

All.A

STATO DI QUALITÀ DEL POPOLAMENTO ITTICO LUCANO

PREMESSA

Il progetto “Stato di qualità del popolamento ittico lucano - Studio propedeutico all’aggiornamento della Carta Ittica della Regione Basilicata” è finalizzato a migliorare la gestione dei siti interessati da attività di pesca, nonché il recupero delle acque interne.

Per perseguire tali obiettivi si procederà ad attuare il progetto di cui in premessa mediante due Macro Azioni definite come segue:

- **Azione 1** - *Studio propedeutico all’aggiornamento della Carta Ittica della Regione Basilicata*: a cura dell’ARPAB;
- **Azione 2** - *Analisi di caratterizzazione genetica per l’identificazione e la selezione di esemplari di trota mediterranea (Salmo ghigi)* secondo il disciplinare ISPRA: a cura dell’ALSIA.

Il Piano finanziario complessivo per la realizzazione degli interventi, di seguito dettagliati, è il seguente:

Tipologia di costo	Importo Totale	A carico Feamp	A carico Enti	
Azione 1 Studio propedeutico all’aggiornamento della Carta Ittica della Regione Basilicata	€ 38.062,50	€ 35.000,00	€ 3.062,50	ARPAB
Azione 2 Analisi di caratterizzazione genetica per l’identificazione e la selezione di esemplari di trota mediterranea	€ 40.000,00	€ 37.000,00	€ 3000,00	ALSIA
TOTALE	€ 78.062,50	€ 72.000,00	€ 6.062,50	

AZIONE 1 – ARPAB

Studio propedeutico all'aggiornamento della Carta Ittica della Regione Basilicata

L'azione si propone di intraprendere una indagine bibliografica del popolamento ittico dei corpi idrici lucani. A tal fine saranno predisposti gli atti propedeutici all'aggiornamento della carta ittica regionale, documento base del futuro Piano Ittico della Regione Basilicata.

Tematica ambientale	<i>Fauna ittica d'acqua dolce ed eurialina della regione Basilicata</i>
Tipologia corpo idrico	<i>Tutti i bacini idrici della Basilicata</i>
Durata	7 mesi: dal 01/05/2023 al 30/11/2023

La Carta Ittica Regionale è lo strumento di base per la redazione del Piano Ittico Regionale. In Basilicata tale documento è stato realizzato per il quinquennio 1998-2002 ed ha portato alla redazione del primo documento a carattere regionale mai prodotto in una regione del Centro e Sud Italia. Tale documento, approvato dalla Regione Basilicata con D.G.R. n. 1814 del 07 ottobre 2003 e con D.C.R. n. 813 dell'11 maggio 2004., necessita ormai di un aggiornamento essendo passati venti anni.

Con il presente studio si intende fare il punto della situazione del popolamento ittico dei fiumi lucani dal 2009 ad oggi per poter meglio indirizzare i futuri campionamenti finalizzati all'individuazione ed alla protezione delle specie ittiche lucane; si considera come anno di riferimento il 2009, anno dello studio sui Salmonidi in Provincia di Potenza.

Pertanto, saranno raccolte tutte le indagini effettuate nei bacini lucani a partire dal 2009 in poi, realizzate grazie al finanziamento e all'esecuzione di diversi progetti di monitoraggio ambientale messi in campo in Basilicata nell'ambito di piani di tutela, nei piani di monitoraggio AIA, VIA, VIInCA, ecc.

In questo modo si ritiene di poter recuperare i dati relativi alle indagini eseguite nel tempo come ad esempio:

- Zona a salmonidi - Provincia di Potenza (2010)
- Monitoraggio Lago Pantano di Pignola (2015)
- PTA ARPA Basilicata (2017)
- Progetto FEAMP Granchio Blu (2021)
- Progetto FEAMP Alloctoni Monticchio (2021)
- Monitoraggio Lago del Pertusillo (2022)
- Studio quanti-qualitativo dei corridoi ittici nel fiume Sinni con particolare attenzione agli effetti sulla specie anguilla europea (2023, in corso)
- Progetto di biomonitoraggio del Parco del Vulture (2023, in programmazione).

Ovviamente la collazione di questi dati non è sufficiente alla redazione della Carta Ittica Regionale e del Piano Ittico Regionale ma, se opportunamente elaborati e organizzati, essi potranno rappresentare un'ottima baseline sulla quale programmare il prossimo periodo di monitoraggio e studio della fauna ittica della Regione Basilicata dalle sorgenti al mare.

