

Il carpione del Garda (*Salmo carpio*): variabilità genetica e relazioni filogenetiche rispetto al complesso *Salmo trutta*

Andrea Gandolfi*, Sara Fantini, Francesca Ciutti, M. Stella Grando

Istituto Agrario di S. Michele all'Adige, Via E. Mach, 1 - 38010 S. Michele a/Adige (TN)

* referente per la corrispondenza (fax 0461 650956; andrea.gandolfi@iasma.it)

RIASSUNTO

Salmo carpio è un endemismo del Lago di Garda, considerato dalla IUCN Red List taxon vulnerabile e come tale ad alto rischio di estinzione in natura nel medio periodo. Se da una parte le forme legislative di tutela del carpione sono da molti considerate carenti e lacunose, d'altra parte risulta difficile identificare un'unità di conservazione in tale taxon, il cui *status* di specie è ad oggi oggetto di discussione. I criteri di diversità comunemente utilizzati per la definizione di specie suggeriscono infatti, in questo taxon, evidenze contrastanti. Le differenze ecologiche del carpione rispetto a *S. trutta*, in particolare il comportamento gregario, l'alimentazione planctofaga e soprattutto la biologia riproduttiva, permetterebbero di definire il carpione come buona specie, isolata da solide barriere riproduttive dai fenotipi lacustri del complesso *S. trutta*, presenti in sympatria nel Garda. Sulla base dei caratteri morfologici, morfometrici e meristici, risulta tuttavia difficile una chiara distinzione tra il carpione e le forme lacustri simpatriche di *S. trutta*. L'analisi della diversità genetica, infine, ha portato differenti autori a formulare ipotesi estremamente diverse sull'origine del carpione e altrettanto diverse conclusioni sull'effettiva validità di tale taxon come unità evolutiva.

L'analisi di sequenza dell'intera regione di controllo del DNA mitocondriale (mtDNA D-loop) su un numero relativamente elevato di individui di carpione e di trote del Garda ci ha permesso di aumentare l'informazione relativa alla diversità genetica del carpione e di riconsiderare le ipotesi relative all'origine e alla filogenesi di questo taxon.

PAROLE CHIAVE: *Salmo carpio* / carpione del Garda / mtDNA D-loop / diversità genetica / analisi filogenetica / *Salmo trutta* m. *lacustris* / Lago di Garda

The Garda Lake 'carpione' (*Salmo carpio*): genetic variability and phylogenetic relationships with the *Salmo trutta* complex

Salmo carpio is endemic to Garda Lake. It is classified by the IUCN Red List as a vulnerable taxon, i.e. facing a high risk of extinction in the wild in the medium-term future. If, on the one hand, conservation guidelines for 'carpione' are by many considered to be deficient, on the other hand, it is tricky to identify a conservation unit in such a taxon, whose species *status* is still debated. Diversity criteria commonly used to define a species offer in this taxon contrasting hints. Ecological differences between *S. carpio* and *S. trutta*, especially gregarious behaviour, planktonic diet and reproductive biology of the former, should allow to define this as a true species, isolated by strong reproductive barriers from the *lacustris* phenotypes of the *S. trutta* complex, that are sympatric in the Garda Lake. However, *S. carpio* and *S. trutta* morpho *lacustris* can be hardly distinguished by morphologic, morphometric and meristic traits. Finally, genetic diversity analysis led different authors to postulate completely different hypotheses about the origin of carpione and to draw likewise dissimilar conclusions about its 'trueness' as an evolutionary unit.

In the present study, genetic diversity of carpione was investigated by sequence analysis of the complete mitochondrial DNA control region (mtDNA D-loop) on a relatively high number of *S. carpio* and *S. trutta* samples from the Garda Lake, prompting us to reconsider the proposed hypotheses on the origin and the phylogeny of the taxon.

