presenza (autoctonia) della trota mediterranea nei suoi corsi d'acqua e di conseguenza la definizione di piani gestionali mirati alla conservazione del complesso *S. trutta*. È da ricordare che attraverso studi molecolari, la trota mediterranea (includente le linee AD e ME; (Splendiani et al., 2019) è stata valutata autoctona (*Salmo ghigii*, Pomini, 1941) nei tributari piemontesi del Po.

Al fine di completare il quadro biogeografico del complesso *Salmo trutta* e quindi di fornire strumenti utili alle future pratiche gestionali nei bacini della Lombardia, in linea con le esigenze di tutela e conservazione, è risultato necessario condurre uno studio mirato alla caratterizzazione genetica attuale e alla caratterizzazione storica delle popolazioni di trote nei bacini lombardi. Lo studio pertanto ha lo scopo di svolgere un'analisi capillare delle popolazioni di trote nei principali bacini lombardi avvalendosi di strumenti molecolari largamente impiegati in letteratura e specifici per i due obiettivi.

### i) OBIETTIVO 1: caratterizzazione genetica attuale

Lo scopo è fornire una descrizione puntuale dell'attuale struttura genetica delle popolazioni di trote lombarde che si consegue con l'integrazione di due processi analitici: da una parte il riconoscimento delle linee evolutive presenti attualmente nei corsi d'acqua lombardi valutate mediante le distanze genetiche mitocondriali; dall'altra, il riconoscimento della combinazione

parentale utile a stimare possibili gradi di ibridazione presenti nelle trote campionate nei bacini lombardi. Per tali scopi, come indicato da una larga letteratura, sono state applicate rispettivamente due strategie molecolari: a) sequenziamento della regione di controllo D-Loop del DNA mitocondriale e b) genotipizzazione del gene nucleare LDH-C1. Le analisi sono state condotte su campioni raccolti in un campionamento esteso e dedicato a ricostruire una struttura biogeografica capillare della trota mediterranea dei principali bacini lombardi.

ii) **OBIETTIVO 2: caratterizzazione genetica storica**

Lo scopo è fornire la descrizione genetica di campioni museali di trota appartenenti a bacini lombardi al fine di verificare quali fossero le linee evolutive presenti sul territorio antecedenti al periodo di “stocking” (1859). Per tale obiettivo, come indicato da letteratura, è stato applicato il sequenziamento della regione di controllo D-Loop del DNA mitocondriale.

## 2 OBIETTIVO 1: caratterizzazione genetica attuale

### 2.1 Materiali e metodi

#### 2.1.1 *Strategia di campionamento*

La campagna di campionamento è stata condotta su tutti i principali bacini lombardi, lungo tratti di torrenti la cui selezione ha risposto ad almeno ad uno dei seguenti criteri:

- Corpi idrici/tratti dove fosse nota la presenza di popolazioni “rustiche” di trota mediterranea;
- Corpi idrici/tratti dove non fossero noti episodi di stocking negli ultimi decenni;
- Corpi idrici/tratti isolati o difficilmente accessibili.

La selezione dei punti di campionamento ha considerato una copertura quanto più omogenea dei territori regionali vocati al ripopolamento salmonicolo. In totale sono state campionate 16 popolazioni naturali da 16 distinti torrenti, appartenenti ai principali bacini idrografici lombardi (8 bacini). È stata inoltre aggiunta una popolazione appartenente al centro ittiogenico di Samolaco (SO) (Tabella 1; Figure 1).

#### 2.1.2 *Campionamento*

Il campionamento è avvenuto utilizzando il metodo dell'elettropesca. Gli esemplari sono stati prontamente anestetizzati. A seguito di un'analisi preliminare del fenotipo, sono stati selezionati 20 esemplari ascrivibili alla trota mediterranea, numero valutato adeguato al fine della descrizione della struttura genetica di una popolazione. In sette popolazioni il numero di individui è risultato inferiore per la scarsità di abbondanza di esemplari (Tabella 1).

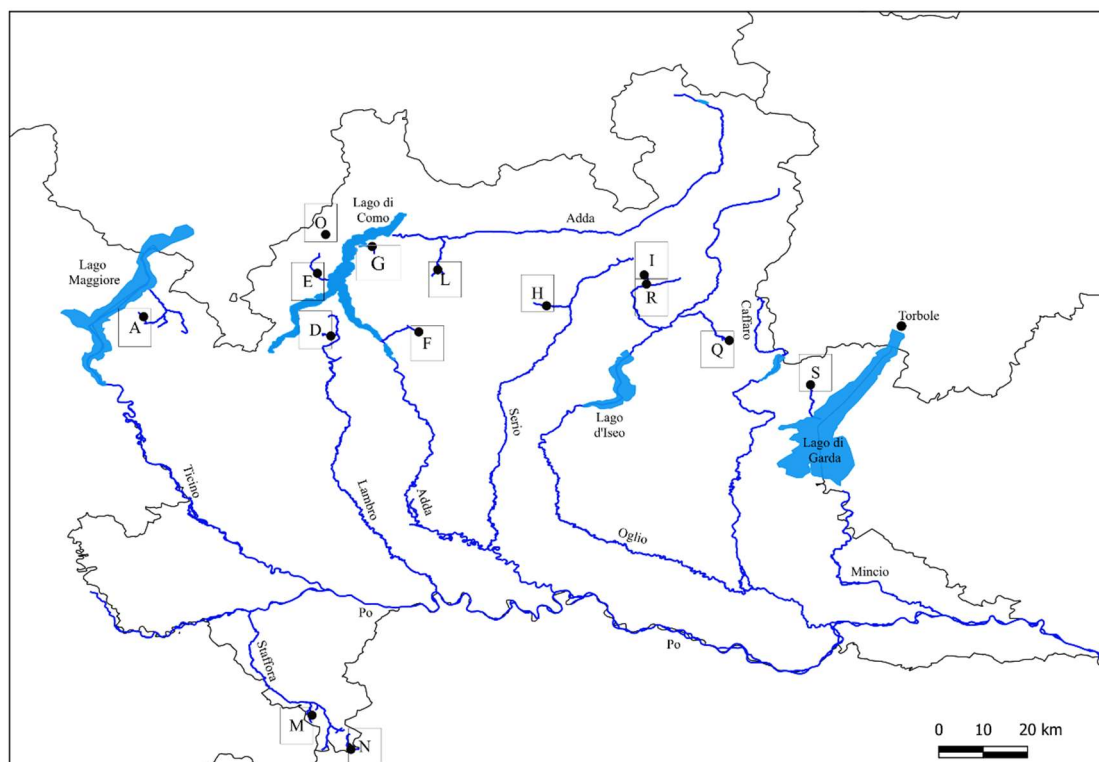


Figure 1: Mappa dei siti campionati in questo studio. Punti di campionamento sono identificati con un ID di popolazione (*cf* Tabella 1).

Al fine di poter associare ciascun genotipo indagato ad un fenotipo, è stato raccolto un campione fotografico per ogni esemplare: l'operazione è stata condotta immettendo i pesci in una teca trasparente e assegnando un ID numerico a ciascun esemplare, in modo che essi fossero distinguibili; per ogni esemplare sono stati presi i dati biometrici di lunghezza totale (mm) e peso (g), per mezzo di un ittometro e di una bilancia di precisione (*cf* Allegato fotografico).

In seguito, è stato prelevato un campione di tessuto proveniente dalla pinna anale, per mezzo di forbici e pinza chirurgica. Il tessuto così raccolto è stato stoccato in provetta Eppendorf contenente etanolo e opportunamente numerata.

Nell'attività di campionamento non sono stati sacrificati individui che sono stati rilasciati in situ a chiusura del rilevamento dei dati e dell'asportazione del frammento di tessuto.

Tabella 1: Popolazioni campionate dettagliati nome popolazione (ID), bacino e sottobacino idrografico, coordinate geografiche (N-E) e numero individui campionati per popolazione (N).

ID	Torrente	Bacino	Sottobacino	Coordinate geografiche	N
A	Marianna	Ticino	Boesio	45°91'83"; 8°71'36"	20
B	Olona**	Olona	-	45°84'62"; 8°81'32"	20
C	Cavalizza**	Ticino	Tresa	45°89'71"; 8°87'87"	10
D	Valle di Rezzago	Lambro	-	45°86'36"; 9°24'55"	20
E	Senagra	Adda	-	46°04'18"; 9°20'73"	20
F	Caldone	Adda	-	45°87'52"; 9°49'52"	20
G	Valle Merla	Adda	-	46°11'79"; 9°36'29"	20
H	Acqualina	Adda	Serio	45°94'94"; 9°85'82"	20
I	Vò	Oglio	Dezzo	46°03'70"; 10°13'56"	10
L	Valle della Pietra	Adda	Bitto	46°05'18"; 9°54'92"	20
M	Lella	Staffora	-	44°78'57"; 9°19'19"	20
N	Avagnone	Trebbia	-	44°68'86"; 9°30'25"	10
O	Samolaco*	Adda	-	46°15'20"; 9°23'07"	20
P	Poschiavino**	Adda	-	46°21'75"; 10°15'34"	10
Q	Grigna	Oglio	-	45°85'08"; 10°37'74"	7
R	Allione	Oglio	-	46°01'10"; 10°14'21"	12
S	Valle di Vesta	Mincio	Toscolano	45°72'48"; 10°60'81"	5

\*Centro Ittiogenico, \*\* Popolazioni non analizzate perché fenotipo marcatamente ascrivibile a *S. trutta* linea Atlantica.

Le analisi genetiche sono state quindi effettuate su 14 popolazioni per un totale di 224 individui (Tabella 1).

## 2.2 Analisi

Al fine di produrre risultati utili alla descrizione dell'attuale struttura genetica sono stati applicati due tecniche molecolari: a) sequenziamento della regione di controllo D-Loop del DNA mitocondriale, previa estrazione del DNA genomico e b) genotipizzazione del gene nucleare LDH-C1.

### 2.2.1 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA è stata effettuata su tutti i campioni a partire da piccole porzioni di pinna anale conservata in etanolo mediante la tecnica del salting out (Aljanabi & Martinez, 1997).

### 2.2.2 Sequenziamento della regione di controllo D-Loop mtDNA

L'amplificazione, tramite Reazione a Catena della Polimerasi (PCR), della regione di controllo (D-Loop) del DNA mitocondriale (mtDNA) è stata condotta utilizzando la coppia di primers L15998-PRO (TACCCCAAACCTCCCAAAGCTA) e HDL-C1 (CCTGAAGTAGGAACCAGATGCCAG) (Sabatini et al., 2011) utilizzando il seguente profilo di amplificazione: 95°C/15 min, 95°C/60 sec, 52°C/60 sec, 72°C/60 sec (40 cicli), seguito da uno step di estensione finale di 72°C/10 min. Le reazioni di amplificazione sono state allestite in un volume finale di 10µl totali che includono 2 µl di DNA estratto, 5µl di Mastermix (QIAGEN Multiplex PCR Kit, QIAGEN Inc, Hilden, Germany), 0.25 µl di ciascun primer (10 µM) e 2.5µl di acqua bi-distillata (RNase-free water, inclusa nel QIAGEN Multiplex PCR Kit).

I prodotti di amplificazione sono stati purificati con sistema enzimatico Exo-SAP (Euroclone) e sequenziati utilizzando un sequenziatore automatico. Per ogni sequenza è stato ottenuto un elettroferogramma. È stato costruito quindi un allineamento multiplo completo di tutte le sequenze ottenute, alle quali sono state aggiunte sequenze pubblicate in banca genetica e selezionate per attinenza genetica mediante la tecnica del BLASTn.

L'aggiunta di sequenze della banca dati ha permesso di identificare la linea evolutiva del DNA mitocondriale e di svolgere l'analisi filogenetica. Per tali analisi sono state aggiunte 12 sequenze della linea atlantica (AT), 16 sequenze della linea adriatica (AD), 13 sequenze della linea mediterranea (ME), 4 sequenze della linea marmorata (MA), 4 sequenze della linea danubiana (DA), scelte per attinenza mediante BLASTn (Tabella supplementare S1). Per l'analisi filogenetica è stata inoltre aggiunta la sequenza di *Salmo salar* come outgroup dell'analisi (Tabella supplementare S1).

La ricostruzione filogenetica è stata condotta utilizzando i metodi propedeutici per qualsiasi ricostruzione filogenetica: Maximum Likelihood (ML), tramite il software GARLI v1.0 (Zwickl, 2006) Neighbour Joining (NJ) tramite PAUP Version 4.0b10 (Swofford, 2003) e Inferenza Bayesiana (BI) con il software MrBayes v.3.2 (Ronquist et al., 2012). Il miglior modello evolutivo per il nostro dataset, il modello HKY + I+ G (Hasegawa et al., 1985), è stato calcolato tramite il software J-ModelTest 3.7 (Darriba et al., 2012). Ogni analisi è stata validata da un valore di permutazione (bootstrap) e di probabilità a posteriori utile a validare la significatività della struttura ad albero. Quindi sono stati creati 3 alberi filogenetici grazie al software FigTree v 1.4.3 (Rambaut, 2016)

successivamente riuniti in un unico albero di consenso, rappresentativo delle tre metodiche. È stata stimata la distanza genetica tra i gruppi evolutivi mediante il software PAUP Version 4.0b10 (Swofford, 2003). Dalla ricostruzione dell'albero filogenetico è stato possibile attribuire gli aplotipi rinvenuti alla linea Atlantica (AT), alla linea Adriatica (AD), alla linea Mediterranea (ME) (aplotipi adriatici), alla linea marmorata (MA), o alla linea Danubiana (DA) utilizzando come riferimento le sequenze precedentemente pubblicate (Tabella S1).

