



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTA' DI AGRARIA, MEDICINA VETERINARIA E MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria

Tesi di laurea in Biotecnologie per l'Alimentazione

*FRODI ALIMENTARI PER SOSTITUZIONE DI SPECIE: IDENTIFICAZIONE DI
SPECIE IN PRODOTTI ITTICI MEDIANTE TECNICA PYROSEQUENCING™*

Relatore:

Dott. *Mattia Cecchinato*

Correlatori:

Dott. *Giovanni Cattoli* e Dott. *Cristian De Battisti*

(Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie)

Laureanda:

Busato Sara

Matricola n. 585989

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

RIASSUNTO

Nel panorama agroalimentare, il settore ittico figura tra i settori commerciali maggiormente soggetti a frodi di sostituzione di specie poichè contraddistinto da una diversificazione dell'offerta estremamente vasta. E' fondamentale identificare le specie oggetto di frode in maniera inequivocabile e rapida per le implicazioni sanitarie oltre che commerciali, connesse ad un'etichettatura non corretta. Tuttavia l'identificazione morfologica, unica tecnica attualmente valida a livello legale in Italia, non è applicabile su prodotti ittici lavorati e trasformati, i quali vengono tuttavia preferiti dal consumatore odierno perché più pratici da utilizzare.

L'utilizzo di metodiche biomolecolari può risolvere il problema legato all'identificazione di specie in prodotti lavorati e trasformati, dato che la molecola bersaglio, il DNA, oltre a consentire una discriminazione molto specifica tra specie, è stabile ai numerosi trattamenti che avvengono durante la trasformazione dei cibi; inoltre l'automazione associata alle tecniche molecolari le rende adatte ad effettuare analisi su larga scala in modo automatizzato, rapido ed economico.

Lo scopo del presente lavoro è stato lo sviluppo di un metodo identificativo di specie ittiche mediante Pyrosequencing™, una tecnica biomolecolare di sequenziamento in tempo reale del DNA, a partire da amplificati di PCR. Si è scelto il Pyrosequencing™ in quanto coniuga maggiori automazione, rapidità, economicità e scalabilità rispetto al metodo di sequenziamento tradizionale di Sanger. Tuttavia, in quanto recente, non è ancora stato validato per indagini di routine; il limite principale è tuttora costituito dal *read-length* di Pyrosequencing™, che difficilmente supera le 60 basi, tuttavia gode del vantaggio di poter leggere la sequenza già a ridosso del primer di sequenziamento.

Il lavoro si è concentrato sulla discriminazione di specie in due gruppi principali di pesci entrambi di largo interesse commerciale ed abitualmente commercializzati come lavorati e trasformati, i Clupeiformi ed i Pleuronectiformi, e ha previsto due indagini: l'Indagine primaria e l'Indagine secondaria. L'**Indagine primaria** ha avuto come target il gene mitocondriale codificante per l'RNA ribosomiale 16S ed è stata efficace nella discriminazione della maggioranza delle specie considerate, anche su prodotti trasformati; un'**Indagine secondaria** su target genomici caratterizzati da maggior variabilità intraspecifica si è tuttavia resa necessaria per discriminare alcune specie filogeneticamente molto affini le cui sequenze si sono rivelate identiche nell'Indagine primaria.

In un futuro prossimo, la disponibilità di sempre più numerose sequenze ed il miglioramento della tecnologia Pyrosequencing™ a livello di *read-length*, potrebbero favorire l'estensione della stessa a molti laboratori che si occupano di frodi alimentari per sostituzione di specie.

Parole chiave: Frodi alimentari, Pyrosequencing™, Identificazione di specie, Clupeiformi, Pleuronectiformi.

ABSTRACT

The fish market is worldwide very subjected to food frauds by species substitution. This is due to its enormous variety of species supply. Identifying species substitution in the fishing industry and market is very important not only from a commercial point of view but also for its possible ecological and toxicological consequences.

The only one technique that is nowadays legally recognized for fish identification in Italy is the morphological characterization, but it is not applicable to processed products, which are nevertheless responsible for a great market share because of their practicalness.

Biomolecular techniques can greatly improve fish species identification because, beside being very specific, they can rely on a high degree of automation and on the stability of the target molecule, that is the DNA. Indeed DNA is very stable to every kind of treatment that is used in the food processing industry.

The aim of this work is implementing the Pyrosequencing™ technique as a fish species identification method in order to improve species substitution identification and thus food frauds management .

Pyrosequencing™ has been chosen because it is more rapid, scalable and economic than the traditional Sanger sequencing method. Nevertheless, though it is a relatively recent technique, it has't yet been validated in the routine analysis. Its main limit consists on its read-length, that hardly exceeds 60 base pairs, but on the other hand the read-length is already possible since the 1st nucleotide downstream the sequencing primer.

The focus of this work has been in the discrimination of two main groups of fish species involved in the fish processing industry: Clupeiformes and Pleuronectiformes.

The aim has been fulfilled thanks to two sequential analysis called Primary analysis and Secondary analysis. The Primary analysis has been performed on the 16S gene and has been efficient, even when applied to processed products, in discriminating the majority of fish frauds concerning the species which has been taken into account. The Secondary analysis has been performed on genomic target regions that were more interspecific variable than the 16S gene, in order to discriminate the species which sequences came out to be identical during the Primary analysis.

In the near future, the availability of a growing number of sequences and the improvement of the read-length in Pyrosequencing™ technology will open the path to the use of Pyrosequencing™ in many laboratories concerned with the identification of fish frauds by species substitution.

Key words: Food frauds, Pyrosequencing, Species identification, Clupeiformes, Pleuronectiformes.

INDICE

1.	<u>INTRODUZIONE</u>	<u>pg. 1</u>
1.1	IMPORTANZA DELL'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE ITTICHE	pg. 1
1.2	QUADRO NORMATIVO	pg. 2
1.1.1	Normativa riguardante la classificazione dei prodotti ittici	pg. 2
1.1.2	Normativa riguardante l'etichettatura dei prodotti ittici	pg. 3
1.3	LIMITI DELLE METODICHE D'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE	pg. 5
1.4	IL PYROSEQUENCING	pg. 8
1.4.1	Principi del <i>pyrosequencing</i>	pg. 8
1.4.2	Implementazione e performance del <i>pyrosequencing</i>	pg. 11
1.5	DNA MITOCONDRIALE E SUO USO NELL'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE	pg. 16
1.6	SPECIE ITTICHE OGGETTO DELL'ANALISI	pg. 17
1.6.1	Clupeiformi	pg. 17
1.6.2	Principali frodi di sostituzione a carico dei Clupeiformi	pg. 20
1.6.3	Pleuronectiformi	pg. 23
1.6.4	Principali frodi di sostituzione a carico dei Pleuronectiformi	pg. 26
1.6.5	Perciformi	pg. 29
1.6.6	Frodi coinvolgenti il Pangasio	pg. 31
2.	<u>SCOPO DELLA TESI</u>	<u>pg. 32</u>
3.	<u>MATERIALI E METODI</u>	<u>pg. 33</u>
3.1	DISEGNO DEI PRIMER DI PCR E DI SEQUENZIAMENTO	pg. 33
3.1.1	Disegno dei primer per l'Indagine primaria	pg. 34
3.1.2	Disegno dei primer per le indagini secondarie	pg. 42
3.2	CAMPIONI ITTICI ANALIZZATI	pg. 48
3.3	ESTRAZIONE DEL DNA	pg. 49
3.4	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) SUI CAMPIONI DI DNA ESTRATTO	pg. 50
3.5	VISUALIZZAZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE	pg. 52

3.6	PYROSEQUENCING™ SUGLI AMPLICONI	pg. 52
3.6.1	Reagenti e materiali di consumo necessari alla preparazione dei campioni per il Pyrosequencing™	pg. 53
3.6.2	Step preliminari alla preparazione dei campioni	pg. 53
3.6.3	Preparazione dei campioni per Pyrosequencing™	pg. 54
3.6.4	Reazione di <i>pyrosequencing</i>	pg. 56
3.7	ANALISI DELLE SEQUENZE	pg. 57
3.8	SEQUENZIAMENTO, CON METODO CLASSICO, DI ALCUNI CAMPIONI PER L'OTTENIMENTO DI SEQUENZE DI RIFERIMENTO	pg. 57
4.	<u>RISULTATI</u>	<u>pg. 60</u>
4.1	INDAGINE PRIMARIA, CONDOTTA SUL GENE 16S	pg. 61
4.1.1	Amplificazione del gene 16S	pg. 61
4.1.2	Pyrosequencing™ sugli amplificati del gene 16S dei Clupeiformi e analisi delle pyrosequenze mediante software Identifire™	pg. 64
4.1.3	Sequenziamento con metodo classico sul gene 16S	pg. 68
4.1.4	Analisi BLAST sulle pyrosequenze del gene 16S dei Clupeiformi	pg. 69
4.1.5	Pyrosequencing™ sugli amplificati del gene 16S dei Pleuronectiformi ed altri pesci ed analisi delle pyrosequenze tramite software Identifire™	pg. 74
4.1.6	Analisi BLAST sulle pyrosequenze del gene 16S dei Pleuronectiformi ed altri pesci	pg. 76
4.2	INDAGINE SECONDARIA PER LA DISCRIMINAZIONE DI <i>ENGRAULIS ENCRASICOLUS</i> TRAMITE UNA PORZIONE GENOMICA VARIABILE	pg. 81
4.2.1	Amplificazione di <i>Engraulis encrasicolus</i> con impiego dei primer EngraJEF ed EngraJER	pg. 81
4.2.2	Pyrosequencing™ sui campioni 106 e 107 di engraulidi tramite il primer EngraJES ed analisi delle pyrosequenze tramite software Identifire™	pg. 81
4.2.3	Sequenziamento con metodo classico sulla porzione genomica discriminante di <i>Engraulis encrasicolus</i>	pg. 83
4.2.4	Analisi BLAST sulle pyrosequenze di engraulidi ottenute con il primer EngraJES	pg. 84
4.3	INDAGINE SECONDARIA PER LA DISCRIMINAZIONE DELLE SPECIE APPARTENENTI AL SUBORDINE PLEURONECTOIDEI, APPLICATA AL GENE CYTB	pg. 86

4.3.1	Amplificazione del gene CYTB dei pleuronectoidei	pg. 86
4.3.2	Pyrosequencing™ sugli amplificati del gene CYTB dei pleuronectoidei e analisi delle pyrosequenze tramite Identifire™	pg. 87
4.3.3	Sequenziamento con metodo classico sul gene CYTB dei Pleuronectoidei	pg. 88
4.3.4	Analisi BLAST sulle pyrosequenze del gene CYTB dei Pleuronectoidei	pg. 90
5.	<u>DISCUSSIONE</u>	<u>pg. 94</u>
6.	<u>CONCLUSIONI</u>	<u>pg. 103</u>
7.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>pg. 104</u>
	<u>ALLEGATI</u>	<u>pg. 110</u>

ELENCO SIGLE ed ABBREVIAZIONI

Art: Articolo

BLAST: *Basic Local Aligment Sequence Tool*

Cap.: capitolo

C.E.: Comunità Europea

CCD: *Charged Coupled Device*

CYTB: CITOCROMO B

D.M. : Decreto Ministeriale

DO: Distribuzione Organizzata

FAO: *Food and Agriculture Organization*

GDO: Grande Distribuzione Organizzata

IEF: IsoElettroFocalizzazione

IUBMB: *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

IZSve: Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Kb: chilobasi

MI: *Max Ident*

MIPAAF: Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali

NAS: Nucleo Anti-Sofisticazioni

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

nt: nucleotide

par.: paragrafo

pb: paia di basi

PCR: *Polymerase chain Reaction*

Reg.: Regolamento

sez.: sezione

SNP: *Syngle Nucleotide Polymorphysm*

SQA: *SeQuence Analysis*

UE: Unione Europea

1. INTRODUZIONE

In questi ultimi anni la richiesta di prodotti della pesca è notevolmente aumentata tanto che l'andamento dei prodotti ittici ha registrato una tendenza alla crescita nei mercati di tutto il mondo e rappresenta oggi una delle voci più importanti del contesto produttivo alimentare. Questo è dovuto a diversi fattori:

- alla crescente convinzione delle maggiori proprietà nutritive dei prodotti ittici rispetto alle carni di consumo tradizionale;
- all'innovazione tecnologica associata a produzione e distribuzione, che ha favorito una migliore qualità e freschezza dei prodotti a livello di commercializzazione, ed una maggiore disponibilità degli stessi a livello della grande distribuzione organizzata (GDO);
- alla crescente offerta di nuove specie ittiche disponibili sul mercato.

In particolare questa vasta diversificazione dell'offerta associata al settore ittico lo espone, più facilmente rispetto ad altri comparti produttivi, a frodi commerciali da sostituzione di specie pregiate con altre di minor valore. Questo tipo di frode, la più comune nel settore ittico, è denominata, in gergo legale, "falsificazione".

In generale, una frode che si verifichi in un comparto alimentare è denominata "frode alimentare" e costituisce un atto in base al quale viene posto in commercio un alimento "diverso" da quello atteso dal consumatore, sorprendendone la buona fede e configurando una diminuzione del valore della merce, economico e/o nutritivo.

1.1 IMPORTANZA DELL'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE ITTICHE

Attualmente la diminuzione delle risorse di pesca nelle acque europee continua a far registrare da anni un rapporto deficitario negli scambi dei prodotti ittici con l'estero, questo anche per effetto della globalizzazione, che vede il mondo asiatico e quello africano in una veste concorrenziale. In particolare l'Italia dimostra una spiccata subordinazione commerciale estera, in quanto importa oltre il 50% dei prodotti ittici. Questo fatto, in concomitanza all'aumento delle segnalazioni, dovuto ai cambiamenti climatici, di fauna ittica "Lessepsiana" nel Mar Mediterraneo (pesci che dal Mar Rosso o dall'Oceano Indiano risalgono fino al Mediterraneo attraverso il Canale di Suez) fa sì che vengano introdotte ogni giorno sui nostri mercati nuove specie alloctone poco conosciute. Pertanto gli ispettori sanitari quali veterinari, vigili sanitari, carabinieri dei NAS, ufficiali delle capitanerie di Porto, chiamati a tutelare il consumatore riguardo alla

salubrità ad alla corretta identificazione degli alimenti, si trovano sempre più spesso in difficoltà nel riconoscimento di specie.

Il riconoscimento di specie assume un'importanza sempre maggiore non solo per la rilevazioni di frodi commerciali da sostituzione di specie, e le implicazioni economiche correlate, ma anche per le molteplici implicazioni di carattere ecologico e sanitario in quanto può capitare che specie potenzialmente tossiche, prima assenti nei nostri mari, entrino nei nostri circuiti commerciali.

In ambito sanitario, la possibilità di identificare con sicurezza le specie potenzialmente tossiche od allergeniche (vari crostacei e molluschi), oltre alle specie provenienti da areali inquinati o non controllati per la presenza di biotossine termoresistenti, assume un gran significato dal punto di vista della sicurezza alimentare.

In ambito ecologico-legale, il corretto riconoscimento favorisce la tutela di specie protette ed il rispetto del fermo biologico.

E' inoltre il consumatore stesso a richiedere di accedere a prodotti sicuri dal punto di vista igienico sanitario e, soprattutto, "sicuri" riguardo alla provenienza e alle garanzie di sostenibilità, manipolazione e gestione con procedure atte a garantire qualità nell'ambito dell'intera filiera di produzione.

La rintracciabilità a livello di filiera è garantita mediante l'etichettatura, disciplinata secondo tutta una serie di norme elencate nel paragrafo seguente. La mancata rispondenza del prodotto a quanto dichiarato in etichetta è classificata come reato.

1.2 QUADRO NORMATIVO

1.2.1 NORMATIVA RIGUARDANTE LA CLASSIFICAZIONE DEI PRODOTTI ITTICI

La normativa attuale fornisce la seguente definizione di "**prodotto ittico**":

"tutti gli animali marini o di acqua dolce (ad eccezione dei molluschi bivalvi vivi, echinodermi vivi, tunicati vivi e gasteropodi marini vivi e di tutti i mammiferi, rettili e rane), selvatici o di allevamento, e tutte le forme, parti e prodotti commestibili di tali animali" (Allegato I del Reg. CE 853/2004, punto 3.1).

Il medesimo allegato suddivide inoltre i **prodotti della pesca** in "**freschi**", "**preparati**" e "**trasformati**" secondo le seguenti definizioni:

"Prodotti della pesca freschi: i prodotti della pesca non trasformati, interi o preparati, compresi i prodotti imballati sotto vuoto o in atmosfera modificata che, ai fini della

conservazione, non hanno subito alcun trattamento diverso dalla refrigerazione, inteso a garantirne la conservazione” (Allegato I del Reg. (CE) 853/2004, punto 3.5);

“Prodotti della pesca preparati: i prodotti della pesca non trasformati sottoposti ad un’operazione che ne abbia modificato l’integrità anatomica, quali l’eviscerazione, la decapitazione, l’affettatura, la sfilettatura e la tritatura” (Allegato I del Reg. (CE) 853/2004, punto 3.6);

“Prodotti della pesca trasformati: i prodotti risultanti dalla trasformazione [aggiunta di ingredienti (es.: panature, salamoie, salse, olio), trattamenti fisici (es.: congelamento, affumicatura, essiccamento), fermentazioni] dei prodotti della pesca o dall’ulteriore trasformazione di detti prodotti trasformati. (Allegato I del Reg. (CE) 853/2004, punto 3.7)

1.2.2 NORMATIVA RIGUARDANTE L’ETICHETTATURA DEI PRODOTTI ITTICI

Il quadro normativo che disciplina le attività della pesca e dell’acquacoltura, nonché la commercializzazione dei prodotti ittici, comprende dapprima, in ordine cronologico, i seguenti tre regolamenti della Comunità europea:

- Reg. (CE) n. 104/2000 del Consiglio del 17/12/1999 relativo all’organizzazione comune dei mercati nel settore della pesca e dell’acquacoltura;
- Reg. (CE) n. 2065/2001 della Commissione del 22/10/2001 che stabilisce le modalità di applicazione del Reg. (CE) n. 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l’informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell’acquacoltura;
- Reg. (CE) n. 178/2002 del 28/01/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio dell’Unione europea che stabilisce i principi ed i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l’Agenzia alimentare e fissa le procedure nel campo della sicurezza e rintracciabilità alimentari e in particolare rende obbligatoria, a partire dal 1 Gennaio 2005, la rintracciabilità dei prodotti agroalimentari e dei mangimi, in tutte le fasi di lavorazione, trasformazione e produzione.

Il Decreto del Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (MIPAAF) del 27/03/2002 relativo all’etichettatura dei prodotti ittici e sistema di controllo recepisce i suddetti regolamenti comunitari, in base ai quali prevede che, in fase di vendita al dettaglio di prodotto fresco, surgelato, salato ed essiccato, si riportino le seguenti informazioni obbligatorie:

1. la denominazione commerciale della specie;

2. il metodo di produzione: pescato, pescato in acque dolci o allevato (come da rettifica al Reg. (CE) n. 2065/2001);
3. la zona di cattura o di produzione: secondo le zone FAO. Per tutte le altre fasi di commercializzazione (Art. 2), oltre ai suddetti punti, deve essere aggiunta la denominazione scientifica della specie interessata (secondo la nomenclatura binomia);
4. in riferimento alla pesca in mare, quando non sussistono dubbi circa la provenienza del prodotto, è consentito omettere, nella vendita al consumatore finale, il metodo di produzione;
5. se i prodotti sono stati decapitati, filettati, spezzettati o triturati, devono comunque recare le indicazioni relative a nome commerciale, metodo di produzione e zona di cattura o di allevamento. Al contrario, gli stessi prodotti sono esclusi dal campo di applicazione dei regolamenti comunitari quando sono cotti o altrimenti preparati.

