

Life⁺ **TROTA**

Deliverable A2 Life+ TROTA - Practical recommendation on the fittest approach to perform the captive breeding and restocking action on macrostigma trout - Part 1 (Genetic analysis).

A cura di Vincenzo Caputo Barucchi, Massimo Giovannotti e
Andrea Splendiani (DiSVA, UNIVPM, Ancona)

1. INTRODUZIONE

Il progetto Life+ TROTA, avviato il 1° novembre 2013, intende porre al centro dell'attenzione l'esigenza di tutelare i pesci dulcicoli dell'area mediterranea. Sebbene siano seriamente minacciati di estinzione, essi sono infatti molto meno considerati rispetto alle numerose strategie di conservazione messe in campo per i vertebrati terrestri. Tra le principali cause della scomparsa di questi animali vanno ricordate l'inquinamento delle acque, il loro eccessivo prelievo, la distruzione degli habitat d'acqua dolce e la diffusione delle specie alloctone invasive. La specie oggetto del nostro progetto è la trota macrostigma (*Salmo macrostigma* Duméril, 1858), simbolo del declino dei pesci dulcicoli, messa a rischio proprio a causa della grande diffusione di una specie aliena, la trota atlantica (*Salmo trutta* L., 1758) di origine nord-europea. Quest'ultima, allevata da oltre un secolo in Italia, viene immessa nei nostri fiumi per garantire un'artificiosa sovrabbondanza di pesce a vantaggio della pesca sportiva, portando anno dopo anno alla progressiva sostituzione della trota autoctona. L'approfondito monitoraggio delle ultime popolazioni di trota macrostigma dell'Appennino centrale e del loro habitat permetterà di pianificarne la tutela e il rafforzamento grazie ad attività di ripopolamento e reintroduzione, con l'auspicabile coinvolgimento e supporto da parte delle principali associazioni di pesca sportiva.

Nel primo anno di progetto le attività tecnico-scientifiche hanno riguardato l'analisi del livello di commistione genetica (introgressione) fra la trota macrostigma e la trota atlantica alloctona (Azione A2). Lo screening genetico condotto durante il primo anno di progetto è stato realizzato analizzando le caratteristiche molecolari (DNA nucleare e mitocondriale), più informative rispetto a quelle morfologiche per descrivere le differenze che si sono accumulate nel corso dell'evoluzione fra le popolazioni. Contestualmente alle analisi genetiche, le attività dell'Azione A2 hanno permesso di raccogliere delle informazioni utili alla definizione dell'ecologia e della dinamica delle popolazioni della trota nativa.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Attività di Campionamento

In totale sono stati visitati 42 siti di campionamento, fra i quali sulla base delle caratteristiche ambientali, della composizione della comunità ittica e delle caratteristiche genetiche delle popolazioni di trota fario, sono stati selezionati i 32 siti riferibili a 14 aree SIC della Regione Marche all'interno dei quali sono state condotte anche le analisi dell'azione preparatoria A3 (Fig.

1). Per lo screening genetico sono stati analizzati 796 esemplari selvatici (provenienti da 35 popolazioni) e 62 individui domestici di origine nord atlantica rappresentativi dello stock alloctono usato in Italia centrale per le attività di ripopolamento (Tab. 1). I pesci selvatici sono stati catturati attraverso la tecnica dell'elettropesca e stabulati in vasche dotate di ossigenatore per il tempo necessario a prelevare piccoli frammenti di pinna adiposa, per registrare alcuni parametri morfologici come lunghezza totale e peso, e per effettuare i rilievi fotografici delle livree. Al termine dei prelievi gli esemplari sono stati rilasciati nel sito di cattura.

2.2 Estrazione del DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto e purificato dai frammenti di pinna adiposa seguendo il protocollo di estrazione automatica (n. 401, *MagCore*[®] *Genomic DNA Tissue Kit*) implementato nell'apparato per l'estrazione degli acidi nucleici della ditta *MagCore*. Dopo l'estrazione la concentrazione del DNA è stata determinata tramite spettrofotometro.

2.3 Analisi del DNA mitocondriale (mtDNA)

Dopo l'estrazione del DNA genomico è stata amplificata tramite PCR (*Polymerase Chain Reaction*) la regione di controllo (*D-loop*) del mtDNA. Per le reazioni di amplificazione è stato utilizzato un termociclatore programmabile e la procedura sperimentale è stata eseguita seguendo il protocollo proposto da Bernatchez & Danzmann (1993).

Lo screening della variabilità genetica mitocondriale è stato condotto su un totale di 650 individui attraverso l'analisi SSCP (*Single-strand conformation polymorphism*). I prodotti di PCR del *D-loop* sono stati digeriti con l'enzima di restrizione *AluI*, caricati su un gel non denaturante di poliacrilammide e sottoposti a una corsa elettroforetica della durata di 12 ore effettuata in camera fredda a 5 W costanti. Un sub-campione di individui con lo stesso profilo SSCP è stato sottoposto al sequenziamento di un segmento di 310 paia di basi (bp) all'estremità 5' del *D-loop* (cfr. Aurelle & Berrebi, 2001).

2.4 Analisi del DNA nucleare (locus *LDH-CI**)

Su un totale di 796 esemplari è stato amplificato un tratto di 440 bp del locus nucleare *LDH-CI**, caratterizzato da alleli diagnostici per le popolazioni atlantiche (allele *90) e mediterranee (allele *100) di *Salmo* sp. (cfr. McMeel *et al.*, 2001). L'amplificato è stato quindi digerito con l'enzima di restrizione *BsII* che non taglia il tratto in questione negli individui omozigoti *LDH-CI*100/100*; mentre produce due frammenti di restrizione di 360 bp e 80 bp negli omozigoti *90/90; e tre frammenti di 440 bp, 360 bp e 80 bp per gli eterozigoti *90/100. I tre genotipi sono stati visualizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2%.

2.5 Analisi del DNA nucleare (microsatelliti)

Per l'analisi del DNA microsatellite sono stati utilizzati sei loci dinucleotidici: *Str73*, *Str60* (Estoup *et al.*, 1993), *Ssa85* (O'Reilly *et al.*, 1996), *SsoSL417* (Slettan *et al.*, 1995), *One μ 2* (Scribner *et al.*, 1996), *Ssa103NVH* (non pubblicato, Genebank n. AF256746) e sei loci tetranucleotidici: *SSsp2216*, *SSsp2213* (Paterson *et al.*, 2004), *OMM1064* (Rexroad *et al.*, 2002), *SsaD190* (King *et al.*, 2005), *Ssa410UOS*, *Ssa408UOS* (Cairney *et al.*, 2000). In totale sono stati analizzati 271 esemplari, provenienti dalle 8 popolazioni selvatiche in cui l'analisi comparata del DNA mitocondriale e del locus *LDH-CI** ha evidenziato una bassa frequenza ($\leq 20\%$) di varianti genetiche riferibili alla trota atlantica alloctona (Tab. 2), più tre popolazioni domestiche usate a scopo comparativo.

La reazione di PCR dei microsatelliti è stata effettuata amplificando più loci contemporaneamente (PCR in multiplex). In particolare, sono state messe a punto due reazioni di PCR: una 5-plex e una 7-plex. La miscela di reazione aveva un volume finale di 15 μ l e la seguente composizione: 3 μ l di soluzione di DNA (~ 40 μ g/ml), 3 μ l di Master mix 5X, 0.5 μ l di Taq polimerasi 5 U/ μ l, 1 μ l di ogni primer-mix (con concentrazione della mix 5 μ M e con il primer forward di ogni locus marcato con uno dei seguenti fluorofori: FAM, VIC, NED e PET). Il protocollo classico di amplificazione è stato leggermente modificato introducendo un processo denominato *touch down* allo scopo di aumentare la specificità della reazione e ridurre al minimo la formazione di amplificati incompleti che possono compromettere l'esatta interpretazione del risultato.

Al termine del programma di PCR l'esito dell'amplificazione è stato controllato attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%. Una volta accertato l'esito positivo dell'amplificazione i campioni sono stati diluiti (circa 10- 20 volte) e conservati a +4 °C fino al momento dell'invio al servizio di genotipizzazione.

2.6. Elaborazione statistica dei dati riguardanti il DNA mitocondriale

I dati relativi alle sequenze del tratto di 310 bp del *D-loop* (Tab. 2) sono stati utilizzati per individuare i siti diagnostici delle principali stirpi mitocondriali di *Salmo sp.*, e quindi per valutare la frequenza degli aplotipi alloctoni (linea genetica AT) e autoctoni (linee genetiche AD, ME e MA). Il livello di introgressione è stato calcolato come proporzione tra aplotipi alloctoni rispetto al numero totale di aplotipi osservati in una data popolazione (Tab. 2).

2.7 Elaborazione statistica dei dati riguardanti il DNA nucleare (locus *LDH-C1 e 12 microsatelliti)**

2.7.1 Polimorfismo dei loci analizzati

Per ogni popolazione è stata calcolata la frequenza allelica, l'eterozigosi attesa (H_E), quella osservata (H_O), il numero di alleli osservati in ciascun locus, e la ricchezza allelica (AR, *allelic richness*); quest'ultimo parametro fornisce una stima della variabilità allelica in relazione alle dimensioni del campione, permettendo quindi di effettuare confronti tra campioni di grandezza diversa. I parametri elencati sono stati calcolati tramite il programma FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995).

2.7.2 Equilibrio di Hardy-Weinberg

La deviazione delle frequenze genotipiche osservate rispetto alle proporzioni previste dalla legge di Hardy-Weinberg è stata stimata attraverso il test esatto di Guo & Thompson (1992). I calcoli sono stati condotti attraverso il programma ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006) che implementa una procedura per stimare la significatività delle deviazioni osservate basata sul metodo della catena di Markov. Il test è stato condotto attraverso 100.000 interazioni e il valore di significatività (α) è stato modificato in base al numero di test (k) multipli effettuati (α/k con $\alpha = 0.05$) utilizzando la correzione di Bonferroni (Rice 1989). Inoltre, per verificare se un'eventuale deviazione dall'equilibrio fosse stata determinata da un eccesso o un difetto di eterozigoti osservati

rispetto all'atteso, è stato calcolato l'indice di fissazione (*F_{is}* di Weir & Cockerham, 1984) tramite il test di Raimond & Rousset, 1995a. Per quest'ultima analisi è stato usato il programma GENEPOP 3.1c (Raimond & Rousset, 1995b) e i valori di significatività (100.000 interazioni della catena di Markov) sono stati corretti anche in questo caso con il metodo di Bonferroni.

2.7.3 Analisi con STRUCTURE

STRUCTURE è un software che utilizza l'approccio bayesiano di Pritchard *et al.* (2000) per definire cluster di individui in base alle frequenze alleliche di loci multipli. Si è ritenuto necessario condurre quest'analisi per verificare i) se i campioni di trota provenienti dai corsi d'acqua studiati e quelli domestici formino un unico gruppo geneticamente omogeneo, come conseguenza di circa un secolo di attività di ripopolamenti effettuate con trote di origine atlantica o ii) se persistano ancora differenze sostanziali tra trote selvatiche autoctone e trote domestiche tali da permettere di identificare più di un unico cluster genetico ($K > 1$). In questa analisi è stato utilizzato il pacchetto statistico STRUCTURE 2.3.3 per individuare il numero più probabile di popolazioni (K) rappresentate nel campione totale di trote. A questo proposito è stata valutata la probabilità che il campione fosse rappresentato da 1 a 11 "K" popolazioni. Per ogni valore di K ipotizzato sono state effettuate 10 corse indipendenti del programma. Ogni corsa è stata caratterizzata da 200.000 interazioni precedute da un periodo di burn-in pari a 20.000. In seguito, è stata effettuata un'ulteriore corsa (1.000.000 interazioni) precedute da un burn-in di 100.000, per calcolare il coefficiente di appartenenza (q) di ogni singolo genotipo in ognuna delle popolazioni individuate.

