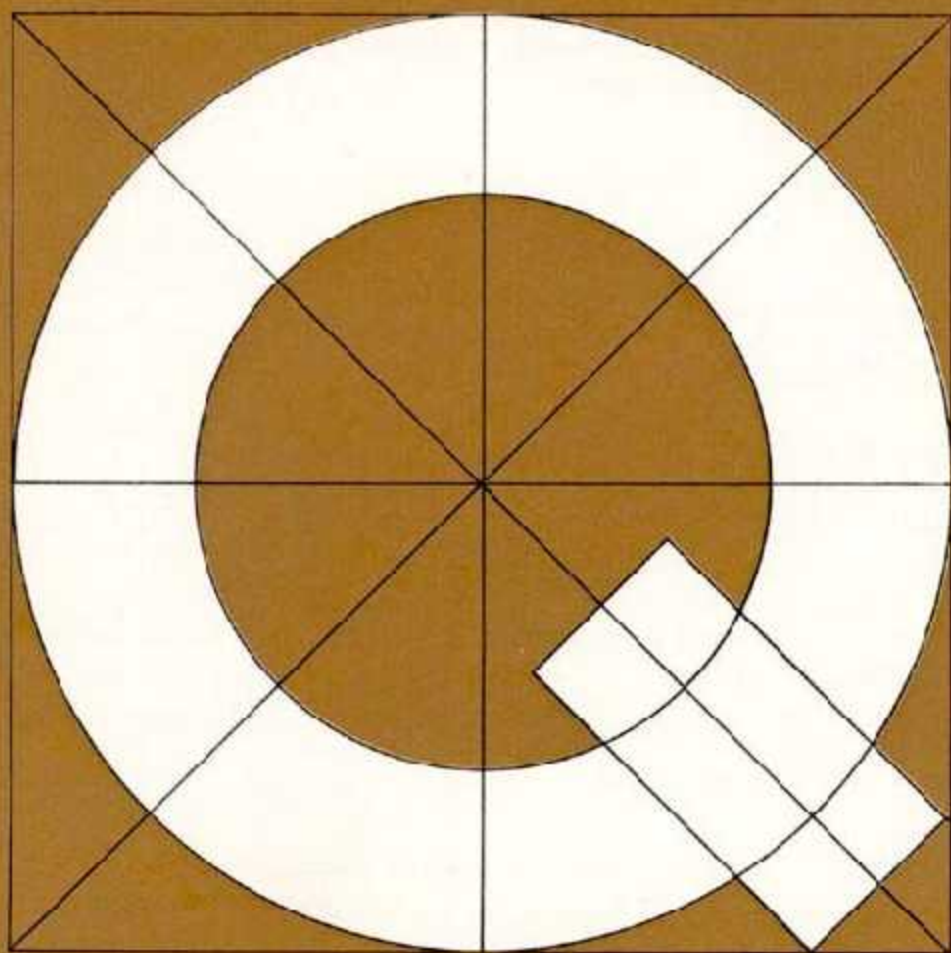


F. de CRISTINI - M. SPECCHI

CONSIDERAZIONI PRELIMINARI SUL POLIMORFISMO
EMOGLOBINICO IN "SALMO TRUTTA FARIO"
E "SALMO GAIRDNERI" DELLE ACQUE DEL FRIULI

PRELIMINARY REPORT ON HEMOGLOBIN
POLYMORPHISM IN "SALMO TRUTTA FARIO" AND
"SALMO GAIRDNERI" OF FRESHWATERS OF FRIULI



quaderni etp

QUADERNI DELL' ENTE TUTELA PESCA - UDINE

Rivista di Limnologia

N. 4 - 1982

Direttore responsabile: **Franco Spizzo**

I «QUADERNI» pubblicano in lingua italiana o in una lingua ufficiale di congressi lavori originali in vari campi della Limnologia, testi di conferenze, atti di convegni, monografie, ecc. Possono venir pubblicate anche note brevi.

I dattiloscritti — composti secondo le norme per gli Autori — vanno inviati a:

Direttore «Quaderni Ente Tutela Pesca»,
Viale Volontari della Libertà N. 37 - 33100 UDINE

I lavori saranno pubblicati nel più breve tempo possibile dopo essere stati sottoposti all'esame di un consulente di redazione nominato volta per volta, secondo le specifiche competenze. Quando il lavoro non dovesse risultare adatto ad essere pubblicato sui «Quaderni», la Direzione si riserva di restituirlo senza particolare motivazione.