Il risultato evolutivo è stato confermato anche attraverso l'analisi di network parsimonioso, processata mediante software TCS (Clement et al., 2000).

### 2.2.3 Genotipizzazione del gene nucleare LDH-C1

L'amplificazione e la digestione enzimatica del gene nucleare LDH-C1 è stata valutata essere una tecnica consolidata per la discriminazione tra la trota mediterranea e la trota atlantica (McMeel et al., 2001). La tecnica è capace di fornire dati sulla combinazione parentale, ovvero se trote omozigote mediterranee, omozigote atlantiche oppure forme ibride. Questi alleli sono caratteristici delle trote provenienti da bacini del centro Europa (gruppo atlantico) e dei bacini del sud Europa (gruppo mediterraneo) (McMeel et al., 2001).

Le amplificazioni sono state realizzate con la coppia di primers LDHXON3F (GGCAGCCTCTTCCTCAAAACGCCCAA) e LDHXON4R (CAACCTGCTCTCTCCCTCCTGCTGACGAA) (McMeel et al., 2001), utilizzando il seguente profilo di amplificazione: 95°C/15 min, 95°C/60 sec, 60°C/60 sec, 72°C/60 sec (35 cicli), seguito da uno step di estensione finale di 72°C/10 min. Le reazioni di amplificazione sono state allestite in un volume finale di 10 µl totali che includono 2µl di DNA estratto, 5µl di Mastermix (QIAGEN Multiplex PCR Kit), 0.25µl di ciascun primer (10 µM) e 2.5 µl di acqua bi-distillata (RNase-free water, inclusa nel QIAGEN Multiplex PCR Kit). Entrambi i primer sono stati marcati con un fluorocromo. Gli amplificati sono stati successivamente processati mediante digestione con l'enzima di restrizione *Bs*/I che non taglia il tratto in questione negli individui omozigoti LDHC1 \*100/100 (gruppo mediterraneo), mentre produce due frammenti di restrizione di 360 bp e 80 bp negli omozigoti \*90/90 (gruppo atlantico), e tre frammenti di 440 bp, 360 bp e 80 bp per gli eterozigoti \*90/100 (ibrido atlantico/mediterraneo). Gli ampliconi marcati sono stati

separati tramite elettroforesi capillare, e gli alleli visualizzati tramite Peak-Scanner 1.0 V (Applied Biosystems). Per ogni individuo è stato ricostruito il genotipo al *locus* nucleare LDH-C1 attraverso la verifica della presenza di alleli nucleari autoctoni mediterranei, indicati come \*100, e/o della eventuale presenza di alleli alloctoni atlantici, indicati con \*90. Gli individui puri mediterranei, quindi, sono caratterizzati dal genotipo \*100/100, equivalente ad un singolo picco a 426 bp, mentre gli individui puri atlantici sono caratterizzati dal genotipo \*90/90, equivalente a due picchi a 80 bp e 348 bp.

## 2.3 Risultati per marcatore

Al fine della descrizione dell'attuale struttura genetica di popolazioni di trota, sono riportati i risultati acquisiti mediante l'applicazione separata delle due tecniche molecolari: a) sequenziamento della regione di controllo D-Loop del DNA mitocondriale, b) genotipizzazione del gene nucleare LDH-C1.

### 2.3.1 Sequenziamento marcatore mitocondriale D-Loop

Su un totale di 224 individui l'amplificazione del marcatore D-Loop è fallita solo in 2 individui di Samolaco (centro ittigenico; O\_206 e O\_207) e un individuo dal torrente Marianna (A\_4).

È stato quindi prodotto un allineamento multiplo di 221 sequenze lunghe 408 paia di basi (bp) contraddistinto da 12 nucleotidi variabili caratterizzati da 9 informazioni parsimoniose e 3 singletons.

Dall'allineamento emergono 9 aplotipi la cui distribuzione e frequenza è riportata in tabella 2. Dei 9 aplotipi riscontrati dall'allineamento multiplo, due aplotipi sono risultati unici (Hap\_7 e Hap\_9) ovvero non presenti in banca dati; gli altri 7 invece sono risultati identici ad aplotipi già noti in banca dati (Tabella S1).



Tabella 2: Distribuzione aplotipi, N indica numero di individui analizzati tramite marcatore mitocondriale D-Loop nella popolazione.

			AT	AD	AD	MA	MA	MA	DA	ME	ME
ID	Torrente	N	Hap1	Hap2	Hap4	Hap5	Hap3	Hap7*	Hap6	Hap8	Hap9*
A	Marianna	19	17	1			1				
D	Valle di Rezzago	20	17		3						
E	Senagra	20	18			2					
F	Caldone	20	19						1		
G	Valle Merla	20	15			3		2			
H	Acqualina	20	18	1						1	
I	Vò	10	10								
L	Valle della Pietra	20	19							1	
M	Lella	20	20								
N	Avagnone	10	7	1						1	1
O	Samolaco	18	14			4					
Q	Grigna	7	7								
R	Allione	12	11			1					
S	Valle di Vesta	5	5								
		221	197	3	3	10	1	2	1	3	1

\*Aplotipi unici

L'aplotipo più abbondante (Hap\_1) è stato riscontrato in tutte le popolazioni (Tabella 2), e nelle popolazioni torrente Lella (M) e Valle di Vesta (S) rappresenta l'unico aplotipo ritrovato. I due nuovi aplotipi riscontrati in questo studio, sono stati trovati in due popolazioni diverse: in particolare Hap\_7 nella popolazione Valle Merla (G) e Hap\_9 nella popolazione Avagnone (N) (Tabella 2).

### 2.3.2 Analisi evolutiva

Gli alberi evolutivi ottenuti tramite i tre metodi precedentemente descritti sono stati uniti in un unico albero riferito alla sequenza esterna di *Salmo salar*. Ogni analisi è stata validata da un valore di probabilità a posteriori e di permutazione (bootstrap) utili a fornire la significatività della struttura ad albero.

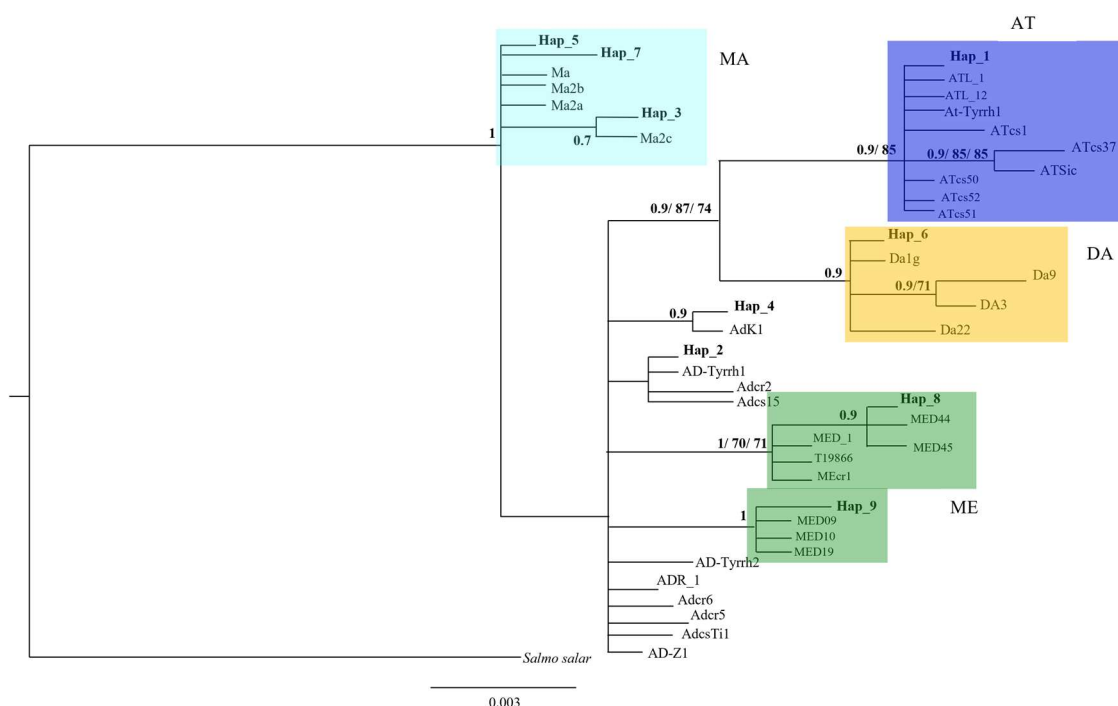


Figure 2: Albero evolutivo di *Salmo trutta* basato sul frammento di 408 bp del marcatore mitocondriale D-Loop. L'albero è risultante dall'integrazione dei metodi di Inferenza Bayesiana (BI), Neighbouring Joining (NJ) e Maximum Likelihood (ML). Ai nodi significativi ( $\geq 70\%$ ) vengono riportati i valori di probabilità a posteriori e bootstrap.

Dalla figura 2 è visibile la separazione tra le linee evolutive di *Salmo trutta* linea Mediterranea, Atlantica, Marmorata e Danubiana. La linea Mediterranea ME forma a sua volta due cladi ben separate, interposti alla linea Adriatica AD, che si differenzia ma senza significativo supporto tra gli aplotipi, ad eccezione di un solo clade significativamente supportato formato da Hap\_4 e aplotipo AdK1. Sono stati ritrovati aplotipi appartenenti a tutte e 5 le linee evolutive; nello specifico, un solo aplotipo sia per linea atlantica AT che per linea danubiana DA (rispettivamente Hap\_1 e Hap\_6), due aplotipi per linea adriatica AD (Hap\_2 e Hap\_4), due aplotipi per linea mediterranea ME (Hap\_8 e Hap\_9) e infine 3 aplotipi appartenenti alla linea marmorata MA (Hap\_3, Hap\_5 e Hap\_7) (Figura 2; Tabella 2).

La distanza evolutiva tra i cladi sottolinea la netta separazione del clade MA, clade AT in quanto valore di distanza percettuale superiore a 1%. Di contro i cladi ME e AD mostrano una distanza genetica inferiore a 1% supportando una più recente connessione evolutiva tra i cladi, già descritta (Splendiani et al., 2021).

Successivamente, la struttura evolutiva che intercorre tra gli aplotipi rinvenuti nel territorio lombardo è stata rappresentata anche tramite un “network parsimonioso”, dove è possibile vedere la frequenza riscontrata nelle popolazioni (Figura 3). Gli aplotipi ritrovati in questo studio (rappresentati secondo la loro frequenza in rosso, Figura 3) mostrano una larga dominanza della linea atlantica nell’unico aplotipo 1 (Hap\_1, N=197), particolarmente preponderante in tutte le popolazioni (Tabella 2). La linea mediterranea (Hap\_8 e Hap\_9) è rappresentata da soli tre individui. L’aplotipo Hap\_9 risulta connesso all’Hap\_22 da un passaggio mutazionale, con il quale forma un clade significativo nella ricostruzione filogenetica (Figura 2), interconnesso agli aplotipi della linea Adriatica, supportando la connessione evolutiva tra ME e AD. L’aplotipo Hap\_8 risulta separato da un passaggio mutazionale all’aplotipo Hap\_21, aplotipo recentemente descritto nel bacino occidentale del Po (Regione Piemonte) (Splendiani et al., 2021).

Questa dominanza atlantica è però caratterizzata da una sequenza mitocondriale uniforme, senza alcuna forma di variabilità, ovvero 197 sequenze identiche, già descritte in letteratura (aplotipo ATcs1, Tabella S1). Di contro, seppur in numero minore (N=10) le sequenze di trota riconducibili al gruppo mediterraneo (linea evolutiva AD e ME) mostrano una variabilità genetica per un totale di due aplotipi adriatici AD, (Hap\_2 e Hap\_4) due aplotipi mediterranei ME, già descritti ad eccezione del nuovo aplotipo qui trovato (Hap\_9, linea ME). I due aplotipi appartenenti alla linea evolutiva adriatica AD (Hap\_2 e Hap\_4) risultano entrambi distanziati da un passaggio mutazionale dall’aplotipo Hap\_16 (linea evolutiva AD), recentemente descritto nel bacino occidentale del Po (Regione Piemonte) (Splendiani et al., 2021).