KEY WORDS: *Salmo carpio* / carpione / mtDNA D-loop / genetic diversity / phylogenetic analysis / *Salmo trutta* m. *lacustris* / Garda Lake

INTRODUZIONE

Salmo trutta è un complesso di specie con ampia distribuzione in Europa, Nord Africa ed Asia Occidentale. È costituito da un eterogeneo mosaico di forme fenotipiche, comprendenti distinte *morphae* geografiche e caratterizzate da una considerevole variabilità nei

caratteri del ciclo biologico (BERNATCHEZ, 2001). Per questi motivi, la sistematica e la tassonomia di *S. trutta* sono a tutt'oggi incerte e continuo oggetto di discussione (vedi review di KOTTELAT, 1997). In tale contesto, è sicuramente interessante il caso del carpione del

Garda (*S. carpio*), descritto come endemismo del Lago di Garda (GANDOLFI *et al.*, 1991) e considerato a rischio di estinzione (IUCN, 2003), ma il cui *status* di specie e addirittura di significativa unità evolutiva e quindi di conservazione è ad oggi dibattuto.

L'attenzione dedicata in passato allo studio del carpione del Garda è stata limitata, e le informazioni scientifiche disponibili sono sicuramente insufficienti a fornire un quadro esauriente della sua biologia, ecologia e genetica. Le principali differenze rilevabili tra questo taxon e *S. trutta*, in particolare rispetto alla morpha *lacustris* simpatica nelle acque del Garda, sono di tipo ecologico: il carpione vive alla profondità di 100-200 m dove svolge attività trofica mostrando un comportamento di tipo gregario (GANDOLFI *et al.*, 1991); si nutre prevalentemente di zooplankton con una dieta che varia stagionalmente (MELOTTO e ALESSIO, 1990); ha un duplice periodo riproduttivo (dicembre-gennaio e luglio-agosto) (ALESSIO *et al.*, 1990) o secondo altri Autori un unico esteso periodo riproduttivo (dall'inverno all'estate) (RAUNICH *et al.*, 1990) durante il quale avviene la deposizione, su fondali fino a 200-300 m di profondità (MALESANI, 1973b). Tali differenze garantirebbero l'isolamento riproduttivo da *S. trutta* (GANDOLFI *et al.*, 1991). A livello morfologico e meristico si riscontrano però tra i due taxa solo differenze limitate (MELOTTO e ALESSIO, 1990) e di difficile utilizzo pratico per il riconoscimento: modeste variazioni sono osservabili nei valori medi per molti caratteri morfologici e meristici (BEHNKE, 1972) e la livrea è molto simile. (TORTONESE, 1970; MALESANI, 1973a; GANDOLFI *et al.*, 1991). L'unico carattere diagnostico certo, e tuttavia di uso ovviamente limitato ad alcune classi di età, è la dimensione massima raggiun-

gibile (MELOTTO e OPPI, 1987; GANDOLFI *et al.*, 1991). A dimostrazione della difficoltà e divergenza di opinioni riguardo alla classificazione su base morfologica del carpione, vanno ricordati i recenti dati di DELLING (2002), che collocano il carpione più vicino a *S. salar* che a *S. trutta*.

Le analisi genetiche condotte da diversi Autori sul genere *Salmo* hanno talvolta incluso, seppure in numero limitato, alcuni campioni di carpione (BERNATCHEZ *et al.*, 1992; GIUFFRÀ *et al.*, 1994, 1996; PATARNELLO *et al.*, 1994; ANTUNES *et al.*, 2002; PRESA *et al.*, 2002). A seconda dei marcatori molecolari analizzati in tali studi, sono state formulate ipotesi diverse, talvolta contrastanti, per spiegare la collocazione sistematica e l'evoluzione di questo taxon (Tab. I). In linea generale, il carpione, così come la morpha *lacustris*, non sarebbe riconducibile in modo univoco ai gruppi aploipici/genotipici definiti per *S. trutta* su base genetica (ceppi ATLANTICO, DANUBIANO, MEDITERRANEO, ADRIATICO e MARMORATA) (BERNATCHEZ *et al.*, 1992; BERNATCHEZ e OSINOV, 1995).