Per l'acquisto dei «Quaderni», anche arretrati, o per richieste di scambi rivolgersi all'Ente Tutela Pesca.

Ente Tutela Pesca del Friuli-Venezia Giulia
33100 UDINE - Viale Volontari della Libertà, N. 37
Tel. (0432) 482285 - 482474

LABORATORIO DI IDROBIOLOGIA
33050 - Ariis di Rivignano (UD) - Via Chiesa, N. 11
Tel. (0432) 775815

Suppl. a NOTIZIARIO E.T.P.
Direzione, Redazione, Amministrazione, 33100 Udine - Viale Volontari della Libertà, N. 37

Autorizzazione del Tribunale di Udine, N. 355 del 31 maggio 1974

Tipografia A. Pellegrini - Udine

Diritti riservati - In caso di riproduzioni, anche parziali, citare la fonte.

copertina - progetto grafico Sandro Comini

CONSIDERAZIONI PRELIMINARI SUL POLIMORFISMO
EMOGLOBINICO IN "SALMO TRUTTA FARIO" E
"SALMO GAIRDNERI" DELLE ACQUE DEL FRIULI

PRELIMINARY REPORT ON HEMOGLOBIN POLYMORPHISM
IN "SALMO TRUTTA FARIO" AND "SALMO GAIRDNERI"
OF FRESHWATERS OF FRIULI

Franco de Cristini *) e Mario Specchi *) **)

Key words: Friuli-Venezia Giulia (Northern Italy) - *Salmo trutta fario* and
Salmo gairdneri - Hemoglobin polymorphism.

Abstract: Electrophoretic analysis of polymorphic hemoglobins in *Salmo trutta fario* and *Salmo gairdneri* is reported.

Riassunto: L'analisi elettroforetica dell'emoglobina di due specie di trota del Friuli-Venezia Giulia ne ha messo in evidenza il polimorfismo, accentuato in *Salmo trutta fario* e quasi assente in *S. gairdneri*. Questo polimorfismo è probabilmente dovuto alla immissione nelle acque interne della regione di esemplari di trote provenienti da località molto diverse e quindi appartenenti a differenti popolazioni, che hanno dato origine a molti ibridi con conseguente aumento della variabilità genetica oltre che morfologica.

La specie indigena (*Salmo trutta marmoratus*) è ancora presente nelle acque dolci del Friuli-Venezia Giulia e dovrà essere oggetto di particolari ricerche per un eventuale ripristino dei popolamenti ittici originari.

Summary: Hemoglobin electrophoretic patterns from two trout species from Friuli-Venezia Giulia revealed remarkable polymorphism more evident in *Salmo trutta fario* than in *S. gairdneri*. Such polymorphism is likely due to introduction in the inner waters of this region of specimens coming from quite different places. Therefore these trouts belonging

* Istituto di Zoologia ed Anatomia Comparata - Università di Trieste

** Laboratorio di Idrobiologia dell'Ente Tutela Pesca - Ariis di Rivignano (UD)

to different populations gave rise to several hybrids increasing the genetic and morphological variability.

The local species (*Salmo trutta marmoratus*) is still present in freshwaters of Friuli-Venezia Giulia and will be investigated aiming to a possible recovery of the previous condition of fish population.

Introduzione

I caratteri biochimici sono stati recentemente molto usati accanto ai caratteri morfologici e morfometrici nello studio delle razze e delle popolazioni di pesci marini e di acque dolci (DE LIGNY, 1969). Fra questi caratteri biochimici, le proteine ed in particolare alcuni enzimi sono stati oggetto di approfonditi studi da parte di molti ricercatori.

L'analisi elettroforetica ha permesso di dimostrare che negli individui di una determinata specie le proteine e gli enzimi si presentano sotto forme molecolari multiple. Questo fenomeno, che è noto con il nome di polimorfismo, rappresenta la regola più che l'eccezione ed è stato calcolato che in una popolazione anche il 60-65% di tutte le proteine possono risultare polimorfiche. Ognuna delle forme molecolari è determinata geneticamente e come tale risulta poco soggetta a variazioni dovute all'ambiente. E' per questo che le proteine sono state usate come veri e propri marcatori genetici e preferite ai tradizionali marcatori morfologici, che risultano essere il più delle volte il risultato finale di una complessa interazione fra fattori genetici ed ambientali.