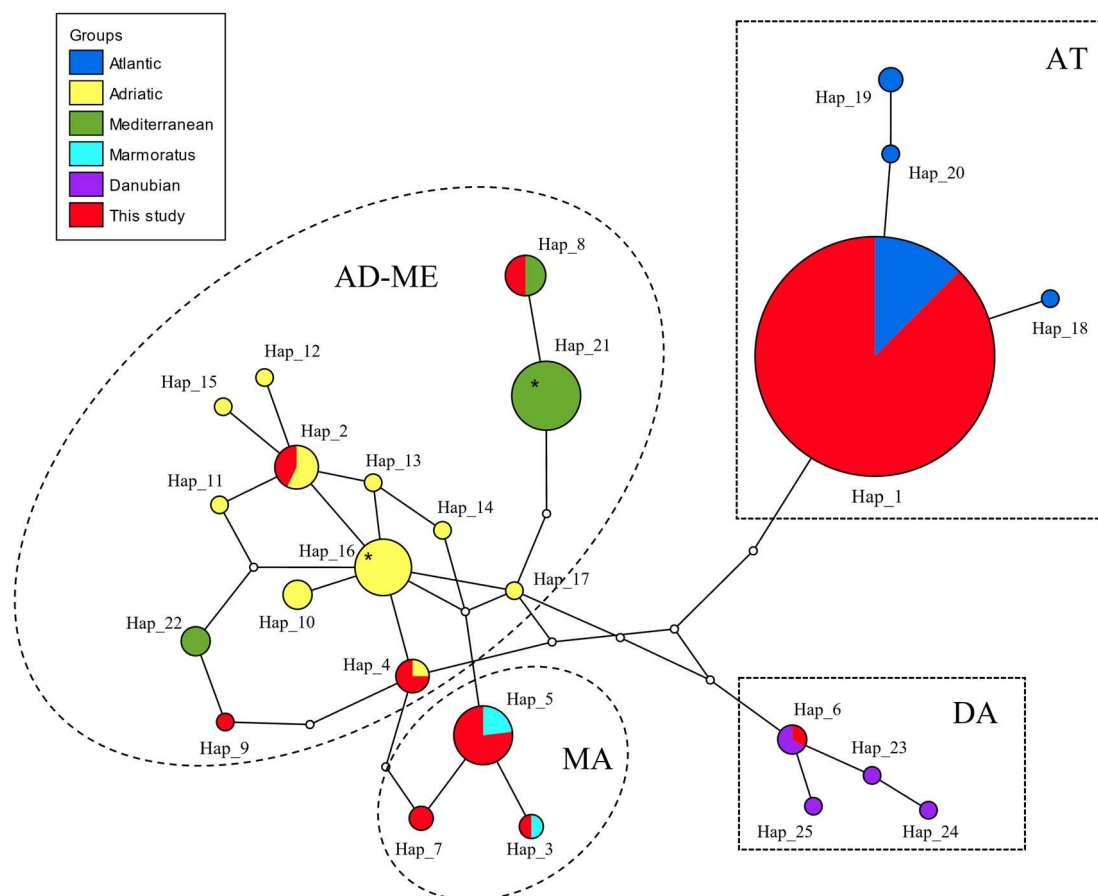


Figure 3: Network parsimonioso ottenuto dall'allineamento multiplo del frammento di 408 bp di D-Loop mtDNA unitamente alle sequenze della banca genetica (Tabella S1). Ogni cerchio rappresenta un aplotipo la cui dimensione è proporzionale alla sua frequenza (cf Tabella 2 e Tabella S1). I cerchi più piccoli non colorati rappresentano ipotetici aplotipi mancanti (passaggio mutazionali). \*Hap\_16 e Hap\_21 (Splendiani et al., 2021).

### 2.3.3 Combinazione parentale del gene LDH-C1

Su un totale di 224 individui stato estratto con successo il DNA. Successivamente l'amplificazione e digestione del gene LDH-C1 è fallita solo in due campioni della popolazione di Samolaco (centro ittigenico; O\_206 e O\_207). I rimanenti 222 individui sono stati discriminati tramite fragment analysis in genotipi omozigoti mediterraneo (LDH-C1 \*100/100), genotipi omozigoti atlantici (LDH-C1 \*90/90) e genotipi eterozigoti ibridi atlantico/mediterraneo (LDH-C1 \*90/100). Nella tabella 3 sono presentati i dati complessivi della caratterizzazione genetica attuale.

Tabella 3: risultati per popolazioni rispetto agli alleli \*90 e \*100 per il gene LDH-C1 e la rispettiva distribuzione di puro mediterraneo (\*100/\*100) (MED), puro atlantico (\*90/\*90) (ATL) e ibrido (\*100/\*90) (HYB). N indica numero dei campioni analizzati con successo.

ID Popolazione	Torrente	Bacino	N	ATL	HYB	MED
A	Marianna	Ticino	20	8	10	2
D	Valle di Rezzago	Lambro	20	3	17	-
E	Senagra	Adda	20	9	11	-
F	Caldone	Adda	20	10	10	-
G	Valle Merla	Adda	20	4	16	-
H	Acqualina	Adda	20	5	14	1
I	Vò	Oglio	10	9	1	-
L	Valle della Pietra	Adda	20	7	13	-
M	Lella	Staffora	20	9	11	-
N	Avagnone	Trebbia	10	1	9	-
O	Samolaco*	Adda	18	8	10	-
Q	Grigna	Oglio	7	6	1	-
R	Allione	Oglio	12	10	2	-
S	Valle di Vesta	Mincio	5	4	1	-
			222	93	126	3

\*Centro ittiogenico

I risultati complessivi mettono in luce: i) un'elevata commistione tra la forma atlantica e mediterranea (*cf* ibrido), fino a raggiungere 57% degli esemplari analizzati, ii) la cui rimanente quota è rappresentata da individui atlantici omozigoti (42% in totale) (Tabella 3). Nel complesso solo l'1% è risultato mediterraneo puro (3 individui sul totale) di cui 2 presenti nel torrente Marianna (A) e uno nel Torrente Acqualina (H), popolazioni che presentano anche individui sia atlantici puri che ibridi.

#### 2.4 Risultati sovrapposti (livello cartografico)

Sovrapponendo i risultati del sequenziamento del marcatore D-Loop alla combinazione parentale del gene nucleare LDH-C1 è possibile acquisire una mappa completa della distribuzione delle linee evolutive e della combinazione parentale sia a livello di popolazione (Tabella 4; Figura 4) sia a livello di bacino (Tabella 5; Figura 5).

Tabella 4: Riepilogo per popolazioni della linea evolutiva di appartenenza rispetto al marcatore mitocondriale D-Loop (Adriatica AD, Atlantica AT, Mediterranea ME, Marmorata MA, Danubiana DA) e rispetto agli alleli \*90 e \*100 per il gene LDH-C1 e la rispettiva attribuzione di omozigote mediterraneo (\*100/\*100), omozigote atlantico (\*90/\*90) e ibrido (\*100/\*90). Codice della popolazione (Pop), numero di individui analizzati tramite marcatore mitocondriale D-Loop ( $N_{dloop}$ ) e gene LDH-C1 ( $N_{LDH}$ ) sono indicati.

Pop	$N_{dloop}$	AD	AT	ME	MA	DA	$N_{LDH}$	ATL	HYB	MED
A	19	1	17	-	1	-	20	8	10	2
D	20	3	17	-	-	-	20	3	17	-
E	20	-	18	-	2	-	20	9	11	-
F	20	-	19	-	-	1	20	10	10	-
G	20	-	15	-	5	-	20	4	16	-
H	20	1	18	1	-	-	20	5	14	1
I	10	-	10	-	-	-	10	9	1	-
L	20	-	19	1	-	-	20	7	13	-
M	20	-	20	-	-	-	20	9	11	-
N	10	1	7	2	-	-	10	1	9	-
O	18	-	14	-	4	-	18	8	10	-
Q	7	-	7	-	-	-	7	6	1	-
R	12	-	11	-	1	-	12	10	2	-
S	5	-	5	-	-	-	5	4	1	-
	221	6	197	4	13	1	222	93	126	3

I risultati delle linee evolutive rivelano una dominanza più incisiva per la linea atlantica AT (89% per  $N=197$ ), diffusa in tutte le popolazioni, mentre il gruppo mediterraneo risulta ripartito in adriatica AD (3% per  $N=6$ ) e mediterranea ME (2% per  $N=4$ ) (Tabella 4; Figura 4). La linea mediterranea è stata rilevata in tre popolazioni, (Acqualina (H), Valle della Pietra (L) e Avagnone (N)), come pure la linea adriatica (popolazione Acqualina (H), Valle di Rezzago (D) e Avagnone (N)). La linea marmorata si presenta invece con più ampia distribuzione (popolazioni Marianna (A), Senagra (E), Caldane (F), Valle Merla (G), e Samolaco (O)) (Figura 4; Tabella 4). La presenza delle linee evolutive mitocondriali adriatica, mediterranea e marmorata, rappresentano solo il 10%, quando invece la combinazione parentale del gene LDH presuppone una maggior presenza di queste linee in quanto l'allele del gruppo mediterraneo è presente in 126 individui ibridi

e in 3 individui omozigoti mediterranei, pari al 30% degli alleli (Figura 4; Tabella 4). Le popolazioni con dominanza della forma omozigote atlantica, Vò (I), Grigna (Q) e Valle di Vesta (S) congruentemente hanno una dominanza assoluta di linea evolutiva atlantica, traccia potenziale di un'introduzione di individui atlantici. Di contro, le uniche due popolazioni in cui è stato rilevato genotipo omozigote mediterraneo (Marianna (A) e Acqualina (H)) presentano una maggiore variabilità genetica per la presenza, oltre alla linea atlantica, delle linee adriatica AD e marmorata MA e mediterranea ME, rispettivamente (Figura 4; Tabella 4).

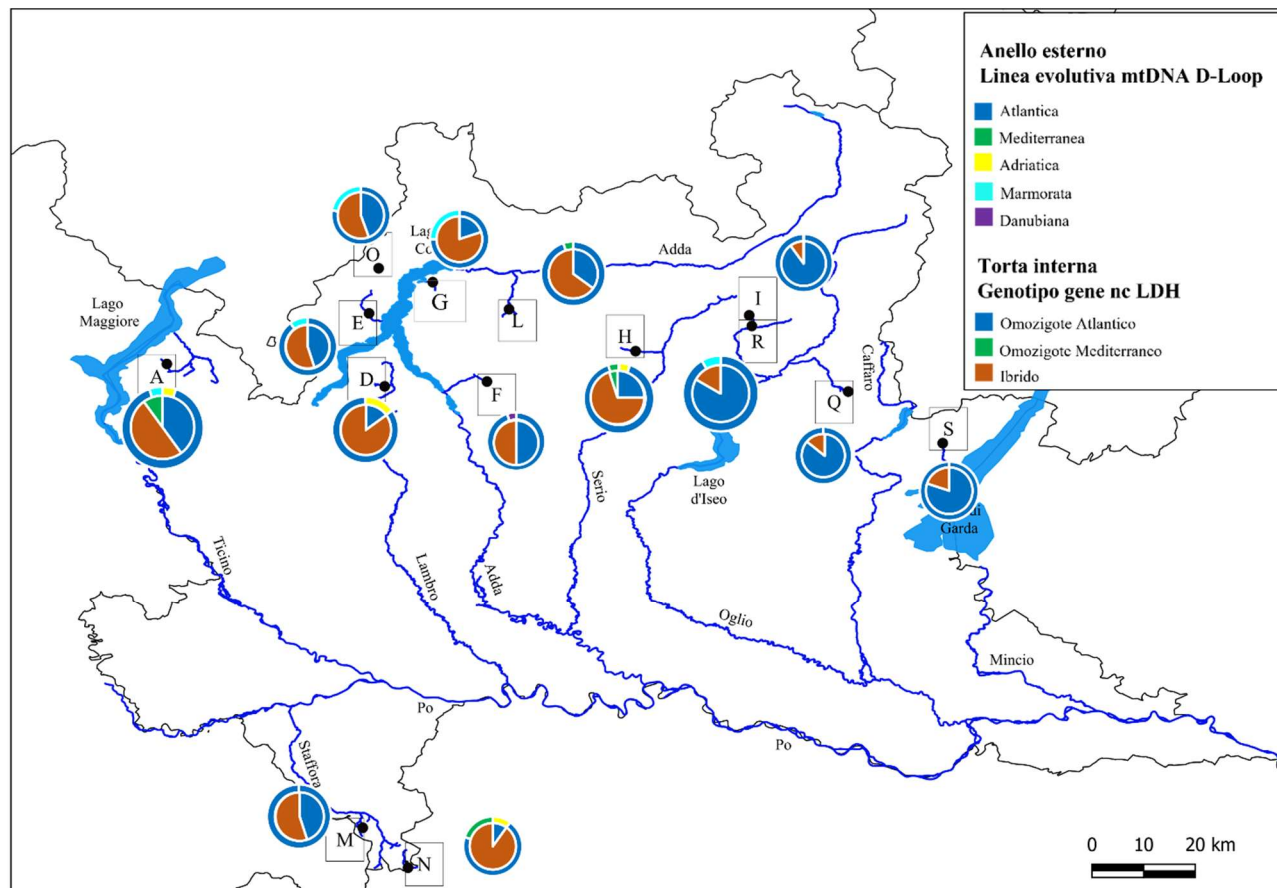


Figure 4: Distribuzione delle linee evolutive e dei risultati degli alleli \*90 e \*100 per il gene LDH-C1. Codice identificativo popolazioni (*cf.* Tabella 1).



In termini di bacini, la linea evolutiva atlantica è diffusa in tutti i bacini lombardi da un minimo del 70% (bacino Trebbia) fino a una dominanza assoluta (100%) nei bacini del Mincio e Staffora (Tabella 5; Figura 5). La presenza di individui ibridi è ampiamente diffusa in tutti i bacini da un minimo del 13% (bacino Mincio) fino al 93% (bacino Adda). Il genotipo omozigote mediterraneo è stato rilevato solo nei bacini di Ticino e Adda (Tabella 5; Figura 5).

Tabella 5: Riepilogo per bacini della linea evolutiva rispetto al marcatore D-Loop (Adriatica AD, Atlantica AT, Mediterranea ME, Marmorata MA, Danubiana DA) e rispetto agli alleli \*90 e \*100 per il gene LDH-C1 e la rispettiva attribuzione di omozigote mediterraneo (MED), omozigote atlantico (ATL) e ibrido (HYB).