Le informazioni sopra indicate sono fornite, secondo i casi, mediante l'etichettatura o l'imballaggio del prodotto, oppure mediante un qualsiasi documento commerciale della merce, ivi compresa la fattura.

Infine v'è ricordato che, a norma dell'Art. 4, par. 1 del Reg. (CE) n. 104/2000, le disposizioni del regolamento non si applicano ai piccoli quantitativi di prodotti venduti direttamente al consumatore finale da parte dei pescatori o delle aziende di acquacoltura ovvero alle quantità il cui prezzo di mercato non superi i 20 Euro per vendita individuale, senza possibilità di cumulo.

Inoltre, per i prodotti esposti alla vendita al dettaglio "preincartati" le suddette informazioni possono essere inserite in un "cartello" apposto in prossimità del comparto relativo, in maniera tale da non indurre in errore il consumatore.

Oltre ai già citati Regolamenti vi sono altri atti normativi quali:

- Reg. (CE) 853/2004 del 25/06/2004 che stabilisce norme sanitarie specifiche in materia di igiene degli alimenti di origine animale, in particolare:
 - Sez. VIII, Cap. V: Norme sanitarie per i prodotti della pesca e tossine nocive per la salute umana:
 - Non devono essere immessi sul mercato i prodotti ottenuti da pesci velenosi delle seguenti famiglie: *Tetraodontidae*, *Molidae*, *Diodontidae* e *Canthigasteridae*;
 - Non devono essere immessi sul mercato i prodotti della pesca contenenti biotossine ad esempio la ciguatossina o la tetradotossina;

- Reg. (CE) n. 854/2004 del 29/04/2004 che stabilisce norme per l'esecuzione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano;
- Provvedimento del 16 novembre 2006 della Conferenza Permanente del Consiglio dei Ministri per i rapporti tra lo Stato e le Regioni e le Provincie Autonome di Trento e Bolzano in materia di linee guida sui prodotti della pesca e sulla nuova regolamentazione comunitaria. Si tratta di un documento che sintetizza, sottoforma di un compendio generale, la nuova legislazione alimentare relativamente ai prodotti della pesca. La finalità di tale documento è quella di rafforzare e coordinare, sul territorio nazionale, comportamenti in linea con la normativa comunitaria;
- Decreto MIPAAF del 31/01/2008 relativo a modifiche ed integrazioni all'elenco delle denominazioni commerciali dei prodotti ittici, allegato al D.M. del 25/07/2005, comprendente la nomenclatura di ben 727 specie:
 - se una specie è inserita nell'elenco, deve essere denominata solo ed esclusivamente con quel nome commerciale.
 - se una specie non figura nell'elenco può essere commercializzata con una denominazione commerciale provvisoria stabilita dall'autorità competente dello Stato membro della UE, entro i cinque mesi successivi all'attribuzione della denominazione commerciale definitiva, che è ripresa nell'elenco delle denominazioni autorizzate (Reg. (CE) n. 2065/2001, Art. 2, comma 1).

1.3 LIMITI DELLE METODICHE D'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE

L'unica metodica che, attualmente in Italia, ha valore a livello legale nell'identificazione di specie è l'**identificazione morfologica** delle caratteristiche anatomiche macroscopiche del pesce intero, secondo chiavi dicotomiche proposte dalla *Food and Agriculture Organization (FAO)*.

Tuttavia quasi la metà dell'attuale consumo domestico di prodotti ittici in Italia (48,6 % nel 2005, dati Ismea) riguarda prodotti lavorati e trasformati, per i quali può risultare difficile riconoscere l'origine e la provenienza da parte dei Servizi Veterinari tramite l'identificazione morfologica (ad esempio, nel caso di filetti di pesce, attraverso la forma del prodotto, lo spessore e l'andamento di miomeri e di miosetti, il colore del muscolo, il colore e tipologia di eventuali residui di pelle o peritoneo rimasti adesi al muscolo).

Per i motivi precedentemente descritti, e in virtù dell'ampia differenziazione dell'offerta di prodotto "lavorato" che caratterizza il mercato, è fondamentale identificare in maniera inequivocabile e rapida le specie oggetto di commercializzazione anche quando le caratteristiche morfologiche identificative non sono più presenti. Si rende pertanto necessario il ricorso a tecniche di laboratorio che siano di supporto all'ispettore sanitario e diventino garanzia per il consumatore.

A tal fine, in passato, in prodotti lavorati, si è spesso ricorso a **metodi di identificazione delle proteine**, in particolare all'isoelettrofocalizzazione (IEF) delle proteine sarcoplasmatiche di pesce (Berrini *et al.*, 2006), ufficializzata nel 1995 negli Stati Uniti dalla *Food & Drug Administration* (FDA) come metodo d'identificazione delle specie ittiche, ma non ufficializzata nell'Unione Europea. Tuttavia l'IEF si è rivelata di scarsa utilità nell'ancora più problematica identificazione di specie in prodotti trasformati, dove alla perdita dell'integrità anatomica si aggiunge, ad esempio, l'azione denaturante del trattamento termico a danno delle proteine, nel caso delle conserve a lunga scadenza, o l'azione denaturante dovuta a fattori fisici e/o chimici nelle semiconserve (prodotti ittici sotto vuoto, marinati, affumicati, salati ed essiccati) a scadenza relativamente breve. Altri limiti nell'applicazione dell'isoelettrofocalizzazione sono dati dall'omologia delle proteine in specie filogeneticamente correlate e dall'elevato polimorfismo di alcune proteine frequentemente osservato in alcune specie (Rehnbein *et al.*, 1995).

Per superare queste difficoltà si sono cercate metodiche di analisi più efficaci che potessero risolvere i limiti delle metodiche precedentemente utilizzate. Tra le procedure attualmente disponibili per queste analisi, le **metodiche biomolecolari** stanno avendo notevole sviluppo negli ultimi anni e sembrano le più promettenti. Le tecniche biomolecolari si basano sull'analisi di sequenze di DNA, le quali consentono di tracciare una vera e propria impronta digitale di un individuo o di una specie. I vantaggi principali dell'analisi biomolecolare stanno nella sensibilità, data la capacità di evidenziare anche poche molecole di DNA grazie all'amplificazione delle stesse mediante PCR, nella specificità, dovuta alla singolarità delle sequenze di DNA, diverse da specie a specie, e in particolare in campo ittico, nella conservazione del materiale bersaglio dell'analisi, gli acidi nucleici i quali, rispetto ad altri target, rimangono identificabili anche in seguito ai numerosi trattamenti che si mettono in atto nel processamento dei cibi quali affumicatura, salagione, acidificazione e trattamento termico, nonostante gli acidi nucleici possano degradarsi, in frammenti di lunghezza variabile, quando il trattamento termico è severo (Momcilovic & Rasooly, 2000).

L'analisi biomolecolare costituisce perciò una metodica sicuramente in grado di garantire una piena tracciabilità all'interno delle filiere dei prodotti animali. Inoltre, la forte automazione che caratterizza soprattutto le più recenti tecniche biomolecolari (PCR Real-Time, sequenziamento, pyrosequencing) le rende particolarmente adatte alle analisi di routine richieste dagli enti preposti alla salvaguardia della sicurezza e della qualità in campo alimentare.

Le tecniche di analisi del DNA finora testate presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve) ai fini dell'identificazione di specie ittiche comprendono PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Real-time PCR (Arcangeli *et al.*, 2007).

La tecnica **PCR-RFLP** si è dimostrata affidabile e rapida per ottenere un'attendibile identificazione di specie anche in prodotti trasformati (Arcangeli *et al.*, 2007), tuttavia non offre garanzie in caso di mutazioni nella sequenza bersaglio dell'enzima. Infatti, mutazioni che coinvolgano un sito di restrizione causerebbero nel profilo di restrizione un'alterazione tale da inficiare il riconoscimento .

La **Real-time PCR** si attesta come una tecnica molto robusta ma applicabile soltanto all'identificazione di frodi grossolane, ad esempio nella sostituzione di specie appartenenti a famiglie tassonomiche diverse, in quanto, altrimenti, la discriminazione a livello di specie renderebbe necessario il laborioso utilizzo di sonde marcate specifiche per ogni specie ittica, con costi insostenibili per attività di routine.

Perciò, nella ricerca di un metodo di analisi del DNA affidabile, rapido, economico e mutazione-resistente a sostegno della rintracciabilità di filiera, ci siamo rivolti all'implementazione, nel riconoscimento di specie, della tecnologia **Pyrosequencing™**, un metodo di sequenziamento che risulta più rapido ed economico del tradizionale metodo di sequenziamento di Sanger. Abbiamo scelto di applicare questa tecnica a sequenze di DNA mitocondriale, il cui uso è molto esteso nell'identificazione di specie e spesso preferibile, per tutta una serie di vantaggi che esso presenta rispetto al DNA nucleare che verranno elencati nel paragrafo 1.5.

1.4. IL PYROSEQUENCING

Il *pyrosequencing* è una tecnica di sequenziamento del DNA per sintesi a temperatura ambiente in tempo reale. L'incorporazione di ogni nucleotide è monitorata grazie ad una cascata enzimatica altamente sincronizzata che porta alla produzione di un segnale di bioluminescenza a seguito del rilascio di pirofosfato, da cui il nome. Tale tecnica ha varie applicazioni: la tecnologia *pyrosequencing* può essere infatti utilizzata, a seconda dello strumento, nell'analisi di *Syngle Nucleotide Polimorphysm* (SNP) e per il sequenziamento di *barcode* (strumentazione Pyro Mark™ ID), come nel nostro caso (fino a 50 basi), come anche nel sequenziamento di interi genomi (strumentazione Pyro Mark™ MD); il *pyrosequencing* è già stato usato in svariati programmi di sequenziamento genomico (Moore *et al.*, 2006) per le sue qualità di rapidità, economicità ed affidabilità, su sequenze corte, in quanto una delle caratteristiche peculiari del *pyrosequencing* sta nel fatto che l'efficienza di sequenziamento è massima nella regione adiacente al primer di sequenziamento (fino ai 30, 35 nt), mentre si riduce progressivamente a valle del primer stesso e questo è responsabile della lunghezza ridotta delle sequenze ottenibili. Per questo motivo il *pyrosequencing* non si sostituisce al sequenziamento classico ma ne costituisce una valida e conveniente alternativa in materia di genotipizzazione.

1.4.1 PRINCIPI DEL PYROSEQUENCING

La cascata enzimatica del *pyrosequencing* si compone di 4 enzimi: frammento di Klenow (exo^-) della DNA Polimerasi I (Derbyshire *et al.*, 1988), ATP sulfurilasi (Segel *et.al*, 1987), Luciferasi (Deluca, 1976) e Apirasi (Komoszynski & Wojtczkak, 1996), catalizzanti le reazioni illustrate in sequenza in **Tab 1.1.** ed in **Fig. 1.1.**

ENZIMA	REAZIONE
DNA Polimerasi: (exo^-) frammento di Klenow (exo^-) della DNA Polimerasi I	$(DNA)_n + dNTP \rightarrow (DNA)_{n+1} + PP_i$
ATP Sulfurilasi	$APS + PP_i \rightarrow ATP + SO_4^{2-}$
Luciferasi	$ATP + D\text{-luciferina} + O_2 \rightarrow \text{ossiluciferina} + AMP + PP_i$ $+CO_2 + \text{luce}$
Apirasi	$dNTP \rightarrow dNMP + 2P_i$ $ATP \rightarrow AMP + 2P_i$

Tab 1.1. I singoli step di reazione (nella colonna di dx) responsabili della tecnologia del *pyrosequencing* e gli enzimi che rispettivamente li catalizzano (nella colonna di sx).

La mix di reazione deve contenere i substrati enzimatici della reazione: adenosina fosfosulfato (APS), D-luciferina ed il filamento stampo del DNA ibridato ad un primer specifico. I quattro deossinucleotidi sono invece aggiunti (dispensati) uno alla volta ciclicamente in un ordine prestabilito; una *Charged Coupled Device* (CCD) camera rileva l'intensità di luce prodotta, proporzionale al numero di nucleotidi incorporati.

La prima reazione della cascata, ossia l'incorporazione del nucleotide, avviene soltanto se il nucleotide dispensato forma un appaiamento con il filamento stampo a livello dell'innescò. In caso contrario non viene prodotto pirofosfato e, di conseguenza, non viene prodotto alcun segnale luminoso fino a che non si dispensa un nucleotide complementare.

L'Apirasi è responsabile della degradazione dei nucleotidi somministrati in eccesso e dell'ATP in eccesso prodotto dalla sulfurilasi prima della somministrazione di un nuovo deossinucleotide. Tale operazione di degradazione è cruciale per la sincronizzazione della sintesi del DNA e perciò assicura che l'intensità di luce rilevata in corrispondenza della somministrazione di un nucleotide provenga soltanto dall'incorporazione di quel nucleotide.

Di seguito vengono riportate nel dettaglio le caratteristiche dei quattro enzimi utilizzati.

Frammento di Klenow (exo⁻) della DNA Polimerasi I

Codice E.C. 2.7.7.7 secondo la nomenclatura IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), il frammento di Klenow (exo⁻) della DNA Polimerasi I risulta dalla mutazione di due amminoacidi nel frammento di Klenow della DNA Polimerasi I (Klenow *et al.*, 1976) di *Escherichia coli*. Tramite tale mutazione il frammento di Klenow è privato dell'attività 3'→5' esonucleasica di *proofreading* (correzione delle bozze) che, se presente, causerebbe una desincronizzazione tra incorporazione del nucleotide e rilevamento del segnale luminoso. La mancanza dell'attività di *proofreading* non ha comunque implicazioni sulla fedeltà d'incorporazione delle basi che è comunque assicurata dagli altri seguenti meccanismi:

- l'ibridizzazione con il nucleotide corretto è più favorita rispetto all'ibridizzazione con i nucleotidi non corretti (Hopfield, 1974);
- il necessario cambiamento conformazionale, da conformazione chiusa ad aperta, avviene solo dopo l'incorporazione del nucleotide corretto; tale cambiamento conformazionale posiziona correttamente il 3'-OH ed il dNTP ai fini dell'attacco nucleofilo e perciò determina il tasso di formazione del legame fosfodiesterico (Bryant *et al.*, 1983; Mizrahi *et al.*, 1985; Kuchta *et al.*, 1987);

- dopo la formazione del legame fosfodiesterico, un cambiamento conformazionale rallenta la dissociazione del nucleotide scorretto dal frammento di Klenow; nel *pyrosequencing* questo rallentamento garantisce l'efficace rimozione dei misappaiamenti da parte dell'apirasi (Ahmadian *et al.*, 2001).

ATP sulfurilasi

Codice E.C.2.7.7.4 secondo la nomenclatura IUBMB, l'ATP sulfurilasi catalizza la seconda reazione nella cascata enzimatica del *pyrosequencing*, ossia la produzione di ATP a partire dal pirofosfato. L'ATP sulfurilasi *in vivo* è implicata nell'attivazione del solfuro ad APS a partire da ATP e solfato (Segel *et al.*, 1987). L'equilibrio della reazione catalizzata *in vivo* dall'ATP sulfurilasi è molto sfavorevole nei riguardi della sintesi di APS, che si ottiene *in vivo* per accoppiamento con reazioni che sottraggano velocemente l'APS ed il PP_i. Trovandosi disaccoppiata, nel sistema di reazione del *pyrosequencing* viene favorita la sintesi di ATP. L'ATP sulfurilasi è sintetizzata da un ampio spettro di organismi tra cui lieviti e funghi filamentosi (Segel *et al.*, 1987); quella disponibile in commercio è stata clonata a partire dal gene *MET3* presente sul cromosoma X di *Saccharomyces cerevisiae* ed è stata prodotta con successo in cellule di *E. coli* (Karamohamed *et al.*, 1999).

Luciferasi

Codice E.C. 1.13.12.7 secondo la nomenclatura IUBMB, la luciferasi è utilizzata in molte varianti da tutti gli organismi bioluminescenti, catalizza la produzione di luce a partire dall'ATP prodotto nello step precedente; perciò nel *pyrosequencing* si utilizza un deossinucleotide modificato come substrato per la polimerasi, l'APS (dATP-S) in luogo dell'ATP, in modo che non venga riconosciuto dalla luciferasi generando rumore di fondo (Ronaghi *et al.*, 1998). La variante commerciale della luciferasi appartiene alla lucciola del Nord America *Photinus pyralis* (De Wet, *et al.*, 1986) e produce luce nelle frequenze del giallo e del verde (550-590 nm) con un picco di emissione a 562 nm a pH fisiologico (Sala-Newby *et al.*, 1996). L'emissione di luce accompagna la decarbossilazione ossidativa della D-luciferina; 0,88 fotoni sono prodotti per ogni molecola di D-luciferina consumata. Nella tecnologia del *pyrosequencing* è la bassa termostabilità della luciferasi a porre dei limiti alla temperatura di reazione, che non dovrebbe superare i 25°C; poiché l'*optimum* di temperatura per gli altri enzimi è maggiore, un aumento della temperatura di reazione potrebbe accorciare il tempo d'analisi e diminuire il rumore di fondo. Tra le strategie usate per aumentare la

termostabilità della luciferasi si sono utilizzate l'aggiunta di composti stabilizzanti quali la glicina-betaina (Simpson & Hammond, 1991; Thompson *et al.*, 1991) e la mutagenesi sito-specifica (White *et al.*, 1996).

Apirasi

Codice E.C.3.6.1.5 secondo la nomenclatura IUBMB, l'apirasi è responsabile della degradazione dei nucleotidi non incorporati e dell'eccesso di ATP prodotto dalla sulfurilasi tra una dispensazione e l'altra. Appartiene alla classe delle ATPasi di tipo E, che comprende le apirasi e le ecto-ATPasi; lo spettro d'azione è molto maggiore per le Apirasi, in quanto possono idrolizzare i nucleosidi tri-, di- e monofosfato (Plesner, 1995). Per l'utilizzo dell'apirasi nel *pyrosequencing* è fondamentale il rapporto tra il tasso d'idrolisi dell'ATP ed il tasso d'idrolisi dell'ADP, in quanto un rapporto elevato accresce l'efficienza della degradazione nucleotidica (Espinosa *et al.*, 2000). Le varianti commerciali dell'apirasi originano dai tuberi della patata *Solanum tuberosum*.

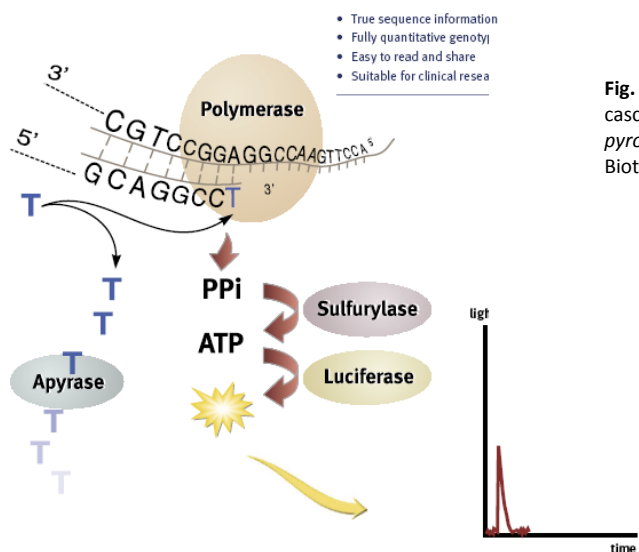


Fig. 1.1. Le reazioni enzimatiche a cascata coinvolte nel *pyrosequencing*. (Immagine Biotage®).