Il presente lavoro si propone di ampliare le informazioni disponibili sulla variabilità genetica di *S. carpio* per contribuire a chiarirne sia la posizione sistematica che le relazioni evolutive. L'analisi si estende, per confronto, al complesso *S. trutta* e, in particolare, a *S. t. trutta* m. *lacustris*, da cui potrebbe essersi originato il carpione in condizioni di simpatia (D'ANCONA e MERLO, 1959).

MATERIALI E METODI

Tra il 2002 e il 2003, sono stati campionati 38 esemplari di carpione, nel Lago di Garda, e 20 campioni di *S. trutta* riconducibili sulla base del fenotipo alla

Tab. I. Autori, numero di individui di carpione analizzati, marcatori utilizzati e diverse ipotesi formulate sull'origine del carpione del Garda.

Autori	N	Marcatori	Ipotesi formulate
BERNATCHEZ <i>et al.</i> , 1992 e GIUFFRÀ <i>et al.</i> , 1994	8; 16	mtDNA D-loop (5' e 3'), Cyt b e ATPase sub.VI	semplice morfotipo di origine recente e polifiletica.
PATARNELLO <i>et al.</i> , 1994	3	mtDNA Cyt b e rDNA 16S	nessuna significativa diversità rispetto a <i>S. trutta</i> .
GIUFFRÀ <i>et al.</i> , 1996	15	47 loci enzimatici (20 enzimi) di cui 24 polimorfici	posizione filogenetica diversa a seconda del metodo di analisi adottato: Hp1: ibrido tra <i>S. marmoratus</i> e <i>S. t. fario</i> ; Hp2: <i>S. carpio</i> e <i>S. t. lacustris</i> sono 2 fenotipi di una stessa popolazione.
PRESA <i>et al.</i> , 2002	1*	rDNA ITS1	sequenza rME1 identica ad alcuni campioni spagnoli (per i quali non si conosce l'aplotipo mitocondriale) appartenente a un gruppo mediterraneo (rME).
ANTUNES <i>et al.</i> , 2002	2	TF (transferrin) (precedente -mente analizzato con allozimi)	<i>S. carpio</i> sarebbe originato per ibridazione introgressiva da <i>S. t. marmoratus</i> ma con un recente flusso genico tra il Lago di Garda e il Kadori River (Black Sea).

* il nome *S. carpio* non viene menzionato e si fa invece riferimento a *S. trutta*, popolazione Garda, con aplotipo MtDNA AD-MA-ME precedentemente analizzato da BERNATCHEZ *et al.*, 1992.

morpha *lacustris*, in parte nel Lago di Garda e in parte alla foce del fiume Sarca. Per ciascuno dei campioni, una porzione di tessuto è stata prelevata dalla pinna caudale e preservata in alcool etilico 96 % a 4 °C. Il DNA totale è stato isolato mediante il protocollo di estrazione messo a punto da ALJANABI e MARTINEZ (1997), seguito da trattamento con RNAase A (0,01 ng/μL).

Per ogni individuo, 1 μL di estratto è stato utilizzato come *template* per la reazione di amplificazione della regione di controllo (D-loop) del mtDNA, utilizzando i primer LN20 (5'-ACCACTAGCACCCAAAGCTA-3') e HN20 (5'-GTGTTATGCTTTAGTTAAGC-3') (SUAREZ *et al.*, 2001). La PCR è stata condotta su un thermal cycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), secondo le condizioni di reazione indicate da SUAREZ *et al.* (2001), sia nel profilo termico che nelle concentrazioni della miscela di reazione (volume totale di 12 μL).

Due aliquote degli amplificati, purificati mediante reazione enzimatica EXO-SAP (http://bmr.cribi.unipd.it/bmr_ita/dna.html), sono state sequenziate utilizzando 3,2 pmol dei due primer (LN20 e HN20) già utilizzati in PCR, al fine di ottenere la lettura della sequenza su entrambi i filamenti della regione amplificata. La reazione di sequenziamento è stata effettuata presso il Servizio di Sequenziamento di DNA del CRIBI - Università di Padova, utilizzando il kit di reazione Big Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), secondo i protocolli suggeriti dal produttore. La corsa di sequenziamento è stata operata su sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 a 16 capillari o ABI PRISM 3730XL a 96 capillari (Applied Biosystems).