<b>Bacino</b>	<b>Linea evolutiva</b>					<b>Genotipo</b>		
	AD	ATL	ME	MA	DA	ATL	HYB	MED
Ticino	1	17	-	1	-	8	10	2
Adda	1	103	2	11	1	43	74	1
Lambro	3	17	-	-	-	3	17	-
Oglio	-	28	-	1	-	25	4	-
Mincio	-	5	-	-	-	4	1	-
Staffora	-	20	-	-	-	9	11	-
Trebbia	1	7	2	-	-	1	9	-
Tot	6	197	4	13	1	93	126	3

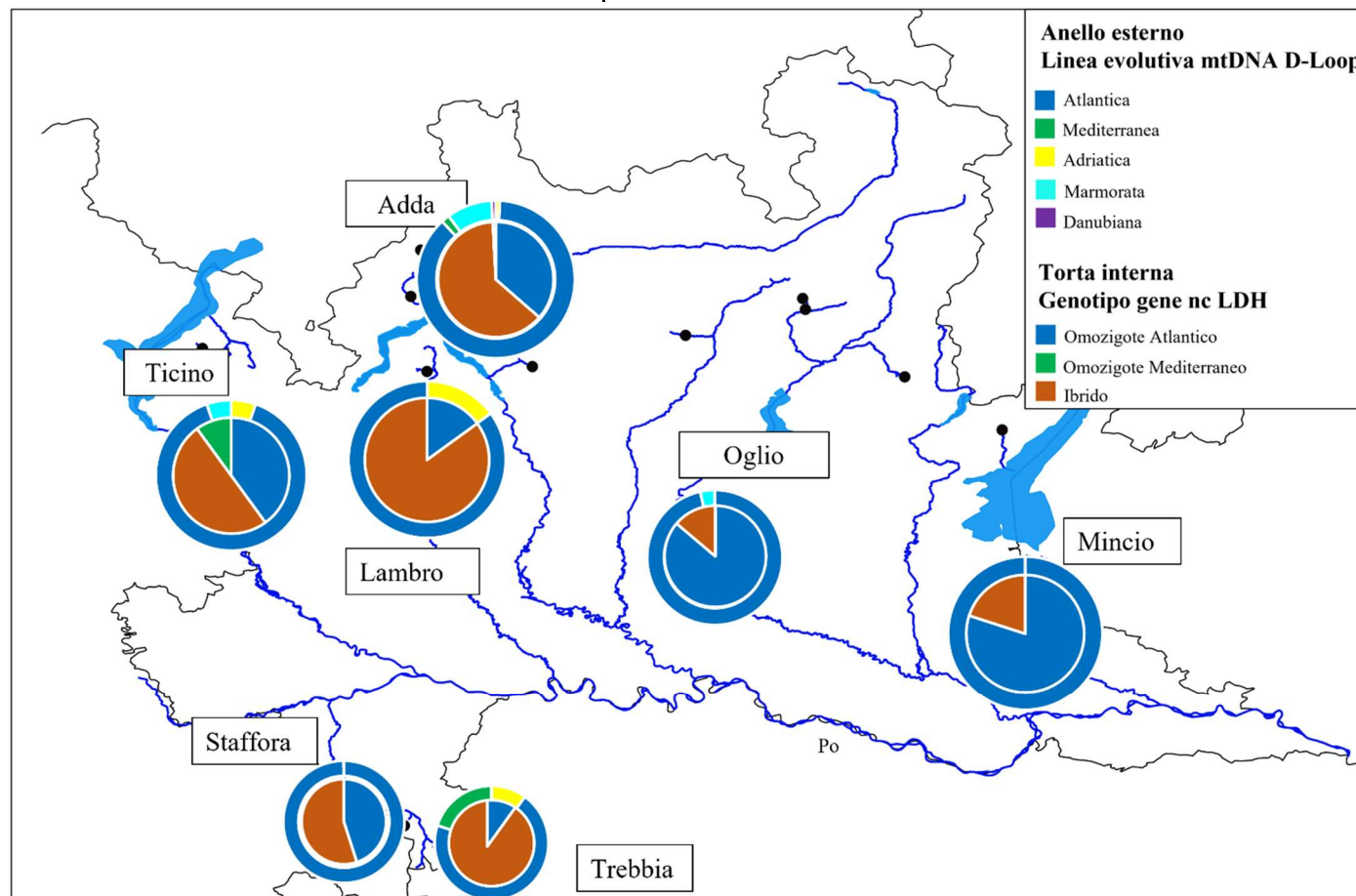


Figure 5: Distribuzione delle linee evolutive e dei risultati degli alleli \*90 e \*100 per il gene LDH-C1 divisa per bacini idrografici (cf. Tabella 1)

### 3 OBIETTIVO 2: caratterizzazione genetica storica

#### 3.1 Materiali e metodi

Le collezioni ittologiche di acqua dolce costruite a metà del 19° secolo sono considerate molto utili per la ricostruzione dell'originale distribuzione geografica di questi vertebrati (Boessenkool et al., 2009).

La ricerca dei campioni utili ai fini di questo studio si è basata sui seguenti criteri:

- Campioni appartenenti a *Salmo* sp. ritrovati nei fiumi lombardi, datati primariamente pre 1859 (data considerata di inizio dell'immissione dei salmonidi (ISPRA, 2021, 10 Dicembre), e almeno pre 1900
- Campioni appartenenti a *Salmo* sp. ritrovati nei laghi lombardi datati primariamente pre 1859, e almeno pre 1900;

Sono stati ritrovati 19 campioni che più si avvicinassero ai criteri selezionati, provenienti dal Museo di Scienze Naturali di Milano, da Kosmos – Museo di Storia Naturale di Pavia, dal Museo Civico di Scienze Naturali di Brescia e dal Naturhistorisches Museum di Vienna (Tabella 6; Figura 6). Per ogni esemplare è stata prelevata una porzione di arco branchiale destro e preservata nello stesso liquido di conservazione (Tabella 6). Tutte le analisi di laboratorio sono state eseguite presso i laboratori del Museo di Vienna, in stanze dedite all'analisi del DNA antico, sterilizzate tramite raggi UV.

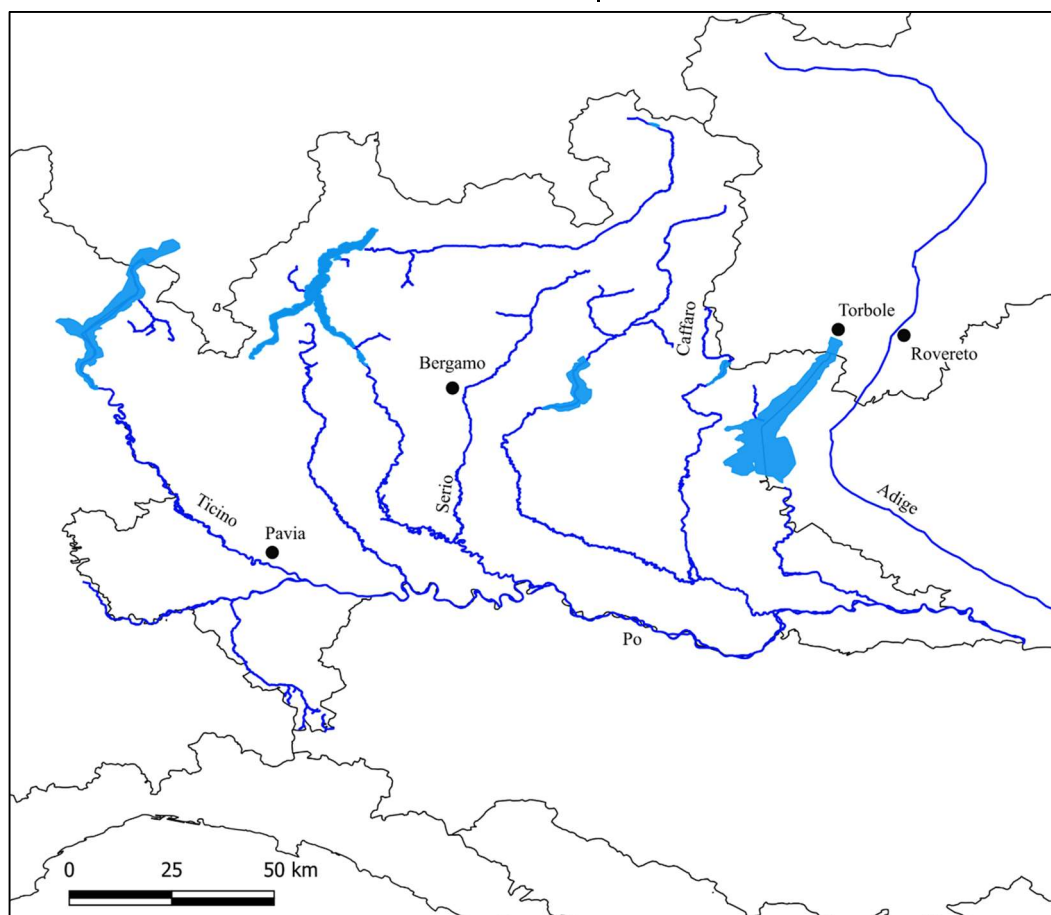


Figure 6: Mappa delle località di origine dei campioni museali (*cf* Tabella 6).

### 3.1.1 *Analisi laboratorio*

I frammenti di arco destro branchiale sono stati lasciati essiccare per rimuovere i residui del liquido di conservazione, e il DNA estratto tramite il kit di estrazione QIAamp® DNA Blood and Tissue Kit (Qiagen) con uso di Mini Elute colonne secondo le istruzioni del kit. Ad ogni estrazione è stato aggiunto un controllo negativo per assicurare il controllo di eventuali contaminazioni; la concentrazione di DNA è stata misurata tramite Qbit, High Sensitivity Kit e il grado di frammentazione tramite TapeStation, High Sensitivity Kit.

Tabella 6: Elenco campioni museali. Indicati il museo di provenienza, la specie di catalogazione, il numero di catalogo dell'esemplare (Cat\_Num), liquido di conservazione del campione, luogo di raccolta, località, data e codice delle analisi genetiche (ID).

Museo	Collezionista	Cat_Num	Conservazione	Fiume	Località	Anno	ID
Vienna	unknown	NMW_96796	Etanolo	Lago di Garda	Torbole	1821	SZ01
	Steindachner	NMW_65951	Etanolo	Lago di Garda	Torbole	1884	SZ02
	Steindachner	NMW_65952	Etanolo	Lago di Garda	Torbole	1884	SZ03
	Steindachner	NMW_65954	Etanolo	Lago di Garda	Torbole	1884	SZ04
	Sturany	NMW_65415	Etanolo	Lago di Garda	Fish farm	1892	SZ05
	Sturany	NMW_66083_1	Etanolo	Lago di Garda	Fish farm	1892	SZ06
	Sturany	NMW_66083_2	Etanolo	Lago di Garda	Fish farm	1892	SZ07
	Sturany	NMW_66489	Etanolo	Lago di Garda	Fish farm	1892	SZ08
	Sturany	NMW_66490_1	Etanolo	Lago di Garda	Fish farm	1892	SZ09
	Sturany	NMW_66490_2	Etanolo	Lago di Garda	Fish farm	1892	SZ10
	unknown	NMW_67946	Etanolo	Adige	Rovereto	Fine '800	SZ11
	unknown	NMW_90252	Etanolo	Adige	Rovereto	Fine '800	SZ12
	Steindachner	NMW_59654	Etanolo	Lago di Garda	Torbole	1884	SZ13
Brescia	unknown	MCSNB 57	Alcool	Caffaro	-	Inizio '900	SZ14
	unknown	MCSNB 13	Alcool	Caffaro	-	Inizio '900	SZ15
Pavia	unknown	MSNPV CP0433 – Ex 435/593	Etanolo	Serio	Bergamo	fine '800	SZ16
	unknown	MSNPV CP0435 – Ex 438/604	Etanolo	Ticino	Pavia	1877	SZ17
Milano	unknown	MSNM Pi 3139_B	Alcool	Serio	-	1858	SZ18
	unknown	MSNM Pi 3139_A	Alcool	Serio	-	1858	SZ19

### 3.1.2 Sequenziamento del marcatore D-Loop mtDNA

L'amplificazione, tramite PCR, della regione di controllo (D-Loop) del DNA mitocondriale (mtDNA) è stata condotta inizialmente su tutti i campioni con la coppia di primer usata in precedenza per i campioni di questo studio (sequenza amplificata circa 450 bp). A causa del diverso grado di degradazione del DNA, per alcuni campioni non è stato possibile amplificare l'intero frammento (~ 450 bp) (Tabella 7). Sono stati quindi disegnati nuovi primer che amplificassero tre frammenti più piccoli sovrapposti (denominati F1-F3) per ottenere l'intero frammento di 450 bp (Figura 7; Tabella 8). Le reazioni di amplificazione sono state allestite in un volume finale di 20  $\mu$ l, con 10  $\mu$ l Mastermix (QIAGEN Multiplex PCR Kit, QIAGEN Inc, Hilden, Germany), 0.5  $\mu$ l per ogni primer (10  $\mu$ M), e un quantitativo di acqua variabile a seconda della concentrazione di DNA per reazione (da 2-7  $\mu$ l per reazione). È stato utilizzato stesso profilo termico ma incrementando i numeri di cicli a 45. I prodotti di PCR sono stati purificati tramite Qiagen PCR purification kit e mandati a sequenziare in entrambe le direzioni a Mycosynth. I frammenti sono stati poi allineati in singola sequenza tramite MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011). I file fasta originali, con sequenze allineate e i primer sono disponibili come materiale supplementare. Per un maggior controllo di qualità il campione più antico (SZ1, datato 1821) è stato amplificato e sequenziato due volte.