3. RISULTATI

3.1 ANALISI RFLP DEL DNA MITOCONDRIALE

3.1.1 Classificazione filogenetica degli aplotipi

Complessivamente sono stati osservati 4 aplotipi già descritti in letteratura. In particolare sono stati identificati: i) l'aplotipo ATs1, appartenente alla linea filogenetica atlantica (AT, *sensu* Bernatchez) e comune nei corsi d'acqua del nord Europa e nelle popolazioni domestiche di trota, ii) l'aplotipo ADs7 (linea filogenetica adriatica, AD), molto comune nell'area peri-adriatica, iii) l'aplotipo MAs5 (linea filogenetica *marmoratus*, MA), osservato finora solo nei corsi d'acqua dell'Italia centrale e iv) l'aplotipo MEs1 (linea filogenetica mediterranea, ME), ampiamente diffuso ovunque nei corsi d'acqua del Mediterraneo.

3.1.2 Variabilità aplotipica all'interno delle popolazioni

In Tab. 2 sono riportate le frequenze aplotipiche per popolazione. I valori di introgressione del genoma mitocondriale atlantico nelle popolazioni di trota esaminate sono stati calcolati come proporzione tra il numero di aplotipi atlantici e il numero totale di aplotipi osservati all'interno di una data popolazione. Complessivamente, 12 popolazioni selvatiche su 35 hanno mostrato la presenza esclusiva di varianti mitocondriali aliene all'area di studio (Tab. 2). Nelle restanti 20 popolazioni selvatiche la frequenza degli aplotipi alloctoni ha mostrato il valore più elevato nelle località BEVA02 e SCAR02 (>70%), mentre nelle località AMBR01, AMBR02, TORS01 e NERA01 stati osservati esclusivamente aplotipi autoctoni; un'elevata presenza di varianti genetiche native è stata anche riscontrata nei siti RAPE01, TENN01 e TENN02 ($\geq 90\%$) (cfr. Fig. 2a-e e Tab. 2). Infine nelle tre località aggiuntive (03AMBR00, 03TENN00 e 04NERA00, campionate nel corso del mese di agosto 2014) non è stata rilevata la presenza di aplotipi alloctoni (Fig. 2d e Tab. 2).

3.2 ANALISI DEL DNA NUCLEARE

3.2.1 Analsi RFLP del locus *LDH-C1**

L'analisi RFLP del locus nucleare *LDH-C1** ricalca a grandi linee l'andamento osservato per il marcatore mitocondriale. Infatti, l'allele *90 è stato osservato con valori prossimi al 100% (range 68,18 - 100%, cfr. Tab. 2) nelle stesse località in cui è stata registrata un'elevata introgressione a livello mitocondriale. Analogamente, la più elevata frequenza dell'allele *100 è stata riscontrata nelle popolazioni AMBR01, AMBR02, TORS01 e NERA01. Una certa asimmetria osservata in alcune popolazioni (per es., 01GIOR01 e 01GIOR02) fra il dato mitocondriale (alta frequenza di aplotipi nativi) e quello nucleare (maggior frequenza dell'allele *90) potrebbe essere attribuita alla maggiore residenzialità dei maschi alloctoni rispetto alle femmine che tendono alla dispersione anadroma (cfr. Splendiani et al., 2013). In nessun caso le frequenze genotipiche osservate per questo locus hanno mostrato una deviazione significativa dalle proporzioni previste in popolazioni in equilibrio di Hardy-Weinberg (cfr. Fig. 2b e Tab. 3). Infine, nei tre campioni raccolti nel mese di Agosto 2014 (03AMBR00, 03 TENN00 e 04NERA00) sono stati osservati valori bassi di introgressione genetica (rispettivamente, 12,5 - 0,0 - 3,6; Fig. 2b e Tab. 2).

3.2.2 Polimorfismo del DNA microsatellite

Le 11 popolazioni (per un totale di 271 esemplari selvatici e 62 domestici, cfr. Tab. 3) sulle quali sono state effettuate le analisi con i marcatori microsatelliti sono state scelte fra quelle che hanno mostrato le frequenze più elevate di varianti genetiche native ($\geq 80\%$) sia a livello del *D-loop* sia del locus *LDH-C1**. Hanno fatto eccezione a questo criterio le popolazioni 07CAMP01 (*90 = 27,08%) e 03TENN01(*90 = 20,51%). Infatti, si è deciso di analizzare ugualmente tali campioni, data la necessità di individuare il maggior numero possibile di siti in cui effettuare l'azione C2. A livello dei dodici microsatelliti utilizzati è stato osservato un totale di 210 alleli (Tab. 3). Il polimorfismo è risultato basso per il locus *Str60* (2 alleli), e via via più elevato per i loci *SSsp2216* (16 alleli), *Ssa408UOS* (26 alleli) e *OMM1064* (35 alleli). La ricchezza allelica (*RA*) ha mostrato un valore medio pari a 3,77 e un range che variava da 2,44 in 03TENN00 a 4,63 in 07CAMP01. Il valore più basso di eterozigosi attesa (calcolata come *gene diversity*, H_E) è stato osservato nella località 03TENN00 (0,40), mentre quello più elevato nella località 00DOME02 (0,79) (Tab. 3).

3.2.3 Equilibrio di Hardy-Weinberg

Su un totale di 121 test effettuati, solo in tre casi è stata osservata una deviazione significativa ($P < 0.05$, dopo la correzione di Bonferroni) delle frequenze genotipiche osservate dalle proporzioni previste all'equilibrio di Hardy-Weinberg; due deviazioni sono state riscontrate, rispettivamente, nei campioni domestici 00DOME01 e 00DOME02 (per il locus *Oneμ2*), mentre una deviazione ha riguardato il campione selvatico 03AMBR001 (per il locus *Ssa103NVH*). In tutti i casi le deviazioni osservate sono risultate associate a un eccesso di omozigoti ($F_{IS} > 0$) (Tab. 3).

3.2.4 Analisi con STRUCTURE

L'analisi bayesiana dei cluster ha permesso di verificare quale fosse il numero più probabile di popolazioni in cui è possibile suddividere l'intero campione di trota proveniente da 35 località delle Marche e da 3 trottocolture, a prescindere dai raggruppamenti stabiliti a priori sulla base della loro provenienza geografica. L'esito delle simulazioni ha indicato come più probabile la presenza di due popolazioni principali ($k = 2$, i.e. stock alloctono e stock autoctono) e di due sottostrutture genetiche ($k = 5$ e $K = 7$) (cfr Fig. 3a-b). Per la sottostruttura composta da cinque "popolazioni" lo stock autoctono si suddivide in tre gruppi genetici (Fig. 3c): i) primo stock del bacino del Tenna che incorpora le località 03AMBR01, 03AMBR02 e 03TENN01, ii) secondo stock del bacino del Tenna che incorpora la località isolata 00TENN00 e iii) stock del fiume Nera (04NERA01 e 04TORS01);

in questa struttura genetica composta da cinque popolazioni principali lo stock domestico si suddivide invece in due gruppi: i) 00DOME01 e ii) 00DOME02 e 00DOME03. Se si prende in considerazione la sottostruttura composta da sette "popolazioni" si osserva, rispetto alla struttura per $k = 5$, la comparsa di un cluster genetico che contraddistingue i campioni dei bacini del Potenza e del Chienti (rispettivamente, 07CAMP011 e 06ACQU01) e la suddivisione della popolazione del bacino del Nera in due popolazioni (Fig. 3c).

La seconda sessione di lavoro effettuata con STRUCTURE è servita per calcolare il coefficiente di appartenenza (q) di ogni singolo individuo e di ogni popolazione a ciascuno dei due cluster individuati. Come si può notare in Fig. 2e, al primo gruppo, che chiameremo alloctono (colore nero nel diagramma a torta), appartengono gli individui provenienti dalle trotilcolture, con valori medi di $q_{alloctono}$ pari al 95%. Una moderata presenza del cluster alloctono ha contraddistinto i campioni provenienti dalle località 07CAMP01 e CAMP01, con un valore medio di $q_{alloctono}$ pari al 39,5% e 17,5%, rispettivamente. Un'elevata appartenenza al cluster nativo ($q_{autoctono}$ barre di colore bianco) è stata invece osservata nei campioni provenienti dai siti 03TENN00, 04TORS01, 03AMBR02 e 03AMBR01, dove i valori medi di appartenenza, sono risultati pari al 99,3%, 98,3%, 98% e 96,8%, rispettivamente. Una situazione intermedia si riscontra, infine, nelle popolazioni 03TENN01 e 04NERA01, in cui i valori medi di appartenenza al cluster nativo sono risultati pari al 90% e 89,2%, rispettivamente. A livello dei singoli individui, i valori più elevati di appartenenza al cluster nativo (caratterizzati da intervalli di credibilità inferiori a 0,10) sono stati osservati nelle località 03TENN00, 04TORS01, 03AMBR02 e 03AMBR01 (dato non mostrato).

4. DISCUSSIONE

I risultati delle analisi genetiche condotte su 796 individui di trota fario provenienti da 35 località di campionamento in 7 bacini fluviali delle Marche (Metauro, Cesano, Esino, Potenza, Chienti, Tenna, Nera) e da tre trotilcolture, hanno messo in evidenza che nell'area di studio le popolazioni di salmonidi presentano ancora una forte connotazione "mediterranea", soprattutto nell'area del Parco nazionale dei Monti Sibillini, aprendo buone prospettive per la conservazione della trota mediterranea in questa zona dell'Appennino. In particolare, le informazioni riguardanti il DNA mitocondriale hanno evidenziato la presenza delle linee genetiche AD, MA e ME, in linea con la storia filogeografica di questo salmonide nell'area mediterranea (cfr. Bernatchez, 2001). Al contrario, la diffusione degli aplotipi di origine atlantica è la chiara conseguenza di semine di trota effettuate con materiale d'allevamento di origine alloctona. Gli aplotipi atlantici sono gli unici

presenti nei campioni domestici usati a scopo comparativo nella presente analisi e questa linea genetica è anche molto diffusa nelle popolazioni selvatiche, soprattutto nei corsi d'acqua delle Marche settentrionali esaminati nel presente progetto (Metauro, Cesano). Fanno eccezione i campioni provenienti da alcuni corsi d'acqua dei bacini del Tenna e del Nera dove è stata registrata l'esclusiva presenza di aplotipi nativi (cfr. Tab. 2 e Fig. 2a-e).

La diffusione dell'allele atlantico *LDH-C*90* evidenzia uno scenario simile a quello descritto per il DNA mitocondriale, confermando che in alcuni corsi d'acqua delle Marche la variabilità genetica originaria della trota è ancora ampiamente diffusa malgrado il massiccio utilizzo di trote atlantiche per i ripopolamenti. Anche in questo caso, i campioni selvatici in cui la variabilità genetica originaria (allele **100*) è risultata preponderante sono quelli provenienti dai bacini del Tenna e del Nera (cfr. Tab. 2 e Fig. 2a-e); viceversa, i bacini del Metauro e del Cesano sono quelli che ospitano le popolazioni più pesantemente influenzate dall'allele atlantico (allele **90*), che in alcune raggiunge la frequenza del 100% (cfr. Tab. 2). Probabilmente, la maggior diffusione della variabilità genetica alloctona in quest'ultimi bacini dipende dalla più intensa attività di ripopolamento realizzata in queste zone, documentata fin dai primi del Novecento; inoltre, le condizioni ecologiche più severe di tali corsi d'acqua, che decorrono su substrati geologici impermeabili (cfr. Nanni, 1991), non hanno mai sostenuto popolazioni di salmonidi abbondanti e ben strutturate (Splendiani et al., 2013). Le immissioni massicce e continue di trote di allevamento avrebbero perciò soppiantato le già esigue popolazioni residenti, dando origine ai popolamenti attuali di ceppo atlantico. È tuttavia da notare che anche in alcune località del Potenza (SCARS02, POTE01b) e del Nera (USS01, USS02), l'allele **90* e i corrispondenti aplotipi mitocondriali atlantici, sono risultati preponderanti (cfr. Tab. 2). Come è stato possibile accertare nel corso del presente studio, si tratta di aree interessate da intense pratiche di ripopolamento (come nel caso del torrente Scarsito), e talvolta soggette a forti fluttuazioni antropiche del deflusso idrico (in particolare, si segnala il caso del torrente Ussita). La mortalità legata alle secche estive si accompagna al rilascio di trote domestiche, giustificando in tal modo l'insolita frequenza di genotipi alloctoni in aree altrimenti caratterizzate dalla maggior diffusione di variabilità genetica nativa.