1.4.2 IMPLEMENTAZIONE E PERFORMANCE DEL PYROSEQUENCING

Il primo sistema commerciale automatizzato che impiegava i principi del *pyrosequencing* risale al 1999 (Nordström *et al.*, 1999). Tale sistema permetteva il sequenziamento di un solo campione alla volta e utilizzava grossi volumi di dispensazione per nucleotidi ed enzimi (1-5 μ L) e di campione (400 μ L). Il sistema automatizzato usato nel presente lavoro, il Pyro Mark ID™ permette invece il sequenziamento parallelo di 96 campioni ed i volumi sia di dispensazione (0.05-0.2 μ L)

che dei campioni (10-50 μ L) sono molto minori, in tal modo i costi ed i tempi richiesti si riducono notevolmente.

Nel frattempo anche la **preparazione del templat**o nell'attuale implementazione del *pyrosequencing*, Pyrosequencing™, è stata sostanzialmente automatizzata con l'introduzione di un sistema a vuoto denominato "Vacuum Prep Tool", costituito da una sorta di "spazzola" a 96 aghi filtranti, collegata ad una pompa a vuoto, per la purificazione contemporanea di 96 prodotti di PCR a partire da una micropiastra a 96 pozzetti; tale processo richiede solo 15 minuti. Il sistema richiede l'utilizzo di un primer di PCR biotinilato e consente il legame del filamento stampo recante la biotina a sfere di sefarosio rivestite di streptavidina; una volta applicato il vuoto al Vacuum Prep Tool, esso aspira completamente, attraverso gli aghi filtranti, l'intera soluzione di PCR, eccetto il templat legato alle sfere di sefarosio, il quale viene trattenuto sul filtro.

Lo strumento da noi utilizzato, il Pyro Mark™ ID instrument, permette l'uso alternativo di due protocolli di sequenziamento a seconda del tipo di analisi da condurre:

- **protocollo SQA (*SeSequence Analysis*)** per il sequenziamento di *barcode* o comunque di sequenze non note, utilizzato nel presente lavoro;
- **protocollo SNP** per identificazione di polimorfismi conosciuti.

Nel procollo SQA è necessario stabilire un ordine di dispensazione ciclico dei nucleotidi, ad esempio ATCG, ed un alto numero di cicli di dispensazione, 15 o 20, in modo da ottenere una sequenza abbastanza lunga da costituire appunto un *barcode*; un tale protocollo richiede perciò circa 1 ora di tempo. Il protocollo SNP consente invece di accorciare i tempi di analisi a circa 10 minuti nel caso si analizzi una regione a sequenza nota per la detection di SNP, corte mutazioni o varianti alleliche; in questo caso l'ordine di somministrazione nucleotidica è predeterminato in base all'ordine in cui i nucleotidi compaiono nella sequenza (nota) a valle del primer di sequenziamento.

Infine, anche l'**analisi delle sequenze** ottenute (pyrosequenze) risulta molto veloce in quanto il software collegato al sequenziatore è corredato di un pacchetto, denominato Identifire™ SW, che permette l'allineamento delle pyrosequenze contro un database locale di sequenze. L'analisi delle sequenze tramite tale software è molto vantaggiosa rispetto ad un'analisi BLAST poiché è molto veloce e permette di bypassare la ridondanza che si incontra nei database biologici tramite un database costruito *ad hoc*, ma soprattutto permette di effettuare un allineamento nel quale i parametri di attribuzione del punteggio sono ottimizzati per il *pyrosequencing* e perciò gli *indel* vengono penalizzati in maniera diversa a seconda che si verifichino all'inizio o

al termine della sequenza. Infatti il *pyrosequencing* presenta, come sua caratteristica principale, un'efficienza di sequenziamento molto alta immediatamente a valle del primer di sequenziamento (normalmente entro i primi 30 nt), che decresce con l'avanzare dei cicli di dispensazione nucleotidica. Proprio per questo motivo il *pyrosequencing* è adatto all'identificazione di polimorfismi che si verifichino in corte regioni nucleotidiche (normalmente fino a 50 nt) e perciò è particolarmente adatto ad analisi di genotipizzazione. Considerata perciò la limitata capacità di lettura (*read-length*), ad un *indel* che si verifichi al termine della sequenza sarà attribuito dall'Identifire™ un peso minore rispetto ad un *indel* che si verifichi nella regione di massima efficienza del sequenziamento.

Il limitato *read-length* si deve all'equilibrio molto fragile che sussiste tra le singole reazioni coinvolte nella cascata enzimatica del *pyrosequencing*, nonostante gli enzimi coinvolti siano stati tutti ingegnerizzati in modo che la loro sincronizzazione sia la maggiore possibile. In ogni caso la catalisi enzimatica, per sua natura, non presenta mai un'efficienza del 100%, ovvero non giunge mai a convertire in prodotti la totalità dei reagenti; questo causa un accumulo progressivo di sottoprodotti che con il procedere della catalisi vanno ad inibire la reazione di sequenziamento. L'entità di questa inibizione è ancora più marcata nel caso in cui siano coinvolte, come in questo caso, reazioni enzimatiche a cascata, dove lo spostamento dell'equilibrio chimico in una delle quattro reazioni provoca delle perturbazioni anche nell'equilibrio di tutte le altre.

I seguenti altri fattori influenzano invece la **qualità della pyrosequenza** ottenuta:

- **effetto inibitorio che l'APS esercita sull'attività dell'Apirasi:** tale effetto inibitorio causa un *plus-frameshift*, ovvero l'inserzione di una base, per incompleta degradazione dei nucleotidi, in una popolazione di templati; il *plus-frameshift* viene ridotto se si utilizza il solo isomero S dell'APS (l'isomero R non rappresenta un substrato per la DNA polimerasi) consentendo di dimezzare la concentrazione dell'APS rispetto all'utilizzo della miscela racemica (Gharizadeh *et al.*, 2002);
- **caratteristiche della sequenza:** sui filamenti stampo che presentano regioni omopolimeriche di timina la processività del frammento di Klenow diminuisce causando un *minus-frameshift* ovvero la delezione di una base dovuta ad incompleta estensione durante la dispensazione della base; questo problema può essere risolto dall'utilizzo dell'enzima Sequenasi (DNA polimerasi del fago T7 privata dell'attività esonucleasica) in luogo del frammento di Klenow, la Sequenasi consente infatti un'affidabile lettura di *stretch* di timina fino alle 8 unità (Gharizadeh *et al.*, 2004) e genera picchi ad alta risoluzione anche a valle delle

regioni omopolimeriche. Un miglioramento della processività può inoltre essere ottenuta mediante l'impiego delle SSB (*Single Stand Binding Proteins*) (Ahmadian *et al.*, 2005);

- **lunghezza dell'amplificato:** c'è un rapporto di proporzionalità inversa tra il *read-length* e la lunghezza dell'amplificato, come anche tra lunghezza dell'amplificato e qualità del frammento sequenziato (Ahmadian *et al.*, 2005), inputabili a misappaiamenti del primer di sequenziamento;
- nel caso di **utilizzo di primer degenerati** si potrebbero formare più facilmente omo o etero dimeri, mentre nel caso di una **quantità eccessiva di primer biotinilato**, esso può competere con il template per il legame alle biglie di sefariosio, inoltre la presenza di DNA a singolo filamento in soluzione disturba gli enzimi del pyrosequencing e peggiora le loro performance (Ahmadian *et al.*, 2005).

Nonostante la difficoltà che il Pyrosequencing™ incontra nell'ottenere sequenze lunghe, esso presenta diversi vantaggi rispetto al sequenziamento di Sanger, secondo quanto illustrato in **Tab. 1.2**.

Per quanto attiene all'identificazione di specie in campioni alimentari e soprattutto lavorati, contestualmente nei prodotti ittici, il limitato *read-length* del Pyrosequencing™ teoricamente non rappresenta un grosso limite, in quanto la circoscrizione dell'analisi ad una porzione genica ridotta e la possibilità di lettura in posizione adiacente al primer danno maggiori garanzie di successo quando il DNA è in forma fortemente degradata. Il limitato output di lettura pone comunque qualche problema in fase di progettazione dei primer, in quanto si necessita di geni con pattern di conservazione tali per cui zone altamente conservate e sufficientemente lunghe siano alternate a zone altamente variabili e discriminanti.

	PYROSEQUENCING™ tramite strumento PYRO MARK™ ID	SEQUENZIAMENTO CLASSICO
OUTPUT DI LETTURA	Lettura adiacente al primer ma <i>read-length</i> che non supera i 50 nt	Gap di circa 20 basi tra il primer ed il primo nucleotide letto ma <i>read-length</i> fino a 400-600 nt
COSTI	Minori sia per l'investimento iniziale che per i reagenti	Maggiori sia per l'investimento iniziale che per i reagenti
PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	Molto rapida: 15 minuti <ul style="list-style-type: none"> a. legame tra templatato e sfere di sefarosio: 10 minuti; b. purificazione con il <i>Vacuum Prep Tool</i>: 50 secondi; c. annealing con il primer di sequenziamento: 4 minuti. 	Lenta: 4 ore <ul style="list-style-type: none"> a. per il lavaggio dai reagenti di PCR: 1 ora; b. amplificazione ciclica: 3h; c. lavaggio dai reagenti della PCR di sequenziamento: 15 minuti.
DURATA DEL SEQUENZIAMENTO VERO E PROPRIO	1 ora, per protocollo SQA (sequenziamento di <i>barcode</i>);	2 ore per l'elettroforesi capillare
DISPONIBILITA' DELLA SEQUENZA	In tempo reale	Al termine dell'analisi (successivamente all'elettroforesi capillare ed all'integrazione dei dati dai due filamenti complementari).

Tab. 1.2. Confronto tra il metodo di sequenziamento Pyrosequencing™ ed il tradizionale metodo di sequenziamento di Sanger (Gharizadeh *et al.*, 2006).

1.5 DNA MITOCONDRIALE E SUO USO NELL'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE

Il DNA mitocondriale (mtDNA) consiste in due catene circolari, una pesante (H, con prevalenza di basi puriniche A e G) e una leggera (L, con prevalenza di basi pirimidiniche C e T). La catena H contiene la maggioranza dei geni.

I geni sono privi di introni e solo la regione di 1024 bp denominata D-loop (D come "dislocazione" in quanto le catene H ed L sono qui distaccate per la presenza di DNA quiescente) non contiene geni ma è deputata alla regolazione dell'mtDNA.

L'mtDNA contiene 37 geni:

- 22 geni codificanti per RNA transfer (tRNA);
- 2 geni codificanti per RNA ribosomiale (rRNA), il 12S ed il 16S;
- 13 geni che codificano per polipeptidi, i quali fanno tutti parte della catena respiratoria localizzata nella membrana mitocondriale interna:
 - ATPasi 6 e 8;
 - NADH deidrogenasi ND 1-7;
 - citocromo ossidasi I, II e III (COI, COII, COIII);
 - citocromo B (CYTB).

Il mtDNA è aploide a trasmissione uniparentale materna (Cann *et al.*, 1992). Nella maggior parte dei casi non subisce fenomeni di ricombinazione e quindi, a livello intraspecifico, si può assimilare ad un clone.

In una cellula, sia il DNA nucleare sia quello mitocondriale sono potenzialmente disponibili per scopi legati all'identificazione di specie. Il mtDNA è preferibile poiché presenta dimensioni minori del DNA nucleare (mediamente 14-18 Kb, con eccezioni sino ai 60-64 Kb) ed un tasso di sostituzione nucleotidica maggiore rispetto al genoma nucleare e quindi presenta maggiori zone polimorfiche a livello interspecifico, facilitando l'identificazione di specie strettamente correlate. Altro vantaggio del mtDNA risiede nella sua notevole resistenza intrinseca alla denaturazione dovuta alla sua conformazione circolare. Risulta perciò particolarmente adatto all'analisi di matrici alimentari sottoposte a trattamenti termici. Inoltre è presente in abbondanza nelle cellule, vi sono infatti diverse copie di mtDNA nelle cellule, in numero variabile da 100 a 10.000, e questo facilita la ricerca di DNA presente in minime quantità o a partire da bassissime quantità di tessuto oggetto d'indagine.

E' nota la sequenza completa del mtDNA per diversi organismi acquatici. I geni mitocondriali maggiormente considerati per gli studi di identificazione di specie sono: il D-loop, l'ND2, gli RNA ribosomiali 12S e 16S e il CYTB (Quinteiro *et al.*, 2001).

1.6 SPECIE ITTICHE OGGETTO DELL'ANALISI

Il presente lavoro mira inizialmente a mettere a punto un metodo d'identificazione universale delle specie ittiche commerciali. Non è però stato possibile reperire, nelle banche dati biologiche, un gene sul quale disegnare un primer di sequenziamento discriminante la totalità delle specie ittiche oggetto di frode. Ci si è perciò orientati all'analisi di singoli gruppi di pesci partendo dal gruppo dei Gadidi, molto importante a livello commerciale ed industriale per la produzione di baccalà e stoccafisso, ma per il quale non è stato possibile reperire alcun gene con le caratteristiche volute.

Si è quindi proceduto all'analisi di altri due gruppi di pesci, ampiamente commercializzati e facilmente passibili di frode: i **Clupeiformi** ed i **Pleuronectiformi**. Abbiamo inoltre analizzato un'altra frode in particolare, riguardante la sostituzione di **Pesce Persico** (*Perca fluviatilis*) con **Persico Africano** (*Lates niloticus*), entrambe specie appartenenti all'ordine dei Perciformi. Le caratteristiche dei gruppi suddetti di pesci, delle singole specie e le principali frodi associate sono esposte nei paragrafi successivi e, più dettagliatamente, negli **Allegati I-V**. In **Fig. 1.2** si illustrano i principali elementi anatomici che caratterizzano i pesci teleostei, utili a comprendere i criteri utilizzati nell'identificazione morfologica di specie ittiche.

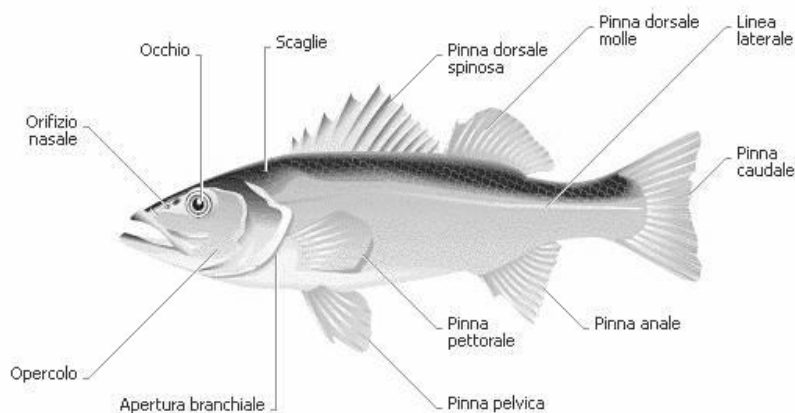


Fig. 1.2. Principali elementi anatomici esterni propri ai teleostei. Immagine Cedifop.

1.6.1 CLUPEIFORMI

L'ordine dei *Clupeiformes* rappresenta il 30%-40% in peso di tutta la fauna di vertebrati marini esistente ed è principalmente formato da due grandi famiglie di interesse commerciale (Clupeidae ed Engraulidae), tra cui figurano i piccoli pesci comunemente conosciuti, rispettivamente, come **aringhe**, **sardine**, **alose** e **spratti** (famiglia Clupeidae) ed **acciughe** (famiglia Engraulidae).

Nessun altro gruppo di pesci è mai stato così importante per l'umanità, che nel corso dei secoli ha sfruttato i clupeiformi come alimento o come fonte di olio, fertilizzanti o mangimi animali. Oggigiorno molte specie di clupeiformi vengono abitualmente commercializzate come prodotto lavorato presso la grande distribuzione: sott'olio, in salamoia, sotto forma di paste ecc..

Le acciughe del genere *Engraulis* e le sardine temperate dei generi *Sardina* e *Sardinops* rappresentano la maggioranza dei clupeiformi pescati in tutto il mondo e popolano le zone marine temperate ad alta produzione primaria di *phytoplankton*: Nord Europa e Mediterraneo, Sud Africa, Australia, Nuova Zelanda, Giappone, California, Perù e Cile. Molti altri clupeidi sono pescati a scopi commerciali ed i più importanti tra questi sono le aringhe nordiche del genere *Clupea*, e le **sardinelle** tropicali del genere *Sardinella*. Tra i clupeiformi di maggiori dimensioni si annoverano le alose o cheppie del genere *Alosa* (famiglia Clupeidae) dell'emisfero boreale, che raggiungono una lunghezza pari a 60 cm ed un peso pari a 3 kg (Nelson, 1994).

Le specie di clupeiformi oggetto del presente lavoro di tesi sono elencate in **Tab. 1.3** e descritte negli allegati **Allegato I** (famiglia Clupeidae) ed **Allegato II** (famiglia Engraulidae) per quanto concerne denominazione ufficiale, identificazione morfologica, distribuzione geografica e valore commerciale.

FAMIGLIA	GENERE	SPECIE	DENOMINAZIONE COMMERCIALE
Clupeidae	<i>Alosa</i>	<i>agone</i>	AGONE
		<i>fallax nilotica</i>	CHEPPIA
	<i>Clupea</i>	<i>harengus</i>	ARINGA
	<i>Sardina</i>	<i>pilchardus</i>	SARDINA
	<i>Sardinella</i>	<i>aurita</i>	ALACCIA
		<i>fimbriata</i>	ALACCIA ASIATICA
	<i>Sardinops</i>	<i>sagax</i>	SARDINA della CALIFORNIA
	<i>Sprattus</i>	<i>Sprattus</i>	SPRATTO
Engraulidae	<i>Engraulis</i>	<i>anchoita</i>	ALICE ATLANTICA
		<i>encrasicolus</i>	ACCIUGA o ALICE
		<i>japonicus</i>	ACCIUGA GIAPPONESE
		<i>mordax</i>	ACCIUGA CALIFORNIANA
		<i>ringens</i>	ACCIUGA PERUVIANA

Tab. 1.3. Specie ittiche di Clupeiformi analizzate nel presente lavoro di tesi.

Caratteristiche

I Clupeiformi possiedono le caratteristiche tipiche che comunemente si associano all'idea di pesce: di colore argento, di forma idrodinamica, dotati di larghe scaglie, pinne prive di lische, coda biforcuta e piccola pinna pelvica al centro del corpo al di sotto di una corta pinna dorsale.

I Clupeiformi sono tecnicamente riconosciuti grazie alle loro peculiarità. Tutti presentano un peculiare scheletro caudale (non visibile esternamente), formato da ossa che offrono sostegno ai raggi della coda. Una caratteristica esterna che contraddistingue molti, ma non tutti, i Clupeiformi è la singola fila di piastre che si estende tra le pinne pari lungo il ventre. Le piastre sono scaglie modificate, generalmente appuntite verso l'estremità posteriore; i Clupeiformi dotati di piastre ben sviluppate si riconoscono al tatto (Nelson, 1994).

La Famiglia Clupeidae

I membri della famiglia Clupeidae sono caratterizzati dall'aver il corpo coperto da squame grandi e caduche. La famiglia Clupeidae comprende 16 generi tra cui quelli considerati nel presente lavoro sono i generi *Alosa* (alose), *Clupea* (aringhe), *Sardina*, *Sardinella* e *Sardinops* (sardine) e *Sprattus* (spratti).