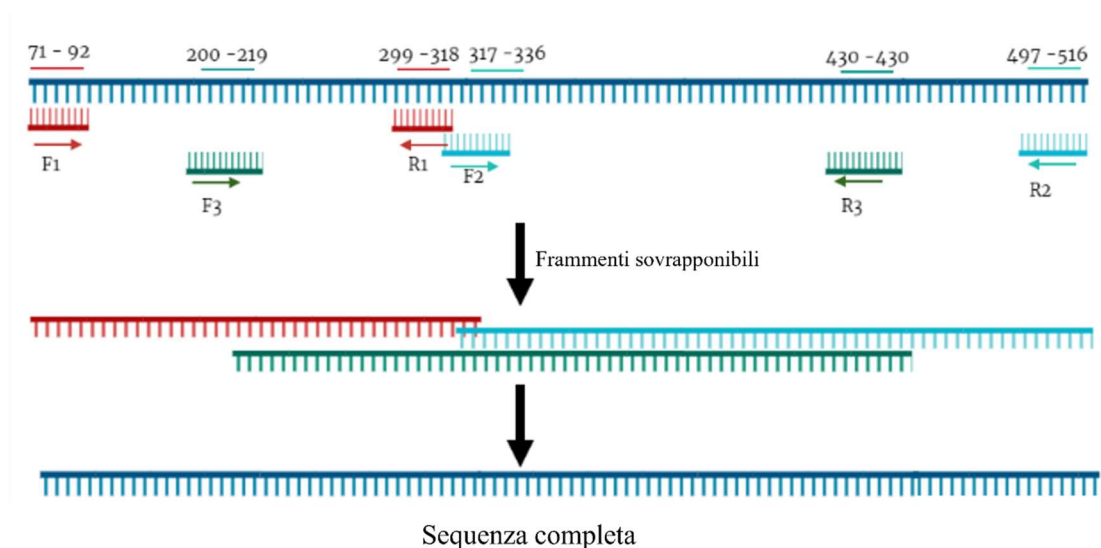


Figure 7: Disegno schematico rappresentante le tre coppie di primer disegnati in questo studio per amplificare tre frammenti più piccoli sovrapponibili per ottenere la sequenza completa del marcatore D-Loop (*cf* Tabella 8).

Tabella 7: Risultato di amplificazione: metodo di amplificazione, frammento completo per amplificazione del frammento mtDNA D-Loop in una reazione, tre frammenti se sono stati amplificati tre frammenti più piccoli sovrapposti di 200-250 bp. Frammento disponibile indicato come completo se sequenza di ~ 400 bp disponibile senza considerare metodo di amplificazione; F1, F2, F3 se amplificazione avvenuta con successo solo per sequenza parziale (*cf* Figura 7).

ID	Anno	Località	Metodo amplificazione	Frammento disponibile
SZ01*	1821	Lago di Garda	Frammento completo	Completo
SZ02	1884	Lago di Garda	Tre frammenti	F1, F2
SZ03	1884	Lago di Garda	Frammento completo	Completo
SZ04	1884	Lago di Garda	Tre frammenti	F1, F2
SZ05	1892	Fish farm	Frammento completo	Completo
SZ06	1892	Fish farm	Frammento completo	Completo
SZ07	1892	Fish farm	Frammento completo	Completo
SZ08	1892	Fish farm	Frammento completo	Completo
SZ09	1892	Fish farm	Frammento completo	Completo
SZ10	1892	Fish farm	Frammento completo	Completo
SZ11	Fine '800	Adige	Frammento completo	Completo
SZ12	Fine '800	Adige	Frammento completo	Completo
SZ13	1884	Lago di Garda	Frammento completo	Completo
SZ14	Inizio '900	Caffaro	Failed	Failed
SZ15	Inizio '900	Caffaro	Tre frammenti	F2
SZ16	fine '800	Serio	Failed	Failed
SZ17	1877	Ticino	Failed	Failed
SZ18	1858	Serio	Tre frammenti	Completo
SZ19	1858	Serio	Tre frammenti	F1, F2

\*Campione sequenziato e amplificato due volte

Tabella 8: Dettaglio dei primers utilizzati per amplificazione del frammento mtDNA DLoop in più frammenti. Nome del nuovo primer, sequenza, lunghezza del primer, base nucleotidica di inizio e fine considerando il frammento completo (450 bp), temperatura di annealing  $T_m$ , nome del primer con cui si accoppia (Coppia) e lunghezza del prodotto di amplificazione (Prodotto (bp)) sono indicati. (*cf* Figura 7).

Nome	Sequenza (5'→3')	Lunghezza	Inizio	Fine	$T_m$	Coppia
TruttaCR_F1	ARTGTTGTACCTTGCTAACDCA	22	71	92	59.56	TruttaCR_R1
TruttaCR_R1	GCCCGTGTTAYNTGGAGTTT	20	318	299	60.25	TruttaCR_F1
Prodotto (bp)	248					
TruttaCR_F2	GCTCCGTCTTTACCCACCAA	20	317	336	59.96	TruttaCR_R2
TruttaCR_R2	TACATTTCGGCTTTCAGGGGG	20	516	497	59.75	TruttaCR_F2
Prodotto (bp)	200					
TruttaCR_F3	ACCCCTCATACATCAGCACT	20	200	219	58.11	TruttaCR_R3
TruttaCR_R3	AYTTCACGAGATGCYYCCTA	20	449	430	58.54	TruttaCR_F3
Prodotto (bp)	250					

### 3.1.3 Analisi dei dati

Alle sequenze amplificate con il frammento completo di campioni museali sono state aggiunte quelle da banca dati utilizzate in precedenza (Tabella S1). È stata quindi condotta una ricostruzione evolutiva tramite Inferenza Bayesiana (BI) con il software MrBayes v.3.1.2 (Ronquist et al., 2012). Il miglior modello evolutivo per il nostro dataset, il modello HKY + I + G (Hasegawa et al., 1985), è stato calcolato tramite il software J-ModelTest 3.7 (Darriba et al., 2012). L'albero evolutivo è stato visualizzato tramite FigTree v 1.4.3 (Rambaut, 2016).

I siti diagnostici di ogni sequenza sono stati messi in evidenza seguendo l'approccio di Splendiani et al. (2017), utilizzando come termine di confronto l'allineamento del genoma mitocondriale completo di *Salmo trutta* (codice GenBank: AM10409) e di quattro sequenze del complesso *S. trutta* appartenenti alle linee evolutive atlantica (ATcs-1, GenBank: AF273086), adriatica (ADcs-1, GenBank: AY836330), mediterranea (MEcs-1, GenBank: AY836350) e marmorata (MA2c, GenBank: JQ582461).

## 3.2 Risultati

L'estrazione del DNA è avvenuta con successo su tutti i 19 campioni. Il frammento completo è stato ottenuto per 12 sequenze la cui attribuzione è avvenuta attraverso la ricostruzione dell'albero evolutivo (Figura 4). Per 4 sequenze è stato ottenuto solo un frammento parziale (SZ02, SZ04, SZ15 e SZ19) che ha consentito comunque di risalire ad un'alta probabilità di associazione alla linea evolutiva sfruttando i siti diagnostici (Splendiani et al., 2017; Tabella 9). Infine, tre campioni (SZ14, SZ16 e SZ17) non hanno mostrato sequenze leggibili (reazione di amplificazione è fallita) (Tabella 7).

L'analisi evolutiva è stata effettuata utilizzando solo le 12 sequenze complete (328 pb). Gli alberi evolutivi ottenuti tramite i tre metodi precedentemente descritti sono stati uniti in un unico albero riferito alla sequenza esterna di *Salmo salar*. Ogni analisi è stata validata da un valore di probabilità a posteriori utile a conferire la significatività della struttura ad albero.



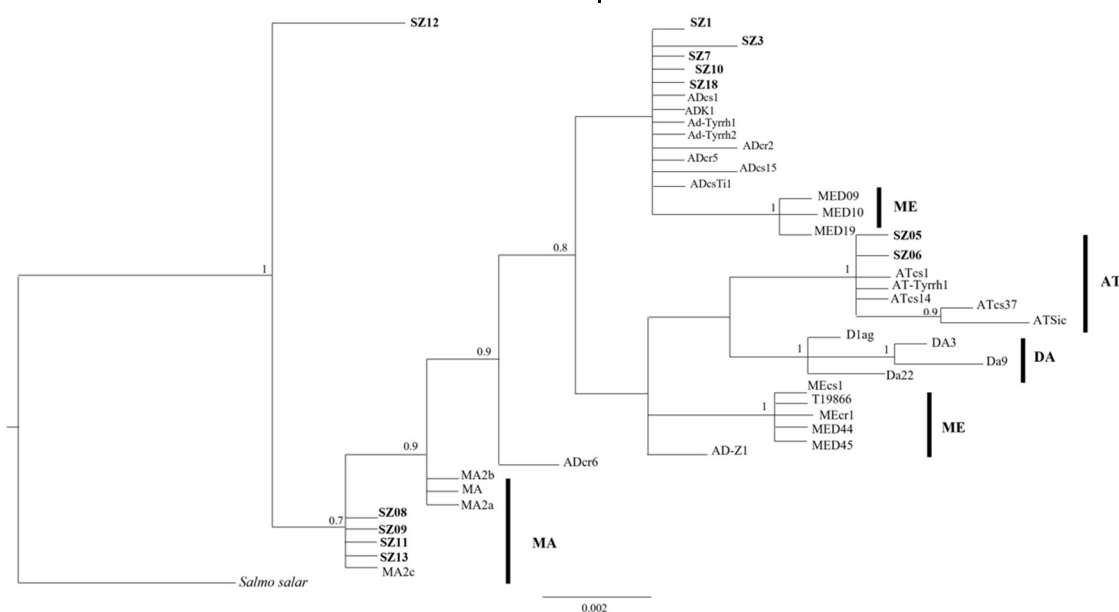


Figure 8: Albero evolutivo di Inferenza Bayesiana (BI) di *Salmo trutta* basato sul frammento di 328 bp del marcatore mitocondriale D-Loop. Ai nodi significativi ( $\geq 70\%$ ) vengono riportati i valori di probabilità a posteriori.

Dalla figura 8 è visibile la separazione tra le linee evolutive di *Salmo trutta* linea Atlantica AT, Marmorata MA e Danubiana DA. La linea Mediterranea ME forma a sua volta due cladi ben separati, interposti alla linea Adriatica AD, che si differenzia ma senza significativo supporto tra gli aplotipi, indice ulteriore di stretta connessione tra AD e ME. Alla luce della struttura evolutiva sono stati attribuiti i campioni alle rispettive linee di appartenenza: due campioni (SZ05 e SZ06) sono inclusi nel clade AT, cinque campioni nel clade AD (SZ01, SZ03, SZ07, SZ10 e SZ18) e quattro campioni nel clade MA (SZ08, SZ09, SZ11 e SZ13) (Figura 8). Un campione (SZ12) risulta a sé stante, ben separato dalle altre cladi. Eseguendo una ricerca in banca dati tramite BLAST, il campione SZ12 risulta più affine alla linea marmorata. Tutte le sequenze ottenute da questo studio risultano essere aplotipi già depositati in banca dati, ad eccezione dei campioni SZ03 (linea adriatica) e SZ12 (Tabella 9).

Le posizioni diagnostiche che consentono di attribuire le sequenze alle linee evolutive sono indicate nella tabella 9, in accordo con Splendiani et al. (2017). Grazie a questa descrizione puntuale è stato possibile attribuire l'appartenenza alla linea evolutiva anche per i campioni di questo studio che non hanno fornito una sequenza completa (SZ02, SZ04, SZ15 e SZ19) (Tabella9; Figura 9).

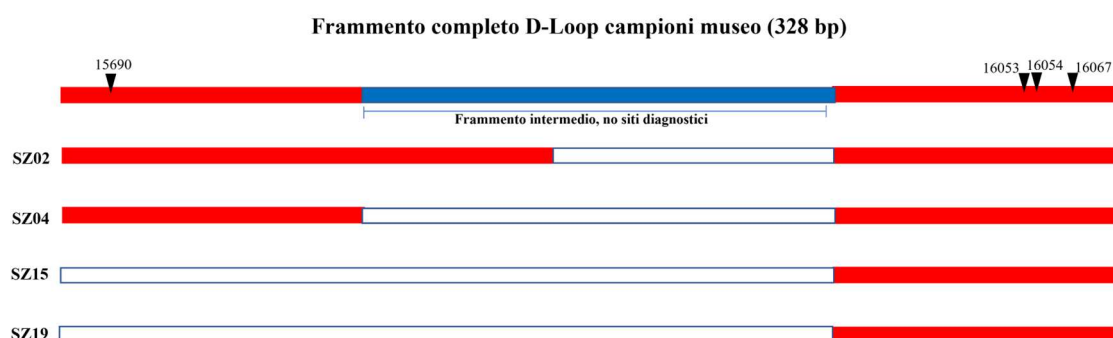


Figure 9: Rappresentazione grafica dei siti diagnostici utili all'assegnazione della linea evolutiva adriatica dei quattro campioni con sequenza inferiore a 300 bp (SZ02, SZ04, SZ15 e SZ19). Il box blu del frammento incompleto indica la zona del frammento che non presenta siti diagnostici (Splendiani et al., 2017). Evidenziati sono le posizioni dei siti diagnostici discriminanti la linea adriatica AD (*cf* Tabella 9). Il box bianco indica il frammento di sequenza mancante nei campioni considerati.