Il prodotto finale del lavoro costituirà dunque la base iniziale per programmare nel prossimo futuro:

- nuovi censimenti ittici, approfondimenti genetici, ecc.
- redazioni dei documenti programmatici (Carta Ittica e Piano Ittico Regionale);
- attuazione di azioni di conservazione (individuazione di zone di protezione speciale, ecc.);
- gestione delle attività antropiche (attività di pesca, ripopolamenti, ecc.).

Parallelamente all'indagine, per garantire uno standard qualitativo elevato delle attività programmatiche che verranno successivamente definite e attuate, risulta fondamentale formare personale regionale, provinciale e operatori delle Associazioni piscatorie fornendo loro informazioni più aggiornate in materia di ittiologia, nonché circa le modalità di campionamento della fauna ittica.

Tale azione generale sarà realizzata attraverso le seguenti attività:

Attività n. 1 - Creazione della baseline

Raccolta, organizzazione e standardizzazione dei dati sulla fauna ittica raccolti dal 2010 ad oggi creazione di un unico database relazionale e georeferenziato, interrogabile e aggiornabile. Per questo primo obiettivo sarà importante coinvolgere tutti gli Enti responsabili dei singoli progetti di monitoraggio susseguitisi negli anni per la condivisione dei dati. Questa baseline costituisce il punto di partenza per le azioni successive.

Importo: € 12.500,00 +IVA

Attività n. 2 – Definizione del Piano di Monitoraggio Ambientale (PMA)

Sulla base del quadro emerso tramite il completamento dell'attività n. 1, verranno individuati i siti ove effettuare nel successivo biennio 2024/2025 mirati campionamenti ittici, necessari per ottenere un quadro esaustivo della distribuzione della fauna ittica su tutto il territorio regionale.

L'attuazione del PMA è indispensabile per la redazione della nuova Carta Ittica Regionale e del nuovo Piano Ittico della Regione Basilicata.

Importo: € 3.125,00 +IVA

Attività n. 3 – Campionamento per le indagini genetiche

Alla luce delle ultime pubblicazioni scientifiche nel campo dell'ittiologia molecolare, per poter definire e attuare le politiche gestionali più idonee, diventa necessario approfondire le conoscenze su alcune specie ittiche presenti sul territorio lucano attraverso analisi genetiche delle specie autoctone lucane e degli endemismi individuati nel territorio regionale.

Gli esemplari già campionati nel corso di recenti studi realizzati con ALSIA nell'ambito del FEAMP 2014-2020, e attualmente stoccati all'interno di incubatoi ittici lucani, saranno oggetto di ulteriori analisi genetiche, oggetto dell'azione 2 sotto la supervisione dell'ARPAB per quanto concerne i campionamenti.

Importo: € 2.459,00 +IVA

Attività n. 4 – Organizzazione dei seminari

Per una buona riuscita del progetto è fondamentale condividere con gli stakeholder i raccolti e le elaborazioni eseguite attraverso le prime 3 attività. Per tale ragione saranno coinvolti innanzitutto i tecnici regionali e provinciali nonché gli operatori del settore, le associazioni di acquacoltori e pescatori, le cooperative della pesca e le associazioni accreditate nel mondo dell'associazionismo ambientale e piscatorio (FIPSAS etc..) che si pensa di coinvolgere per la futura programmazione ittica 2024/2026.

E' fondamentale formare soprattutto il personale sopra definito affinché acquisisca tutte le nozioni necessarie per poter comprendere e gestire l'enorme pool di informazioni che avranno a disposizione. A tal fine l'ARPAB organizzerà almeno 4 seminari sul territorio che avranno soprattutto la funzione formativa e divulgativa e che tratterà i principali aspetti dell'ittiologia: biologia delle specie ittiche, ecologia, tassonomia, genetica delle popolazioni, genetica della conservazione.

Importo: € 13.115,00 +IVA

Costi progettuali

QUADRO ECONOMICO A_1				
ATTIVITA'	DESCRIZIONE	TOTALE	FEAMP	ARPAB
Attività n. 1	Creazione della baseline	15.250,00 €	€ 14.250,00	€ 1.000,00
Attività n. 2	Definizione del Piano di Monitoraggio Ambientale (PMA) da eseguire nel periodo 2024/2026	3.812,50 €	€ 3.250,00	€ 562,50
Attività n. 3	Campionamento specie per successiva analisi	3.000,00 €	€ 2.500,00	€ 500,00
Attività n. 4	Organizzazione di un seminario formativo per tecnici regionali	16.000,00 €	€ 15.000,00	€ 1.000,00
		38.062,50 €	€ 35.000,00	€ 3.062,50