Le sequenze ottenute per i due filamenti di ciascun individuo sono state unite ad ottenere una unica sequenza corrispondente all'intera lunghezza del frammento amplificato. Le sequenze così ottenute per tutti gli individui sono state allineate utilizzando CLUSTAL X (THOMPSON *et al.*, 1997).

L'analisi filogenetica è stata compiuta utilizzando il software PAUP* 4.0b10 (SWOFFORD, 2003), con i criteri di Massima Parsimonia (MP), di Distanza secondo l'algoritmo di Neighbor Joining (NJ) e di Maximum Likelihood (ML), a partire dall'allineamento completo o da una selezione delle sequenze comprendente tutti gli aplotipi individuati nel presente studio ed altri aplotipi rinvenuti, in letteratura, in *S. trutta*.

L'analisi di MP è stata condotta considerando i gap (inserzioni/delezioni) come un quinto stato nucleotidico, mentre nei metodi di NJ e ML i modelli evolutivi significativamente più adatti ai dati, secondo un test gerarchico di Likelihood Ratio (hierarchical Likelihood Ratio Test - hLRT) o secondo il Criterio Informativo

di Akaike (Akaike Information Criterion - AIC) sono stati scelti utilizzando il programma MODELTEST (POSADA e CRANDALL, 1998) e impostati in PAUP*. I livelli di confidenza della topologia degli alberi filogenetici così ottenuti sono stati stimati mediante tecnica di Bootstrap, su 1000 repliche, e utilizzando gli stessi criteri impostati per la costruzione degli alberi.

Mutazioni ricorrenti alle stesse posizioni nucleotidiche (omoplasia) non sono rare nella regione ipervariabile del mtDNA e, a fronte di ciò, la ricostruzione di un albero evolutivo secondo i criteri e le assunzioni dei metodi tradizionali di analisi filogenetica è spesso impossibile. Per questa ragione i dati sono stati ulteriormente analizzati con TCS (CLEMENT *et al.*, 2000), che, secondo un metodo statistico di parsimonia (TEMPLETON *et al.*, 1992), consente di rappresentare differenti possibili alberi in un singolo network filogenetico, permettendo così di individuare le aree di ambiguità, dovute a omoplasia, in forma di "loop" (VERNESI *et al.*, 2002).

RISULTATI

Il sequenziamento effettuato con i due primer LN20 e HN20 ha permesso di ottenere sequenze di lunghezza di circa 540 e 430 pb rispettivamente. Per entrambi i filamenti, la qualità del segnale di sequenza è risultata nettamente peggiorata e difficilmente interpretabile a valle di una regione poli-T (poli-A in reverse). La sovrapposizione delle due sequenze per questa regione ha tuttavia consentito di ottenere una sequenza di buona qualità per l'intera lunghezza dell'amplificato.

L'allineamento delle sequenze così ottenute per i campioni analizzati è risultato di lunghezza pari a 960 pb, con 16 posizioni nucleotidiche polimorfiche, di cui 3 non informative e 13 informative secondo il criterio di parsimonia.

Sono stati individuati 4 aplotipi per *S. carpio* (carpio1, 2, 3 e carpio4) e 8 per *S. trutta* m. *lacustris* (lacustris1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e lacustris8). Un aplotipo è condiviso tra i due taxa (carpio4 = lacustris7). In tabella II sono riportate le frequenze relative alla zona di campionamento e le frequenze totali di ciascun aplotipo per i due taxa.

I test statistici hLRT e AIC hanno individuato rispettivamente come più adatti ai dati il modello di Hasegawa-Kishino-Yano (HKY, frequenze nucleotidiche variabili e tassi di transizione e transversione diversi) (HASEGAWA *et al.*, 1985), unitamente a una variazione dei tassi di mutazione tra diverse regioni della sequenza secondo una distribuzione gamma (G) e ad una frazione di siti invariabili (I), e il modello di Tamura-Nei (TrN, frequenze nucleotidiche variabili, tasso di transversione costante e tassi di transizione variabili) (TAMURA e NEI, 1993), unitamente a una frazione di siti

invariabili (I).