In definitiva, la comparazione dei dati riguardanti i livelli da alti a moderati di introgressione a livello dei marcatori mitocondriale (*D-loop*) e nucleare (*LDH-C1**) ha consentito di individuare le popolazioni per le quali valutare, congiuntamente ai risultati dell'Azione A3, la realizzazione delle attività previste dalle successive azioni C3 (eradicazione) e C4 (*supportive breeding*), rispettivamente (cfr. Tab. 2). Sulla base dei livelli di maggiore integrità genetica osservata, è stato

altresì possibile selezionare le 8 popolazioni (inclusa la popolazione 03TENN00, utilizzata come esempio di popolazione nativa pura) delle quali è stata esaminato il polimorfismo genetico relativo a 12 loci microsatelliti (Tab. 3). Le informazioni scaturite da quest'analisi saranno propedeutiche all'individuazione delle popolazioni da cui attingere individui mediterranei "puri" da utilizzare nell'azione C2 (riproduzione artificiale di individui selvatici).

L'analisi condotta attraverso dodici microsatelliti ha messo in evidenza che nel reticolo idrografico indagato le popolazioni di trota native e quelle domestiche non hanno raggiunto una condizione di panmissia, suggerendo quindi la presenza di meccanismi che sono di ostacolo al completo mescolamento dei due pool genetici. L'individuazione di un valore di $K = 2$ ne rappresenta una chiara testimonianza. Le popolazioni che hanno mostrato un coefficiente di appartenenza al cluster nativo ($q_{autoctono}$) con valori medi superiori al 95% sono risultate 03TENN00, 03AMBR02, 03AMBR01 e 04TORS01. Nelle rimanenti popolazioni analizzate il coefficiente di commistione tra genoma atlantico e genoma mediterraneo ha mostrato valori medi variabili fra 61% in 07CAMP01 e 90% in 04NERA01, con una frazione elevata di individui con valori di appartenenza al cluster nativo prossimi al 100% (Fig. 2e). Questo dato mette in evidenza un'introggressione genetica tra lo stock domestico e quello originario estremamente limitata, che avvalora la possibilità di utilizzare tali popolazioni come sorgente dei riproduttori per l'Azione A2.

Il secondo livello di probabilità emerso dall'analisi bayesiana ha mostrato una situazione più diversificata, con l'individuazione di tre popolazioni geneticamente distinte di trota macrostigma, diffuse rispettivamente nei bacini 1) del Nera, 2) del Tenna e 3) del Chienti/Potenza. La più ampia diffusione di quest'ultima popolazione è probabilmente dovuta al flusso genico realizzatosi durante le ultime fasi glaciali del Pleistocene. In questo periodo infatti la maggior parte dei fiumi del versante adriatico marchigiano erano interconnessi attraverso il collegamento con l'antico bacino del Po che fino a circa 12.000 anni fa sfociava poco a nord di Pescara. Le tre popolazioni individuate rappresentano pertanto delle unità gestionali distinte che saranno utilizzate separatamente nelle attività di stabulazione e riproduzione nell'ambito dell'Azione C2.

L'ulteriore livello di struttura genetica che ha messo in evidenza una netta separazione tra la popolazione proveniente dal fosso Il Rio (03TENN00) con il resto dei campioni provenienti dal reticolo del fiume Tenna (03AMBR02, 03 AMBR01 e 03TENN01), potrebbe essere la conseguenza di una "sovrastima" di struttura genetica dovuta alla presenza nel campione 03TENN00 di un'elevata presenza di individui strettamente "imparentati" tra loro. I bassi valori di diversità genetica rilevati nel campione 03TENN00 (cfr. Tab. 3) e la sua posizione isolata (i.e. separata da una cascata

di oltre 30 m dal resto del reticolo idrografico), sostengono l'ipotesi di una sovrastima di struttura genetica. (e.g. Porrás-Hurtado et al., 2013). Un'analoga interpretazione potrebbe essere suggerita per spiegare la separazione in due cluster del campione del fiume Nera (04NERA01) e quello del fosso di Torsa (04TORS01).

In conclusione, le informazioni sulla struttura genetica risultano propedeutiche per alcune azioni concrete di conservazione. Infatti, le popolazioni geneticamente meno introgresse col genoma alieno costituiscono la sorgente degli individui selvatici per le attività di riproduzione in cattività (Azione C2), attualmente in corso presso l'impianto ittiogenico di Cantiano. Quattro popolazioni moderatamente introgresse saranno oggetto di interventi di "supportive breeding" (Azione C4) con le trote prodotte in cattività. Infine, sei tratti fluviali in cui le trote hanno mostrato una composizione genetica riconducibile alla specie aliena saranno sottoposti alla rimozione di questi pesci di provenienza alloctona (Azione C3) (cfr. Fig. 4). La selezione dei siti C3 e C4 verrà realizzata tenendo conto non solo della struttura genetica delle popolazioni presenti ma anche delle caratteristiche ambientali (Azione A3). Ciò garantirà che la reintroduzione (Azione C4) delle trote mediterranee prodotte in cattività possa dare origine a popolazioni stabili, in grado di autosostenersi nel tempo.

5. BIBLIOGRAFIA

- Aurelle, D. & Berrebi, P. (2001) Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta*, L.) populations from south-western France: data from mitochondrial control region variability. *Molecular Ecology*, 10, 1551–1561.
- Bernatchez L., 2001. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution*, 55: 351-379.
- Bernatchez, L., Danzmann, R. G., 1993. Congruence in control-region sequence and restriction-site variation in mitochondrial DNA of brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). *Mol. Biol. Evol.*, 10: 1002-1014.
- Cairney, M., Taggart, J.B., Hoyheim, B., 2000. Characterization of microsatellite and minisatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and cross-species amplification in other salmonids. *Mol. Ecol.* 9, 2155–2234.

- Caputo V, Giovannotti M, Nisi Cerioni P, Caniglia ML, Splendiani A. 2004. Genetic diversity of brown trout in central Italy. *J Fish Biol.*, 65: 403-418.
- Estoup A., Presa P., Krieg F. et al., 1993. (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, 71: 488-496.
- Excoffier L., Laval G., Shneider S. (2005). Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1: 47-50.
- Goudet J., 1995. *FSTAT* (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Heredity*, 86: 485–486.
- Guo S. W., Thompson E. A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.
- Hansen M.M., Loeschke V., 1996. Genetic differentiation among Danish brown trout populations, as detected by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. *J. Fish Biol.* 48: 422-436.
- Jeffreys A.J., Flavell, R.A., 1977. A physical map of the DNA region flanking the rabbit β -globin gene. *Cell*, 12: 429-439.
- King, T.L., Eackles, M.S., Letcher, B.H., 2005. Microsatellite DNA markers for the study of Atlantic salmon (*Salmo salar*) Kinship, population structure, and mixed-fishery analysis. *Mol. Ecol. Notes* 5, 130–132.
- 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. *Mol. Ecol.*, 10: 29-34.
- O'Reilly P.T., Hamilton L.C., McConnell S.K., Wright J.M., 1996. Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 2292–2298.
- Paterson, S., Piertney, S.B., Knox, D., Gilbey, J., Verspoor, E., 2004. Characterization and PCR multiplexing of novel highly variable tetranucleotide Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellites. *Mol. Ecol. Notes* 4, 160–162.

- Porras-Hurtado L., Ruiz Y., Santos C., Phillips C., Carracedo A., Lareu M.V., 2013. An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. *Frontiers in Genetics*, 4, 1-13.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Raymond M., Rousset F., 1995a. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49: 1280–1283.
- Raymond M., Rousset F., 1995b. *GENEPOP* (Version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248–249.
- Rexroad, C.E., Coleman, R.L., Hershberger, W.K., Killefer, J., 2002. Rapid communication: thirty-eight polymorphic microsatellite markers for mapping in rainbow trout. *J. Anim. Sci.* 80, 541–542.
- Rice W. R. 1989. Analyzing table of statistical test. *Evolution* 43: 223-225.
- Scribner, K. T., Gust, J. R. & Fields, R. L. (1996). Isolation and characterization of novel salmon microsatellite loci: cross-species amplification and population genetic applications. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 833–841.
- Slettan, A., Olsaker, I., Lie, Ø., 1995. Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the *SSOSL25*, *SSOSL85*, *SSOSL311*, *SSOSL417* loci. *Anim. Genet.* 26, 281–282.
- Splendiani A., Giovannotti M., Nisi Cerioni P., Caniglia M.L., Caputo V., 2006. Phylogeographic inference on the native brown trout mtDNA variation in central Italy. *Ital. J. Zool.*, 73: 179-189.
- Splendiani, A, Ruggeri, P, Giovannotti, M, Caputo Barucchi, V. (2013) Role of environmental factors in the spread of domestic trout in Mediterranean streams. *Freshwater Biology*, 58, 2089–2101.
- Weir B.S., Cockerham C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.