Si tratta di specie diverse a seconda della provenienza: le "sardine" norvegesi consistono in novellame di *Sprattus sprattus*; quelle portoghesi sono adulti di *Sardina pilchardus* mentre quelle provenienti dalla costa atlantica del Nord America sono esemplari giovani di *Aringa Clupea harengus*. I generi *Sardina* e *Sardinella* si differenziano dal genere *Sardinops* per la disposizione dei rakers nel primo arco branchiale (i rakers posteriori inferiori sono sormontati dai superiori più prominenti in *Sardina* e *Sardinella*, mentre sono ridotti nel genere *Sardinops*).

Le alose si distinguono dagli altri membri della famiglia Clupeidae per un'incisione tra la mascella superiore destra e la mascella superiore sinistra. Il numero di spine branchiali aumenta con l'età fino alle centinaia. Utilizzano le loro ben sviluppate tasche faringee (organi epibranchiali) per nutrirsi di organismi microscopici (Nelson, 1994).

La Famiglia Engraulidae

I membri della famiglia Engraulidae si riconoscono facilmente a causa del prognatismo del muso e della mascella inferiore, tendenzialmente lunga, che si estende ben dietro l'occhio formando una larga bocca. Questa è aperta soltanto nel lato sinistro

poichè le acciughe si nutrono per filtrazione. Il muso dell'acciuga ospita un organo rostrale, unico esempio all'interno di questa famiglia, costituito dalla parte anteriore del canale sensoriale che si estende anteriormente sopra e sotto gli occhi. Non visibile esternamente se non per il caratteristico muso, l'organo rostrale presenta probabilmente una funzione sensoriale non ancora conosciuta.

La parte posteriore della testa risulta invece molto simile tra clupeidi ed engraulidi, e generalmente indistinguibile.

Infine le acciughe vere e proprie sono parte di un gruppo evolutivamente avanzato (*Engraulis* e nove altri generi) e a questo devono la scarsità o assenza di piastre (Nelson, 1994).

1.6.2 PRINCIPALI FRODI DI SOSTITUZIONE A CARICO DEI CLUPEIFORMI

Falsificazione di Acciuga o Alice con Papalina o Spratto e con altri Engraulidi

Questa frode viene prospettata in virtù delle ridotte dimensioni della Papalina o Spratto (*Sprattus sprattus*), che tra i Clupeiformi è la specie di minor pezzatura, che consente di sostituirla con la più nobile **Acciuga** o **Alice** (*Engraulis encrasicolus*). I prezzi di alcune specie di clupeiformi presso il mercato di Chioggia sono riportati in **Tab. 1.4**.

Nome commerciale	Prezzo all'ingrosso (Euro/Kg)
ACCIUGA o ALICE	1,10 - 2,39
ALACCIA	1,57 - 1,66
ARINGA	1,00 - 1,26
BIANCHETTO (novellame diclupeidi)	7,65 - 10,28
CHEPPIA o ALOSA	1,49 - 1,60
SARDINA	1,29 - 2,58
SPRATTO o PAPALINA	non disponibile

Tab. 1.4. Prezzi delle principali specie di clupeiformi in vendita al mercato ittico di Chioggia durante il primo semestre del 2009 (Dati ISMEA).

La frode di sostituzione può essere perpetrata soprattutto sul prodotto fresco, ma anche sporadicamente, su quello congelato, o più frequentemente quando presente come conserva sotto sale. Il riconoscimento morfologico tra le specie considerate si basa sulla mandibola che è più corta rispetto alla mascella superiore nell'**Acciuga** o **Alice** (*Engraulis encrasicolus*), mentre è prominente o sopravanza nella

Papalina o **Spratto** (*Sprattus sprattus*) ed inoltre in quest'ultima specie la pinna dorsale è in posizione più caudale.

Nel caso in cui la commercializzazione venga effettuata su soggetti salinati e decapitati, il riconoscimento si verificherà mediante l'ispezione della carena, che nell'**Acciuga** o **Alice** (*Engraulis encrasicolus*) al tatto è priva di asperità, risultando liscia, mentre la **Papalina** o **Spratto** (*Sprattus sprattus*) è dotata di piccoli scudi cornei, rilevabili dalle pinne ventrali fino allo sfintere anale.

Un'altra prova differenziativa consiste nel sospendere per la pinna dorsale le specie in oggetto: l'**Acciuga** o **Alice**, una volta sospesa rimane orizzontale, mentre la **Papalina** o **Spratto** (*Sprattus sprattus*), avendo la pinna dorsale posta in posizione più arretrata, assumerà una posizione inclinata verso il basso (Malandra & Renon, 1998).

A causa della globalizzazione, è possibile trovare sui nostri mercati anche specie di acciuga tipiche di altri areali, quali l'Acciuga giapponese (*Engraulis japonicus*), l'Acciuga peruviana (*Engraulis ringens*), l'Alice Atlantica (*Engraulis anchoita*) e l'Acciuga californiana (*Engraulis mordax*).

Falsificazione di Agone con Cheppia, Alaccia, Papalina o Spratto e Sardina

L'**Agone** (*Alosa fallax lacustris*) costituisce la varietà stanziale in acqua dolce della Cheppia (*Alosa fallax nilotica*), che invece vive nel mare e risale i fiumi solo per la riproduzione. L'Agone vive esclusivamente nei laghi prealpini e pur essendo un pesce di limitate qualità gastronomiche, localmente, soprattutto su alcune coste rivierasche del lago di Como, riveste una particolare importanza economica. Oltre al consumo fresco, l'Agone è famoso grazie ad un'antica usanza di conservazione che impiega l'essiccamento, preceduto da eviscerazione e salatura: il prodotto ottenuto viene chiamato "missultino". Le due specie del genere *Alosa*, a parità di dimensioni sono molto simili, nell'età adulta l'Agone è più piccolo, 25-30 cm di lunghezza e slanciato, mentre la Cheppia, più tozza, raggiunge anche i 50-60 cm.

La distinzione morfologica si effettua grazie ad una caratteristica anatomica riguardante il numero di brachiospine: 30-40 nell'Agone, 20-24 nella Cheppia. La frode di sostituzione con Sardina ed Alaccia è praticabile solo con soggetti freschi, in quanto il loro alto contenuto di grasso li espone a problemi di conservazione (irrancidimento) se trasformati in **missultino**.

Non esistono grossi problemi legati al riconoscimento, in quanto la caratteristica impronta di tre raggi rilevati sull'opercolo branchiale è presente unicamente nella sardina (*Sardina pilchardus*) e la mancanza di macchiette nere (eccetto una piccola sul

bordo dell'opercolo) lungo la linea laterale, sostituite da una linea dorata, è tipica dell'Alaccia (*Sardinella aurita*).

Un'altra frode, di significato locale, che si può verificare con il **missultino** è la sostituzione con Papaline o Spratti, eviscerati, salati, essiccati e pressati, che si trovano facilmente in commercio: il riconoscimento è agevole, grazie alla pinna dorsale che nella Papalina o Spratto, (*Sprattus sprattus*) è posta in posizione più arretrata e per l'assenza di macchiette nere sui fianchi (Malandra & Renon, 1998).

Falsificazione di Bianchetto con Pesce ghiaccio

Ai sensi del D.M. MIPAAF del 31/01/2008, con la denominazione commerciale di **Bianchetto** può essere immesso sul mercato il novellame di *Sardina pilchardus*. Si tratta di un prodotto di notevole interesse commerciale consumato prevalentemente fresco, ma anche utilizzato, in alcune regioni italiane, per la preparazione di conserve. Purtroppo, la limitata reperibilità del prodotto ed il costo elevato hanno portato negli ultimi anni alla vendita di specie morfologicamente simili, ma di minore valore commerciale, in particolare, quelle di origine cinese importate in Italia come prodotto congelato. Quest'ultime, appartenenti all'Ordine *Osmeriformes*, Famiglia *Salangidae*, vengono nell'insieme identificate come *Icefishes* e/o *Noodlefishes* e sono ampiamente diffuse in Asia (Corea, Giappone, Vietnam e Cina), dove popolano sia le acque dolci che salate. Ai sensi della vigente normativa, soltanto due generi dei sei di tale famiglia (*Protosalanx* spp. e *Neosalanx* spp.) possono essere commercializzati sul nostro territorio come Pesce Ghiaccio e non mancano segnalazioni di casi di sostituzione in prodotti sia freschi che lavorati. Sebbene il riconoscimento delle specie sopra citate possa essere effettuato attraverso lo studio dei caratteri morfologici, tuttavia tale metodica può rivelarsi non sempre di facile esecuzione per le piccole dimensioni degli esemplari (Armani *et al.*, 2007).

Falsificazione di Sardina con Alaccia e Papalina o Spratto

La **Sardina** (*Sardina pilchardus*), unica specie in Italia ad essere inscatolata sott'olio, quando viene commercializzata fresca, avendo carni molto gustose, può essere sostituita con Papalina o Spratto (*Sprattus sprattus*) da cui si distingue per l'occhio piccolo, l'opercolo non raggiato e per possedere la pinna dorsale arretrata, in modo tale che, se sospesa tra le dita, si "inchina"; può essere sostituita anche con l'Alaccia (*Sardinella aurita*), da cui si differenzia per avere una riga dorata sopra la linea laterale che nel tempo sbiadisce fino a scomparire, ma soprattutto si differenzia dall'opercolo

che nella sardina è raggiato e in rilievo, mentre l'Alaccia presenta una macchietta nera sul margine posteriore dell'opercolo (Malandra & Renon, 1998).

1.6.3 PLEURONECTIFORMI

Gli esemplari adulti dell'ordine *Pleuronectiformes* o Pesci piatti presentano il corpo compresso lateralmente, mentre gli occhi si trovano entrambi situati nel medesimo lato del corpo. Questo significativo scostamento dalla comune simmetria del piano corporeo è il risultato di cambiamenti radicali che avvengono durante lo sviluppo larvale. Probabilmente tutti i pesci piatti condividono un unico comune antenato con un gruppo ancora non identificato di pesci simmetrici, presumibilmente un perciforme (ordine *Perciformes*). I pesci piatti costituiscono inoltre i "camaleonti del mare". Molte specie possono infatti modificare il pattern di colorazione del loro lato oculare per mimetizzarsi nell'ambiente, per questo motivo il pattern di pigmentazione del lato oculare varia moltissimo tra le diverse specie, a differenza del lato cieco solitamente molto pallido o privo di pigmentazione. I membri di questo gruppo altamente diversificato si trovano negli oceani e mari di tutto il mondo, mentre poche sono le specie d'acqua salmastra o dolce. I pesci piatti si trovano soprattutto nelle pendenze continentali degli oceani ma possono anche venire catturati nelle acque più profonde. Molte sono le specie d'importanza commerciale tra cui sogliole (subordine Soleoidei) e halibut, rombi, passere, platesse, limande (subordine Pleuronectoidei).

Sono le abitudini alimentari dei pleuronectiformi a determinare la profondità alla quale possono venire catturati e questo ha infine effetto sul valore commerciale, che sarà maggiore per le specie strettamente bentoniche.

I pesci piatti primitivi, appartenenti a famiglie quali Psettodidae, Bothidae e Pleuronectidae sono, generalmente, predatori di pesci. Perciò questi pesci nuotano spesso alla ricerca di cibo nelle acque di media profondità. Di conseguenza la loro vita non è completamente confinata nei fondali oceanici perciò anche la pesca di questi esemplari risulta meno difficoltosa. A livello morfologico si caratterizzano per una bocca larga e quasi simmetrica con dentizione ben sviluppata.

Gruppi di pesci piatti più specializzati (un certo numero di Pleuronectoidei e Soleoidei) si cibano soprattutto di lombrichi e molluschi o di crostacei. Poiché questi pesci vivono quasi esclusivamente nei fondali e perciò giacciono con un lato quasi sempre rivolto verso la sabbia, la loro asimmetria sembra essersi evoluta ad un livello maggiore. In alcune specie le mascelle presentano denti soltanto sul lato cieco mentre le mascelle del lato oculare hanno evoluto una funzione secondaria: formano un sifone

che accresce la quantità d'acqua immessa nella cavità boccale. Questo adattamento facilita la respirazione, permettendo di assumere acqua priva di sabbia. (Chapleau & Amaoka, 1994).

Le specie di pleuronectiformi analizzate nel presente lavoro di tesi si trovano elencate in **Tab. 1.6** e **Tab. 1.7** e descritte negli allegati **Allegato III** (subordine Pleuronectoidei) e **IV** (subordine Soleoidei).

Pleuronectoidei

Le 300 e più specie del subordine Pleuronectoidei dell'ordine *Pleuronectiformes* comprendono le specie comunemente chiamate passere, platessa, rombi e halibut. La maggioranza dei pleuronectoidei si suddivide in due gruppi: il primo con il lato oculare a destra (famiglia Pleuronectidae), ed il secondo con il lato oculare a sinistra (famiglia Bothidae). I pleuronectoidei con lato oculare a destra sono piuttosto diversificati per quanto concerne morfologia e struttura. Molte specie (tra cui halibut, passera, platessa) sostengono importanti industrie della pesca negli oceani Artico, Atlantico e Pacifico. L'Halibut atlantico *Hippoglossus hippoglossus* detiene il record del mondo, tra i pesci piatti, in quanto a dimensioni, con un esemplare di 2,5 m di lunghezza e 90 kg di peso.

Tra le passere con lato oculare a sinistra, il genere *Paralichthys* annovera un certo numero di specie d'importanza commerciale. Alcuni crescono fino ad una lunghezza di 1,5 metri (Chapleau & Amaoka, 1994).

Soleoidei

Le 220 o più specie del subordine Soleoidei dell'ordine *Pleuronectiformes* vengono, quasi in ogni istanza, denominati sogliole. Essi includono tre famiglie: la famiglia con lato oculare destro Achiridae (Sogliole Americane), le Soleidae (sogliole in senso stretto) e la famiglia con lato oculare sinistro Cynoglossidae (sogliole linguatae). Le sogliole formano un gruppo di pesci piatti altamente specializzati in quanto presentano molte caratteristiche di asimmetria in aggiunta all'orientamento degli occhi: una piccola bocca ruotata con piccoli denti, occhi di piccole dimensioni; pinne pettorali e pelvica scarsamente sviluppate ed altamente asimmetriche. Infine, le sogliole linguatae presentano un lungo uncino a livello della faccia, il quale si sovrappone alla regione della bocca, mentre sono prive delle pinne pettorali e della pinna pelvica nel lato oculare (Chapleau & Amaoka, 1994).

FAMIGLIA	GENERE	SPECIE	DENOMINAZIONE COMMERCIALE
Cynoglossidae	<i>Paraplagusia</i>	<i>bilineata</i>	SOGLIOLA INDO-PACIFICA
Soleidae	<i>Dicologlossa</i>	<i>cuneata</i>	SOGLIOLA CUNEATA
	<i>Solea</i>	<i>kleinii</i>	SOGLIOLA TURCA
		<i>lascaris</i>	SOGLIOLA DEL PORRO
		<i>senegalensis</i>	SOGLIOLA ATLANTICA
		<i>solea</i>	SOGLIOLA

Tab. 1.6. Quadro tassonomico delle specie di Soleoidei analizzate nel presente lavoro di tesi.

FAMIGLIA	GENERE	SPECIE	DENOMINAZIONE COMMERCIALE
Bothidae	<i>Arnoglossus</i>	<i>laterna</i>	ZANCHETTA o SUACIA
Citharidae	<i>Citahrus</i>	<i>linguatula</i>	LINGUATTOLA
Pleuronectidae	<i>Hippoglossus</i>	<i>hippoglossus</i>	HALIBUT
	<i>Lepidopsetta</i>	<i>bilineata</i>	PASSERA DEL PACIFICO
	<i>Hippoglossoides</i>	<i>elassodon</i>	PASSERA DEL PACIFICO
	<i>Limanda</i>	<i>aspera</i>	LIMANDA
		<i>limanda</i>	
	<i>Platichthys</i>	<i>flesus</i>	PASSERA
	<i>Pleuronectes</i>	<i>quadrituberculatus</i>	PLATESSA DEL PACIFICO
		<i>platessa</i>	PLATESSA
<i>Reinhardtius</i>	<i>hippoglossoides</i>	HALIBT DELLA GROENLANDIA	
Scophthalmidae	<i>Psetta</i>	<i>maxima</i>	ROMBO CHIODATO
		<i>maeotica</i>	ROMBO TURCO o TUBERCOLATO
	<i>Schophthalmus</i>	<i>rhombus</i>	ROMBO LISCIO o SOASO

Tab. 1.7. Quadro tassonomico delle specie di Pleuronectoidei analizzate nel presente lavoro di tesi.

1.6.4 PRINCIPALI FRODI DI SOSTITUZIONE A CARICO DEI PLEURONECTIFORMI

Nome commerciale	Prezzo all'ingrosso (Euro/Kg)
HALIBUT	7,84 – 8,83
PANGASIO	3,78
PASSERA	3,89 – 7,03
PLATESSA	6,59 – 7,94
ROMBO LISCIO o SOASO	9,20 – 14,35
SOGLIOLA	6,09 – 17,42
SOGLIOLA DEL PORRO	2,74 – 4,32
SOGLIOLA PELOSA	1,00
ZANCHETTA	1.92 – 3.06

Tab. 1.7. Prezzi di alcune specie di Pleuronectiformi e della loro principale frode, il Pangasio, in vendita al mercato ittico di Chioggia durante il primo semestre del 2009 (Dati ISMEA).

Falsificazioni a carico della Sogliola

All'interno del subordine dei Soleoidei, caratterizzato dall'avere occhi sul lato destro, è fondamentale riconoscere gli elementi che differenziano la *Solea vulgaris*, unica specie riportata nel D.M. MIPAAF del 31/01/2008 col nome di **Sogliola**, dalle numerose specie presenti sui nostri mercati, d'interesse commerciale, che per la loro straordinaria somiglianza morfologica, forma e livrea, si prestano alla frode di sostituzione, soprattutto perché la **Sogliola**, rappresenta per le sue caratteristiche organolettiche un importante prodotto della pesca universalmente apprezzato. I prezzi delle sogliole e di altri pesci piatti presso il mercato misto di Chioggia sono riportati in **Tab. 1.7.**

Le sogliole che comunemente giungono sui nostri mercati sono: **Sogliola** (*Solea solea*), la più pregiata, Sogliola cuneata (*Dicologlossa cuneata*), Sogliola del porro (*Solea lascaris*), Sogliola turca (*Solea kleini*) e Sogliola atlantica (*Solea senegalensis*), in misura minore si trova nei mercati anche la Sogliola Indo-Pacifica (*Paraplagusia bilineata*).

Altri pesci che vengono talvolta spacciati per Sogliola sono la Linguattola (*Citharus linguatula*) e la Zanchetta o Suacia (*Arnoglossus laterna*) (Malandra e Renon, 1998), i cui caratteri morfologici distintivi verranno espilgcati nel sottoparagrafo seguente (Malandra & Renon, 1998).

Falsificazione di Soleoidei con Pleuronectoidei

Il subordine dei Pleuronectoidei è caratterizzato dall'aver un corpo appiattito, con forma ellissoidale e lato oculare a destra e pertanto le specie più significative di questo sottordine, Limanda, Platessa, Passera, sono spesso utilizzate per essere vendute come **Sogliole** del subordine Soleoidei.