La topologia degli alberi ottenuti dalle analisi MP, ML-HKY+I+G e ML-TrN+I è identica (Fig. 1). Tutti gli aplotipi di carpione sono all'interno di un unico cluster, supportato da elevati valori di Bootstrap, costituito da due gruppi principali, anch'essi ben supportati. Entro uno di questi si trova anche l'aplotipo lacustris7, identico all'aplotipo carpio4, e quindi come atteso associato a questo. L'aplotipo lacustris5 risulta basale rispetto al gruppo del carpione ed è significativamente separato da tutti i rimanenti aplotipi di lacustre. I rapporti tra questi ultimi risultano poco risolti, eccetto che per il cluster formato da lacustris2 e

Tab. II. Frequenze degli aplotipi rinvenuti in *S. carpio* e in *S. t. trutta* m. *lacustris*: f Garda = frequenze relative, per taxon, nel Lago di Garda; f Sarca = frequenze relative, per taxon, nel fiume Sarca; fTot = frequenza totale, per taxon; - = frequenze nulle; * = aplotipi rappresentati da un unico esemplare.

Aplotipo	f Garda	f Sarca	fTot
carpio1	0,132	-	0,132
carpio2	0,737	-	0,737
carpio3	0,105	-	0,105
carpio4*	0,026	-	0,026
lacustris1	0,125	0,250	0,200
lacustris2	0,125	0,250	0,200
lacustris3	0,250	0,083	0,150
lacustris4	0,250	0,250	0,250
lacustris5*	0,125	-	0,050
lacustris6*	0,125	-	0,050
lacustris7*	-	0,083	0,050
lacustris8*	-	0,083	0,050

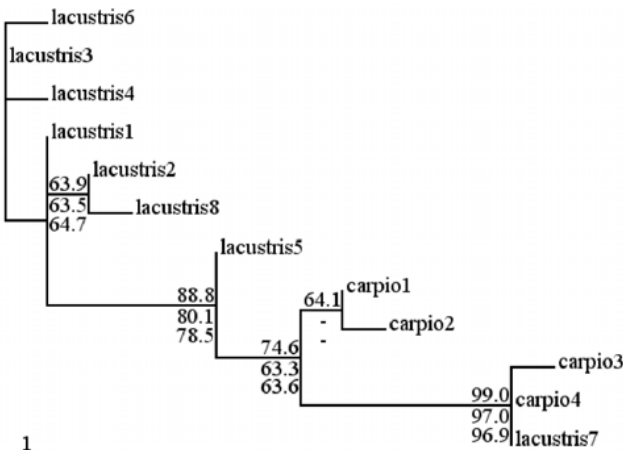


Fig. 1. Albero (MP) senza radice rappresentante le relazioni filogenetiche tra gli aplotipi rinvenuti in *S. carpio* e in *S. trutta* m. *lacustris*. I valori di bootstrap superiori a 50 sono riportati al di sopra (MP) e al di sotto (ML HKY+I+G e ML TrN+I) di ciascun nodo.

lacustris8.

Le analisi NJ basate sull'utilizzo dei due diversi modelli evolutivi selezionati ha fornito due alberi consenso con topologie differenti a seconda del modello esplicitato (alberi non mostrati), ed entrambe molto simili alla topologia ottenuta con gli altri metodi di analisi.

Il confronto con le sequenze della D-loop del complesso *S. trutta* presenti in *GenBank* ha permesso di evidenziare come alcuni degli aplotipi trovati nel presente studio non fossero stati precedentemente individuati (carpio1, carpio3 e lacustris5) o fossero corrispondenti, per la parte comune, a sequenze più brevi (carpio4 = lacustris7, lacustris6 e lacustris8).