FIGURE E TABELLE

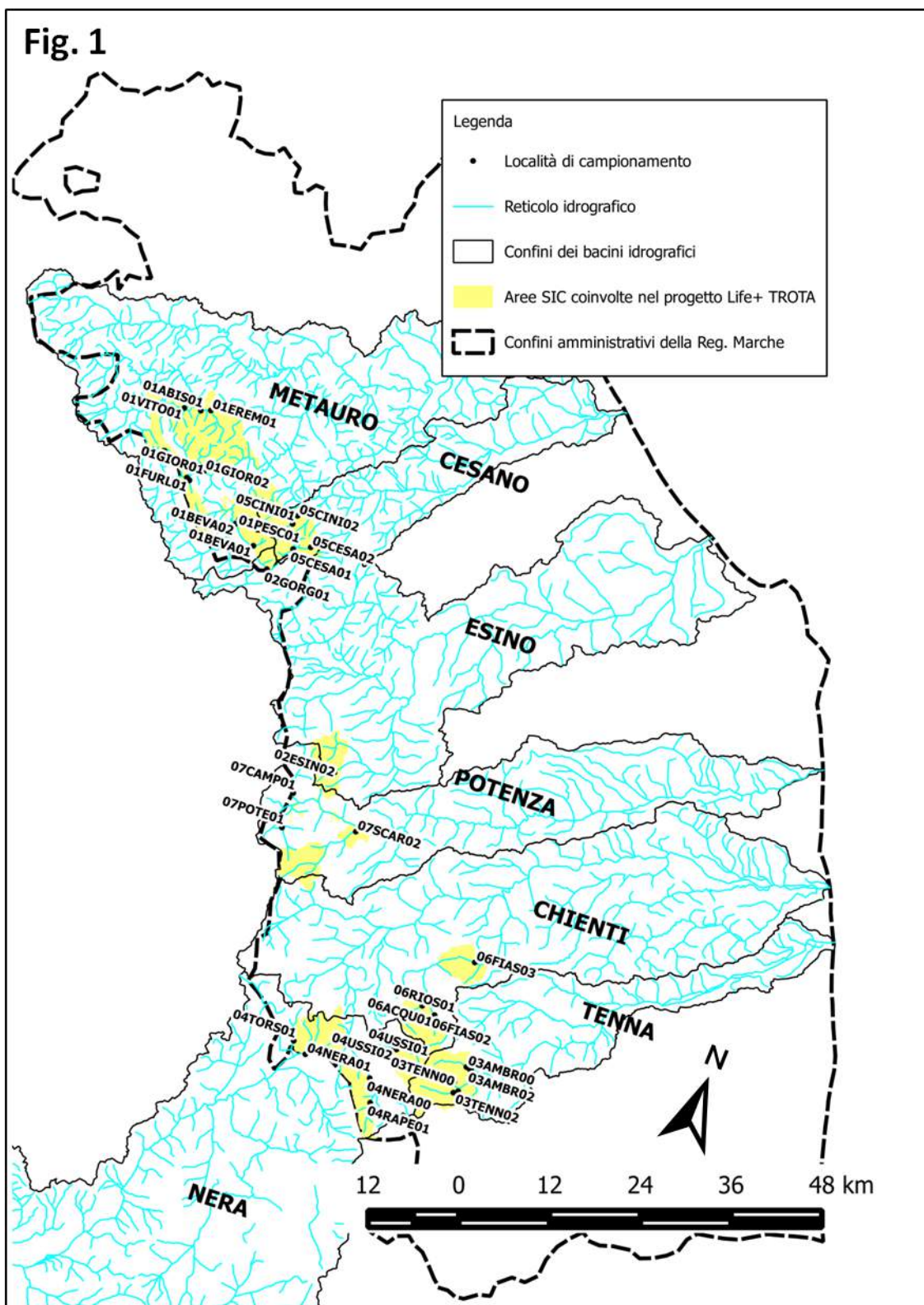
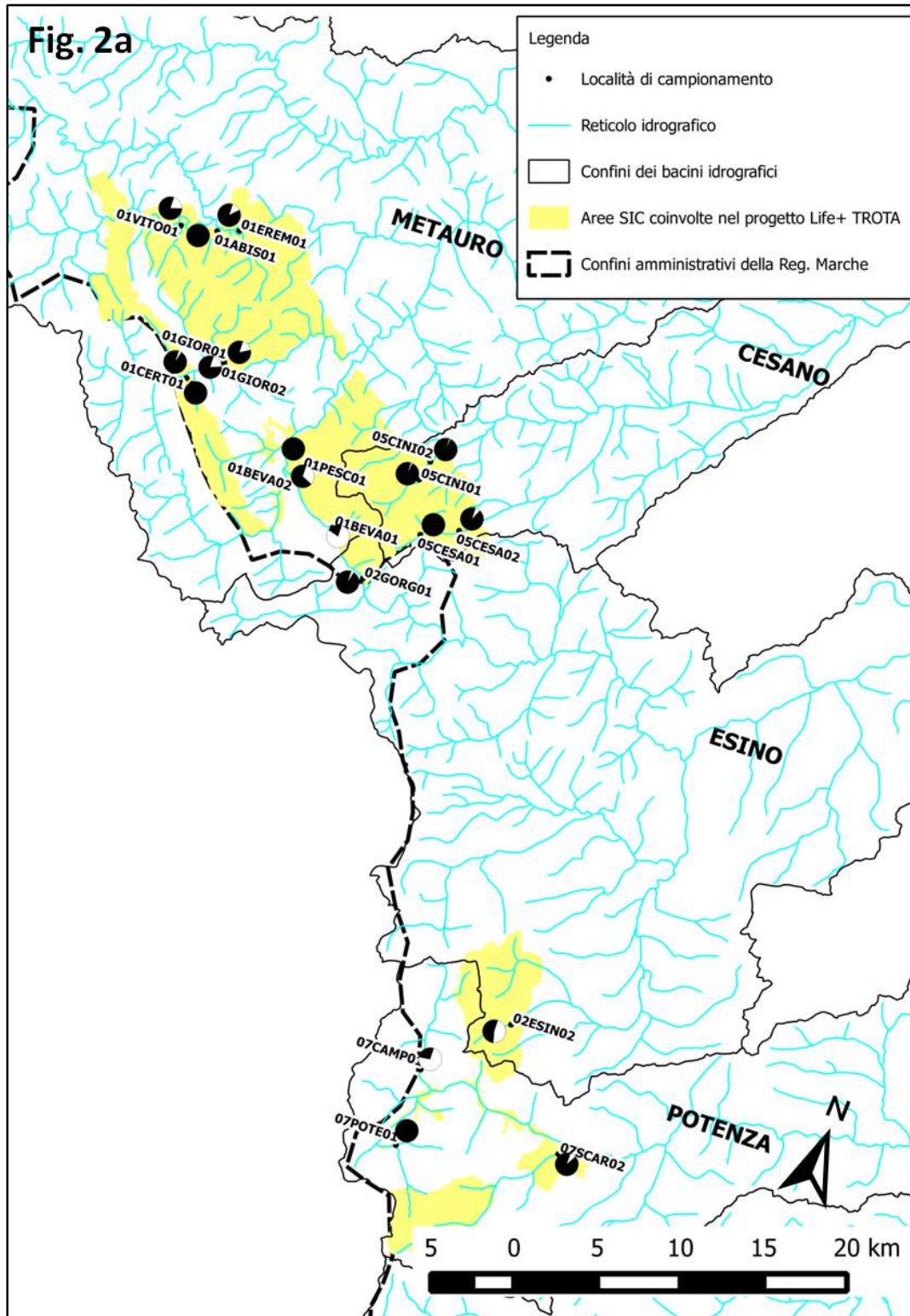
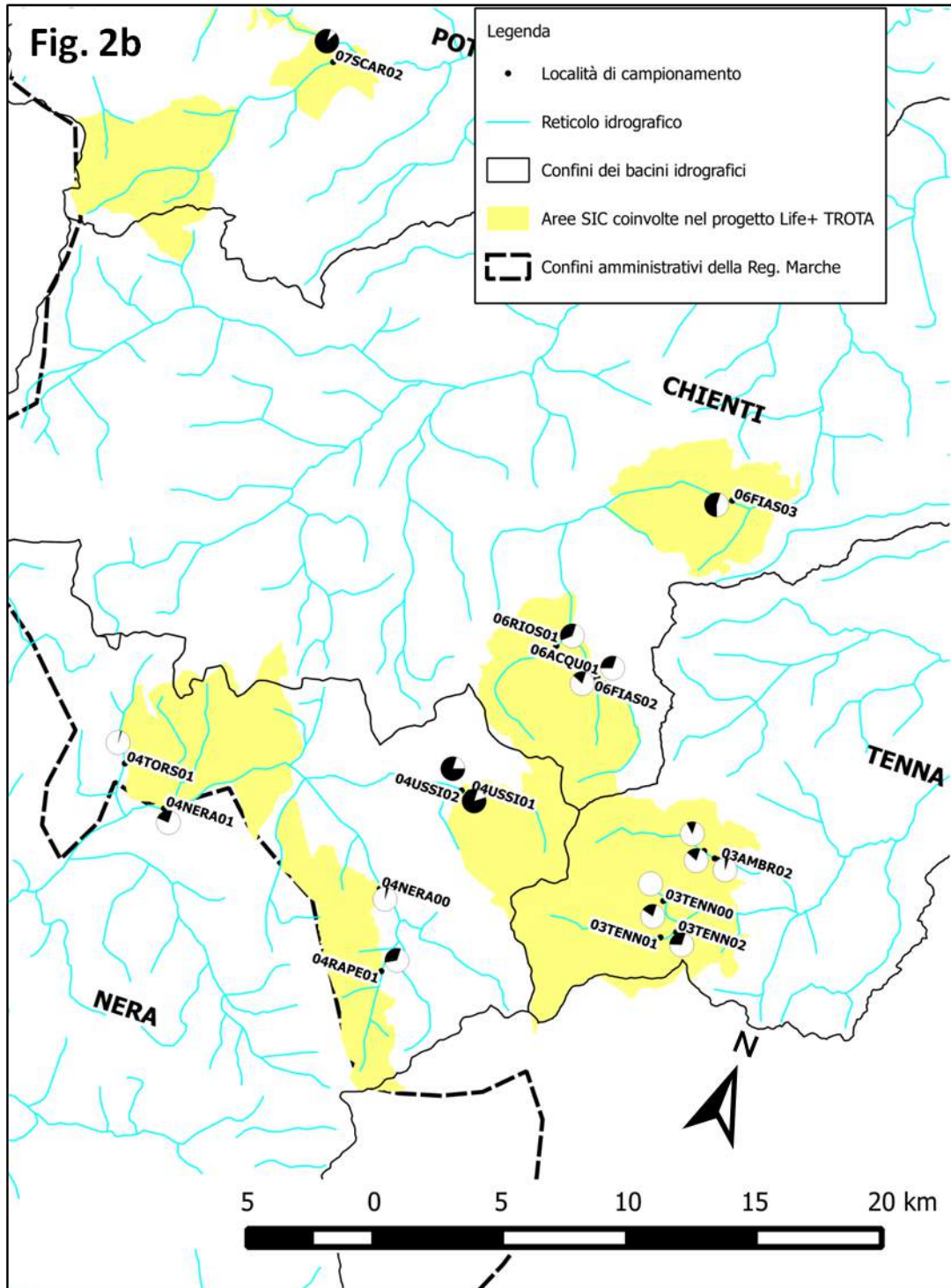
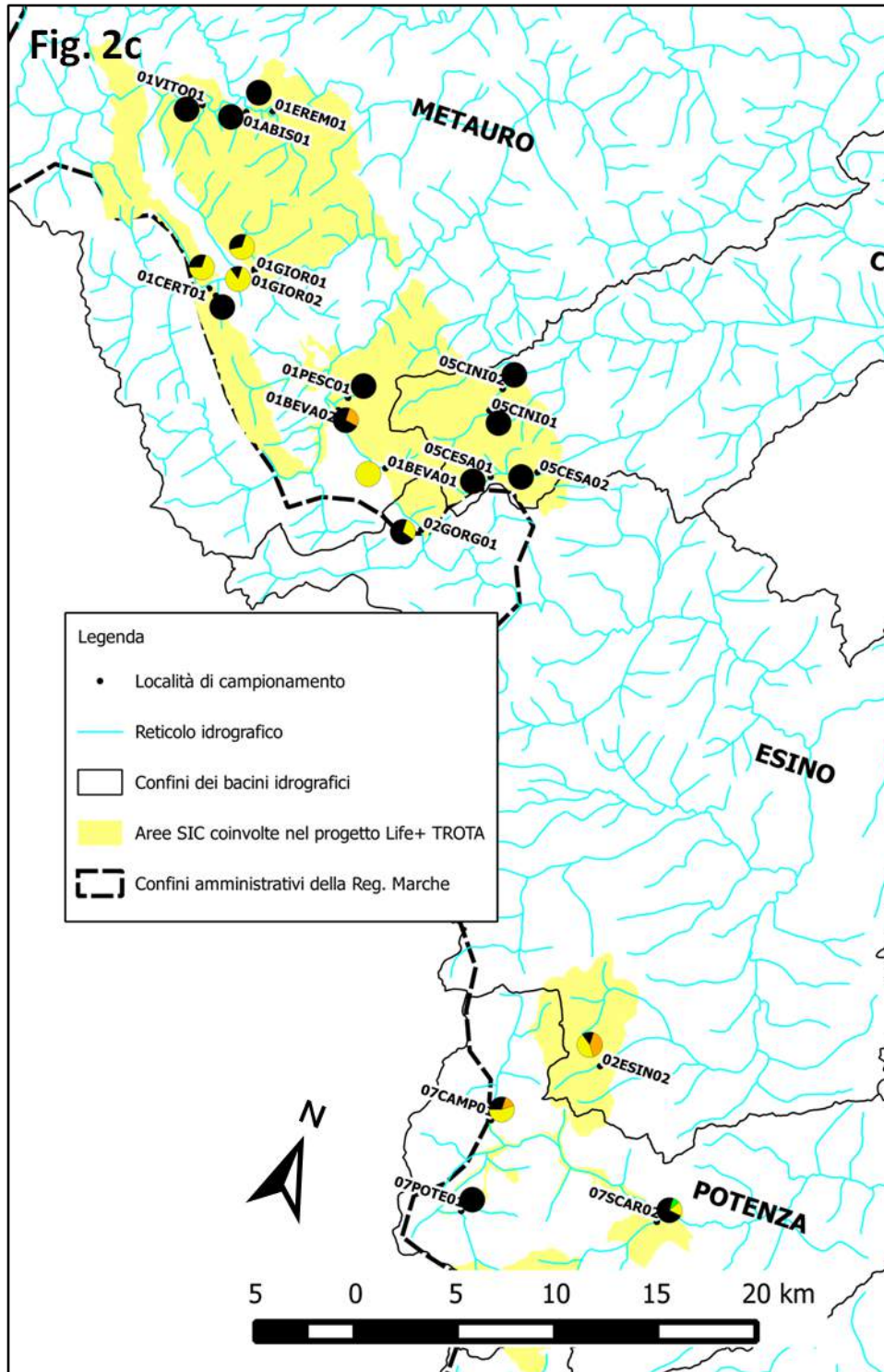