Si ritiene non indispensabile la descrizione delle singole specie, nel senso che le differenze tra i due subordini sono così eclatanti da permettere una facile identificazione. Gli elementi anatomici di più facile riscontro sono: il peduncolo caudale, presente soltanto nelle specie dei Pleuronectoidei, infatti nei **Soleoidei** la pinna caudale ha inizio ove terminano posteriormente le pinne dorsale ed anale; il preopercolo è rilevabile unicamente nei Pleuronectoidei; la bocca è detta terminale nei Pleuronectoidei in quanto è posizionata all'apice del muso, mentre è detta subterminale nei **Soleoidei**, in quanto situata sotto la linea mediana ed infine la lunghezza dei raggi delle pinne dorsale ed anale, nei Pleuronectoidei, ha un andamento crescente all'inizio fino a metà circa della pinna, per poi decrescere, mentre nei **Soleoidei** la lunghezza dei raggi è uniforme per tutta la lunghezza delle pinne (Malandra e Renon, 1998).

Tra le specie di Pleuronectoidei più morfologicamente simili ai Soleoidei si annoverano la Linguattola (*Citharus linguatula*), famiglia Citharidae, e la Zanchetta o Suacia (*Arnoglossus laterna*, *Arnoglossus kessleri*), famiglia Botidae. Si tratta di pesci piatti, con occhi sul lato sinistro, molto comuni nei nostri mari, di piccole dimensioni, di norma da 10 a 15 cm, che possono essere venduti per **Soglioline** (*Solea vulgaris*).

Premesso che la **Sogliola** (*Solea vulgaris*) è protetta da una misura minima, 20cm, sotto la quale ne è vietata la pesca e pertanto il commercio, la differenza principale si rileva verificando la trasparenza della pelle, riscontrabile unicamente nelle specie oggetto di sostituzione, Linguattola o Zanchettone (*Citharus linguatula*) e Zanchetta o Suacia (*Arnoglossus laterna*) ed è evidenziabile ponendo gli esemplari controluce; si osserva così la diafanità delle carni di tali specie a differenza della **Sogliola** la quale presenta una pelle opaca, che non consente il passaggio della luce. Altre peculiarità sono: la posizione degli occhi a sinistra nella Linguattola (*Citharus linguatula*) e nella Zanchetta o Suacia (*Arnoglossus laterna*), mentre nelle **Sogliole** (*Solea solea*) vi è assenza del peduncolo caudale e bocca posta inferiormente o subterminale (Malandra & Renon, 1998).

Falsificazioni a carico della Platessa

La **Platessa** (*Pleuronectes platessa*), appartenente al subordine dei Pleuronectoidei, vive sul fondo del mare e si nutre di molluschi ed altra fauna di piccole dimensioni; è di forma ovalare e si riconosce principalmente per le macchie tondeggianti rosso brillante o aranciate diffuse anche sulle pinne. Negli anni '70 la specie *Pleuronectes platessa* fu scelta come una specie ittica su cui puntare per il mercato dei filetti congelati/surgelati sia per motivi qualitativi che quantitativi.

Accade però che i notevoli quantitativi di filetti di Platessa attualmente in vendita nei reparti del fresco e soprattutto del congelato/surgelato delle pescherie, della GDO e della DO (Distribuzione Organizzata) e proposti nei pasti della ristorazione collettiva sono decisamente in contraddizione con i recenti studi in materia di pesca i quali appunto evidenziano un netto abbassamento delle riserve di pesca della stessa e considerando inoltre che questa specie non viene ancora allevata.

Eurofishmarket, in un'indagine del 2006 (Eurofishmarket, 2006), aveva documentato come una discreta quantità di filetti di Passera (*Plathichys flesus flesus*) e Limanda (*Limanda limanda*) commercializzati frammisti o in totale sostituzione di quelli di Platessa. Una successiva indagine Eurofishmarket del 2007 (Gaggioli *et al.* 2007), attuata per mezzo dell'IEF, confermava il dato del 2006 poiché sul totale di campioni analizzati, solo il 26% risultava correttamente etichettato e apparteneva quindi alla specie *Pleuronectes platessa*) e lo completava in quanto si riscontrava, nell'indagine del 2007, che i sostituti della platessa dei Mari del Nord (le sopraccitate specie *Plathichys flesus flesus* e *Limanda limanda*) non erano più sufficienti a sopperire, neppure se messi insieme, alla richiesta della stessa in nell' Unione europea (UE). Pertanto sono state reperite sul mercato mondiale altre specie ittiche "sosia della platessa" (**Tab. 1.8**) come la *Limanda aspera* (Limanda), la *Lepidopsetta bilineata* (Passera del Pacifico) e la *Pleuronectes quadrituberculatus* (Platessa del Pacifico), prevalentemente di provenienza dal Pacifico. Le differenze principali tra i filetti di pesce piatto pescati nei mari del Nord Europa (Zona FAO 27), come la **Platessa** (*Pleuronectes platessa*) o come la Limanda (*Limanda limanda*) o la Passera (*Plathichys flesus flesus*) e quelli pescati nei mari di Bering e del Giappone (Zona FAO 61) come la *Limanda aspera*, *Lepidopsetta bilineata* (Passera del Pacifico) e la *Pleuronectes quadrituberculatus* (Platessa del Pacifico) sono principalmente nel differente processo di pesca e di lavorazione, nel valore nutrizionale e sensoriale e nel periodo di durata della conservazione del filetto.

Denominazione scientifica	Denominazione obbligatoria (D.M. 31/01/2008 MIPAAF)	Zona FAO
<i>Plathichys flesus flesus</i>	Passera	27
<i>Lepidopsetta bilineata</i>	Passera del Pacifico	61
<i>Pleuronectes quadrituberculatus</i>	Platessa del Pacifico	61
<i>Limanda limanda</i>	Limanda	27
<i>Limanda aspera</i>	Limanda	61

Tab. 1.8. Principali specie commercializzate in sostituzione della Platessa (Gaggioli *et al.*).

Falsificazione di Rombo chiodato con Rombo turco o tubercolato

I pesci denominati “Rombi” si distinguono, tra i pesci piatti, per la tipica forma a rombo. Il **Rombo chiodato** (*Psetta maxima*) ed il **Rombo liscio o Soaso** (*Scophthalmus rhombus*) costituiscono, tra i membri della famiglia Scophthalmidae, delle specie molto pregiate, paragonabili alla Sogliola, soprattutto quando si tratti di esemplari pescati, tipologia di nicchia poichè il 70% dei rombi che attualmente raggiungono i nostri mercati provengono da acquacoltura.

Quale specie pregiata, il **Rombo chiodato** è soggetto a frodi di sostituzione con Pleuronectoidei di minor pregio ma anche con altre specie della famiglia Scophthalmidae, tra cui una specie importata dalla Turchia, riscontrabile sui nostri mercati: Rombo turco o tubercolato (*Psetta maxima maeotica*) non riportato nel Decreto MIPAAF del 31/01/2008. Le differenze sostanziali che differenziano il Rombo o Rombo chiodato dal Rombo turco o tubercolato sono tre e, precisamente: la forma del corpo più quadrangolare nel Rombo turco o tubercolato (*Psetta maeotica*), mentre nel **Rombo** o **Rombo chiodato** (*Psetta maxima*) i tubercoli sono più piccoli dell’occhio e sono disposti solo sul lato oculare.

La presenza di tubercoli così grossi nel Rombo turco o tubercolato rende improponibile la frode con il **Rombo liscio o Soaso** (*Scophthalmus rhombus*) (Malandra & Renon, 1998).

1.6.5 PERCIFORMI

L’ordine *Peciformes* rappresenta di gran lunga il più vasto e diversificato gruppo di vertebrati includendo sia i piccoli ghiozzi che i grandi tonni. I perciformi abitano quasi ogni tipo di habitat acquatico, dai torrenti di alta montagna fino alle profondità oceaniche, a causa dell’enorme radiazione adattativa di cui sono stati oggetto.

Nel presente lavoro si è particolarmente interessati alla famiglia Percidae, la più numerosa famiglia di percoidi d'acqua dolce, la quale comprende la specie d'interesse commerciale **Pesce Persico** (*Perca fluviatilis*), e la famiglia Centropomidae (lucci), che include la principale frode a carico del pesce persico, ovvero il *Lates niloticus* o Persico Africano. I Centropomidi sono pesci predatori che abitano le acque dolci marine e salmastre delle regioni tropicali e subtropicali. Si caratterizzano per una pinna dorsale relativamente alta, triangolare e spinosa, e la linea laterale che si estende ben sopra la coda. La maggior parte delle specie di Centropomidi provengono dall'Africa e la loro lunghezza è variabile dai 30 cm ai 2 m (Barrister, 1994).

Sostituzione di Pesce Persico con Persico Africano

Il **Pesce Persico** è una specie d'acqua dolce di notevole interesse economico in Europa (ma oramai rara sul mercato perché quasi in ogni istanza sostituita dal più economico Persico africano); in Italia è molto richiesta e sovente importata dall'Europa centrale e settentrionale per far fronte alla insufficiente disponibilità interna. Viene commercializzata fresca o congelata, sia intera che in filetti.

La frode di sostituzione del **Pesce persico** con il Persico Africano viene attuata mediante la commercializzazione delle suddette specie come filetti. I filetti di Persico Africano (*Lates niloticus*) vengono prodotti nell'Africa centrale, principalmente in Kenia e Tanzania, ed in seguito raggiungono i mercati europei dove costituiscono uno dei prodotti ittici maggiormente commercializzate in Italia come nel resto dell'Europa.

Nei filetti di **Pesce Persico** (*Perca fluviatilis*) il tessuto muscolare si presenta di colore rosa tenue, privo di bande, mentre il tessuto muscolare del Persico Africano si presenta di norma di colore rosato, con delle bande o striature caratteristiche, di colore più scuro sulla superficie esterna (Malandra e Renon, 1998). La differenza di pregio commerciale tra le due specie suddette è però notevole in quanto il prezzo al dettaglio dei filetti di Pesce persico raggiunge anche i 30,00 euro/Kg contro i 10-15 euro/Kg dei filetti di Persico africano.

Il Persico Africano rappresenta comunque una specie molto ricercata dal consumatore europeo per i suoi filetti dal sapore abbastanza neutro, scarto nullo e assenza di spine. E' stato più volte sottoposto a divieti commerciali perché prodotto in zone inquinate (Malandra & Renon, 1998).

1.6.6 FRODI COINVOLGENTI IL PANGASIO

La denominazione Pangasio raggruppa tutte le specie ittiche appartenenti al genere *Pangasius*. Il genere *Pangasius* appartiene alla famiglia Pangasidae dell'ordine Siluriformes. E' un grosso (130 cm) pesce d'acqua dolce tipico del Sud-Est Asiatico, è presente nel bacino dei fiumi Mekong e Chao Phraya, tra i più inquinati al mondo. E' stato ampiamente introdotto anche in altri fiumi a scopo di acquacoltura. Figura tra le specie allevate più importanti in Thailandia e sta acquistando crescente interesse sui nostri mercati, commercializzata prevalentemente congelata, sia intera che in filetti.

Spesso i suoi filetti vengono spacciati fraudolentemente per filetti di pregiati **Pleuronectoidei** e **Soleoidei**. Ad esempio, i suoi filetti risultano molto simili, per colorazione, a quelli dell'**Halibut** (*Hippoglossus hippoglossus*) e dell'**Halibut della Groenlandia** (*Reinhardtius hippoglossoides*); entrambe le specie descritte nell' **Allegato III**.

Il Pangasio, viene apprezzato dal consumatore odierno poichè è economico (il prezzo all'ingrosso del Pangasio è illustrato in **Tab. 1.7**) e pratico da preparare in quanto commercializzato al dettaglio esclusivamente sotto forma di filetti; ha tuttavia un valore nutrizionale molto ridotto, ben inferiore ai pesci nostrani di acquacoltura: è minimo infatti il suo contenuto di grassi $\Omega 3$. Un trattamento all'origine con additivi chimici gli consente di trattenere l'acqua allo scongelamento e mantenere sode le carni, e in tal modo viene talvolta spacciato per **Sogliola** fresca.

2. **SCOPO DELLA TESI**

Lo scopo del presente lavoro è stato l'utilizzo e la messa a punto della metodica Pyrosequencing per l'identificazione di specie ittiche a sostegno della lotta alle frodi commerciali di sostituzione di specie in luogo delle metodiche attualmente in uso. Tale metodica è stata applicata a due gruppi principali di pesci soggetti a frode, ovvero Clupeiformi e Pleuronectiformi.

3. **MATERIALI e METODI**

3.1 **DISEGNO DEI PRIMER DI PCR E DI SEQUENZIAMENTO**

Dopo aver verificato la disponibilità delle sequenze di un certo numero di geni mitocondriali per quanto riguarda vari gruppi di specie ittiche, e dopo aver valutato, per ogni gene, la presenza di zone conservate sufficientemente lunghe per il disegno di primer, si è scelto di mettere a punto la metodica *pyrosequencing* sul gene 16S di Clupeiformi e Pleuronectiformi per una serie di motivi:

- a. vasta rappresentatività nelle banche dati biologiche primarie;
- b. bassissimo livello di mutagenesi intraspecifica che consente al gene di mantenersi pressoché costante nel tempo all'interno della stessa specie;
- c. presenza di vaste zone evolutivamente conservate tra organismi diversi immediatamente affiancate da zone ipervariabili, le quali nei Clupeiformi e Pleuronectiformi rendevano possibile la discriminazione tra specie; presenza cioè un pattern di zone conservate ed ipervariabili perfettamente adatto al disegno di primer per *pyrosequencing*;
- d. è un gene mitocondriale perciò presenta vari vantaggi rispetto ai geni nucleari (precedentemente illustrati nel paragrafo 1.5).

Sono state perciò allineate, tramite il software MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007), tutte le sequenze disponibili in GenBank® (Benson *et al.*, 2005) per quanto riguarda il gene 16S delle di Clupeiformi e Pleuronectiformi elencate rispettivamente in **Tab. 1.3** e **Tab. 1.5-1.6**, unitamente alle specie di altri pesci quali: *Lates niloticus* (*Perciformes*), *Neosalanx* spp. e *Protosalanx* spp. (*Perciformes*), *Pangasius* spp. (*Siluriformes*) e *Perca fluviatilis* (*Perciformes*).

Questa analisi *in silico*, illustrata in **Fig. 3.3**, ha permesso di evidenziare le zone conservate all'interno dell'allineamento, su cui si sono disegnati i primer di amplificazione, ed in particolare una zona conservata adiacente ad una zona polimorfica discriminante; su tale zona conservata è stato disegnato il primer di sequenziamento per *pyrosequencing*.

Considerando pari a 30 nucleotidi (nt) la lunghezza della regione nella quale si ottiene la massima efficienza di sequenziamento tramite Pyrosequencing™, è stato stabilito che le sequenze ragionevolmente ottenibili avessero lunghezza pari appunto a 30 nt e si è valutata la capacità discriminante del primer di sequenziamento sulla base

dei polimorfismi presenti entro questi primi 30 nt a valle del primer, tramite una matrice di distanze (**Fig. 3.2**). Questa analisi *in silico* ha dimostrato la possibilità, con tale primer, di discriminare tutte le specie considerate eccetto alcune. Per quanto riguarda i Clupeiformi si è infatti riscontrata identità tra le specie *Engraulis encrasicolus* ed *Engraulis japonicus*; per quanto invece riguarda i Pleuronectiformi sono risultati identici tra loro i membri di due gruppi di specie, appartenenti al subordine Pleuronectoidei: il primo gruppo comprende le specie *Hippoglossoides elassodon*, *Reinhardtius hippoglossoides* e le specie appartenenti al genere *Limanda*: *Limanda limanda* e *Limanda aspera*; il secondo gruppo comprende le specie *Pleuronectes quadrituberculatus*, *Pleuronectes platessa*; *Platichthys flesus*, *Lepidopsetta bilineata*.

Per poter discriminare anche queste specie si è proceduto al disegno di altri due set di primer per l'amplificazione di zone genomiche maggiormente variabili. Il primo set di primer è stato disegnato per la discriminazione degli engraulidi a livello di una regione genomica variabile; il secondo set di primer, per la discriminazione delle specie suddette di Pleuronectoidei, è stato disegnato a livello del gene CYTB.

Da ora in avanti verrà chiamata "Indagine primaria" l'analisi sul gene 16S ed "Indagine secondaria" l'analisi per la discriminazione delle specie non identificabili con la sola Indagine primaria.

3.1.1 DISEGNO DEI PRIMER PER L'INDAGINE PRIMARIA

L'allineamento per il disegno dei primer sul gene 16S deriva in realtà dall'unione di due diversi allineamenti: il primo per i Clupeiformi, il secondo per i Pleuronectiformi unitamente alle specie di "altri pesci" suddette. I due allineamenti sono stati in seguito uniti in uno unico sul quale si sono disegnati una coppia di primer di PCR ed un primer per il Pyrosequencing™.

Per alcune specie figuravano in banca dati le sequenze del gene 16S relative a diversi isolati, i cui codici GenBank® sono illustrati in **Tab. 3.1**; è stato perciò opportuno ricavare una sequenza consenso per ciascuna specie allineando tali isolati tra loro mediante il programma per analisi di sequenze *BioEdit* (Hall, 2007) secondo l'algoritmo ClustalW utilizzando i parametri disponibili di *default*.

Specie	Codici <i>Accession</i> GenBank® delle sequenze utilizzate
CLUPEIFORMI	
<i>Alosa fallax</i>	EU552738.1, EU552737.1
<i>Clupea harengus</i>	EU552769.1
<i>Engraulis anchoita</i>	AM911215.1
<i>Engraulis australis</i>	EU848445.1
<i>Engraulis encrasicolus</i>	AM911212.1, AM911211.1, AM911209.1, EU410420.1
<i>Engraulis japonicus</i>	AB246181.1
<i>Engraulis mordax</i>	EF458391.1, EF458390.1, EF458389.1, AM911213.1, EU099500.1 DQ912072.1, AB246182.1, AY328468.1
<i>Engraulis ringens</i>	AM911210.1
<i>Neosalanx e Protosalanx spp.</i>	EU419753.1, AY279365.1, AY279364.1, AY279361.1
<i>Sardina pilchardus</i>	EU410421.1, EU419754.1, DQ912088.1
<i>Sardinella aurita</i>	EU552782.1, AM911207.1, DQ912067.1
<i>Sardinops sagax</i>	GQ412303.1, GQ365310.1, GQ365308.1, GQ365305.1, GQ365298.1, GQ365288.1, GQ365280.1, GQ365279.1, GQ365276.1, GQ365270.1, EF458393.1, EF458392.1, EU548186.1, EU548185.1, EU548184.1, EU552729.1, EU552728.1
<i>Sprattus sprattus</i>	AM911201.1

Tab. 3.1. Codici *Accession* GenBank® delle sequenze del gene 16S di clupeiformi e frodi associate (*Neosalanx* e *Protosalanx* spp.) utilizzate per ricavare le sequenze consenso di ogni specie da utilizzare nell'allineamento finale per il disegno di primer in **Fig 3.3**.