Mentre un confronto con i metodi tradizionali di analisi filogenetica tra le sequenze ottenute in questo studio e quelle presenti in Genbank ha fornito solamente alberi la cui topologia risulta poco supportata per i bassissimi valori di bootstrap, la rappresentazione dei dati in forma di network ha permesso di porre in relazione gli individui qui analizzati con le 5 linee di aplotipi mitocondriali ipotizzate in letteratura per *S. trutta* (Fig. 2).

DISCUSSIONE

L'analisi di un numero di campioni superiore ad ogni altro studio precedente, per l'intera lunghezza

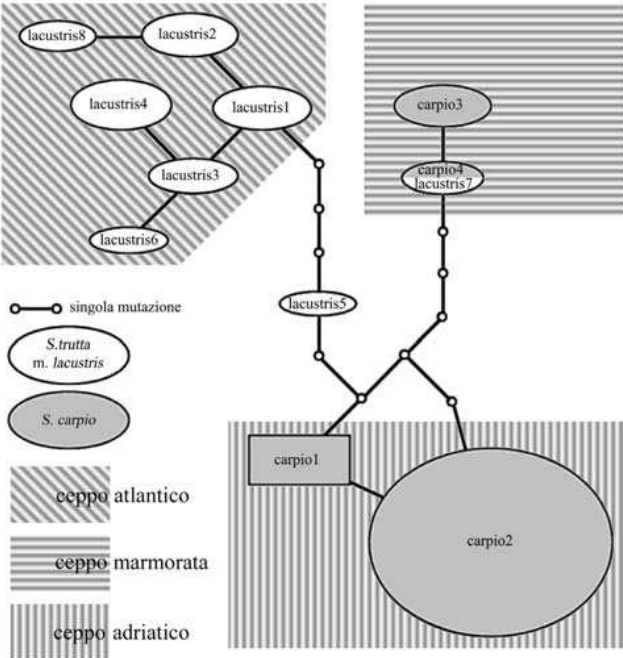


Fig. 2. Network rappresentante le relazioni filogenetiche tra gli aplotipi rinvenuti in *S. carpio* e in *S. trutta* m. *lacustris*. L'aplotipo entro il rettangolo rappresenta l'origine più probabile; la dimensione delle ellissi è proporzionale al numero di individui aventi i diversi aplotipi.

della regione D-loop del mtDNA, ha confermato solo in parte quanto ipotizzato sulla base dei precedenti studi. In *S. carpio* è possibile riconoscere sia aplotipi considerati propri della linea ADRIATICA, più frequenti, che altri tipici della linea MARMORATA. Entro ogni linea si trovano due aplotipi distinti ed uno dei quattro, carpio1, prossimo al gruppo ADRIATICO, è stato qui descritto per la prima volta.

La presenza delle due linee sarebbe spiegabile ipotizzando un'origine di *S. carpio* per introgressione, in epoca recente, nel Lago di Garda. È infatti probabile che ripetuti contatti secondari si siano verificati tra le diverse linee nei periodi interglaciali e che queste abbiano dato origine a popolazioni ibride (BERNATCHEZ, 2001). Il carpione potrebbe essersi originato da una delle popolazioni ibride, rimasta isolata nel Lago di Garda che, come si ipotizza per il bacino del Po, potrebbe aver quindi rappresentato una zona di contatto secondario tra le due linee ADRIATICA e MARMORATA. In generale, la regione Mediterranea-Adriatica contiene la più ricca risorsa di specie endemiche di salmonidi, probabilmente a seguito della storia evolutiva dei *taxa* associata agli eventi di glaciazione del Pleistocene. Così come ipotizzato per le forme endemiche *Salmothymus obtusirostris*, (SNOJ *et al.*, 2002) e *Salmo (Platysalmo) platycephalus* (SUSNIK *et al.*, 2004), anche nel caso del carpione, l'origine recente spiegherebbe l'assenza di una sostanziale differenziazione genetica da *S. trutta*. Tale interpretazione non è in contrasto con l'ipotesi che tali linee costituiscano degli adattamenti locali ossia linee evolutive a sé stanti e come tali degne di conservazione.