AZIONE 2 – ALSIA

Analisi di caratterizzazione genetica per l'identificazione e la selezione di esemplari di trota mediterranea (*Salmo ghigi*)

Le analisi di caratterizzazione genetica di esemplari di trota da destinare ad attività di ripopolamento saranno effettuate dal Centro Ricerche Metapontum Agrobios dell' Alsia (CRMA-alsia) sul DNA estratto da campioni di frammenti di pinna adiposa, che verranno recapitati presso i suoi laboratori. Il campionamento presso l'allevamento e l'identificazione univoca dei singoli esemplari di trota dovranno essere svolti sotto la responsabilità di soggetti diversi da CRMA-alsia ovvero di personale competente dell'ARPAB come previsto al punto 3 dell'Azione 1.

Il profilo genetico di esemplari di trota mediterranea (*Salmo ghigi*), verrà individuato mediante confronto con trote di sicura origine atlantica e trote mediterranee (trote mediterranee certificate come tali da terzi), utilizzate queste ultime come controllo positivo per la stima del livello di purezza delle trote oggetto di indagine. L'utilizzo dei due controlli, trote di sicura origine atlantica e trote mediterranee, nelle indagini molecolari, è fortemente suggerito dall'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA, Rif. Int. 67169/2022 e 9425/2023).

Per l'inserimento del controllo positivo (trota mediterranea) nelle attività della presente scheda progettuale, il CRMA-alsia ha la necessità di essere supportato nell'accesso a tale materiale da utilizzare come riferimento nell'indagine.

Le analisi molecolari, riportate nelle attività di seguito elencate, prevedono l'impiego di diversi marcatori molecolari, nucleare (LDH-C1), mitocondriale (D-Loop) e microsatelliti, come indicato da ISPRA (Rif. Int. 67169/2022 e 9425/2023).

Per la supervisione delle attività proposte e da realizzare nella presente scheda progettuale, si propone l'istituzione di un comitato tecnico-scientifico istituito presso CRMA -alsia composto da 2-3 esperti di ittiologia di acque dolci, da individuare nel panorama italiano. Si prevede il ricorso alla consulenza e intervento del comitato tecnico scientifico in 3 fasi del progetto:

- a) inizio progetto, per la validazione del piano sperimentale proposto;
- b) nel corso del suo svolgimento per una verifica delle attività in itinere;
- c) fine progetto per la convalida e certificazione dei risultati ottenuti.

L'intervento si articolerà con riunioni del comitato tecnico-scientifico mediante tavoli di confronto con tecnici del CRMA-alsia tenuti o presso la sede del Centro ricerche o in remoto con l'ausilio di piattaforme ad hoc.

Attività a. 1

Estrazione del DNA genomico da campioni di trota

In questa fase si prevede l'estrazione di DNA genomico da frammenti di pinna adiposa prelevati da 90 esemplari di trota così suddivisi:

- ✓ Gruppo A: 40 esemplari di sicura origine Atlantica e purezza provenienti da allevamenti;
- ✓ Gruppo B: 50 esemplari, provenienti da allevamenti di riferimento per la regione Basilicata, da impiegare come riproduttori nelle attività di ripopolamento.

Attività a. 2

Analisi con il marcatore nucleare LDH-C1

Per il marcatore nucleare LDH-C1, (lattato deidrogenasi) l'analisi verrà condotta su una regione di circa 440 bp in cui la presenza di una differenza nucleotidica (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) consente di discriminare la variante atlantica da quella mediterranea.

Il rilievo della differenza nucleotidica (SNP) verrà effettuato come riportato da McMeel et al., (2001) ovvero amplificazione prima della regione di 440 bp con i primer specifici della regione target e digestione poi dell'amplificato con l'enzima di restrizione BslI.

Il pattern elettroforetico dei 90 campioni di trota consentirà la discriminazione di eventuali

- ✓ individui eterozigoti a tale locus (*90/*100) e la selezione di
- ✓ individui omozigoti per la variante atlantica (*90/*90) attesi nel gruppo di trote di sicura origine atlantica (gruppo A) e
- ✓ esemplari omozigoti per la variante mediterranea (*100/*100) desiderati nel gruppo di trote da destinare ad attività di ripopolamento (gruppo B).