Nello specifico, per SZ02 e SZ04 è stato acquisito solo il frammento iniziale e finale (frammento intermedio mancante), mentre per SZ15 e SZ19 solo il frammento finale, per un totale di nucleotidi minori di 300. Le sequenze SZ02 e SZ04, mostrano nella parte iniziale del frammento analizzato il sito diagnostico caratterizzante la linea adriatica AD (sito 15757) e nella parte finale gli 3 siti diagnostici caratterizzanti questa la linea AD (siti nelle posizioni 16053, 16054 e 16067) (Tabella 9; Figura 9); essendo la parte di sequenza mancante non discriminante per questa linea (Splendiani et al., 2017), si può ipotizzare l'appartenenza di questi campioni alla linea adriatica. Lo stesso si può ipotizzare per i campioni SZ15 e SZ19 che presentano i 3 siti diagnostici nella parte finale di frammento, tipici della linea adriatica (Tabella 9; Figura 9).

Tabella 9: Informazioni delle posizioni diagnostiche variabili dei campioni museali comparate con la sequenza di riferimento del genoma completo (codice GenBank AM910409), individuate allineandole con sequenze del complesso *S. trutta* appartenenti alle linee evolutive atlantica, mediterranea, adriatica e marmorata. (/ Posizione nucleotidica non rilevata dovuta all'amplificazione mancata del frammento di D-Loop completo; . posizione nucleotidica identica alla sequenza di riferimento; - presenza di un gap). \*Aplotipi unici.

ID	Località	Anno	Aplotipo	Posizioni variabili D-Loop												
				15757	15777	15790	15810	15842	15860	15864	15926	15927	16011	16053	16054	16067
AF273086			ATcs-1	C	-	C	G	T	A	C	G	C	G	C	T	T
AY836360			ADcs-1	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	C	C
AY836350			MEcs-1	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	T	C	C
JQ582461			MA2c	.	A	.	.	C	.	.	A	T	.	T	C	C
SZ01	Torbole	1821	ADcs-1	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	C	C
SZ02	Torbole	1884	-	.	.	.	.	.	.	.	/	/	/	T	C	C
SZ03	Torbole	1884	AD_SZ3*	.	.	.	.	.	.	.	C	.	A	T	C	C
SZ04	Torbole	1884	-	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	C	C
SZ05	Fish farm	1892	ATcs-1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SZ06	Fish farm	1892	ATcs-1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SZ07	Fish farm	1892	ADcs-1	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	C	C
SZ08	Fish farm	1892	Ma2c	.	A	.	.	C	.	.	A	T	.	T	C	C
SZ09	Fish farm	1892	Ma2c	.	A	.	.	C	.	.	A	T	.	T	C	C
SZ10	Fish farm	1892	ADcs-1	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	C	C
SZ11	Rovereto	-	Ma2c	.	A	.	.	C	.	.	A	T	.	T	C	C
SZ12	Rovereto	-	MA_SZ12*	T	A	T	.	C	.	T	A	T	.	T	C	C
SZ13	Torbole	1884	Ma2c	.	A	.	.	C	.	.	A	T	.	T	C	C
SZ15	Caffaro	1900	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	.	T	C	C
SZ18	Serio	1858	ADcs-1	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	C	C
SZ19	Serio	1858	-	/	/	/	/	/	/	/	/	.	.	T	C	C

### 3.2.1 *Riscontro geografico dei campioni museali*

Il campione più antico (SZ01, datato 1821), di origine alla confluenza del lago Garda (loc. Torbole, Figura 6), è risultato essere un aplotipo adriatico già descritto in letteratura (ADcs-1). Nella stessa località i campioni SZ03 e SZ13, datati 1884, sono risultati essere rispettivamente un nuovo aplotipo adriatico (AD\_SZ3) e un aplotipo appartenente alla linea marmorata Ma2c, già descritto in letteratura (Figura 6; Tabella 9). Sempre a Torbole 1884, i campioni SZ02 e SZ04 risultano appartenere alla linea adriatica in base ai siti discriminanti prima descritti (Tabella 9).

I campioni provenienti dal centro ittiogenico ('fish farm'), datati post 1880, appartengono alla linea atlantica (SZ05 e SZ06), linea marmorata (SZ08 e SZ09) e adriatica (SZ07 e SZ010) (Tabella 9).

I campioni SZ11 e SZ12, provenienti dal fiume Adige (loc. Rovereto, Figura 6) sono risultati appartenenti alla linea marmorata, rispettivamente aplotipo Ma2c (già descritto in letteratura) e un nuovo aplotipo MA\_SZ12 (Figura 6; Tabella 9).

I campioni provenienti dal fiume Serio (SZ18 e SZ19) datati 1858, risultano appartenenti alla linea adriatica; nello specifico il campione SZ18 risulta essere l'aplotipo ADcs-1, mentre il campione SZ19 ha chiari tratti di linea adriatica definito su un frammento ridotto (Figura 6; Tabella 9).

Infine, il campione SZ15 proveniente dal fiume Caffaro risalente a inizio '900, risulta appartenere alla linea adriatica definito tramite siti diagnostici su frammento ridotto (Tabella 9).

## 4 DISCUSSIONI

### 4.1 Obiettivo 1: caratterizzazione genetica attuale

Grazie all'integrazione di due processi analitici ormai consolidati in letteratura, la caratterizzazione genetica attuale delle trote su territorio lombardo è stata fornita. Il riconoscimento delle linee evolutive mitocondriali e la combinazione parentale dei campioni analizzati hanno messo in luce uno stato generale attuale di forte ibridazione (Figura 10). Ogni singolo individuo, sulla base del riconoscimento della linea evolutiva e della combinazione parentale, è stato descritto secondo il seguente criterio (Tabella S2):

- “puro atlantico” con genotipo LDH atlantico e linea evolutiva atlantica;
- “puro mediterraneo” con genotipo LDH mediterraneo e linea evolutiva mediterranea/adriatica;
- “ibrido” con genotipo LDH ibrido a prescindere della linea evolutiva.

All'interno del gruppo ibrido si riconoscono anche due forme di incrocio tra individui ibridi, ovvero “introgresso atlantico” (4 individui) con genotipo LDH atlantico e linea evolutiva non atlantica, e “introgresso mediterraneo” (2 individui) con genotipo LDH mediterraneo e linea evolutiva non mediterranea (Tabella S2).

Dall'analisi della combinazione genetica dei due marcatori, risulta evidente una forte ibridazione estesa su tutto il territorio regionale (Figura 10). Gli individui ibridi infatti rappresentano il 61% degli individui analizzati, distribuiti in tutte le popolazioni (Figura 10). Gli individui puri atlantici rappresentano il 39% dei campioni analizzati; questi rappresentano la maggioranza degli individui campionati per le popolazioni Vò (I) (90%), Grigna (Q) (85%), Allione (R) (83%) e Valle di Vesta (S) (80%) (Figura 10; Tabella S2). È stato individuato solo individuo classificato come “puro Mediterraneo”, nella popolazione Acqualina (individuo H\_124) (Tabella S2; Figura 10).

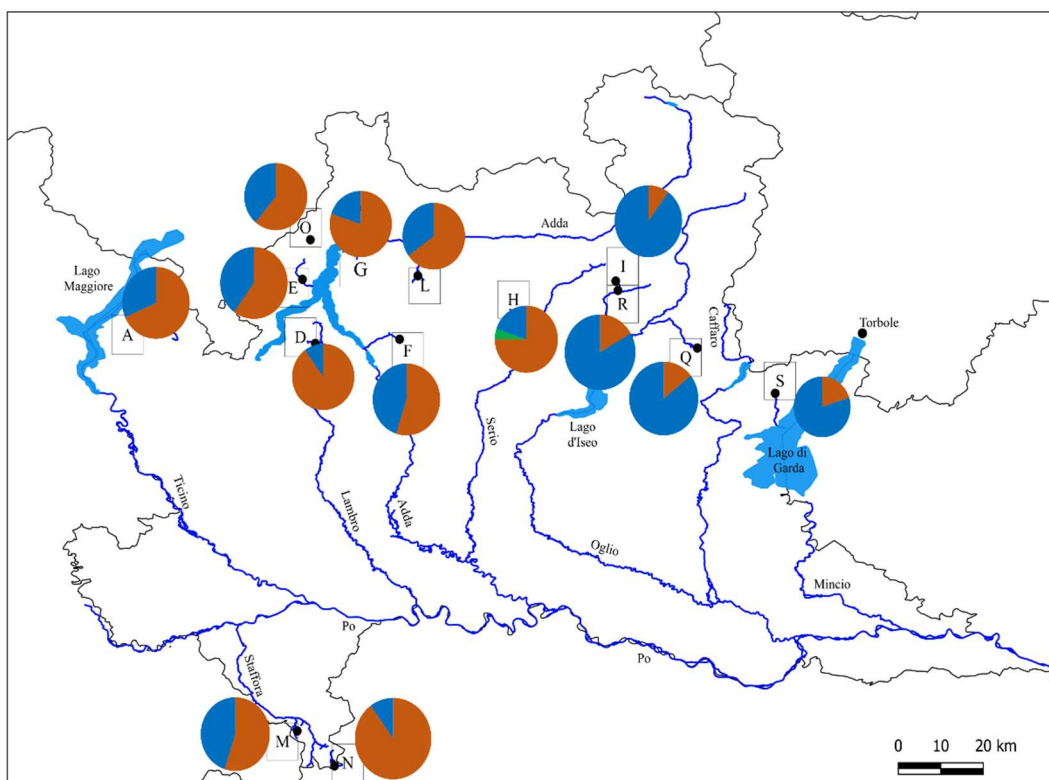


Figure 10: Rappresentazione delle popolazioni analizzate data dall'integrazione del riconoscimento delle linee evolutive (marcatore D-Loop) e della combinazione parentale (gene LDH-C1): in blu sono gli individui 'puri atlantici', in verde gli individui 'puri mediterranei' e in arancione gli individui 'ibridi', espressi in percentuale (cf Tabella S2). I campioni dettagliati "introgressi" in tabella S2 sono stati qui rappresentati come 'ibridi'.

#### 4.2 Obiettivo 2: caratterizzazione genetica storica

La caratterizzazione genetica di campioni museali ha permesso di fornire un inquadramento storico sul territorio lombardo in un periodo antecedente l'inizio delle introduzioni di salmonidi (1859) fino agli inizi del 1900 (Figura 11). Il campione museale più antico disponibile permette di affermare la presenza del gruppo mediterraneo (linea evolutiva AD e ME) sin dal 1821 (Figura 11a). Situazione confermata e rinforzata dall'aggiunta di altri due campioni nel 1858 che mostrano la presenza della linea adriatica AD nel Lago di Garda e nel fiume Serio (Figura 11b). Agli inizi del 1900 è possibile osservare la presenza della linea adriatica AD sul tutto il territorio lombardo, comprendente i grandi laghi subalpini, Maggiore grazie allo studio di Splendiani et al.

(2017) e Garda, sia i fiumi, nonché la presenza delle linee atlantica AT (circonscritta ad un centro ittiogenico) e marmorata MA (Figura 11c).

I campioni datati 1821 e 1858 analizzati in questo studio rinforzano e avvalorano l'ipotesi, avanzata da Splendiani et al. (2017) e Stefani et al., (2019), per cui le trote di linea adriatica AD possano essere sopravvissute durante le glaciazioni del Pleistocene in pochi rifugi entro le Alpi meridionali.

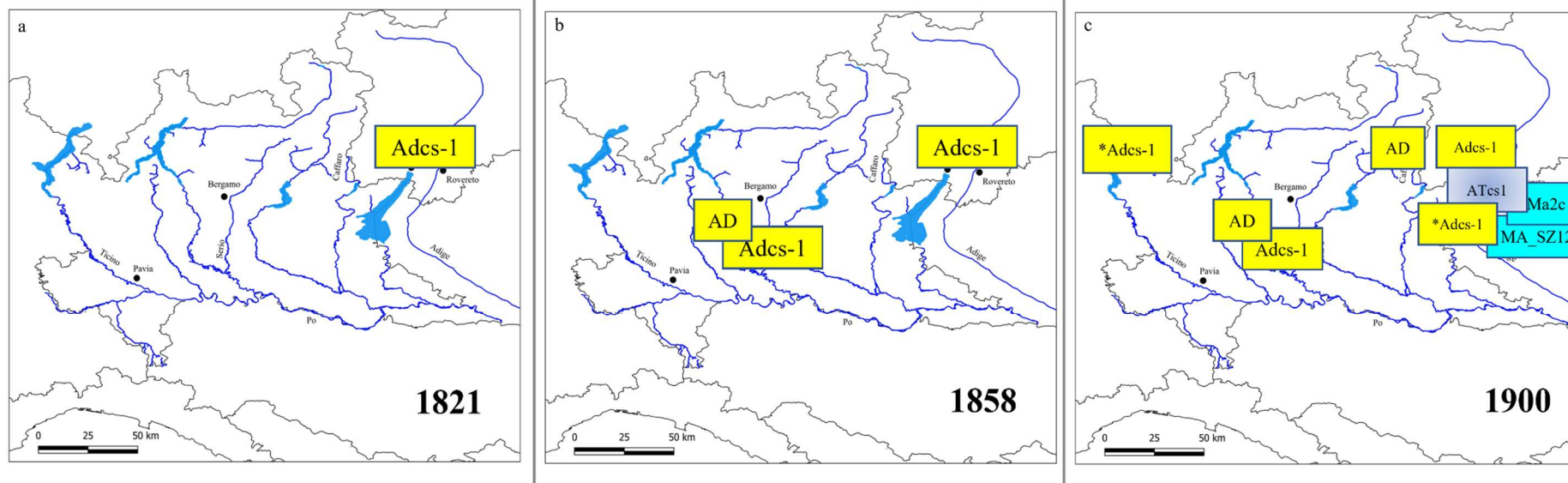


Figure 11: Rappresentazione grafica cronologica dell'informazione genetica storica della trota su territorio lombardo grazie ai campioni museali disponibili. Nello specifico, rappresentate sono le linee evolutive note con corrispondenza geografica nel a) periodo storico più antico disponibile (1821), b) nel periodo pre-stocking, e c) agli inizi del 1900.