I diversi aplotipi individuati in *S. t. trutta* m. *lacustris* appartengono per la maggior parte alla linea ATLANTICA. Questo dato è quasi sicuramente il risultato di immissioni di materiale alloctono a scopo di ripopolamento e può sicuramente essere di supporto alla futura

gestione della fauna ittica del lago. È infatti auspicabile che, oltre alla cessazione dell'immissione di materiale non autoctono, in future campagne ittiogeniche la effettiva autoctonia degli individui prelevati in loco per la spremitura sia saggiata prima del loro utilizzo come riproduttori.

Mentre l'aplotipo lacustris5 risulta di incerta collocazione, lacustris7 (identica a carpio4) è riconducibile al gruppo MARMORATA (Ma2 in GIUFFRÀ *et al.*, 1994). Poiché l'aplotipo lacustris7 è stato individuato in un esemplare campionato nel fiume Sarca, si può escludere che ciò sia determinato dall'erronea classificazione su base morfologica di un carpione come lacustre. Questo aplotipo potrebbe dunque rappresentare la forma autoctona di *S. trutta* m. *lacustris*, che deriverebbe dal ceppo MARMORATA o più probabilmente ne rappresenterebbe semplicemente un fenotipo lacustre.

Lo studio dei rapporti evolutivi di *S. carpio* e *S. t. trutta* m. *lacustris* necessita sicuramente di ulteriori approfondimenti, mediante l'analisi di ulteriori marcatori molecolari su un numero sempre maggiore di campioni. È infatti possibile, come suggerito dai dati qui ottenuti, che una maggiore quantità di informazione di sequenza e un campionamento più esteso portino a una migliore comprensione della storia evolutiva non solo di *S. carpio*, ma anche di *S. trutta* m. *lacustris* e in qualche misura dell'intero complesso *S. trutta*.

RINGRAZIAMENTI

Il presente lavoro è stato svolto nell'ambito del progetto "POPSAL - Diversità genetica e potenzialità di acquicoltura delle popolazioni naturali di salmonidi in Trentino" finanziato dal Fondo Unico della Provincia Autonoma di Trento, e del progetto "Raccolta, caratterizzazione genetica, allevamento e diffusione dei pesci salmonidi autoctoni dei laghi del versante italiano delle Alpi. N. 6-C-65" finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali.

BIBLIOGRAFIA

- ALESSIO G., MELOTTO S., OPPI E., 1990. Indagini fondamentali sulla biologia del carpione, *Salmo carpio* L., del Lago di Garda. Atti III Convegno Nazionale Associazione Ittiologi Italiani Acque Dolci / *Rivista di Idrobiologia*, **29**: 51-68.
- 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.
- ANTUNES, A., TEMPLETON, A. R., GUYOMARD, R., ALEXANDRINO, P., 2002. The role of nuclear genes in intraspecific evolutionary inference: genealogy of the *transferrin* gene in the brown trout. *Molecular Biology and Evolution*, **19** (8): 1272-1287.
- BEHNKE R.J., 1972. The systematics of salmonid fishes of recently deglaciated lakes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **29**: 639-671.
- 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**: 161-173.
- 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** (2): 351-379.
- BERNATCHEZ, L., OSINOV, A., 1995. Genetic diversity of trout