Una delle proteine più usate per queste indagini è l'emoglobina, che presenta nei pesci un polimorfismo alquanto accentuato (SICK, 1961; FYHN and SULLIVAN, 1974). L'interpretazione dei patterns elettroforetici dell'emoglobina è talvolta difficile. Infatti, contrariamente a quanto avviene nei mammiferi nei quali la molecola dell'emoglobina è costituita da quattro catene polipeptidiche a due a due uguali, nei pesci il tetramero può essere composto da quattro catene polipeptidiche tutte diverse tra loro e questo fa aumentare notevolmente la variabilità della molecola emoglobinica (WILKINS, 1970; DE CRISTINI et al., 1979).

Il polimorfismo delle proteine e delle emoglobine in particolare è stato usato in alcuni casi per chiarire dal punto di vista tassonomico, la posizione sistematica di alcune specie di pesci e dei loro ibridi (IUCHI, 1973; IUCHI et al., 1975).

L'indagine sul comportamento elettroforetico delle emoglobine di

alcune specie di trota del Friuli-Venezia Giulia è stata pertanto condotta nell'intento di descrivere e di interpretare il polimorfismo emoglobinico trovato in queste specie e per contribuire a risolvere per via biochimica il complesso ed ancor controverso problema della sistematica del genere *Salmo*.

Materiali e metodi

Il prelievo di sangue è stato effettuato o mediante puntura branchiale per gli esemplari di maggiori dimensioni o, sacrificando l'animale, col taglio della coda per quelli di dimensioni più piccole. Il sangue è stato raccolto in soluzione fisiologica refrigerata ed ivi conservato a 4° C fino al momento dell'analisi in laboratorio. Dopo alcuni lavaggi in soluzione fisiologica seguiti da centrifugazioni a 4000 giri/min per 30' ed allontanamento del sopranatante, i globuli rossi sono stati emolizzati con acqua distillata e quindi posti a —20° C per 15' per completare l'emolisi. La soluzione di emoglobina è stata quindi sottoposta ad elettroforesi su strisce di acetato di cellulosa (Cellogel) applicando una differenza di potenziale di 350 volts fra gli elettrodi corrispondente ad una intensità di corrente di 2 mA/cm.

Il tampone che ha fornito la miglior separazione elettroforetica è stato il Tris-EDTA-Acido borico a pH 8.9. Per la colorazione delle frazioni emoglobiniche si è usato l'Amido Schwartz 10 B.

Risultati e discussione

Sono stati analizzati complessivamente 51 campioni emoglobinici di trote provenienti dalle acque dolci del Friuli-Venezia Giulia. I 27 esemplari di *Salmo trutta fario* provenivano dal lago di Fusine (9 esemplari), dall'Isonzo presso Gradisca (2 esemplari), dal lago di Barcis (2 esemplari) e dall'allevamento di Flambro (14 esemplari). Di *Salmo gairdneri* sono stati analizzati 24 esemplari, 10 dell'allevamento di Ariis e 14 dell'allevamento di Flambro. I patterns emoglobinici delle trote da noi analizzate sono alquanto complessi, con differenze inter ed infraspecifiche.

Salmo trutta fario è la specie che presenta il polimorfismo più accentuato. In tutti i 27 esemplari analizzati si possono distinguere due gruppi di bande, uno a bassa ed uno ad alta velocità di migrazione elettroforetica. Le differenze più rilevanti si notano a carico del grup-

po di bande a bassa velocità elettroforetica. Negli esemplari di *Salmo trutta fario* del lago di Fusine (profili elettroforetici *a*, *b*, *c* della fig. 1) le bande sono più numerose (da 3 a 5) di quelle che si riscontrano