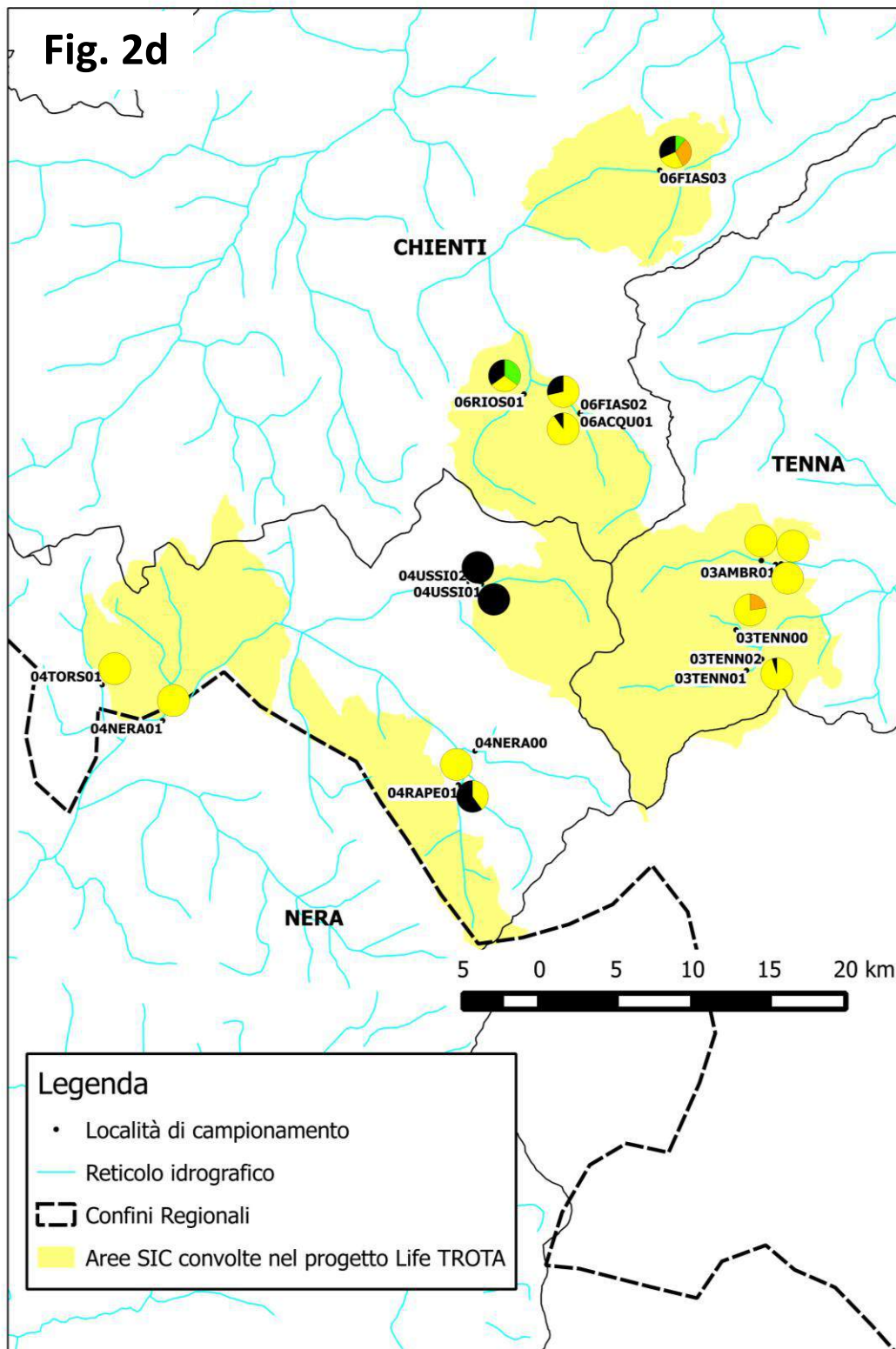
Fig. 1. Distribuzione dei 35 siti in cui sono state condotte le attività di campionamento di trota nel corso dell'azione A2. Le sigle delle località corrispondono a quelle riportate in Tab. 1.

Practical recommendation on the fittest approach to perform the captive breeding and restocking action on macrostigma trout - Part 1









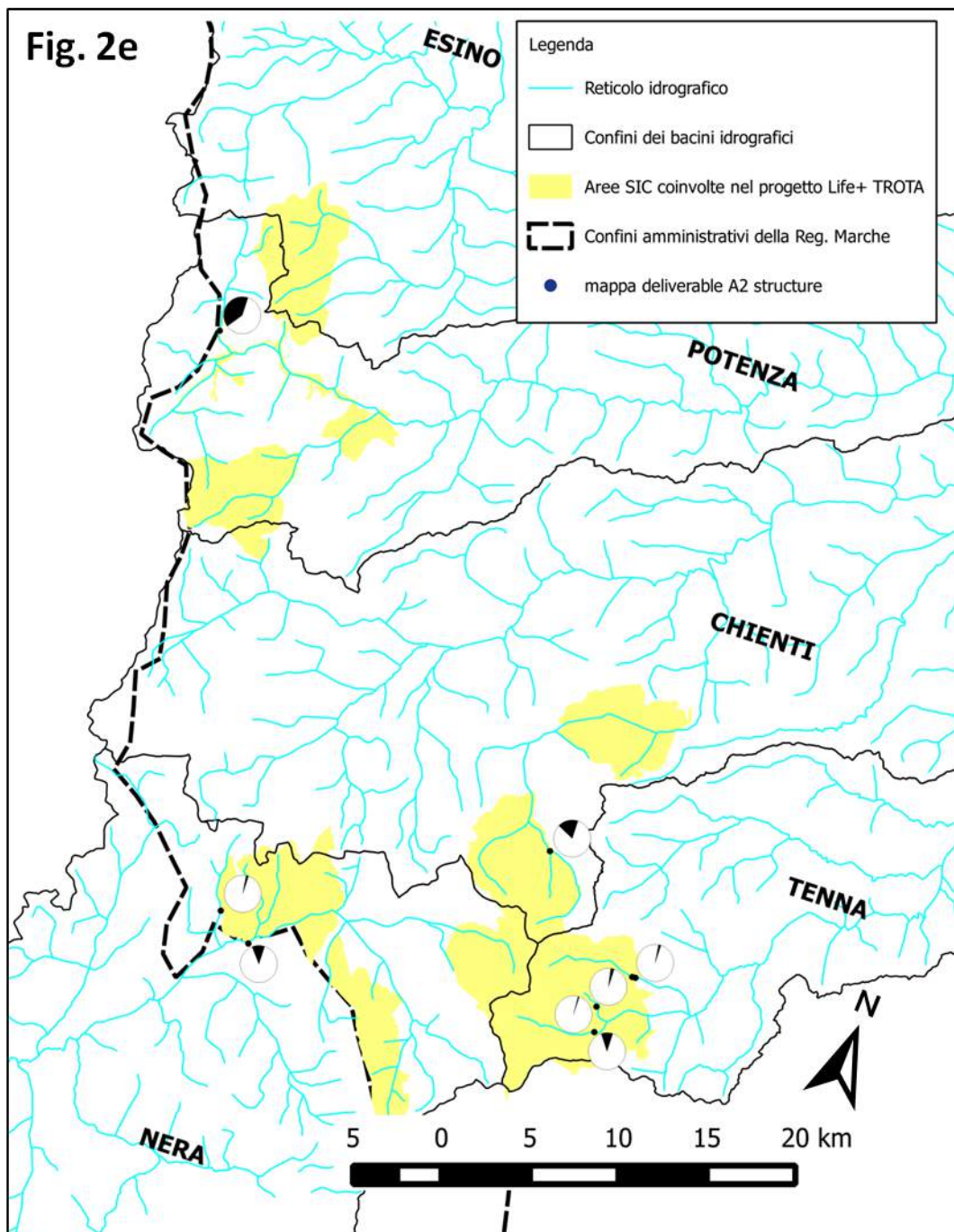


Fig. 2a - e. Distribuzione delle frequenze alleliche del locus *LDH-C1** (il colore nero corrisponde all'allele *90, quello bianco all'allele *100) : **a)** settore centro-settentrionale della Regione Marche, **b)** settore meridionale. Distribuzione delle frequenze aplotipiche del *D-loop* (in nero ATs1, in giallo ADs7, in arancione MAs5, in verde MEs1): **c)** settore centro-settentrionale, **d)** settore meridionale. Distribuzione dei coefficienti medi di appartenenza (*q* di STRUCTURE) ai cluster alloctono ed autoctono: **e)** settore centro-meridionale.

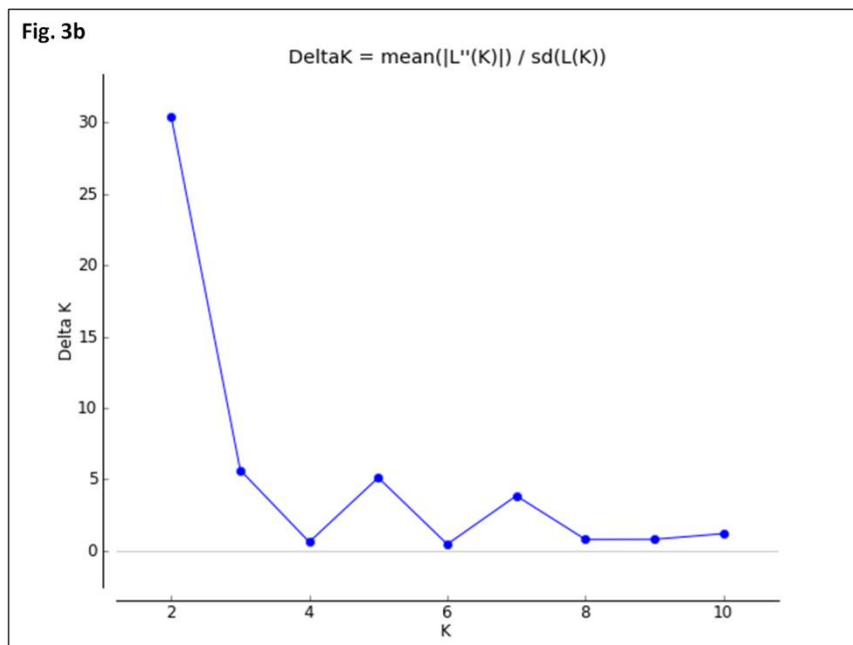
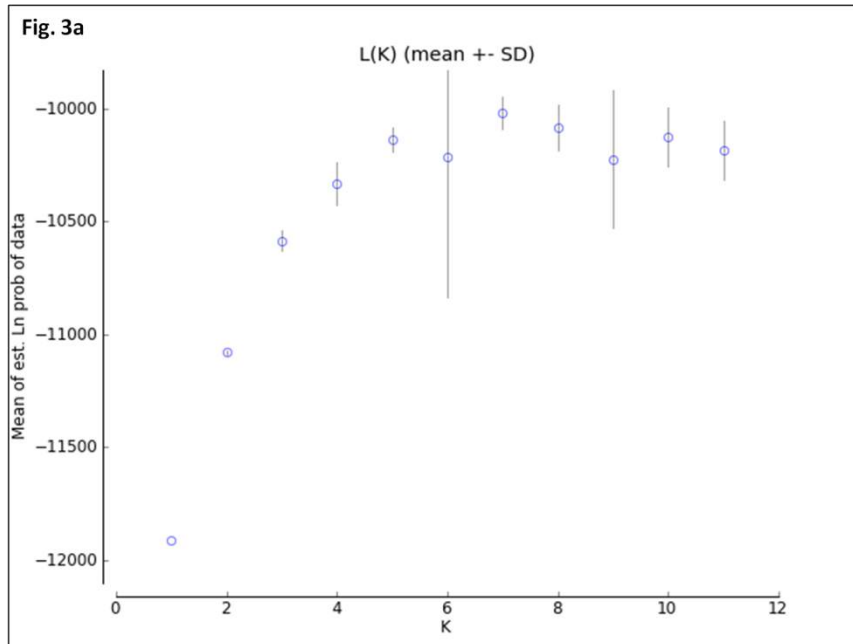