- (genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. *Molecular Ecology*, **4**: 285-297.
- CLEMENT, M., POSADA, D., CRANDALL, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**: 1657-1619.
- D'ANCONA, U., MERLO, S., 1959. La speciazione nelle trote italiane e in particolare quelle del lago di Garda. *Atti dell'Istituto Veneto di Scienze. Lettere ed Arti*, **117**: 19-26.
- DELLING B., 2002. Morphological distinction of marble trout, *Salmo marmoratus*, in comparison to marbled *Salmo trutta* from river Otra, Norway. *Cybiurn*, **26**: 283-300.
- GANDOLFI G., ZERUNIAN S., TORRICELLI P., MARCONATO A., 1991. *Ipesci delle acque interne italiane*. Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma, 617 pp.
- GIUFFRÀ, 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**: 161-171.
- GIUFFRÀ, E., GUYOMARD, R., FERGUSON, G., 1996. Phylogenetic relations and introgression patterns between incipient parapatric species of Italian brown trout (*Salmo trutta* L. complex). *Molecular Ecology*, **5**: 207-220.
- HASEGAWA, M., KISHINO, H., YANO, T., 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **22**: 160-174.
- IUCN, 2003. IUCN Red List of Threatened Species. www.redlist.org.
- KOTTELAT, M., 1997. European freshwater fishes. *Biologia*, **52**, Suppl. 5: 1-271.
- MALESANI, V., 1973a. Il Carpinone (*Salmo trutta carpio*) del Garda. *Annali dell'Università di Ferrara, Sezione XIII, Anatomia Comparata*, **3**: 125-145.
- MALESANI, V., 1973b. Studio delle distribuzioni e delle aree di riproduzione delle specie ittiche del lago di Garda. *Bollettino di Pesca, Piscicoltura e Idrobiologia*, **28**: 121-193.
- MELOTTO, S., ALESSIO, G., 1990. Biology of carpinone, *Salmo carpio* L., an endemic species of Lake Garda (Italy). *Journal of Fish Biology*, **37**: 687-698.
- MELOTTO, S., OPPI, E., 1987. Stato attuale delle conoscenze sul carpinone, endemismo benacense. Atti II Convegno Nazionale Associazione Ittiologi Italiani Acque Dolci: 239-249.
- PATARNELLO, T., BARGELLONI, L., CALDARA, F., COLOMBO, L., 1994. Cytochrome b and 16S rRNA sequence variation in the *Salmo trutta* (Salmonidae, Teleostei) species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **3** (1): 69-74.
- POSADA, D., CRANDALL, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14** (9): 817-818.
- PRESA, P., PARDO, B.G., MARTINEZ, P., BERNATCHEZ, L., 2002. Phylogeographic Congruence Between mtDNA and rDNA ITS Markers in Brown Trout. *Molecular Biology and Evolution*, **19** (12): 2161-2175.
- RAUNICH, L., BALESTRA, V., MALESANI, V., ZACCANTI, F., 1990. Observation on the reproductive period of the Lake Garda Salmonid Carpinone. *Rivista di Idrobiologia*, **29**: 847-859.
- SNOJ, A., MELKIC, E., SUSNIC, S., MUHAMEDAGIC, S., DOVC, P., 2002. DNA phylogeny supports revised classification of *Salmo* *obtusirostris*. *Biological Journal of the Linnean Society*, **77**: 399-411.
- SUAREZ, J., BATTISTA, L.M., ALMODOVAR, A., MACHORDOM, A., 2001. Evolution of the mitochondrial control region in Palearctic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula. *Heredity*, **87**: 198-206.
- SUSNIC, S., SCHÖFFMANN, J., SNOJ, A., 2004. Phylogenetic position of *Salmo* (*Platysalmo*) *platycephalus* Behnke 1968 from South-Central Turkey, evidenced by genetic data. *Journal of Fish Biology*, **64**: 1-14.
- SWOFFORD, D.L., 2003. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TAMURA, K., NEI, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, **10**: 512-526.
- TEMPLETON, A.R., CRANDALL, K.A., SING, C.F., 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, **132** (2): 619-633.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**: 4876-4882.
- TORTONESE, E., 1970. *Osteichthyes, parte I, Fauna d'Italia*. Vol. X, Edizioni Calderini, Bologna, 545 pp.
- VERNESI, C., PECCHIOLI, E., CARAMELLI, D., TIEDEMANN, R., RANDI, E., BERTORELLE, G., 2002. The genetic structure of natural and reintroduced roe deer (*Capreolus Capreolus*) population in the Alps and central Italy, with reference to the mitochondrial DNA phylogeography of Europe. *Molecular Ecology*, **11**: 1285-1297.