Specie	Codici <i>Accession GenBank</i> [®] delle sequenze utilizzate
PESCI PIATTI	
<i>Dicologlossa cuneata</i>	AY359660.1, AB125252.1, AY157321.1
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	NC_009709.1, AM749125.1, AM749124.1, AM749123.1, AM749122.1
<i>Hippoglossoides elassoson</i>	DQ464120.1, DQ464119.1
<i>Pleuronectesquadrituberculatus</i>	FJ870406.1
<i>Pleuronectes platessa</i>	EU348298.1, AY359673.1, AY157328.1
<i>Psetta maxima</i>	NC_013183.1, EU419747.1, AM182441.1, AM182440.1
<i>Psetta maxima maeotica</i>	EU410416.1
<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	FJ870423.1, FJ870422.1
<i>Pegusa kleinii</i>	AB125248.1, AF112847.1
<i>Scophthalmus rhombus</i>	AY359665.1, AY998044.1
<i>Solea lascaris</i>	AY359662.1, AB125245.1, AF112849.1
<i>Solea senegalensis</i>	NC_008327.1, AY359661.1, AB270760.1, AB125246.1
<i>Solea solea</i>	AF488442.1, EF095584.1, AB125247.1
ALTRE SPECIE	
<i>Lates niloticus</i>	EU348303.1, AB122030.1, U85007.3
<i>Pangasius spp.</i>	DQ334317.1, DQ334316.1, DQ334315.1, DQ334314.1, DQ334313.1, DQ334310.1, DQ334309.1, DQ334308.1, DQ334307.1, DQ334306.1, DQ334305.1, DQ334304.1, DQ334303.1, DQ334302.1, DQ334301.1, DQ334300.1, DQ334299.1, DQ334298.1, DQ334297.1, DQ334296.1, DQ334295.1, DQ334294.1, DQ334293.1, DQ334292.1, DQ334291.1, DQ334290.1, AF072751.1
<i>Perca fluviatilis</i>	DQ077959, DQ077958.1, DQ077957.1, DQ077956.1, DQ077955.1, DQ077954.1, AY254567.1, AF518221.1, AY141442.1, EU87422.1

Tab. 3.2. Codici Genebank delle sequenze del gene 16S, dei pleuronectiformi, dei perciformi e loro frodi, utilizzate per ricavare le sequenze consenso di ogni specie da utilizzare nell'allineamento finale per il disegno di primer in **Fig 3.3**.

I consensi ottenuti per ciascuna specie sono stati allineati tra loro tramite il programma per analisi di sequenze *MEGA* versione 4.1 secondo l'algoritmo *ClustalW* utilizzando una matrice di sostituzione *IUB* (secondo la quale ogni identità fornisce un punteggio pari a 1.9, mentre ogni *mismatch* fornisce un punteggio pari a 0) unitamente alle seguenti penalità a carico dei gap:

- a. Per allineamento a coppie:
 - i. penalità associata all'apertura di un gap: 50;
 - ii. penalità associata all'estensione di un gap: 6,66;

- b. Per allineamento multiplo:
- i. Penalità associata all'apertura di un gap: 15
 - ii. Penalità associata all'estensione di un gap: 6,66

Sul profilo così ottenuto, si sono disegnati i primer di PCR e di sequenziamento illustrati in **Tab. 3.3** e schematizzati in **Fig. 3.1**, i quali generano, in linea teorica, un frammento della lunghezza di 289pb.

Nome primer	Funzione	Sequenza	T _{melting}
16SForbio	<i>forward</i> biotinilato	5'-ACG AGA AGA CCC TDT GGA G-3'	58°C
16SRev	<i>reverse</i>	5'-TGT TAT CCC TAG GGT AAC TTG-3'	60°C
16Sseq,	sequenziamento	5'- GTC GCC CCA ACC GAA GA- 3'	56°C

Tab. 3.3. Primer di PCR e di sequenziamento per l'identificazione di Pleuronectiformi, Clupeiformi, Persico africano e Pangasio.



Fig. 3.1. Schema delle posizioni occupate dai primer per *Engraulis* nell'allineamento mostrato in **Fig. 3.3**.

In **Fig. 3.3** si nota che i primer di amplificazione 16SForBio e 16sRev sono stati disegnati in due zone molto conservate tra tutte le specie di pesci. Tali primer sono perciò universali. Tra le degenerazioni presenti nell'allineamento a livello delle regioni scelte per il disegno dei primer, sono state considerate nei primer soltanto quelle comuni a più sequenze per non abbassare eccessivamente la concentrazione di primer specifico e rischiare di compromettere così l'efficienza della PCR.

Il primer di sequenziamento, con orientamento *reverse*, è stato disegnato in una zona conservata più corta di quelle su cui sono stati disegnati i primer di amplificazione, ma a ridosso di una regione ipervariabile.

Si nota che le sequenze appartenenti alle specie *Dicologlossa cuneata*, *Pegusa kleinii* e *Solea lascaris* non giungono a coprire la regione del primer *reverse*, ma la conservazione che si riscontra nell'allineamento permette di supporre che anche le sequenze appartenenti alle tre specie suddette siano conservate a livello di tale regione.

Si nota inoltre che la sequenza della specie *Perca fluviatilis* presenta due *mismatch* rispetto al primer *reverse*, ma è stato ritenuto rischioso spostare il primer *reverse* verso destra, al fine di evitare la presenza di un numero troppo alto di appaiamenti G-C nella regione 3' del primer stesso; considerando inoltre la relativa rarità di tale specie nel mercato, si provvederà a disegnare un primer *ad hoc* nel caso si riesca a reperirla.

E' stata quindi valutata la capacità discriminante della sequenza ottenibile mediante il primer di sequenziamento sulla base, innanzitutto, del numero di

polimorfismi in ciascuna sequenza nei primi 30-40 nucleotidi a valle dello stesso; in secondo luogo grazie ad un'analisi *in silico* tramite matrice di distanze, che è stata calcolata per verificare le differenze tra le sequenze (**Fig 3.2**). Tali matrici dimostrano che si verificano delle identità di sequenza tra alcune specie:

- tra le due specie di Engraulidi *Engraulis encrasicolus* (**Acciuga**) ed *Engraulis japonicus* (Acciuga giapponese);
- tra i membri del subordine Pleuronectoidei, in particolare:
 - tra le specie *Hippoglossoides elassodon* (Passera del Pacifico), *Reinhardtius hippoglossoides* (**Halibut della Groenlandia**), e le specie appartenenti al genere *Limanda*: *Limanda limanda* (Limanda) e *Limanda aspera* (Limanda), in particolare l'identità di sequenza tra queste specie impedisce l'identificazione delle frodi di sostituzione a carico dell'Halibut della Groenlandia;
 - tra le specie *Pleuronectes quadrituberculatus* (Platessa del Pacifico), *Pleuronectes platessa* (**Platessa**), *Platichthys flesus* (Passera), *Lepidopsetta bilineata* (Passera del Pacifico), in particolare l'identità tra queste specie impedisce l'identificazione delle frodi di sostituzione della Platessa con pleuronectoidei di minor pregio;
- tra le due specie di scoftalmidi *Psetta maxima* (**Rombo chiodato**) e *Psetta maotica* (Rombo turco o tubercolato).

Queste identità impediscono la discriminazione univoca delle specie suddette e quindi l'identificazione delle relative frodi di sostituzione ed hanno perciò imposto la ricerca di uno specifico set di primer per *pyrosequencing* su di un gene maggiormente variabile. Nel caso dei Pleuronectoidei è stato scelto il gene codificante per il citocromo b (CYTB), mentre per la discriminazione degli engraulidi *Engraulis encrasicolus* ed *Engraulis japonicus* è stata scelta una porzione genica mitocondriale variabile.

(A)

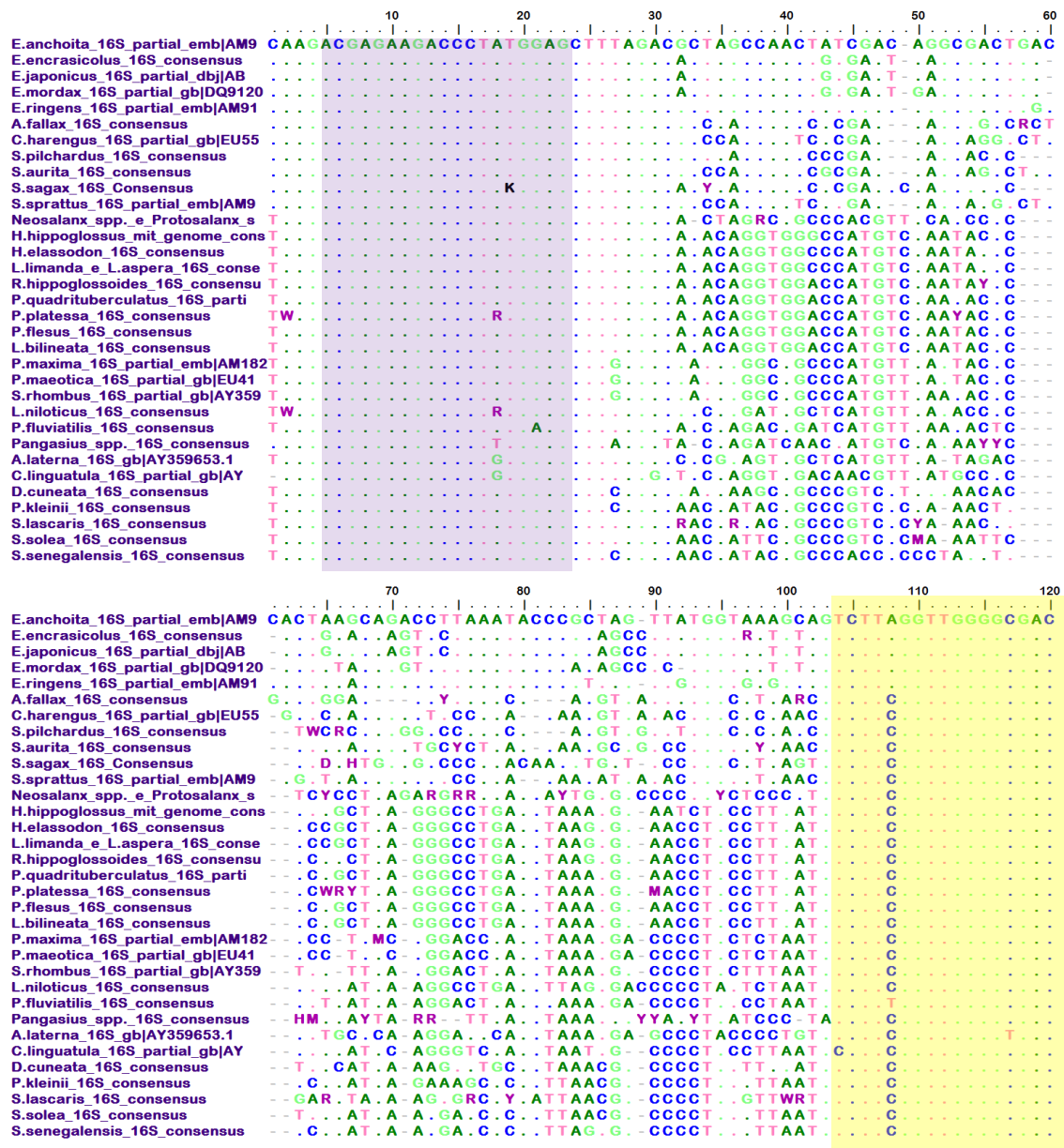
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. <i>E. encrasicolus</i>											
2. <i>E. leipomicus</i>	0.000										
3. <i>E. mordax</i>	0.470	0.470									
4. <i>E. ringens</i>	0.554	0.554	0.279								
5. <i>E. anchoita</i>	0.493	0.493	0.241	0.073							
6. <i>A. fallax</i>	0.590	0.590	0.675	0.628	0.507						
7. <i>C. harengus</i>	0.816	0.816	0.742	0.786	0.719	0.132					
8. <i>S. pilchardus</i>	0.831	0.831	0.889	0.666	0.602	0.199	0.167				
9. <i>S. aurita</i>	0.666	0.666	0.662	0.574	0.514	0.234	0.271	0.192			
10. <i>S. sagax</i>	0.644	0.644	0.708	0.503	0.500	0.585	0.590	0.657	0.514		
11. <i>S. sprattus</i>	0.684	0.684	0.680	0.724	0.658	0.195	0.048	0.235	0.273	0.649	
12. <i>Neosalanx</i> spp. e <i>Protosalanx</i>	0.713	0.713	0.598	0.718	0.780	0.883	0.889	0.795	0.577	0.270	0.951

(B)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. <i>H. elassodon</i>																		
2. <i>L. limanda</i> e <i>L. aspera</i>	0.000																	
3. <i>R. hippoglossoides</i>	0.000	0.000																
4. <i>H. hippoglossus</i>	0.093	0.093	0.093															
5. <i>P. quadrituberculatus</i>	0.045	0.045	0.045	0.045														
6. <i>P. platessa</i>	0.045	0.045	0.045	0.045	0.000													
7. <i>P. flesus</i> 16S	0.045	0.045	0.045	0.045	0.000	0.000												
8. <i>L. bilineata</i>	0.431	0.431	0.431	0.434	0.352	0.352	0.352	0.352										
9. <i>P. maxima</i>	0.277	0.277	0.277	0.152	0.213	0.213	0.213	0.213	0.204									
10. <i>S. rhombus</i>	0.558	0.558	0.558	0.558	0.558	0.558	0.558	0.558	0.506	0.403								
11. <i>Psetodes</i> spp.	2.740	2.740	2.740	2.740	2.740	2.740	2.740	2.740	3.411	3.475	1.436							
12. <i>L. niloticus</i>	0.481	0.481	0.481	0.331	0.404	0.404	0.404	0.404	0.529	0.355	0.569	2.740						
13. <i>P. fluviatilis</i>	3.311	3.311	3.311	3.391	3.326	3.326	3.326	3.326	3.326	2.617	5.455	11.739	3.535					
14. <i>Pangasius</i> spp.	1.066	1.066	1.066	0.756	0.913	0.913	0.913	0.913	1.146	0.715	1.932	5.610	0.911	4.581				
15. <i>S. solea</i>	0.618	0.618	0.618	0.899	0.746	0.746	0.746	0.746	0.891	0.891	1.644	5.610	0.626	4.395	0.146			
16. <i>S. senegalensis</i>	0.670	0.670	0.670	0.462	0.563	0.563	0.563	0.563	1.084	0.501	1.068	4.224	0.563	3.411	0.627	1.500		
17. <i>D. cuneata</i>	1.745	1.745	1.745	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500	2.435	2.435	1.644	3.326	1.644	4.391	0.436	0.694	3.362	
18. <i>S. laccaris</i>	0.670	0.670	0.670	0.677	0.563	0.563	0.563	0.563	0.766	0.766	1.534	4.391	0.677	3.499	0.152	0.211	0.694	0.496
19. <i>P. kleinii</i>																		

Fig. 3.2. Matrici di distanze dei clipeiformi con relative frodi (A), e dei pleuronectiformi con relative frodi (B) ottenute tramite il software MEGA 4.1. Le sequenze utilizzate per la creazione delle matrici comprendono i primi 30 nucleotidi a valle del primer di sequenziamento 16Sseq, una lunghezza mediamente ottenibile in una seduta di Pyrosequencing™.

Fig 3.3. Allineamento, visualizzato graficamente tramite il software BioEdit, usato per il disegno di primer sul gene 16S. I riquadri colorati evidenziano le regioni sulle quali sono stati disegnati, nell'ordine, il primer 16SForBio (in viola), il primer 16Sseq (in giallo) ed il primer 16SRev (in turchese nella pagina successiva).



130 140 150 160 170 180

E.anchoita_16S_partial_emb|AM9 CACGGGAGAAAA TAAAGC CCCAGGCAG ACCGGGGG AT
E.encrasicolus_16S_consensus G A AA
E.japonicus_16S_partial_dbj|AB G A AA
E.mordax_16S_partial_gb|DQ9120 A A AA
E.ringens_16S_partial_emb|AM91 G
A.fallax_16S_consensus T . C GA TG TA C
C.harengus_16S_partial_gb|EU55 G G . A GA AG TT C T
S.pilchardus_16S_consensus G T . C C GA TG TG A
S.aurita_16S_consensus G AG . G . C CT . GA AG AT AACRA
S.sagax_16S_Consensus G T . C C GA TG T C
S.spratrus_16S_partial_emb|AM9 G G . A GA AG TT C T
Neosalanx spp. e Protosalanx s G AG . T . A G CT . T TG AA TT C
H.hippoglossus_mit_genome_cons T GA . T . C A C C TG AA A C C
H.lassodon_16S_consensus T GA . T . C A C C TG AG A C C
L.limanda_e_L.aspera_16S_conse T GA . T . C A C C TG AG A C C
R.hippoglossoides_16S_consensu T GA . T . C A C C TG AA A C C
P.quadrituberculatus_16S_parti T GA . T . C A C C TG AA A C C
P.platessa_16S_consensus T GA . T . C A C C TG AA ARC C
P.flesus_16S_consensus T GA . T . C A C C TG AA A C C
L.bilineata_16S_consensus T GA . T . C A C C TG AA A C C
P.maxima_16S_partial_emb|AM182 T G T . C A C T TG ATA A C C
P.maeotica_16S_partial_gb|EU41 T G T . C A C T TG ATA A C C
S.rhombus_16S_partial_gb|AY359 T G T . C A C C TG G ATA A C C
L.niloticus_16S_consensus T A GA . C . A C T C TG AT A T CCA
P.fluviatilis_16S_consensus G GA . C . A A C C TG AT A C
Pangasius spp. 16S_consensus G Y Y R RTT H
A.laterna_16S_gb|AY359653.1 T GT C C A C T T A A C CTAGAA GGACACCACCACGGGA
C.linguatula_16S_partial_gb|AY T GA . C . A A C AA TG AT A A C C CA AACCC T CACTTA
D.cuneata_16S_consensus T GA . C . C A C T TG AT A A C C C AACCCAC T G
P.kleini_16S_consensus G GA . T . C A C T TG AT A AAC CT CACCCCT TACT
S.lascaris_16S_consensus G GA . T . C Y A C T TG GTRA A C CTW TAYCCCRYACT
S.solea_16S_consensus G GA . T . C A C T TG ATAA A C CTT AACCCCT TCACT
S.senegalensis_16S_consensus G GA . T . C A C T TG ATAA A C CTA AACCCCT TCACT

190 200 210 220 230 240

E.anchoita_16S_partial_emb|AM9 ACCCTT GAGCCAAGAGT AGCTACTCTAAGCCACAGAA TTTT T GACTGAG
E.encrasicolus_16S_consensus A G T A G . A H
E.japonicus_16S_partial_dbj|AB A G T A G . A A
E.mordax_16S_partial_gb|DQ9120 A C T A G . A A
E.ringens_16S_partial_emb|AM91 A .
A.fallax_16S_consensus AA . A C CCA AG T A . CA CA T
C.harengus_16S_partial_gb|EU55 AA . A CTA AC T A . CA CA A
S.pilchardus_16S_consensus AA . A CTA AG G T R . CA CA C
S.aurita_16S_consensus AA . A CCA AG T A . AA C C
S.sagax_16S_Consensus AA . A CCA AG T A . CA CA T
S.spratrus_16S_partial_emb|AM9 AA . A CTA AC T A . CA CA A
Neosalanx spp. e Protosalanx s KA TCAM A T G CCR Y G C A AW C C R
H.hippoglossus_mit_genome_cons GTTAC TTCTTCT GCA C C A AG C AG A C C A
H.lassodon_16S_consensus GTTAC TTCTTCT GCA C C A AG C AG A C C A
L.limanda_e_L.aspera_16S_conse GTTAC TTCTTCT GCA C C A RG C AG A C C A
R.hippoglossoides_16S_consensu GTTAC TTCTTCT GCA C C A AG C AG A C C A
P.quadrituberculatus_16S_parti GTTAC TTCTTCT GCA C C A AG CAAG A C C A
P.platessa_16S_consensus GTTAC TTCTTCT GCA C C A AG CMAG A C C A
P.flesus_16S_consensus GTTAC TTCTTCT GCA C C A AG CAAG A C C A
L.bilineata_16S_consensus GTTAC TTCTTCT GCA C C A AG CAAG A C C A
P.maxima_16S_partial_emb|AM182 GTTAACT CC AATG CCA AC C TTA C CA A
P.maeotica_16S_partial_gb|EU41 TTTAACT CC AATG CCA AC C TTA C CA A
S.rhombus_16S_partial_gb|AY359 GTTAACT C AG CCA AC C GTTA C CA A
L.niloticus_16S_consensus TTTT T CTACACT AC A T CCA AG A TTTA A C CA C
P.fluviatilis_16S_consensus CCCC T AA A T CTC G GTTA C CA
Pangasius spp. 16S_consensus AHY AA A Y RAGA AT Y T R YA C C Y
A.laterna_16S_gb|AY359653.1 ACCACT TACCCCT CA AA C G CCC C C GTTA GA GC T A
C.linguatula_16S_partial_gb|AY CCCC T AT A T T G TATA C GTTA C CA A
D.cuneata_16S_consensus CCGTCT T AC AA GGA AC TTAT C CA A
P.kleini_16S_consensus CCCCCT T A A A C GGA AC TTA C CA A
S.lascaris_16S_consensus CYYGCT T AA AA T GGA AC TWAK Y C CA A
S.solea_16S_consensus CCGTCT T A A A T GGA AC TTA C CTTA
S.senegalensis_16S_consensus CCGTCT T AA AG T GGA AC G CTA C CTTA