Fig. 3c

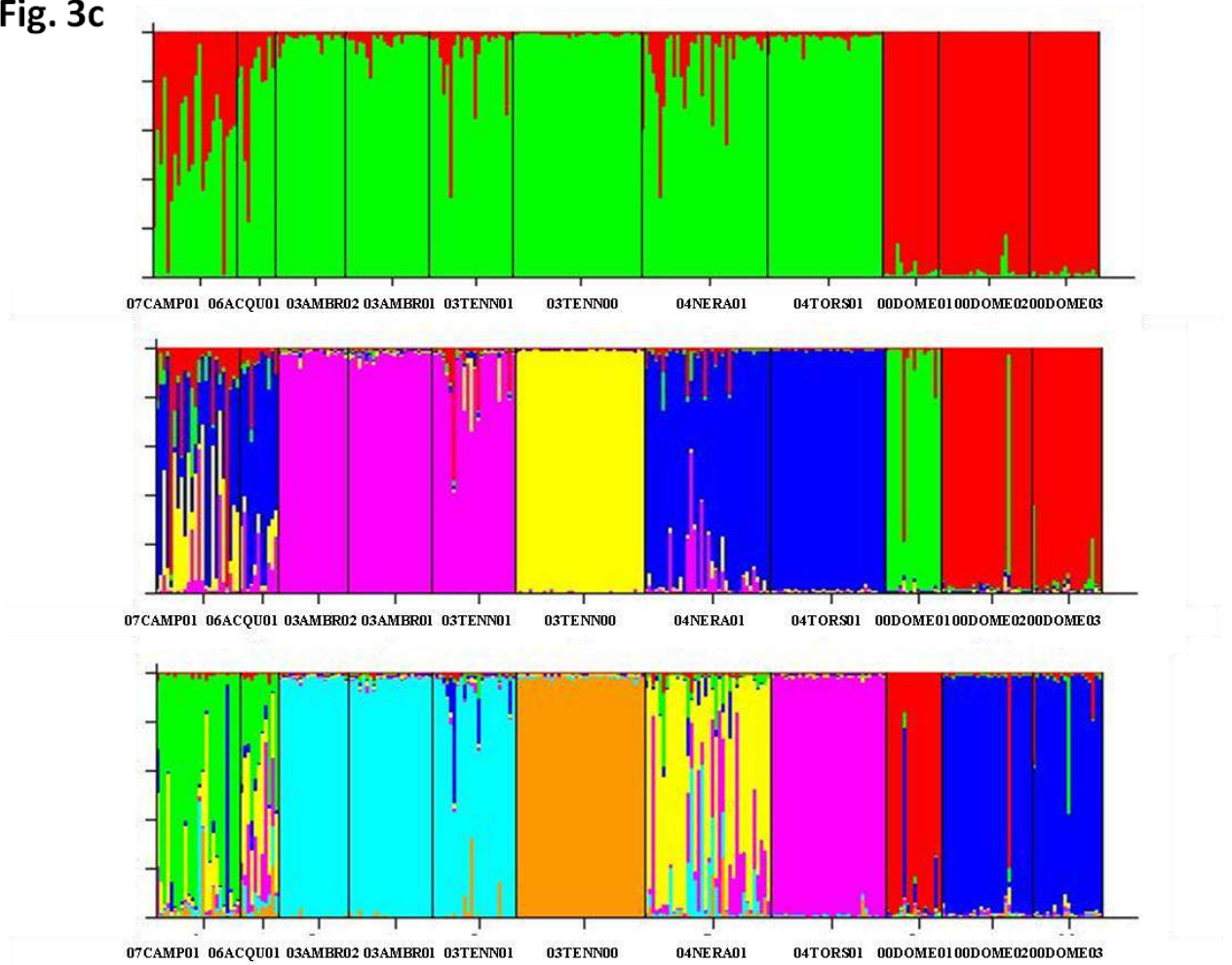


Fig. 3a - c. **a)** Distribuzione dei valori che indicano la probabilità del data set genotipico di essere costituito da una struttura genetica rappresentabile da 1 a 11 clusters [P(D)]; i valori sono stati calcolati utilizzando il metodo incorporato nel software STRUCTURE. **b)** Analisi statistica del parametro Δk di Evanno *et al.* (2005), calcolato per individuare i punti di flesso della curva della distribuzione dei valori di probabilità (i.e. i valori di k più probabili). **c)** Bar plot che mostra l'appartenenza del genotipo di ogni singolo individuo, rispettivamente, a 2, 5 e 7 cluster genetici.

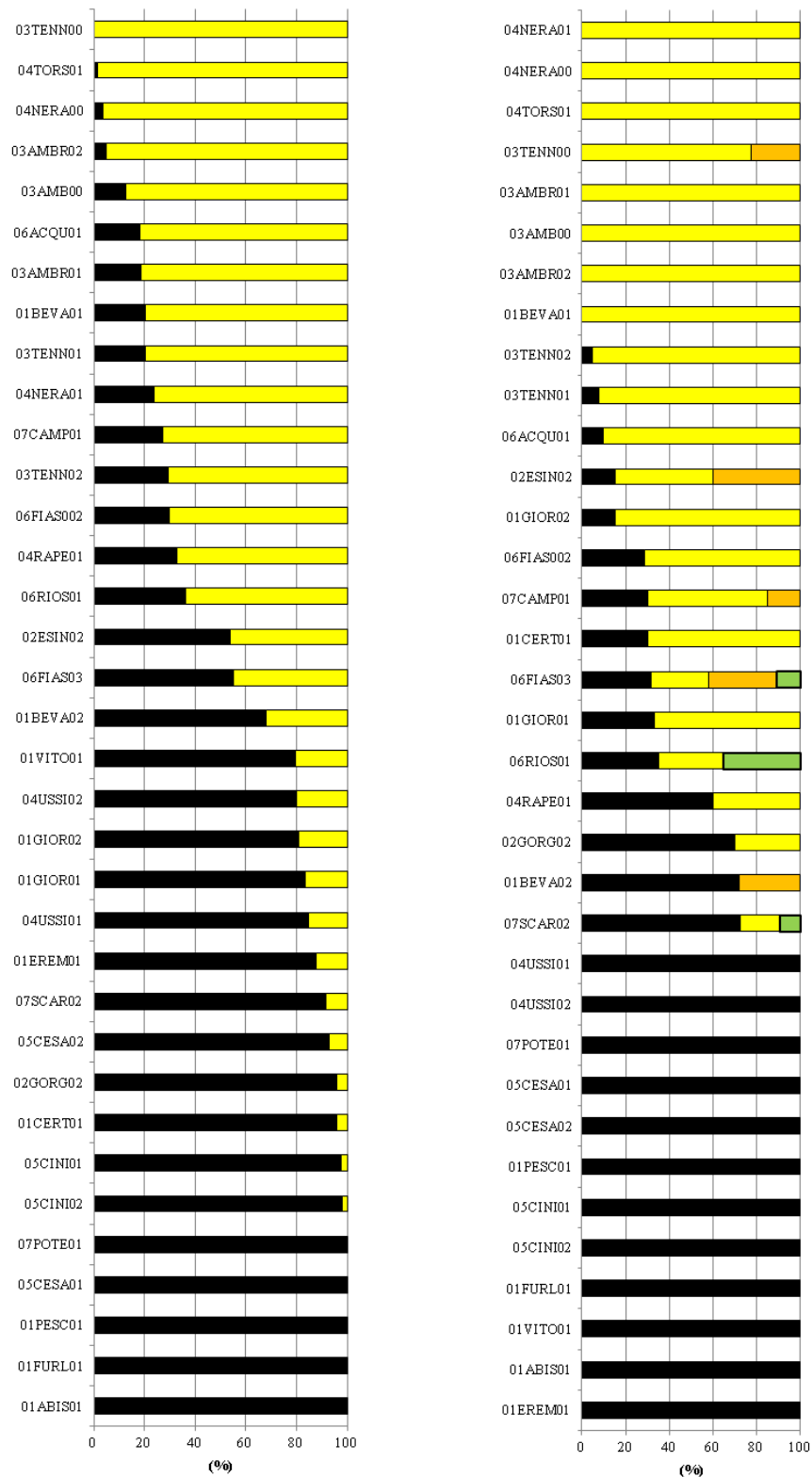


Fig. 4. Distribuzione, in ordine crescente di introgressione genetica, delle frequenze aplotipiche (mtDNA) e alleliche (*LDH-C1**) nei 35 campioni selvatici di trota analizzati nel corso dell'azione A2.

Tab. 1. Quadro riassuntivo dei campionamenti. Da sinistra a destra sono indicati: il codice dei campioni come riportato nelle figure e nel testo, le coordinate UTM, la denominazione del Sito di Importanza Comunitaria (SIC) coinvolto, il nome del corso d'acqua, il nome bacino idrografico e la taglia del campione analizzato con i tre marcatori molecolari utilizzati.