Attività a. 3

Analisi con il marcatore mitocondriale D-Loop

Per il marcatore mitocondriale della regione di controllo D-Loop, le analisi saranno condotte come descritto da Cortey and Garcia-Marin (2002) che prevede l'amplificazione di un frammento di circa 1000 bp della regione di controllo D-Loop e sequenziamento Sanger per l'individuazione degli aplotipi mitocondriali.

L'analisi dei dati di sequenziamento consentirà di assegnare a ciascuno dei 90 esemplari di trota l'aplotipo mitocondriale. Nel caso del gruppo di trote di sicura origine atlantica (gruppo A) è atteso l'aplotipo atlantico (AT), nel gruppo di esemplari da destinare ad attività di riproduzione e quindi ripopolamento (gruppo B), gli aplotipi desiderati sono quelli mediterraneo (ME) e adriatico (AD).

Attività a. 4

Selezione di esemplari di trota

Sulla base dei risultati ottenuti con il marcatore nucleare LDH-C1 e mitocondriale D-Loop, si procederà alla selezione di:

- ✓ individui (max n.30) *90/*90 al locus nucleare LDH-C1 e aplotipo mitocondriale (DLoop) atlantico (AT) dal gruppo di trote di sicura origine atlantica (gruppo A);
- ✓ individui (max n.30) *100/*100 al locus nucleare LDH-C1 e aplotipo mitocondriale (DLoop) mediterraneo (ME) o adriatico (AD) dal gruppo di trote da impiegare come riproduttori (gruppo B).

Gli esemplari di trota così selezionati verranno successivamente sottoposti ad ulteriori analisi con i marcatori molecolari microsatelliti per l'individuazione del profilo genetico di interesse (trota mediterranea con $q \geq 98\%$).

Attività a. 5

Analisi con i microsatelliti

I campioni di trota selezionati nell'attività a.4 (max 60 individui) verranno successivamente sottoposti ad analisi con i 15 microsatelliti indicati da ISPRA (nota con Rif. Int. 67169/2022 e 9425/2023). Nelle analisi di genotipizzazione verranno inseriti, come controlli positivi, almeno 3 campioni di trota con background genetico mediterraneo certificato come tale e recuperato da soggetti terzi.

Le amplificazioni con i primer marcati verranno effettuate secondo le indicazioni bibliografiche per ciascun microsatellite. La separazione elettroforetica su capillare e l'analisi con appropriati software consentirà il rilievo del numero e delle dimensioni degli alleli prodotto da ciascun microsatellite in ogni individuo di trota.

I dati saranno raccolti ed opportunamente organizzati per le analisi.

Attività a. 6

Analisi bioinformatica e statistica dei dati e selezione degli esemplari di trota da impiegare come riproduttori

I dati prodotti con le 3 classi di marcatori molecolari (LDH-C1, D-Loop e microsatelliti) verranno successivamente sottoposti ad elaborazione congiunta con appropriati software di analisi che consentiranno, grazie alla presenza dei campioni di riferimento, trote di sicura origine Atlantica e trote mediterranee certificate da terzi, di assegnare/stimare per ciascun campione di trota del gruppo B il suo livello di purezza o di introgressione. Solo gli esemplari di trota che a seguito delle analisi presenteranno le seguenti caratteristiche potranno essere classificati come trota mediterranea (*Salmo ghigii*) ed utilizzati come riproduttori:

- ✓ genotipo LDH-C1: *100/*100;
- ✓ Aplotipo D-Loop: AD (adriatico) o ME (mediterraneo);
- ✓ Genoma mediterraneo (STR): $q \geq 98\%$

Attività a. 7

Stesura del Report

I risultati prodotti nel corso del progetto verranno raccolti e presentati in una relazione finale. In tale relazione verranno riportati i dati ottenuti con ciascuna classe di marcatore molecolare per singolo campione analizzato e l'elaborazione congiunta dei dati finalizzata alla selezione dei riproduttori.

Costi progettuali

Il costo previsto per eseguire le attività è pari a € 40.000, articolato nelle seguenti voci di costo:

Tabella 1. Costi del progetto

Tipologia di costo	Totale	FEAMP	ALSIA
Personale	17.000 Euro	14000	3000
Materiale di consumo	6.000 Euro	6000	
Servizi	5.300 Euro	5.300	
Consulenza tecnico-scientifica	10.000 Euro	10000	
Spese generali	1.700 Euro	1.700	
Totale	40.000 Euro	37.000	3.000

Tempi

Per la realizzazione dell'Azione 2 sono previsti 4 mesi dalla consegna di tutti i campioni di trota da analizzare con i 3 marcatori molecolari, compresi i campioni di trota mediterranea certificati come tali da terzi.