250 260 270 280 290 300

E.anchoita_16S_partial_emb|AM9 A T GATCCGGTTGACA GACCGATTGACGAACCAAGTTACCC TAGGGATAACAGCGCAA
E.encrasicolus_16S_consensus A A A A A A A
E.japonicus_16S_partial_dbj|AB A A A A A A A
E.mordax_16S_partial_gb|DQ9120 A A A A A A A
E.ringens_16S_partial_emb|AM91 A .
A.fallax_16S_consensus A C TT TG CCA
C.harengus_16S_partial_gb|EU55 A C TT TG CCA
S.pilchardus_16S_consensus A C T TG CCA G
S.aurita_16S_consensus A C T TG CA G
S.sagax_16S_Consensus A C TA TG CCA G
S.spratrus_16S_partial_emb|AM9 A C TT TG A
Neosalanx spp. e Protosalanx s A CRC A TG A G A
H.hippoglossus_mit_genome_cons C A T CA
H.lassodon_16S_consensus C A T CA R
L.limanda_e_L.aspera_16S_conse A A T CA
R.hippoglossoides_16S_consensu C A A CA
P.quadrituberculatus_16S_parti C T A CA
P.platessa_16S_consensus C T A W CA
P.flesus_16S_consensus C T A CA
L.bilineata_16S_consensus C T A CA
P.maxima_16S_partial_emb|AM182 A CA A A G CA G
P.maeotica_16S_partial_gb|EU41 A CA A A G CA G
S.rhombus_16S_partial_gb|AY359 A CA T A G CA G
L.niloticus_16S_consensus A CA T A G T CA G
P.fluviatilis_16S_consensus TAA CA T G CA G T
Pangasius spp. 16S_consensus AR CCWVWV HCCG YCA G
A.laterna_16S_gb|AY359653.1 A G T A CA C
C.linguatula_16S_partial_gb|AY CA CT A G A TA A C
D.cuneata_16S_consensus .
P.kleini_16S_consensus .
S.lascaris_16S_consensus .
S.solea_16S_consensus A CC T G CAG
S.senegalensis_16S_consensus A CT T G CA

3.1.2 DISEGNO DEI PRIMER PER LE INDAGINI SECONDARIE

Come precedentemente evidenziato, il primer di sequenziamento così disegnato sull'rDNA 16S è risultato sufficiente a discriminare la maggioranza, ma non la totalità, delle frodi d'interesse commerciale a carico di Pleuronectiformi e Clupeiformi. Perciò altri primer sono stati disegnati per risolvere alcuni casi particolari:

- identità, nella porzione sequenziata del rDNA 16S, tra Acciuga o Alice (*Engraulis encrasicolus*) ed Acciuga giapponese (*Engraulis japonicus*);
- identità, nella porzione dell' rDNA 16S sequenziata mediante Pyrosequencing™, tra i membri del subordine Pleuronectoidei.

Il problema della discriminazione biomolecolare delle specie *Psetta maeotica* e *Psetta maxima* non può che essere tralasciato per il momento poiché l'unica sequenza disponibile per la specie *P. maeotica* è proprio quella relativa al gene 16S.

Il **caso a** è stato risolto allineando i genomi mitocondriali di due isolati per ciascuna specie di *Engraulis encrasicolus* (codici *Accession*: NC_009581.1, AP009137.1) ed *Engraulis japonicus* (codici *Accession*: NC_003097.1AB040676.1) reperiti nella banca dati GenBank. I genomi di tale specie risultano molto simili e si differenziano soltanto per circa 600 SNP sparsi sulle circa 17.000 pb che compongono il genoma mitocondriale. Questi SNP risultano del tutto condivisi tra le sequenze appartenenti alla stessa specie. Il primer di sequenziamento ed i primer di PCR disegnati sugli engraulidi sono posizionati, rispettivamente, a ridosso e nell'intorno di una porzione genomica caratterizzata da 6 SNP sparsi su 25 pb. I primer, illustrati in **Tab. 3.3** e schematizzati in **Fig. 3.4**, sono stati disegnati con l'aiuto del software "Pyrosequencing™ Assay Design SW", in dotazione al pyrosequenziatore, su di una porzione dell'allineamento di circa 300 pb (**Fig. 3.5**), che circondano la regione variabile suddetta; tali primer generano un frammento di lunghezza pari a 291 pb.

Nome primer	Funzione	Sequenza	T _{melting}
EngraJEF	<i>forward</i> biotinitilato	5' -GCAGCCTTCCTTACCTTAAACA-3'	68.6
EngraJER	<i>reverse</i>	5' -GTAGGAGGTTTGTGGCGAGAG-3'	70.1
EngraJES	sequenziamento	5' -AGTCACTTGGGTAAGAATC-3'	50.7

Tab. 3.4. Primer di PCR e di sequenziamento per la discriminazione di *E. encrasicolus* ed *E. japonicus*.

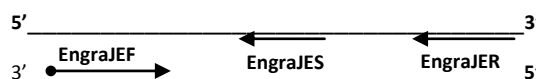


Fig. 3.4. Schema delle posizioni occupate dai primer per la discriminazione di *E. encrasicolus* ed *Engraulis japonicus* nell'allineamento riportato in **Fig. 3.5**.

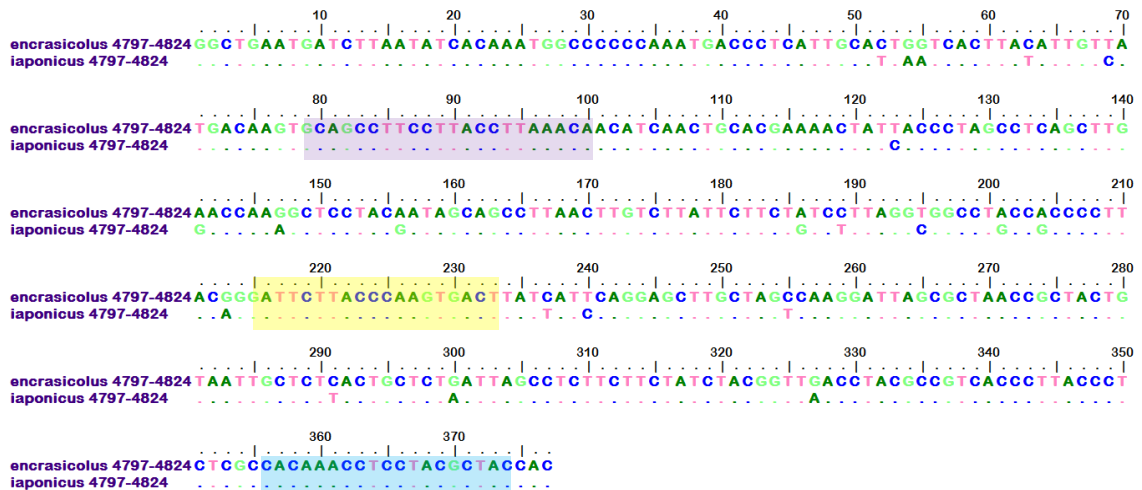


Fig. 3.5. Allineamento, visualizzato graficamente tramite il software Bioedit, per il disegno del set di primer per pyrosequencing per l'amplificazione ed il sequenziamento di una regione genomica mitocondriale discriminante tra *Engraulis encrasicolus* ed *Engraulis japonicus*. I riquadri colorati evidenziano le regioni sulle quali sono stati disegnati, nell'ordine, il primer EngraJEF (in viola), il primer EngraJES (in giallo) ed il primer EngraJER (in turchese). I numeri 4797 e 4824 si riferiscono alle posizioni occupate nel genoma mitocondriale, rispettivamente, dallo SNP iniziale inizio e dallo SNP finale della regione genomica discriminante e sita adiacente al primer di sequenziamento.

Per il **caso b** si è ricorsi all'allineamento di un altro gene maggiormente variabile: quello codificante per il citocromo b (CYTB), sul quale si sono disegnati i primer illustrati in **Tab 3.4** e schematizzati in **Fig. 3.6**, PleuFbio, PleuRseq1 e PleuRseq2, che generano un frammento della lunghezza di 520 pb.

Nome primer	Funzione	Sequenza	T _{melting}
PleuFbio	Forward biotinilato	5'-ATC GCA AAC GAT GCT TTA G-3'	54°C
PleuRseq1	Reverse e sequenziamento	5'-GGA ARA GRA AGT GGA AKG C- 3'	54°C
PleuRseq2	Reverse e sequenziamento	5'-GGA ARA GRA AGT GGA AKG C- 3'	

Tab 3.5. Primer di PCR e di sequenziamento per l'identificazione dei Pleuronectoidei.

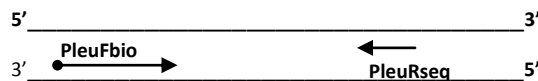


Fig. 3.6. Schema delle posizioni occupate dai primer per il gene *Cytb* dei pleuronectoidei nell'allineamento riportato in **Fig. 3.5**.

L'allineamento delle sequenze codificanti per il *CYTB* è stato condotto secondo le stesse modalità adottate precedentemente per il 16S: si è ottenuta la sequenza consenso dei diversi isolati appartenenti alla stessa specie, ed è stato quindi condotto un allineamento sulle sequenze consenso delle specie ittiche di pleuronectoidei riportate di seguito:

- *Glyptocephalus cynoglossus*;
- *Hippoglossides elassodon*;
- *Hippoglossoides platessoides*;
- *Hippoglossoides robustus*;
- *Hippoglossus hippoglossus*;
- *Isopsetta isolepis*;
- *Lepidopsetta bilineata*;
- *Lepidopsetta polyxistra*;
- *Limanda limanda*;
- *Liopsetta mochigarei*;
- *Liopsetta pinnifasciata*;
- *Microstomus kitt*;
- *Paralichthys olivaceus*;
- *Parophrys vetulus*;
- *Platichthys stellatus*;
- *Platichthys flesus*;
- *Psettichthys melanostictus*;
- *Pleuronectes platessa*;
- *Pseudopleuronectes herzensteini*;
- *Pseudopleuronectes obscurus*;
- *Pseudopleuronectes yokohamae*;
- *Reinhardtius hippoglossoides*.

Si noti la presenza di specie di pleuronectoidei estranee al nostro progetto d'analisi. Si è infatti scelto di inserire anche tali specie al fine di rendere l'allineamento stesso il più rappresentativo possibile della variabilità genetica del subordine dei Pleuronectoidei. Le specie sopraelencate sono accomunate da un'identità di sequenza pari o leggermente inferiore al 100% con le specie *Pleuronectes platessa* o *Reinhardtius hippoglossoides*, a livello della porzione del gene 16S sequenziabile mediante Pyrosequencing™. L'analisi è stata condotta con il software *BLAST* [*Basic Local Alignment Sequence Tool* (Altschul et al., 1990)] sul database di sequenze *non redundant (nr)* della banca dati GenBank®. I codici *Accession* delle sequenze utilizzate sono illustrati in **Tab. 3.6**.

Tutti i primer utilizzati nel presente lavoro sono stati sintetizzati da Eurofins Scientific. Tale azienda produttrice non sintetizza primer con più di 2 posizioni degenerate, per questo motivo abbiamo dovuto ordinare due distinti primer PleuRSeq1 e PleuRSeq2, di cui il primo degenerato alle due posizioni esterne di degenerazione, ed il secondo degenerato nella posizione interna.

Infine, per l'ottenimento di sequenze di riferimento sul gene CYTB della specie (*Pleuronectes quadrituberculatus*) per la quale non figurava alcuna sequenza in GenBank®, sono stati disegnati dei primer *ad hoc* in modo che il frammento amplificato contenesse la regione polimorfica sequenziabile mediante Pyrosequencing™. Il primer *forward*, denominato **CytbFseq**, è stato disegnato su di una regione del gene CYTB a monte del primer di sequenziamento e relativamente conservata tra le sequenze delle specie supposte più filogeneticamente correlate al genere *Pleuronectes*, ossia le sequenze delle specie *Pleuronectes platessa*, *Pseudopleuronectes herzensteini*, *Pseudopleuronectes obscurus*, *Pseudopleuronectes yokohamae*, *Lepidopsetta bilineata*, *Lepidopsetta mochigarei*, *Liopsetta pinnifasciata* e *Paralichthys olivaceus*. Mentre il primer *reverse* **tRNAproRseq**, data

l'estrema variabilità della sequenza del CYTB a valle del primer di sequenziamento PleuRSeq, è stato disegnato a livello del gene tRNA della prolina (che segue la sequenza del gene CYTB nei genomi mitocondriali degli osteitti) perché rappresentato in GenBank® da un numero maggiore di specie. Le caratteristiche dei primer CytbFseq ed tRNARseq sono riportate in **Tab. 3.6.**

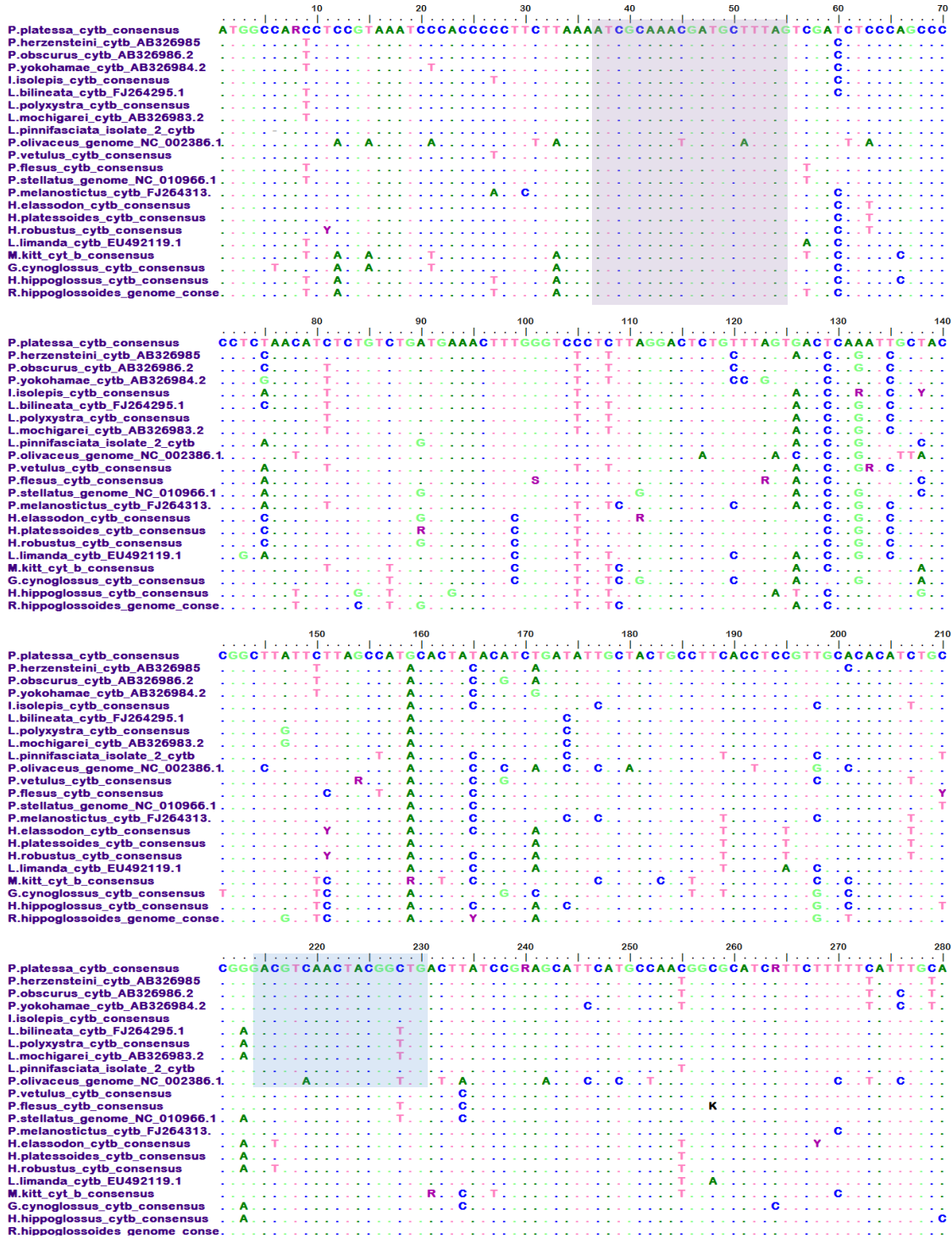
Nome primer	Funzione	Sequenza	T _{melting}
CytbFseq	<i>Forward</i>	5'-GAC GTM AAC TAC GGY TG-3'	52.8°C
tRNARseq	<i>Reverse</i>	5'-GGT GTT ATT ACA TAC ATG- 3'	52.0°C

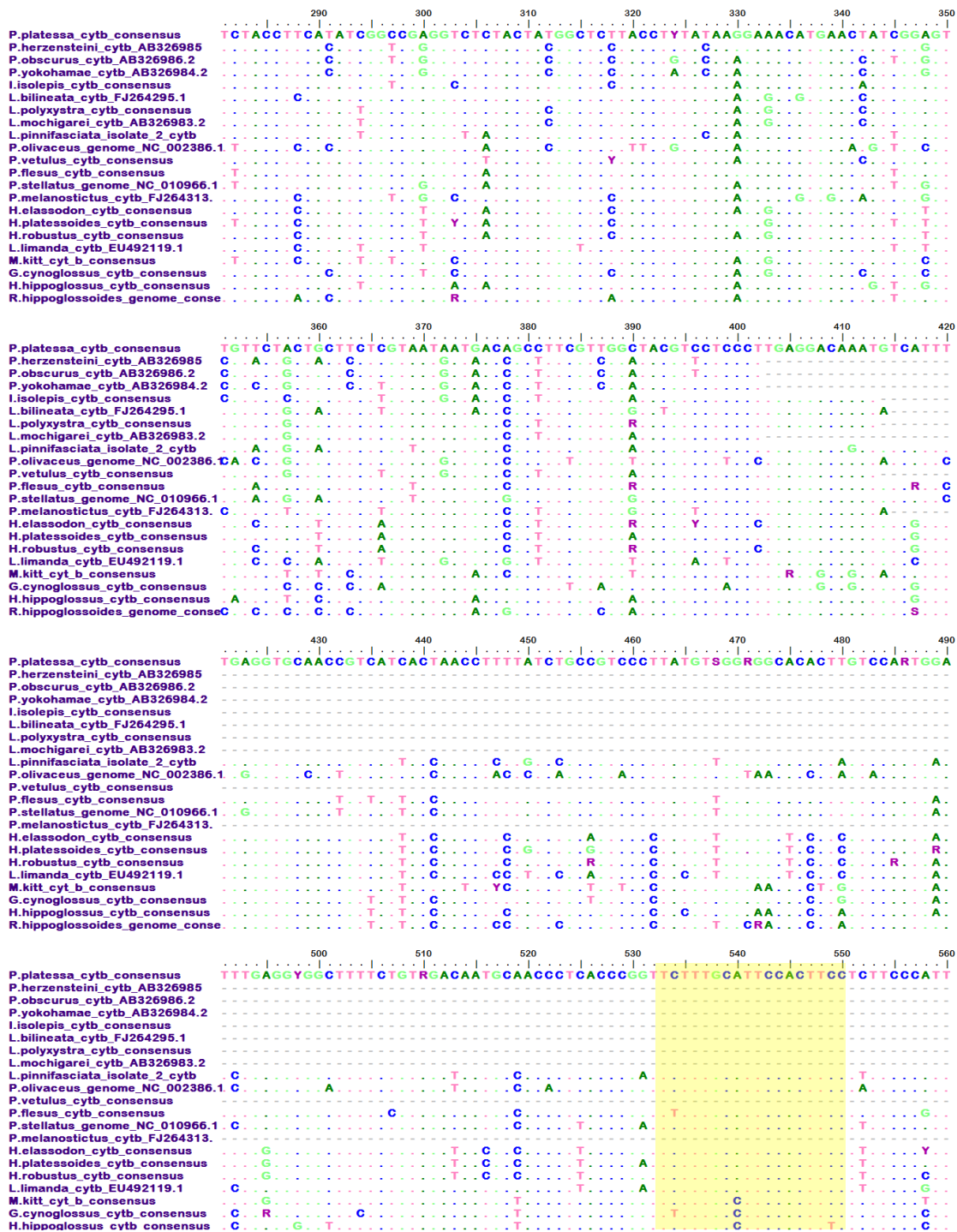
Tab 3.6. Primer di amplificazione per il sequenziamento con metodo classico della porzione del gene CYTB dei Pleuronectoidei utilizzata nell'Indagine secondaria.