Codice del campione	x	y	SIC	Corso d'acqua	Bacino Idrografico	N. n	N. mt	N.mc
01ABIS01	299500	4828575	Monte Nerone - Gola di Gorgo a Cerbara	Abisso	Metauro	2	2	
01BEVA01	311204	4813310	Monte Catria - Monte Acuto	Bevano	Metauro	27	20	
01BEVA02	308488	4815781	Monte Catria - Monte Acuto	Bevano	Metauro	22	20	
01CERT01	300475	4819588	Serre Del Burano	Certano	Metauro	25	20	
01EREM01	300745	4829006	Monte Nerone - Gola di Gorgo a Cerbara	Eremo	Metauro	8	8	
01FURL01	300844	4819952	Serre del Burano	Furlani	Metauro	8	8	
01GIOR01	302290	4821140	Monte Nerone - Gola di Gorgo a Cerbara	Giordano	Metauro	15	15	
01GIOR02	302327	4821075	Monte Nerone - Gola di Gorgo a Cerbara	Giordano	Metauro	13	13	
01PESC01	308757	4816513	Monte Catria - Monte Acuto	Peschiera	Metauro	6	6	
01VITO01	297312	4828221	Monte Nerone - Gola di Gorgo a Cerbara	Vitoschio	Metauro	32	20	
02ESIN02	331067	4788550	Monte Giuoco del Pallone - M. Cafaggio	Esino	Esino	28	20	
02GORG01	314560	4810744	Monte Catria - Monte Acuto	Gorga	Esino	24	20	
03AMBR01	360172	4756800	Valle dell'Ambro	Ambro	Tenna	27	20	27
03AMBR02	360362	4756816	Valle dell'Ambro	Ambro	Tenna	20	20	20
03TENN01	359095	4753180	Valle dell'Infernaccio - M. Sibilla	Tenna	Tenna	39	20	39
03TENN02	359625	4753561	Valle dell'Infernaccio - M. Sibilla	Tenna	Tenna	36	20	
04NERA01	338956	4751894	Gola della Val Nerina - M. Fema	Nera	Nera	42	20	42
04RAPE01	349085	4749455	Valle Rapegna e M. Cardosa	Rapegna	Nera	36	20	
04TORS01	336902	4753175	Gola della Val Nerina - M. Fema	Torsa	Nera	33	20	33
04USSI01	350035	4756343	Monte Bove	Ussita	Nera	23	20	
04USSI02	349528	4756355	Monte Bove	Ussita	Nera	25	20	
05CESA01	316750	4814944	Monte Catria - Monte Acuto	Cesano	Cesano	18	18	
05CESA02	318898	4815891	Monte Catria - Monte Acuto	Cesano	Cesano	28	20	
05CINI01	315663	4818087	Monte Catria - Monte Acuto	Cinisco	Cesano	23	20	
05CINI02	315962	4819318	Monte Catria - Monte Acuto	Cinisco	Cesano	28	20	
06ACQU01	353553	4762119	Val di Fibbia - V. dell'Acqua Santa	Acquasanta	Chienti	11	11	11
06FIAS02	353564	4762155	Val di Fibbia - V. dell'Acqua Santa	Fiastrone	Chienti	36	20	
06FIAS03	356469	4770422	Gola del Fiastrone	Fiastrone	Chienti	19	19	

Practical recommendation on the fittest approach to perform the captive breeding and restocking action on macrostigma trout - Part 1

Codice del campione	x	y	SIC	Corso d'acqua	Bacino Idrografico	N. n	N. mt	N.mc
06RIOS01	351643	4762837	Val di Fibbia - V. dell'Acqua Santa	Rio Sacro	Chienti	20	20	
07CAMP01	326729	4784295	Piana di Pioraco	Campodonico	Potenza	24	20	24
07POTE01	326722	4779504	Gola di Pioraco	Potenza	Potenza	24	20	
07SCAR02	336173	4782001	Gola di Pioraco	Scarsito	Potenza	12	12	
03TENN00	358763	4754582	Valle dell'Infernaccio - M. Sibilla	Il Rio	Tenna	31	31	31
03AMBR00	359683	4756946	Valle dell'Ambro	Ambro	Tenna	17	17	
04NERA00	349687	4750604	Valle Rapegna e M. Cardosa	Nera	Nera	14	14	
00DOME01	Liguria			Allevamento		16	16	16
00DOME02	Cantiano			Allevamento		26	26	26
00DOME03	Visso			Allevamento		20	20	20

Tab. 2. Resoconto dei livelli di introggressione osservati a livello del locus nucleare *LDH-CI**, del *D-loop* (aplotipi da *ATs1* a *MEs1*, *sensu* Bernatchez) e di dodici microsatelliti (valori del coefficiente di appartenenza di STRUCTURE (*q*) al cluster alloctono e a quello autoctono).

Codice	<i>LDH-CI*90</i>	<i>LDH-CI*100</i>	<i>ATs1</i>	<i>ADs7</i>	<i>MA.s5</i>	<i>MEs1</i>	<i>q_{alloctono}</i>	<i>q_{autoctono}</i>
01ABIS01		100.0	100.0					
01BEVA01	20.4	79.6		100.0				
01BEVA02	68.2	31.8	72.2		27.8			
01CERT01	96.0	4.0	30.0	70.0				
01EREM01	87.5	12.5	100.0					
01FURL01	100.0		100.0					
01GIOR01	83.3	16.7	33.3	66.7				
01GIOR02	80.8	19.2	15.4	84.6				
01PESC01	100.0		100.0					
01VITO01	79.7	20.3	100.0					
02ESIN02	53.7	46.3	15.0	45.0	40.0			
02GORG01	95.8	4.2	70.0	30.0				
03AMBR01	18.5	81.5		100.0			3.0	97.0
03AMBR02	5.0	95.0		100.0			2.0	98.0
03TENN01	20.5	79.5	7.7	92.3			10.0	90.0
03TENN02	29.4	70.6	5.0	95.0				
04NERA01	23.8	76.2		100.0			11.0	89.0
04RAPE01	32.9	67.1	60.0	40.0				
04TORS01	1.5	98.5		100.0			2.0	98.0
04USSI01	84.8	15.2						
04USSI02	80.0	20.0						
05CESA01	100.0							
05CESA02	92.9	7.1						
05CINI01	97.7	2.3						

Practical recommendation on the fittest approach to perform the captive breeding and restocking action on macrostigma trout - Part 1

Codice	<i>LDH-CI*90</i>	<i>LDH-CI*100</i>	<i>ATs1</i>	<i>ADs7</i>	<i>MA.s5</i>	<i>MEs1</i>	<i>qalloctono</i>	<i>qautoctono</i>
05CINI02	98.2	1.8						
06ACQU01	18.2	81.8	10.0	90.0			18.0	83.0
06FIAS02	30.0	70.0	28.6	71.4				
06FIAS03	55.3	44.7	31.6	26.3	31.6	10.5		
06RIOS01	36.1	63.9	35.0	30.0		35.0		
07CAMP01	27.1	72.9	30.0	55.0	15.0		40.0	60.0
07POTE01	100.0		100.0					
07SCAR02	91.7	8.3	72.7	18.2		9.1		
03TENN00	0.0	100.0		77.42	22.58		1.0	99.0
03AMBR00	12.5	87.5		100.0				
04NERA00	3.6	96.4		100.0				

Tab. 3. Frequenze alleliche, eterozigosi attesa H_E , indice di fissazione F_{IS} e ricchezza allelica RA calcolati su dodici microsatelliti e 8 popolazioni selvatiche e 3 domestiche di trota.

<i>Oneu2</i>	07CAMP01	06ACQU01	03AMBR01	03AMBR02	03TENN01	03TENN00	04NERA01	04TORS01	00DOME01	00DOME02	00DOME03
144									0.67		
170					0.23						
178	0.21										
184	0.21										
220	0.21			0.50							
240	0.42		0.75	0.50			0.14		0.33	0.24	0.50
260										0.20	
210	0.21			0.75		0.32					
212	0.83	0.91		0.50	0.23	0.32	0.69				
214	0.17	0.45					0.25				
216	0.63	0.91		0.50	0.91	0.16	0.28	0.16		0.12	0.15
218	0.14	0.91					0.14	0.23	0.33	0.24	0.15
220		0.45					0.14	0.15		0.20	
222	0.21										0.25
224			0.50			0.16			0.33		
226		0.91		0.25							
230	0.13	0.18	0.18		0.23	0.16	0.15	0.15			
232	0.63	0.27	0.63	0.65	0.64		0.25	0.36	0.67		
234							0.69	0.17	0.67		
236							0.56	0.16			
238									0.13		
240						0.16			0.13		
242											0.25
244									0.33		0.50
246						0.15					
248	0.42	0.91		0.25	0.23	0.60				0.40	0.50
250	0.42		0.25		0.14	0.81	0.14		0.23	0.24	0.20
252	0.83		0.50	0.25	0.45		0.56		0.17	0.40	0.13
254	0.21						0.14				0.25
256	0.21										
260						0.32					
262										0.20	0.25

Practical recommendation on the fittest approach to perform the captive breeding and restocking action on macrostigma trout - Part 1

264	0.42					0.16				0.20	0.10
266											0.25
H_E	0.93	0.89	0.58	0.57	0.58	0.62	0.85	0.78	0.89	0.82	0.91
F_{IS}	0.29	-0.13	0.14	-0.05	0.14	0.23	0.05	0.22	0.03	0.37	0.45
RA	6.42	5.58	3.25	3.55	3.35	3.62	5.02	4.13	5.67	4.63	5.78
<i>SSsp2213</i>	07CAMP01	06ACQU01	03AMBR01	03AMBR02	03TENN01	03TENN00	04NERA01	04TORS01	00DOME01	00DOME02	00DOME03
149				0.21					0.50		
161										0.38	
169				0.21	0.87			0.30	0.22	0.14	0.75
173	0.42		0.50	0.63	0.65		0.28				
177	0.28	0.32	0.25	0.21	0.22	0.54	0.33	0.42		0.23	0.75
181	0.19	0.32	0.68	0.56	0.46	0.82	0.15	0.20	0.19	0.15	0.10
185	0.21	0.91	0.25	0.15	0.34		0.97		0.63	0.14	0.23
189	0.42	0.45			0.22		0.28			0.58	0.10
193	0.21	0.23			0.22		0.14		0.31	0.14	0.13
197	0.83						0.28			0.58	
210				0.42	0.22						0.15
250	0.42										0.25
290								0.15			0.13
213				0.42			0.13	0.33			
217	0.13										
221	0.17			0.83			0.15			0.19	
225	0.63					0.68	0.42			0.38	
229						0.54					
H_E	0.88	0.77	0.49	0.66	0.70	0.31	0.82	0.68	0.68	0.88	0.89
F_{IS}	0.01	-0.19	-0.12	-0.01	-0.06	0.06	0.09	0.11	0.09	-0.06	-0.02
RA	5.41	3.85	2.49	3.82	3.64	2.19	4.78	3.16	3.44	5.33	5.46

Practical recommendation on the fittest approach to perform the captive breeding and restocking action on macrostigma trout - Part 1

<i>OMM164</i>	07CAMP01	06ACQU01	03AMBR01	03AMBR02	03TENN01	03TENN00	04NERA01	04TORS01	00DOME01	00DOME02	00DOME03
164		0.45								0.19	
168	0.21									0.38	
172	0.42	0.91	0.25	0.83	0.13	0.19	0.14	0.23		0.58	0.75
176			0.25		0.83		0.14	0.15	0.31	0.29	0.15
180			0.50						0.63		0.50
184	0.21									0.19	
188	0.42									0.58	
192	0.21	0.14		0.21			0.14	0.15			
196		0.18	0.13	0.14	0.21	0.18			0.25	0.19	0.25
200						0.28					
240									0.63		0.25
280	0.14	0.45			0.83	0.54			0.47		0.25
212	0.23	0.45		0.42	0.14		0.42			0.19	0.18
216	0.42						0.42	0.15		0.19	0.75
220	0.14	0.91									
224	0.21									0.38	
230						0.14				0.19	0.25
234				0.21			0.42	0.15			0.50
238						0.14	0.28	0.17		0.58	0.75
242	0.63									0.38	0.50
246	0.21	0.91	0.30	0.31	0.21		0.83			0.58	0.50
250	0.83	0.91	0.38	0.35	0.56	0.22	0.14	0.33		0.58	0.25
254	0.21	0.14	0.75	0.63			0.56			0.19	0.25
258	0.42								0.94		
262	0.63		0.25				0.14			0.77	0.75
266									0.31		
270	0.21						0.69	0.14			
274							0.17	0.61			
278										0.58	0.25
288							0.14				
292								0.15			
296	0.42									0.19	
300								0.15		0.19	
340							0.14	0.15			

Practical recommendation on the fittest approach to perform the captive breeding and restocking action on macrostigma trout - Part 1