\*campioni museali dallo studio di Splendiani et al., 2017.



## 5 CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati ottenuti è possibile avanzare le seguenti considerazioni:

- ✓ Le numerose trote atlantiche riscontrate in tutti i bacini lombardi, unitamente alla loro uniformità genetica possono essere interpretate come un segnale di una recente diffusione, facilmente riconducibile a un'attività di introduzione e semina.
- ✓ La variabilità genetica rilevata nelle trote mediterranee analizzate nei bacini lombardi può essere interpretata come segnale di origine locale (bacino del Po). Questa ipotesi è supportata dal fatto che le trote mediterranee sono risultate presenti nei bacini lombardi in tempi antecedenti alle attività di introduzione.

In conclusione, sembra poco plausibile considerare il segnale genetico acquisito in questo studio come conseguenza di attività di introduzione di esemplari di trota mediterranea, quanto piuttosto pare più plausibile ipotizzare una avvenuta attività di introduzione delle trote atlantiche in bacini già popolati da trote mediterranee, quest'ultima considerazione supportata dalle numerose trote ibride rilevate.

Tali considerazioni conclusive sono supportate dalle risultanze sperimentali esposte in dettaglio nella relazione che per comodità di lettura vengono nel seguito brevemente riassunte:

### Caratterizzazioni sul quadro genetico attuale:

- Le linee evolutive associate alla trota mediterranea (AD e ME) sono presenti in 10 individui di 4 popolazioni, caratterizzate da quattro forme aplotipiche (segnale di variabilità genetica).
- La linea evolutiva atlantica è diffusa in tutte le popolazioni, ma solo in un'unica forma aplotipica (segnale di uniformità genetica).
- Sono state trovate 86 trote atlantiche, 133 trote ibride e una trota mediterranea

### Caratterizzazioni sul quadro genetico storico:

- I campioni museali analizzati in questo studio attestano che le trote mediterranee (esemplari della linea evolutiva mediterranea AD) erano già presenti nel 1821 alla confluenza del Lago Garda (loc. Torbole); presenza confermata nel fiume Serio



nel 1858, quindi in una finestra temporale precedente le introduzioni di salmonidi avvenute nel 1859 (ISPRA, 2021).

## 6 BIBLIOGRAFIA

- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques *Nucleic Acids Research* 25(22), 4692-4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- Allendorf, F. W., Ryman, N., & Utter, F. M. (1987). Genetics and fishery management. *Population genetics and fishery management*, 1-19.
- Bernatchez, L., Guyomard, R., & Bonhomme, F. (1992). DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular ecology*, 1(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1992.tb00172.x>
- Blanc, M. (1971). *European inland water fish*. Fishing News [for the] Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Boessenkool, S., Star, B., Scofield, R. P., Seddon, P. J., & Waters, J. M. (2009). Lost in translation or deliberate falsification? Genetic analyses reveal erroneous museum data for historic penguin specimens. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1684), 1057-1064. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1837>
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10), 1657-1660.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods* 9(8), 772-772.
- Giuffra, E., Bernatchez, L., & Guyomard, R. (1994). Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from northern Italy. *Molecular Ecology*, 3(2), 161-171.
- Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T.-a. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*, 22(2), 160-174.
- ISPRA. (2021, 10 Dicembre). *Tabella specie ittiche autoctone - Richiesta di modifica status non autoctonia trota mediterranea (Salmo ghigii)*. ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01166.x>
- Meraner, A., Gratton, P., Baraldi, F., & Gandolfi, A. (2013). Nothing but a trace left? Autochthony and conservation status of Northern Adriatic *Salmo trutta* inferred from PCR multiplexing, mtDNA control region sequencing and microsatellite analysis. *Hydrobiologia*, 702(1), 201-213. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1321-8>
- 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 Populations

- (Northern and Central Italy). *Environmental Biology of Fishes*, 68, 349-2356.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1023/B:EBFI.00000005762.81631.fa>
- Rambaut. (2016). <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D. L., Aaron, Darling, A., . . . Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61(3), 539-542.
- Sabatini, A., Cannas, R., Follesa, M. C., Palmas, F., Manunza, A., Matta, G., . . . Cau, A. (2011). Genetic characterization and artificial reproduction attempt of endemic Sardinian trout *Salmo trutta* L., 1758 (Osteichthyes, Salmonidae): Experiences in captivity. *Italian Journal of Zoology*, 78(1), 20-26.  
<https://doi.org/10.1080/11250003.2010.497171>
- Splendiani, A., Fioravanti, T., Giovannotti, M., Olivieri, L., Ruggeri, P., Nisi Cerioni, P., . . . Caputo Barucchi, V. (2017). Museum samples could help to reconstruct the original distribution of *Salmo trutta* complex in Italy. *Journal of Fish Biology*, 90(6), 2443-2451.
- Splendiani, A., Palmas, F., Sabatini, A., & Caputo Barucchi, V. (2019). The name of the trout: considerations on the taxonomic status of the *Salmo trutta* L., 1758 complex (Osteichthyes: Salmonidae) in Italy. *The European Zoological Journal*, 86(1), 432-442. <https://doi.org/10.1080/24750263.2019.1686544>
- Splendiani, A., Ruggeri, P., Giovannotti, M., Pesaresi, S., Occhipinti, G., Fioravanti, T., . . . Caputo Barucchi, V. (2016). Alien brown trout invasion of the Italian peninsula: the role of geological, climate and anthropogenic factors [OriginalPaper]. *Biological Invasions*, 18(7), 2029-2044. <https://doi.org/doi:10.1007/s10530-016-1149-7>
- Stefani, F., Anzani, A., & Marieni, A. (2019). Echoes from the past: a genetic trace of native brown trout in the Italina Alps. *Environmental Biology of Fishes*, 102, 1327-1335. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10641-019-00899-y>
- Swofford, D. L. (2003). *PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10*.
- Tamura, K., Peterson D Fau - Peterson, N., Peterson N Fau - Stecher, G., Stecher G Fau - Nei, M., Nei M Fau - Kumar, S., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. (1537-1719 (Electronic)).  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Zwickl, D. J. (2006). *Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion* The University of Texas at Austin.].

## 7 Appendice I

Tabella S1: Codici di riferimento banca genetica delle sequenze del complesso *Salmo trutta* utilizzate per analisi evolutiva e network parsimonioso. Per ogni sequenza linea evolutiva basata sul marcatore mitocondriale D-Loop (linea), nome dell'aplotipo depositato dallo studio originale (GenBank), codice di accesso alla banca dati (Acc. Num.), nome assegnato in questo studio (questo studio) e riferimento bibliografico (bibliografia) sono indicati.

Linea	GenBank	Acc. Num.	Questo studio	Bibliografia
Atlantica	ATcs1	AF273086	Hap_1	(Cortey & García-Marín, 2002; Cortey et al., 2009) (Berrebi et al., 2019)
Atlantica	ATcs2	AF273087	Hap_1	(Cortey & García-Marín, 2002)
Atlantica	ATcs3	AF274574	Hap_1	(Cortey & García-Marín, 2002)
Atlantica	ATcs4	AF274575	Hap_1	(Cortey & García-Marín, 2002)
Atlantica	ATSic	JF297974	Hap_20	(Snoj et al., 2011)
Atlantica	AT-Tyrrh1	KX450263	Hap_1	(Berrebi et al., 2019)
Atlantica	ATcs14	EF530476	Hap_18	(Cortey et al., 2009)
Atlantica	ATcs37	EF530499	Hap_19	(Cortey et al., 2009)
Atlantica	ATcs38	EF530500	Hap_19	(Cortey et al., 2009)
Atlantica	ATcs50	EF530510	Hap_1	(Cortey et al., 2009)
Atlantica	ATcs51	EF530511	Hap_1	(Cortey et al., 2009)
Atlantica	ATcs52	EF530512	Hap_1	(Cortey et al., 2009)
Adriatica	ADcs1	AY836330	Hap_16	(Cortey et al., 2004)
Adriatica	ADorh1	MK448034	Hap_16	(Splendiani et al., 2021)
Adriatica	ADcs15	AY836344	Hap_15	(Cortey et al., 2004)
Adriatica	AdcsTi1	KU667314	Hap_16	(Marić et al., 2017)
Adriatica	AD-Z1	DQ381565	Hap_17	(Sušnik et al., 2007)

Adriatica	AD-Tyrrh1	KX450257	Hap_2	(Berrebi et al., 2019)
Adriatica	AD-Tyrrh2	KX450258	Hap_10	(Berrebi et al., 2019)
Adriatica	AD-Tyrrh3	KX450259	Hap_11	(Berrebi et al., 2019)
Adriatica	AD-Tyrrh4	KX450260	Hap_2	(Berrebi et al., 2019)
Adriatica	AD-Tyrrh5	KX450261	Hap_10	(Berrebi et al., 2019)
Adriatica	AD-Tyrrh6	KX450262	Hap_10	(Berrebi et al., 2019)
Adriatica	ADcr2	MK184916	Hap_12	(Delling et al., 2020)
Adriatica	ADcr3	MK184921	Hap_2	(Delling et al., 2020)
Adriatica	ADcr4	MK184826	Hap_2	(Delling et al., 2020)
Adriatica	ADcr5	MK184935	Hap_13	(Delling et al., 2020)
Adriatica	ADcr6	MK184943	Hap_14	(Delling et al., 2020)
Adriatica	ADK1	JX846932	Hap_4	(Jadan et al., 2015)
Mediterranea	MEcs4	AY836353	Hap_21	(Cortey et al., 2004)
Mediterranea	MEcs6	AY836355	Hap_21	(Cortey et al., 2004)
Mediterranea	MEcs7	AY836356	Hap_21	(Cortey et al., 2004)
Mediterranea	MEcs8	AY836357	Hap_21	(Cortey et al., 2004)
Mediterranea	MEcs1	AY836350	Hap_21	(Splendiani et al., 2021)
Mediterranea	MEcr1	MK184945	Hap_21	(Delling et al., 2020)
Mediterranea	T19866	MK184949	Hap_21	(Delling et al., 2020)
Mediterranea	Mecs25	MG970274	Hap_21	(Vera et al., 2011)
Mediterranea	MED09	KY661214	Hap_22	(Zuffi et al., 2017)
Mediterranea	MED10	KY661215	Hap_22	(Zuffi et al., 2017)
Mediterranea	MED19	KY661224	Hap_22	(Zuffi et al., 2017)
Mediterranea	MED44	KY661248	Hap_8	(Zuffi et al., 2017)
Mediterranea	MED45	KY661249	Hap_8	(Zuffi et al., 2017)
Mediterranea	MED50	KY661254	Hap_8	(Zuffi et al., 2017)

Marmorata	Ma2a	DQ841189	Hap_5	(Meraner et al., 2007)
Marmorata	Ma2b	DQ841190	Hap_5	(Meraner et al., 2007)
Marmorata	Ma2C	JQ582461	Hap_3	(Meraner et al., 2007)
Marmorata	Ma	MW251444	Hap_5	(Segherloo et al., 2021)
Danubiana	Da1f	MK675073	Hap_6	(Kanjuh et al., 2020)
Danubiana	Da1g	MK675074	Hap_6	(Kanjuh et al., 2020)
Danubiana	DA3	AY185571	Hap_23	(Duftner et al., 2003)
Danubiana	DA9	AY185572	Hap_24	(Duftner et al., 2003)
Danubiana	DA22	AF321993	Hap_25	(Weiss et al., 2001)
<i>Salmo salar</i>	Leguer2	GQ376149	*	(Machado-Schiaffino et al., 2009)

\*Sequenza utilizzata solo per analisi evolutiva

- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques *Nucleic Acids Research* 25(22), 4692-4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- Allendorf, F. W., Ryman, N., & Utter, F. M. (1987). Genetics and fishery management. *Population genetics and fishery management*, 1-19.
- Bernatchez, L., Guyomard, R., & Bonhomme, F. (1992). DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular ecology*, 1(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1992.tb00172.x>
- Berrebi, P., Caputo Barucchi, V., Splendiani, A., Muracciole, S., Sabatini, A., Palmas, F., . . . Marić, S. (2019). Brown trout (*Salmo trutta* L.) high genetic diversity around the Tyrrhenian Sea as revealed by nuclear and mitochondrial markers. *Hydrobiologia*(826), 209-231. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10750-018-3734-5>
- Blanc, M. (1971). *European inland water fish*. Fishing News [for the] Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Boessenkool, S., Star, B., Scofield, R. P., Seddon, P. J., & Waters, J. M. (2009). Lost in translation or deliberate falsification? Genetic analyses reveal erroneous museum data for historic penguin specimens. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1684), 1057-1064. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1837>
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10), 1657-1660.
- Cortey, M., & García-Marín, J. L. (2002). Evidence for phylogeographically informative sequence variation in the mitochondrial control region of Atlantic brown trout [<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb02429.x>]. *Journal of Fish Biology*, 60(4), 1058-1063. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb02429.x>
- Cortey, M., Pla, C., & García-Marín, J.-L. (2004). Historical biogeography of Mediterranean trout. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33(3), 831-844. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.08.012>
- Cortey, M., Vera, M., Pla, C., & García-Marín, J.-L. (2009). Northern and Southern expansions of Atlantic brown trout (*Salmo trutta*) populations during the Pleistocene [<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01220.x>]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97(4), 904-917. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01220.x>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods* 9(8), 772-772.
- Delling, B., Sabatini, A., Muracciole, S., Tougaard, C., & Berrebi, P. (2020). Morphologic and genetic characterisation of Corsican and Sardinian trout with comments on *Salmo* taxonomy. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, 21(hal-02566709), 421. <https://doi.org/https://doi.org/10.1051/kmae/2020013>
- Duftner, N., Weiss, S., Medgyesy, N., & Sturmbauer, C. (2003). Enhanced phylogeographic information about Austrian brown trout populations derived from complete mitochondrial control region sequences [<https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00038.x>]. *Journal of Fish Biology*,