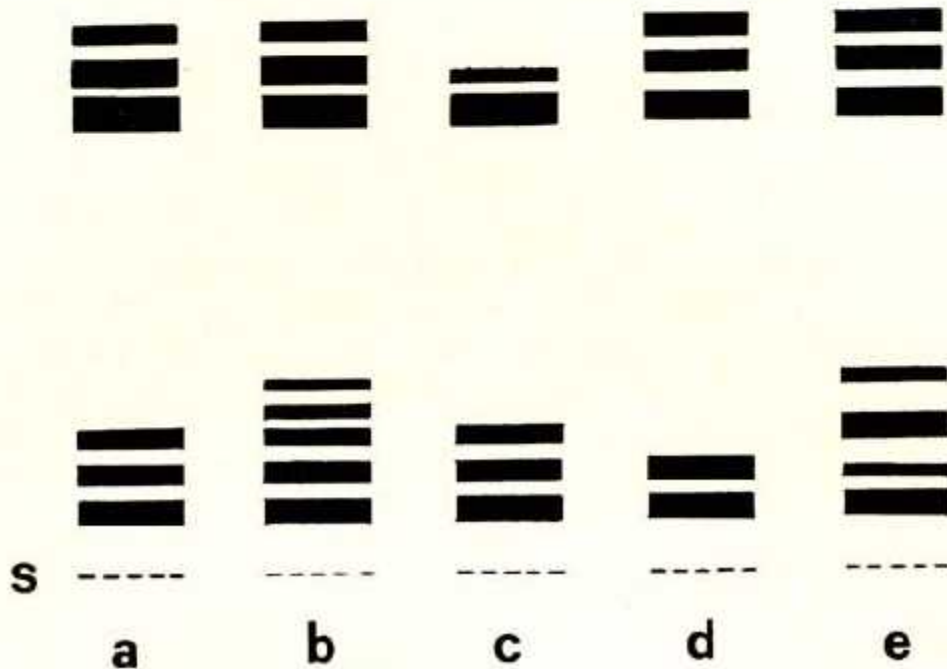


Fig. 1 - Profili elettroforetici dell'emoglobina di *Salmo trutta fario*. I patterns *a*, *b*, *c* sono relativi agli esemplari catturati nel lago di Fusine, quello *d* agli esemplari di Flambro e quello *e* agli esemplari di Barcis e dell'Isonzo. S - Linea di partenza.
Electrophoretic patterns of hemoglobin of Salmo trutta fario. a, b, c: patterns found in samples from Fusine lake; d: pattern of samples from Flambro hatchery; e: pattern of samples from Barcis lake and Isonzo river. S - Start line.

negli esemplari provenienti dall'allevamento di Flambro (fig. 1 profilo *d*), che mostrano 2 o al massimo 3 bande. Alcune differenze si notano anche fra le bande ad alta velocità elettroforetica: le bande sono 3 e presentano la stessa intensità negli esemplari di *Salmo trutta fario* di Flambro (fig. 1, *d*) mentre variano da 2 a 3 negli esemplari di Fusine (fig. 1 *a*, *b*, *c*).

Il profilo elettroforetico degli esemplari di *Salmo trutta fario* del lago di Barcis e dell'Isonzo è mostrato in fig. 1, *e*. Come si può vedere dal confronto con gli altri patterns della fig. 1, esso si avvicina a quello caratteristico degli esemplari di Fusine.

Più uniforme invece il quadro elettroforetico di *Salmo gairdneri*. I 14 esemplari raccolti nell'allevamento di Flambro non mostrano al-

cuna differenza tra di loro, sia nel numero sia nella mobilità elettroforetica delle 6 bande (fig. 2 a). Lo stesso pattern emoglobinico è stato fornito dai 10 esemplari dell'allevamento di Ariis. Soltanto in due campioni (fig. 2 b, c) risultavano assenti due deboli bande. Questo però potrebbe dipendere da fattori tecnici non controllabili, quali la

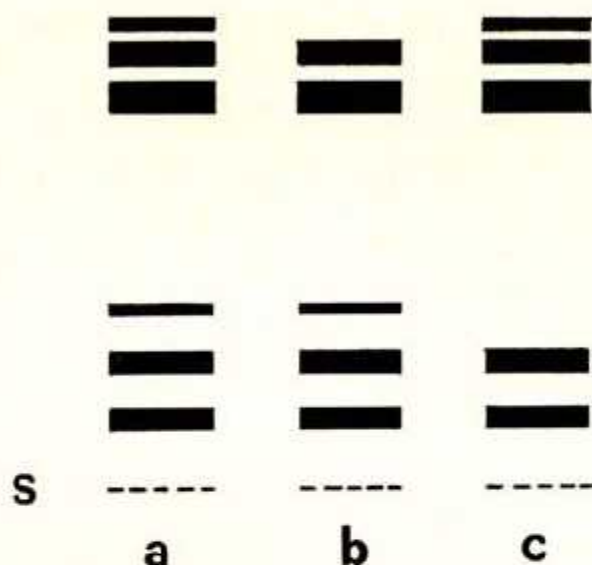


Fig. 2 - a: pattern elettroforetico dell'emoglobina fornito dagli esemplari di *Salmo gairdneri* dell'allevamento di Flambro e di Ariis. I patterns b e c si riferiscono a due esemplari provenienti dall'allevamento di Ariis. S - Linea di partenza.
a: *electrophoretic pattern of hemoglobin of Salmo gairdneri caught in Flambro and Ariis hatcheries.* b, c: *patterns of two samples from Ariis.* S - Start line.

concentrazione del campione di emoglobina o l'irregolarità del substrato su cui è stata fatta l'elettroforesi. Non saremmo comunque propensi a ritenere che in questa specie esista un polimorfismo emoglobinico, dal momento che anche altri autori (IUCHI, 1973) hanno dimostrato che *Salmo gairdneri* è monomorfica per quanto riguarda l'emoglobina.