362		0.45									
H_E	0.92	0.93	0.76	0.77	0.66	0.82	0.87	0.82	0.72	0.90	0.93
F_{IS}	0.00	0.13	0.02	0.03	0.24	0.17	0.14	0.11	-0.22	-0.07	0.15
RA	6.23	6.27	4.10	4.16	3.70	4.45	5.37	4.60	3.91	6.10	6.43
<i>SsaDI90</i>	07CAMP01	06ACQU01	03AMBR01	03AMBR02	03TENN01	03TENN00	04NERA01	04TORS01	00DOME01	00DOME02	00DOME03
180										0.19	
116	0.83	0.91	0.38	0.42	0.31		0.15	0.23	0.31	0.17	0.75
120	0.21	0.91						0.76	0.31	0.19	
124	0.13	0.36	0.55	0.78	0.42	0.97	0.43	0.33	0.47	0.96	0.50
128	0.83	0.45			0.83		0.14			0.96	0.15
132	0.23	0.23			0.42	0.38	0.56	0.32	0.63	0.96	
136	0.28	0.14				0.26	0.97				
140	0.13		0.75	0.13		0.26	0.11	0.45		0.19	0.75
144	0.21	0.45		0.13	0.83		0.11		0.31	0.44	0.30
148					0.21		0.14		0.31	0.38	0.28
152	0.83				0.42		0.28		0.31	0.38	0.75
156	0.21										
192							0.14				
280									0.31		
H_E	0.87	0.81	0.57	0.48	0.73	0.72	0.79	0.74	0.70	0.79	0.81
F_{IS}	-0.06	-0.12	-0.62	-0.23	-0.27	-0.24	-0.24	-0.32	-0.36	-0.22	0.02
RA	5.23	4.62	2.48	2.68	3.80	3.41	4.51	3.63	3.66	4.58	4.53

Practical recommendation on the fittest approach to perform the captive breeding and restocking action on macrostigma trout - Part 1

<i>Ssa103NVH</i>	07CAMP01	06ACQU01	03AMBR01	03AMBR02	03TENN01	03TENN00	04NERA01	04TORS01	00DOME01	00DOME02	00DOME03
92	0.46	0.10	0.75	0.78	0.50	1.00	0.26	0.32			
94										0.60	
96							0.14		0.19	0.20	
100			0.25								
120			0.75		0.14		0.14				
140	0.83						0.83		0.16		0.50
160		0.50		0.21			0.14			0.20	0.75
180										0.40	
110										0.20	
112	0.42	0.50					0.14	0.65			0.50
114	0.13	0.35	0.25		0.11		0.42			0.14	0.20
116	0.42	0.10	0.10	0.13	0.23		0.14		0.31	0.80	0.13
118							0.14		0.31		
120	0.21		0.25	0.63	0.23		0.42		0.34	0.36	0.23
122	0.83				0.23		0.42		0.63	0.20	0.28
124	0.21						0.28		0.94	0.40	
126	0.21										
128					0.23		0.14				
130							0.69		0.63	0.20	
132							0.13	0.32	0.31		
134		0.50									
136		0.50									
152	0.21										
154	0.42										
156		0.50					0.14				
158		0.10					0.69	0.23			
160		0.50					0.28	0.97			
162				0.83	0.14		0.69	0.24			
164		0.50			0.23		0.28	0.81			
166								0.21			
168								0.16			
170	0.21										
172	0.21										
<i>H_E</i>	0.77	0.87	0.43	0.48	0.71		0.90	0.84	0.83	0.81	0.83
<i>F_{IS}</i>	0.35	0.33	0.43	0.66	0.30		0.23	0.50	0.25	0.12	0.16

Practical recommendation on the fittest approach to perform the captive breeding and restocking action on macrostigma trout - Part 1

RA	4.67	5.75	2.70	2.81	4.01	1.00	5.92	4.80	4.85	4.73	4.63
<i>Str60</i>	07CAMP01	06ACQU01	03AMBR01	03AMBR02	03TENN01	03TENN00	04NERA01	04TORS01	00DOME01	00DOME02	00DOME03
95	0.96	0.86	0.65	0.64	0.94	1.00	0.93	0.88	0.63	0.52	0.68
99	0.42	0.14	0.35	0.36	0.63		0.97	0.12	0.38	0.48	0.32
H_E	0.82	0.25	0.47	0.47	0.12		0.18	0.22	0.48	0.59	0.44
F_{IS}	-0.02	-0.11	-0.30	0.30	-0.05		-0.09	0.16	0.23	-0.14	0.05
RA	1.31	1.76	1.98	1.98	1.43	1.00	1.58	1.67	1.99	2.00	1.97
<i>Ssa85</i>	07CAMP01	06ACQU01	03AMBR01	03AMBR02	03TENN01	03TENN00	04NERA01	04TORS01	00DOME01	00DOME02	00DOME03
102		0.14	0.53	0.46	0.54	0.97	0.83	0.16	0.63		
104	0.27	0.45	0.25				0.56		0.25	0.12	0.33
108	0.38	0.46	0.38	0.27	0.31	0.69	0.63	0.86	0.31	0.77	0.13
110	0.19	0.18	0.75	0.91	0.14	0.28	0.97		0.28	0.35	0.25
112	0.14	0.14			0.42		0.97	0.15	0.94	0.38	0.40
114	0.63	0.45		0.18			0.42			0.15	0.13
120								0.15			
H_E	0.75	0.75	0.59	0.69	0.69	0.47	0.59	0.25	0.77	0.76	0.72
F_{IS}	0.23	-0.22	0.16	0.02	-0.03	0.06	0.01	0.14	-0.05	-0.12	-0.04
RA	3.80	4.12	2.68	3.33	2.89	2.44	3.36	1.86	3.89	3.85	3.55
<i>Str73</i>	07CAMP01	06ACQU01	03AMBR01	03AMBR02	03TENN01	03TENN00	04NERA01	04TORS01	00DOME01	00DOME02	00DOME03
138						0.14		0.15		0.19	
140	0.52	0.65	0.25	0.24		0.90	0.56	0.58	0.22	0.17	0.71
142	0.31	0.10	0.70	0.60	0.74	0.86	0.28	0.21	0.28		0.36
144	0.63	0.50		0.48	0.15		0.83		0.31	0.37	0.25
146	0.14	0.20	0.28	0.33	0.87		0.83	0.20	0.19	0.42	0.64
148										0.19	
154					0.22						
H_E	0.63	0.55	0.45	0.55	0.43	0.19	0.69	0.59	0.76	0.67	0.54
F_{IS}	0.08	-0.09	-0.13	0.04	0.10	0.08	0.23	0.03	0.10	-0.15	0.34
RA	3.01	2.95	2.14	2.51	2.49	1.65	2.98	2.84	3.67	3.09	2.72

Practical recommendation on the fittest approach to perform the captive breeding and restocking action on macrostigma trout - Part 1

<i>SsoSLA17</i>	07CAMP01	06ACQU01	03AMBR01	03AMBR02	03TENN01	03TENN00	04NERA01	04TORS01	00DOME01	00DOME02	00DOME03
103				0.14							
105	0.31	0.23	0.65	0.48	0.52	1.00	0.83				
107		0.45		0.23					0.13		
109	0.21			0.23	0.21						0.26
111					0.21		0.83	0.18	0.10	0.23	0.79
113	0.83	0.45	0.50	0.91	0.15		0.69		0.67	0.14	0.34
115	0.13	0.91	0.50	0.23	0.63		0.14	0.24	0.37	0.17	0.53
117	0.63	0.91	0.23	0.14	0.42		0.36	0.33		0.19	0.79
119	0.83	0.36		0.68	0.63		0.19	0.14		0.19	0.79
121	0.31		0.25		0.83			0.91		0.77	0.79
123							0.28	0.15			0.26
127							0.28		0.10	0.58	0.79
129							0.14		0.17	0.19	0.13
131		0.14		0.23	0.21						0.26
133										0.77	
135										0.19	
137					0.21				0.33		
151									0.33		
H_E	0.79	0.81	0.54	0.74	0.74		0.83	0.78	0.82	0.86	0.85
F_{IS}	-0.06	0.11	-0.03	0.08	0.11	NA	0.10	-0.25	0.11	-0.07	0.08
RA	4.27	4.62	2.83	4.20	4.11	1.00	4.57	4.08	4.78	5.12	5.30

<i>SSsp2216</i>	07CAMP01	06ACQU01	03AMBR01	03AMBR02	03TENN01	03TENN00	04NERA01	04TORS01	00DOME01	00DOME02	00DOME03
131			0.13						0.31	0.43	
135	0.63			0.23						0.14	0.25
139	0.19	0.91		0.68	0.33	0.39	0.18	0.27		0.29	0.40
143	0.17	0.36		0.16	0.21		0.97				0.15
147	0.15	0.18			0.21			0.25	0.94		0.33
151	0.42								0.34	0.71	0.50
155									0.19		0.50
163			0.25					0.19			
167			0.25	0.14	0.21			0.96			
171	0.19	0.14	0.13	0.23	0.83	0.14	0.22	0.38	0.31		
175	0.15	0.23	0.13	0.39	0.52	0.60	0.25	0.12			
179							0.42	0.38		0.71	

Practical recommendation on the fittest approach to perform the captive breeding and restocking action on macrostigma trout - Part 1

183	0.63						0.19	0.15			
187							0.14				
191									0.31		
195			0.13					0.19			
H_E	0.87	0.79	0.93	0.77	0.62	0.50	0.82	0.83	0.76	0.76	0.72
F_{IS}	0.09	-0.03	-0.09	0.29	0.06	0.22	0.02	-0.16	-0.07	-0.36	0.25
RA	5.13	4.15	6.00	4.03	3.00	2.10	4.44	4.73	3.89	3.96	3.65
<i>Ssa408U/OS</i>	07CAMP01	06ACQU01	03AMBR01	03AMBR02	03TENN01	03TENN00	04NERA01	04TORS01	00DOME01	00DOME02	00DOME03
176				0.24							
208	0.21									0.80	0.91
212	0.21		0.25	0.71	0.43		0.16			0.60	0.14
216	0.13	0.91	0.50				0.31		0.94		0.14
220	0.21				0.43					0.10	
224	0.33				0.22		0.31	0.16		0.80	
228	0.21	0.91	0.25	0.12	0.22	0.13	0.16	0.19		0.40	
232					0.43		0.16				0.45
236					0.43				0.63	0.60	
240		0.45				0.27	0.63			0.20	0.45
242	0.14	0.27			0.43	0.18		0.23	0.31	0.16	0.14
246	0.42	0.91			0.87		0.31			0.60	0.91
250	0.63		0.25		0.22			0.47	0.34		0.14
254			0.10	0.24	0.22				0.63		0.91
258		0.45							0.63	0.20	0.91
262	0.21	0.45			0.13		0.47	0.14			
266				0.24			0.47		0.34		
270	0.83	0.45					0.30			0.60	
274	0.42	0.45					0.17	0.36			
278			0.50	0.67	0.48	0.35	0.94	0.16			
280		0.18	0.25	0.24							
284		0.45	0.25	0.24		0.33					
288	0.42					0.33					
296	0.63										
312										0.80	
364				0.24							
H_E	0.86	0.90	0.69	0.55	0.75	0.77	0.85	0.77	0.77	0.97	0.93

Practical recommendation on the fittest approach to perform the captive breeding and restocking action on macrostigma trout - Part 1

F_{IS}	0.13	-0.12	0.06	-0.23	0.08	-0.09	0.05	-0.06	0.19	0.03	0.13
RA	5.42	5.82	3.69	3.29	4.55	3.94	5.13	4.02	4.13	5.89	6.21
	07CAMP01	06ACQU01	03AMBR01	03AMBR02	03TENN01	03TENN00	04NERA01	04TORS01	00DOME01	00DOME02	00DOME03
Mean H_E	0.76	0.76	0.59	0.61	0.60	0.40	0.73	0.66	0.75	0.79	0.78
Mean RA	4.63	4.50	3.12	3.31	3.36	2.44	4.33	3.59	3.99	4.48	4.57