- 62(2), 427-435. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00038.x>
- Giuffra, E., Bernatchez, L., & Guyomard, R. (1994). Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from northern Italy. *Molecular Ecology*, 3(2), 161-171.
- Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T.-a. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*, 22(2), 160-174.
- ISPRA. (2021, 10 Dicembre). *Tabella specie ittiche autoctone - Richiesta di modifica status non autoctonia trota mediterranea (Salmo ghigii)*. ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
- Jadan, M., Strunjak-Perović, I., Topić Popović, N., & Čož-Rakovac, R. (2015). Three major phylogenetic lineages of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) in the Krka River system (Croatia) revealed by complete mitochondrial DNA control region sequencing [<https://doi.org/10.1111/jai.12631>]. *Journal of Applied Ichthyology*, 31(1), 192-196. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jai.12631>
- Kanjuh, T., Marić, A., Piria, M., Špelić, I., Maguire, I., & Simonović, P. (2020). Diversity of brown trout, *Salmo trutta* (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae), in the Danube River basin of Croatia revealed by mitochondrial DNA [10.3750/AIEP/02939]. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 50(3), 291-300.
- Machado-Schiaffino, G., Griffiths, A., Bright, D., Stevens, J., & Garcia-Vazquez, E. (2009). *Salmo salar* isolate Leguer2 control region, partial sequence; mitochondrial.
- Marić, S., Sušnik Bajec, S., Schöffmann, J., Kostov, V., & Snoj, A. (2017). Phylogeography of stream-dwelling trout in the Republic of Macedonia and a molecular genetic basis for revision of the taxonomy proposed by S. Karaman. *Hydrobiologia*, 785(1), 249-260. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2930-4>
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01166.x>
- Meraner, A., Baric, S., Pelster, B., & Dalla Via, J. (2007). Trout (*Salmo trutta*) mitochondrial DNA polymorphism in the centre of the marble trout distribution area. *Hydrobiologia*(579), 337-349. <https://doi.org/DOI 10.1007/s10750-006-0479-3>
- Meraner, A., Gratton, P., Baraldi, F., & Gandolfi, A. (2013). Nothing but a trace left? Autochthony and conservation status of Northern Adriatic *Salmo trutta* inferred from PCR multiplexing, mtDNA control region sequencing and microsatellite analysis. *Hydrobiologia*, 702(1), 201-213. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1321-8>
- 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 Populations (Northern and Central Italy). *Environmental Biology of Fishes*, 68, 349-2356. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/B:EBFI.0000005762.81631.fa>
- Rambaut. (2016). <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D. L., Aaron, Darling, A., . . . Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61(3), 539-542.
- Sabatini, A., Cannas, R., Follesa, M. C., Palmas, F., Manunza, A., Matta, G., . . . Cau, A. (2011). Genetic characterization and artificial reproduction attempt of endemic Sardinian trout *Salmo trutta* L., 1758 (Osteichthyes, Salmonidae): Experiences in captivity. *Italian Journal of Zoology*, 78(1), 20-26. <https://doi.org/10.1080/11250003.2010.497171>
- Segherloo, I. H., Freyhof, J., Berrebi, P., Ferchaud, A.-L., Geiger, M., Laroche, J., . . . Bernatchez, L. (2021). A genomic perspective on an old question: *Salmo* trouts or *Salmo trutta* (Teleostei: Salmonidae)? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 162, 107204. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107204>
- Snoj, A., Marić, S., Sušnik, B. S., Berrebi, P., Janjani, S., & Schöffmann, J. (2011). Phylogeographic structure and demographic patterns of brown trout in North-West Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61, 203-211. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.05.011>
- Splendiani, A., Berrebi, P., Tougard, C., Righi, T., Reynaud, N., Fioravanti, T., . . . Caputo Barucchi, V. (2021). The role of the south-western Alps as a unidirectional corridor for Mediterranean brown trout (*Salmo trutta* complex) lineages. *Biological Journal of the Linnean Society*, 131(4), 909-926. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa125>
- Splendiani, A., Fioravanti, T., Giovannotti, M., Olivieri, L., Ruggeri, P., Nisi Cerioni, P., . . . Caputo Barucchi, V. (2017). Museum samples could help to reconstruct the original distribution of *Salmo trutta* complex in Italy. *Journal of Fish Biology*, 90(6), 2443-2451.
- Splendiani, A., Ruggeri, P., Giovannotti, M., Pesaresi, S., Occhipinti, G., Fioravanti, T., . . . Caputo Barucchi, V. (2016). Alien brown trout invasion of the Italian peninsula: the role of geological, climate and anthropogenic factors [OriginalPaper]. *Biological Invasions*, 18(7), 2029-2044. <https://doi.org/doi:10.1007/s10530-016-1149-7>
- Stefani, F., Anzani, A., & Marieni, A. (2019). Echoes from the past: a genetic trace of native brown trout in the Italina Alps. *Environmental Biology of Fishes*, 102, 1327-1335. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10641-019-00899-y>
- Sušnik, S., Snoj, A., Wilson, I. F., Mrdak, D., & Weiss, S. (2007). Historical demography of brown trout (*Salmo trutta*) in the Adriatic drainage including the putative S. letnica endemic to Lake Ohrid. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(1), 63-76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.08.021>
- Swofford, D. L. (2003). *PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10*.
- Tamura, K., Peterson D Fau - Peterson, N., Peterson N Fau - Stecher, G., Stecher G Fau - Nei, M., Nei M Fau - Kumar, S., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. (1537-1719 (Electronic)). <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Vera, M., Sourinejad, I., Bouza, C., Vilas, R., Pino-Querido, A., Kalbassi, M. R., & Martínez, P. (2011). Phylogeography, genetic structure, and conservation of the

- endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877), from Iran. *Hydrobiologia*, 664(1), 51-67.
- Weiss, S., Schlötterer, C., Waidbacher, H., & Jungwirth, M. (2001). Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmo trutta* in tributaries of the Austrian Danube: massive introgression of Atlantic basin fish — by man or nature? [<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01261.x>]. *Molecular Ecology*, 10(5), 1241-1246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01261.x>
- Zuffi, G., Papa, G., & Plazzi, F. (2017). *Morphological and genetic characterization of Salmo trutta species complex specimens from the Panigale fish farm (Lizzano in Belvedere, BO)* University of Bologna, Italy
- Zwickl, D. J. (2006). *Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion* The University of Texas at Austin.].

## 8 Appendice II

Tabella S2: Dettaglio degli individui rispetto alla linea evolutiva per il gene D-Loop e agli alleli \*90 e \*100 per il gene LDH-C1, la cui combinazione permette attribuzione per individuo: puro mediterraneo (genotipo LDH mediterraneo e linea evolutiva adriatica); int\_Atlantico (genotipo LDH atlantico e linea evolutiva non atlantica); int\_Mediterraneo (genotipo LDH mediterraneo e linea evolutiva non mediterranea); puro atlantico (genotipo LDH atlantico e linea evolutiva atlantica); puro mediterraneo (genotipo LDH mediterraneo e linea evolutiva mediterranea); ibrido (genotipo LDH ibrido).

Torrente	ID	mtDNA		LDH	
		Linea	Aplotipo	Genotipo	Combinato
Marianna	A_1	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro atlantico</i>
	A_2	Adriatica	Hap_2	Ibrido	Ibrido
	A_3	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	A_5	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	A_6	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro atlantico</i>
	A_7	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro atlantico</i>
	A_8	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro atlantico</i>
	A_9	Marmorata	Hap_3	Omozigote Atlantico	Ibrido
	A_10	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	A_11	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro atlantico</i>
	A_12	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	A_13	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	A_14	Atlantica	Hap_1	<b>Omozigote Mediterraneo</b>	<b>Int_Mediterraneo</b>
	A_15	Atlantica	Hap_1	<b>Omozigote Mediterraneo</b>	<b>Int_Mediterraneo</b>
	A_16	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	A_17	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	A_18	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	A_19	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	A_20	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro atlantico</i>
Valle di Rezzago	D_41	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	D_42	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	D_43	Adriatica	Hap_4	Ibrido	Int_Atlantico
	D_44	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	D_45	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	D_46	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	D_47	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	D_48	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	D_49	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	D_50	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	D_51	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	D_52	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	D_53	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	D_54	Adriatica	Hap_4	Omozigote Atlantico	Int_Atlantico
	D_55	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	D_56	Adriatica	Hap_4	Ibrido	Ibrido
	D_57	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	D_58	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	D_59	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	D_60	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
Senagra	E_61	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	E_62	Marmorata	Hap_5	Omozigote Atlantico	Int_Atlantico
	E_63	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	E_64	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	E_65	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>

	E_66	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	E_67	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	E_68	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	E_69	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	E_70	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	E_71	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	E_72	Marmorata	Hap_5	Ibrido	Ibrido
	E_73	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	E_74	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	E_75	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	E_76	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	E_77	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	E_78	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	E_79	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	E_80	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
Caldone	F_81	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	F_82	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	F_83	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	F_84	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	F_85	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	F_86	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	F_87	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	F_88	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	F_89	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	F_90	Danubiana	Hap_6	Omozigote Atlantico	Ibrido
	F_91	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	F_92	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	F_93	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	F_94	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	F_95	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	F_96	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	F_97	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	F_98	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	F_99	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	F_100	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
Valle Merla	G_101	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	G_102	Marmorata	Hap_7	Ibrido	Ibrido
	G_103	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	G_104	Marmorata	Hap_7	Ibrido	Ibrido
	G_105	Marmorata	Hap_7	Ibrido	Ibrido
	G_106	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	G_107	Marmorata	Hap_5	Ibrido	Ibrido
	G_108	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	G_109	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	G_110	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	G_111	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	G_112	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	G_113	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	G_114	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	G_115	Marmorata	Hap_4	Ibrido	Ibrido
	G_116	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	G_117	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	G_118	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	G_119	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	G_120	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
Acqualina	H_121	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	H_122	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	H_123	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido

				<b>Omozigote Mediterraneo</b>	<b>Puro Mediterraneo</b>
	H_124	Adriatica	Hap_2	Omozigote Mediterraneo	Puro Mediterraneo
	H_125	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	H_126	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	H_127	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	H_128	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	H_129	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	H_130	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	H_131	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	H_132	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	H_133	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	H_134	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	H_135	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	H_136	Mediterranea	Hap_8	Omozigote Atlantico	<i>Int Atlantico</i>
	H_137	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	H_138	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	H_139	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	H_140	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
Vò	I_141	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	I_142	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	I_143	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	I_144	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	I_145	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	I_146	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	I_147	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	I_148	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	I_149	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	I_150	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
Valle della Pietra	L_151	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	L_152	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	L_153	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	L_154	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	L_155	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	L_156	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	L_157	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	L_158	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	L_159	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	L_160	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	L_161	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	L_162	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	L_163	Mediterranea	Hap_8	Ibrido	Ibrido
	L_164	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	L_165	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	L_166	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	L_167	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	L_168	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	L_169	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	L_170	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
Lella	M_171	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	M_172	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	M_173	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	M_174	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	M_175	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	M_176	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	M_177	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	M_178	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	M_179	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	M_180	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido

	M_181	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	M_182	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	M_183	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	M_184	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	M_185	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	M_186	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	M_187	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	M_188	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	M_189	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	M_190	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
Avagnone	N_191	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	N_192	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	N_193	Adriatica	Hap_2	Ibrido	Ibrido
	N_194	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	N_195	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	N_196	Mediterranea	Hap_9	Ibrido	Ibrido
	N_197	Mediterranea	Hap_8	Ibrido	Ibrido
	N_198	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	N_199	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	N_200	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
Samolaco	O_201	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	O_202	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	O_203	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	O_204	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	O_205	Marmorata	Hap_5	Omozigote Atlantico	Ibrido
	O_208	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	O_209	Marmorata	Hap_4	Ibrido	Ibrido
	O_210	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	O_211	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	O_212	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	O_213	Marmorata	Hap_5	Ibrido	Ibrido
	O_214	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	O_215	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	O_216	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	O_217	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	O_218	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	O_219	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	O_220	Marmorata	Hap_5	Ibrido	Ibrido
Grigna	Q_231	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	Q_232	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	Q_233	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	Q_234	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	Q_235	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	Q_236	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	Q_237	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
Allione	R_238	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	R_239	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	R_240	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	R_241	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	R_242	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	R_243	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
	R_244	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	R_245	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	R_246	Marmorata	Hap_5	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	R_247	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	R_248	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	R_249	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido
Valle di	S_250	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>



Vesta	S_251	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	S_252	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	S_253	Atlantica	Hap_1	Omozigote Atlantico	<i>Puro Atlantico</i>
	S_254	Atlantica	Hap_1	Ibrido	Ibrido