Non possiamo certamente trarre delle conclusioni di carattere generale dai dati finora in nostro possesso, visto che l'indagine è stata condotta su uno scarso numero di campioni. Possiamo comunque affermare che in *Salmo trutta fario* esiste un notevole polimorfismo emoglobinico, che è pressochè assente in *S. gairdneri*. Queste due specie presentano poi dei quadri emoglobinici completamente diversi fra

loro; questo risultato è in relazione al fatto che le specie esaminate rappresentano due entità tassonomiche distinte.

Il polimorfismo emoglobinico, e biochimico in generale, viene interpretato attualmente da molti autori in chiave evolutiva e/o adattativa. L'alto numero di frazioni emoglobiniche trovato da IUCHI (1973) in esemplari giovani ed adulti di *Salmo gairdneri irideus* (verosimilmente *S. gairdneri*) è spiegato dall'autore come una sorta di adattamento fisiologico e i diversi fenotipi descritti da KOSSWIG (1973) per le emoglobine di varie sottospecie di *Salmo trutta* come una norma di reazione del genoma di questa specie.

L'elevato numero di bande emoglobiniche da noi trovato negli esemplari di *Salmo gairdneri* e l'accentuato polimorfismo caratteristico di *S. trutta fario* potrebbero essere spiegati come una risposta genetica e/o fisiologica agli ambienti diversi nei quali vivono queste due specie.

L'interpretazione ed il significato di questo polimorfismo sono resi ancor più complessi dal fatto che nelle acque interne del Friuli-Venezia Giulia sono stati immessi nei decenni scorsi molte trote fario ed iridee provenienti da località molto diverse (GRIDELLI, 1936) e quindi da differenti popolazioni le quali hanno dato origine ad un aumento della variabilità non solo morfologica ma anche biochimica. Per il momento quindi non siamo in grado di interpretare in modo definitivo questa variabilità emoglobinica che l'elettroforesi ha permesso di rilevare in *Salmo trutta fario* e *S. gairdneri*. Sarà pertanto necessario esaminare un maggior numero di esemplari raccogliendoli anche in zone diverse da quelle nelle quali sono stati raccolti finora i campioni. Sarà anche opportuno estendere le analisi biochimiche ad altre proteine, che potrebbero rivelarsi dei buoni marcatori genetici per le altre sottospecie di trote. Inoltre potranno essere usate tecniche immunologiche al fine di evidenziare affinità delle proteine del siero di individui appartenenti a razze o sottospecie diverse o provenienti da varie popolazioni.

Oltre a queste ricerche attualmente in corso, dovrà venir preso in considerazione il notevole problema di *Salmo trutta marmoratus* e dei suoi ibridi con *S. trutta fario* (TORTONESE, 1980). *Salmo trutta marmoratus* è la vecchia trota nostrana che, fino a pochi decenni or sono (fino cioè all'immissione delle due specie *S. trutta fario* e *S. gairdneri*) era l'unica trota che popolava le acque del Friuli e dell'isontino. *Salmo trutta marmoratus*, malgrado le massicce immissioni delle due specie sopra menzionate e malgrado il pesante sforzo di pe-

sca, è ancora ben rappresentata nelle acque del Friuli-Venezia Giulia.

Con ricerche biochimiche ed immunologiche, affiancate ovviamente da indagini di tipo ecologico, si potrà quindi avere non solo un quadro più completo del polimorfismo emoglobinico ma si potrà in maniera definitiva chiarire la posizione sistematica delle diverse specie e degli ibridi di trota che popolano le acque dolci del Friuli-Venezia Giulia al fine di acquisire tutte le notizie biologiche più importanti per un ripristino, ove possibile, dei popolamenti ittici originari della regione.

Bibliografia

- CRISTINI de F., MICALI F., MARZARI R. e GRAZIOSI G. - 1979 - Isolation and electrophoretic characterization of the haemoglobin subunits of *Sardina pilchardus* (Walb.). *Boll. Soc. Adriat. Scienze*, LXIII, 67-71.
- FYHN U.E.H. e SULLIVAN B. - 1974 - Hemoglobin polymorphism in Fishes. I. Complex Phenotypic Patterns in the toadfish, *Opsanus tau*. *Biochem. Genet.*, 11 (5), 373-385.
- GRIDELLI E. - 1936 - I pesci d'acqua dolce della Venezia Giulia. *Ed. Del Bianco*, Udine.
- IUCHI I. - 1973 - Chemical and physiological properties of the larval and the adult hemoglobins in rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 44 B, 1087-1101.
- IUCHI I., SUZUKI R. e YAMAGAMI K. - 1975 - Ontogenetic Expression of Larval and Adult Hemoglobin Phenotypes in the Intergenetic Salmonid Hybrids. *J. Exp. Zool.*, 192, 57-64.
- KOSSWIG C. - 1973 - The Role of Fish in Research on Genetics and Evolution. *Da: Genetics and Mutagenesis of Fish*. Ed. J.H. Schröder, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- LIGNY de W. - 1969 - Serological and biochemical studies on fish population. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 7, 411-513.
- SICK K. - 1961 - Haemoglobin polymorphism in fishes. *Nature*, 192, 894-896.
- TORTONESE E. - 1980 - I Salmonidi italiani. *Quaderni ETP*, Udine, 2, 1-11.
- WILKINS N.P. - 1970 - The subunits composition of the haemoglobins of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Biochim. Biophys. Acta*, 214, 52-63.

NORME PER GLI AUTORI

I lavori o le note devono essere redatti in forma concisa e il numero delle tabelle e delle figure limitato allo stretto necessario. I lavori potranno essere di un massimo di 25 cartelle dattiloscritte compresi i riassunti e la bibliografia; le note brevi di non più di 5 cartelle. I lavori e le note dovranno essere corredati da un riassunto in italiano e da un summary in inglese con la relativa traduzione del titolo in inglese nel caso il lavoro non fosse scritto in quest'ultima lingua.

I lavori dovranno essere dattiloscritti a doppio spazio su una sola facciata del foglio in modo da contenere circa 40 righe di 60 battute. Per facilitare una rapida revisione devono essere inviati in due copie.

Le illustrazioni devono essere contrassegnate sul retro con un numero progressivo. L'Autore potrà dare alla Redazione suggerimenti ed uno schema per la composizione delle figure. Dei disegni dovranno essere inviati l'originale ed una riproduzione, delle fotografie due copie. Disegni e foto dovranno contenere istruzioni sul rapporto di riduzione. Le tabelle con le spiegazioni relative e le didascalie (con traduzione in inglese) delle figure devono essere inviate su fogli a parte.

Il testo, salvo casi particolari, dovrà essere generalmente così articolato:

- a) Titolo del lavoro in italiano
- b) Titolo del lavoro in inglese
- c) Nome dell'Autore o degli Autori
- d) Ente di appartenenza degli Autori e indirizzo
- e) Parole chiave
- f) Abstract di non più di tre righe (in inglese)
- g) Riassunto
- h) Summary
- i) Introduzione
- l) Materiali e Metodi
- m) Discussione
- n) Conclusioni
- o) Bibliografia.

Le citazioni bibliografiche nel testo devono essere indicate in minuscolo (quindi nel dattiloscritto saranno sottolineate due volte). La bibliografia dovrà essere in ordine alfabetico e dovrà comprendere il nome degli Autori, la data di pubblicazione, il titolo completo del lavoro, il titolo abbreviato del periodico sottolineato (le abbreviazioni devono essere fatte secondo le norme di «Bibliographic Guide for Editors and Authors» dei Chemical Abstracts o di «World List of Scientific Periodicals» 4th Ed., London 1964-65 o infine di «Serial Sources for the Biosis Data Base» della Bio Sciences Information Service), il numero del volume, il numero del fascicolo (tra parentesi) ed infine i numeri della prima e dell'ultima pagina.

Es.: SPECCHI, M. e OREL, G. - 1968 - I popolamenti dei fondi e delle rive del valone di Muggia presso Trieste. Bol. Soc. Adriatica Scienze. Trieste, 56 (1), 137-161.

Gli Autori riceveranno 25 estratti gratuiti. Altri estratti potranno essere forniti a pagamento.