Specie	Codici <i>Accession</i> GenBank® delle sequenze utilizzate
<i>Glyptocephalus cynoglossus</i>	EU492157.1, EU492156.1, EU492258.1, EU492257.1
<i>Hippoglossides elassodon</i>	DQ464120.1, DQ464119.1
<i>Hippoglossoides platessoides</i>	EU492111.1, EU492110.1, EU492286.1, EU492285.1
<i>Hippoglossoides robustus</i>	DQ464123.1, DQ464122.1, DQ464121.1
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	NC_009709.1, EU492151.1
<i>Isopsetta isolepis</i>	FJ264450.1, FJ264368.1, FJ264360.1, FJ264328.1
<i>Lepidopsetta bilineata</i>	FJ264451.1, FJ264295.1, FJ264294.1, EU513799.1
<i>Lepidopsetta polyxistra</i>	FJ264370.1, FJ264369.1, FJ264362.1,
<i>Limanda limanda</i>	EU492119.1, EU492118.1, EU492288.1, EU492287.1,EU224011.1, EU224010.1
<i>Liopsetta mochigarei</i>	AB26983.2
<i>Liopsetta pinnifasciata</i>	DQ464115.1
<i>Microstomus kitt</i>	EU492117.1,EU492116.1,EU492290.1, EU492289.1,EU224065.1, EU224064.1
<i>Paralichthys olivaceus</i>	NC_002386.1
<i>Parophys vetulus</i>	FJ264440.1, FJ264291.1, FJ264255.1, EU548204.1, EU548203.1
<i>Platichthys stellatus</i>	NC_010966.1 EF424428.1
<i>Platichthys flesus</i>	FJ515658.1, EU109757.1, EU109756.1 EU109755.1 EU109754.1 EU109753.1 EU109752.1 EU492121.1 EU492120.1 EU492294.1 EU492293.1 EU224026.1 AB125334.1 AF113179.1
<i>Psettichthys melanosticus</i>	FJ264313.1, FJ264269.1, FJ264253.1,
<i>Pleuronectes platessa</i>	EU109751.1 EU109750.1 EU109749.1 EU109748.1 EU109747.1 EU109746.1 EU109745.1 EU109744.1 EU109743.1 EU109742.1 EU492113.1 EU492112.1 EU492292.1 EU492291.1 EU224076.1 EU224075.1 AY164472.1
<i>Pseudopleuronectes herzensteini</i>	AB326985.2
<i>Pseudopleuronectes obsurus</i>	AB326986.2, DQ464116.1
<i>Pseudopleuronectes yokohamae</i>	AB326984.2
<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	NC_009711.1 AM749133.1 AM749132.1, AM749131.1 AM749130.1

Tab. 3.7. Codici *Accession* GenBank® delle sequenze utilizzate per creare le sequenze consenso specie-specifiche con cui poi è stato creato l'allineamento per il disegno di primer sul gene CYTB dei Pleuronectoidei, riportato in **Fig. 3.7**.

Fig. 3.7. Allineamento, visualizzato graficamente tramite il software BioEdit, utilizzato per il disegno di primer sul gene Cytb di specie di pleuronectoidei. I riquadri colorati evidenziano, nell'ordine la regione su cui si è disegnato il primer PleuFbio (in viola), la regione sulla quale si è disegnato il primer per sequenziamento classico CytbFseq (in blu) ed infine la regione su cui si sono disegnati i primer PleuRseq1 e PleuRseq2 (in giallo).





3.2 CAMPIONI ITTICI ANALIZZATI

I campioni ittici oggetto dell'analisi provengono dal mercato ittico di Chioggia e sono stati preventivamente identificati mediante analisi morfologica dai veterinari dell'IZSve (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie), sezione di Adria (RO), mediante le chiavi dicotomiche proposte dalla FAO. Tutte le specie ittiche analizzate fanno parte di un database che racchiude le specie d'interesse commerciale, e le corrispondenti frodi, presenti nei mercati europei.

I campioni di specie utilizzati ed i corrispondenti numeri identificativi sono elencate in **Tab. 3.8** e **Tab. 3.9**.

Campione	Nomenclatura binomia	Denominazione commerciale	Processamento subito	Origine
PLEURONECTIFORMI				
4	<i>Pleuronectes quadrituberculatus</i>	Platessa del Pacifico	congelata	
5	<i>Pleuronectes platessa</i>	Platessa	Congelata	
9	<i>Limanda limanda</i>	Limanda	Congelata	
15	<i>Pleuronectes platessa</i>	Platessa	congelata	
16	<i>Pleuronectes platessa</i>	Platessa	congelata	
36	<i>Hippoglossoides elassodon</i>	Passera del Pacifico	Congelata	
39	<i>Paraplagusia bilineata</i>	Sogliola indo-pacifica	Congelata	
51	<i>Solea senegalensis</i>	Sogliola atlantica	Congelata	
75	<i>Solea solea</i>	Sogliola	Congelata	
80	<i>Solea solea</i>	Sogliola	Congelata	NL
85	<i>Pleuronectes platessa</i>	Platessa	Congelata	FAO 27
89	<i>Solea solea</i>	Sogliola	Congelata	IT
95	<i>Pleuronectes quadrituberculatus</i>	Platessa del Pacifico		
ALTRE SPECIE				
87	<i>Lates niloticus</i>	Persico africano	Congelato	
88	<i>Pangasius hypophthalmus</i>	Pangasio	congelato	
98	<i>Pangasius hypophthalmus</i>	Pangasio	congelata	

Tab. 3.8. Campioni di pleuronectiformi e loro frodi, denominate "altre specie", sottoposti a Pyrosequencing™ nel presente lavoro.

Campione	Nomenclatura binomia	Denominazione commerciale	Processamento subito	Origine
CLUPEIFORMI				
34	<i>Sardinops sagax</i>	Sardina della California	congelata	
62	<i>Sprattus sprattus</i>	Papalina o Spratto	congelata da fresca	IT
64	<i>Sprattus sprattus</i>	Papalina o Spratto	congelata da fresca	IT
73	<i>Sardinella aurita</i>	Alaccia	congelata da fresca	IT
106	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Acciuga o Alice	congelata da fresca	
108	<i>Sardinella fimbriata</i>	Alaccia asiatica	congelata	
LAVORATI DI CLUPEIFORMI				
A	<i>Clupea harengus</i>	Aringa	salata e fermentata	
B	<i>Alosa agone</i>	Missoltino	agone salato ed essiccato	
C	<i>Alosa agone</i>	Agone	fresco	
D	<i>Alosa fallax nilotica</i>	Cheppia	fresca	
107	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Acciuga o Alice	congelata da salata sott'olio	

Tab. 3.9. Campioni di clupeiformi sottoposti a Pyrosequencing™ nel presente lavoro.

3.3 ESTRAZIONE DEL DNA

Per l'estrazione del DNA genomico totale è stato impiegato un kit commerciale denominato “**High Pure PCR Template Preparation Kit**” (Roche®), il quale si basa sull'uso combinato di agenti denaturanti (urea), deproteinizzanti (Proteinasi K), detergenti (Triton®X-100 e sull'adsorbimento del DNA ad una membrana costituita da due strati di fibra di vetro in presenza di un sale caotropico (guanidinio idrocloruro). Il protocollo di estrazione del DNA genomico totale ha previsto i seguenti step:

- I. con una forbice sterile sono stati prelevati 25-50 mg di tessuto muscolare di pesce, che venivano ridotti quanto più possibile in piccoli frammenti al fine di facilitare il successivo step di lisi delle membrane cellulari;
- II. ciascun campione, posto in una provetta sterile con 200 µL di Tissue lysis buffer (4M urea, 200 mM Tris, 200 mM NaCl, 200 mM EDTA, ph 7,4 a 25°C) e Proteinasi K (3.5 mg/mL), è stato messo ad incubare in un bagno termostato a 55°C per 1 ora;

- III. a ciascun campione sono poi stati aggiunti 200 μL di Binding buffer (6M guanidio-HCl), 10mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton[®]X-100 (v/v), pH 4 a 25°C) e, dopo incubazione a 70°C per 10 minuti, sono stati aggiunti 100 μL di isopropanolo successivamente mescolato utilizzando un puntale da 1 mL, in modo da intrappolare i residui insolubili di tessuto nel puntale stesso che successivamente è stato gettato;
- IV. si è trasferita la miscela in colonnine fornite dal kit , che sono state centrifugate a 8000 *g* per un minuto in modo da far adsorbire il DNA sulla membrana di fibra di vetro;
- V. il DNA legato alla membrana è stato trattato con 500 μL di Inhibithor Removal buffer (Etanolo 37,7% (v/v), 5 M guanidinio-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 a 25°C) che permette l'inattivazione degli agenti inibitori della PCR;
- VI. la membrana è stata lavata dai sali due volte mediante centrifugazione ad 8000 *g* per 1 minuto in presenza di 500 μL di Washing buffer (20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7.5 a 25°C, 80% (v/v) di etanolo);
- VII. infine si è recuperato l'acido nucleico eluendo per centrifugazione a 8000 *g* utilizzando 200 μL di Elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5 a 25°C) preriscaldato a 70°C.

3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR) SUI CAMPIONI DI DNA ESTRATTO

E' stato utilizzato lo stesso protocollo di PCR per tutte e tre le sedute di amplificazione (Gene 16S, gene CYTB e porzione genomica mitocondriale *Engraulis*). Tale protocollo è stato inizialmente messo a punto sul gene 16S e poi adattato alle altre due analisi cambiando la temperatura di *annealing* dei primer. Tra essi il primer *forward* è biotinilato per supportare la successiva purificazione del DNA dai reagenti della PCR richiesta dal protocollo di Pyrosequencing[™].

Per ogni reazione di amplificazione sono stati inclusi sia i controlli negativi d'estrazione sia il controllo negativo della *master-mix*. Si riportano in **Tab. 3.10** e **Tab. 3.11**, rispettivamente, il protocollo di preparazione della *master-mix* ed il ciclo termico utilizzati.

Merita un appunto la preparazione dell'aliquota di primer *reverse* PleuRseq, nella quale è stata generata una miscela equimolare delle varie sottoforme del primer, tenendo conto del diverso grado di degenerazione dei primer PleuRseq1 e PleuRseq2. Perciò il primer degenerato 2 volte PleuRseq1 ha concorso con un volume doppio di

stock 100 μM rispetto al pimer PleuRSeq2 (degenerato una volta) nella formazione dell'aliquota, in modo tale da ottenere una concentrazione equimolare dei vari sottotipi; nella fattispecie, la concentrazione di ogni sottotipo nella miscela PleuRSeqmix era pari a 5 μM e la concentrazione totale di primer nella stessa miscela era pari a 30 μM . E' stato ritenuto opportuno non utilizzare una concentrazione pari a 10 μM per ogni sottotipo per non incorrere in una diminuzione di efficienza della PCR con una concentrazione eccessiva di primer.

REAGENTE	CONCENTRAZIONE FINALE	VOLUME PER UNA REAZIONE
H ₂ O ultrapura sterile	/	25,7 μL
10X PCR buffer	1X	5,0 μL
MgCl ₂ 25mM	2,0 mM	4,0 μL
dNTPs mix 10 mM	1,0 mM	5,0 μL
Primer <i>forward</i> 10 μM	0,5 μM	2,5 μL
Primer <i>reverse</i> 10 μM	0,5 μM	2,5 μL
Ampli Taq Gold 5U/ μL	1.5 U	0.3 μL
DNA estratto	/	5,0 μL

Tab. 3.10. Protocollo di PCR utilizzato per l'amplificazione del gene 16S sulle specie analizzate nel presente lavoro, come anche per l'amplificazione del gene CYTB delle specie di Pleuronectoidei e della porzione genomica per la discriminazione del genere *Engraulis*. Si rammenta per quanto riguarda l'amplificazione del gene CYTB dei pleuronectoidei, che nell'aliquota utilizzata di primer *reverse*, degenerato, la concentrazione totale di primer è stata pari a 30 μL , a fronte di una concentrazione pari a 5 μM di ciascun sottotipo.

ATTIVAZIONE Taq 95°C per 10 min	DENATURAZIONE 95°C per 30 s		ELONGAZIONE 72°C per 30 s	ELONGAZIONE FINALE 72°C per 5 min
		ANNEALING 58°C, <i>Engraulis</i> 55°C, 16S 52°C, <i>cytb</i> } 30s		
	40 cicli			

Tab. 3.11. Il ciclo termico e le diverse temperature di annealing utilizzati nell'amplificazione, rispettivamente, della porzione genomica di *Engraulis encrasicolus* ed *Engraulis japonicus*, del gene 16S di tutti i pesci, e del gene *Cytb* dei pleuronectoidei.

Nel caso invece della PCR preliminare al sequenziamento con metodo classico del gene CYTB dei campioni di pleuronectoidei, il ciclo termico in **Tab. 3.11** è stato sottoposto a due variazioni:

- la temperatura di *annealing* è stata abbassata a 50°C in modo da essere ottimizzata per la sottoforma del primer degenerato *CytbFseq* a temperatura di

melting minore, ed in modo che il primer possa legarsi al template anche in presenza di polimorfismi non prevedibili. Questa considerazione è importante dato che il primer è stato disegnato per l'amplificazione di sequenze sconosciute;

- il ciclo di elongazione è stato allungato a 45 secondi per permettere alla polimerasi di amplificare un frammento, pari a circa 1200 pb, molto più lungo rispetto ai precedenti.

3.5 VISUALIZZAZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE

La positività degli amplificati e l'eventuale contaminazione dei controlli negativi è stata valutata mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% in *buffer* TAE (Tris, Acido acetico, EDTA) in presenza di 0,1 µl/ml di intercalante GelRed™ (Biotium). Sono stati quindi caricati in ciascun pozzetto 5 µl di amplificato e la corsa, della durata di 45 minuti, è stata condotta in presenza di *buffer* TAE 0,5X ad una differenza di potenziale di 100 V, intensità di corrente pari ad 80 mA e potenza pari ad 8W.

3.6 PYROSEQUENCING SUGLI AMPLICONI

Il sequenziamento degli ampliconi con tecnologia Pyrosequencing™ è stato condotto grazie alla strumentazione polivalente "Pyro Mark ID™ system, 220-240 V" (cod. 60-0240, Biotage AB™) collegata ad un computer e comprendente:

- il **Pyro Mark™ ID instrument** ovvero il blocco sequenziatore;
- l'accessorio "**PyroMark™ Vacuum Prep Workstation** 220-240V (cod. 60-0235, Biotage AB) per la preparazione dei campioni da sottoporre a Pyrosequencing™;
- **Pyro Mark™ ID SW**, software per il *setting* di una seduta di sequenziamento;
- **Assay design™ SW**, software per il disegno di primer di PCR e di sequenziamento per un progetto di Pyrosequencing™;
- **Identifire™ SW**, software per l'analisi delle sequenze ottenute mediante Pyrosequencing™.

3.6.1 REAGENTI E MATERIALI DI CONSUMO NECESSARI ALLA PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER IL PYROSEQUENCING™

La procedura di preparazione dei campioni per Pyrosequencing™ sfrutta l'uso di un kit e altri reagenti commerciali sviluppati per il **"Pyro Mark ID™ system"**: il kit **Sequencing Consumable Reagents (60 runs)** (cod. SEQ-2 Diatech®) costituito da varie soluzioni alcune delle quali utilizzate per la preparazione del campione (Binding buffer e Annealing buffer) altre per la purificazione del campione (**Denaturation solution 1X, Washing buffer 5X, SEQ water e DEPC water**), come anche da consumabili quali le piastre **96-well preparation plate ("Piastra di Binding")** e la pellicola **Clear seal film**. Altri reagenti accessori non inclusi nel kit sono le biglie **Streptavidin Sepharose™ High Performance** (cod. 17-5113-01, GE Healthcare Bio.Sciences AB®) e l'etanolo al 70% (v/v) diluito con SEQ water mentre altri consumabili sono le piastre **PSQ™ 96 Plate Low** (cod. 40-0010, Diatech®) ("Piastra di Annealing"), le vaschette **Vacuum Prep Tool Throughs** (cod. 60-0182) e gli aghi filtranti **Vacuum Prep Tool Filter Probes** (cod. 60-0180).

3.6.2 STEP PRELIMINARI ALLA PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Prima di iniziare la procedura di preparazione dei campioni è necessario accendere il sequenziatore "PyroMark™ ID instrument" almeno un'ora prima di iniziare la corsa per permettere alla CCD camera di stabilizzarsi; nel frattempo si portano reagenti e materiali necessari per la procedura a temperatura ambiente e si imposta un blocco termostato per piastre da 96 pozzetti alla temperatura prevista per la fase di annealing del primer di sequenziamento.

E' molto importante la fase preliminare di *setting* della corsa, per la quale si utilizza l'apposita funzione del software **"Pyro Mark™ ID"**, associato al sequenziatore.

E' necessario infatti attivare nel software i pozzetti della Piastra di *Annealing* che verranno utilizzati e specificare, per ciascuno di essi, il codice identificativo del campione che si intende caricarvi unitamente ai volumi di templat e di biglie che si intendono utilizzare per quel campione. Ciascun campione dovrà occupare nella piastra di binding la stessa posizione che gli è stata assegnata nella Piastra di *Annealing* tramite l'utilizzo del software.

Infine, è necessario specificare l'ordine di dispensazione dei nucleotidi prescelto (ad esempio ATCG) e il numero di cicli di dispensazione. Nelle nostre sedute di Pyrosequencing™ abbiamo scelto un numero di cicli di dispensazione pari a 15, sufficiente a coprire una regione di circa 50 nucleotidi, corrispondente al massimo *read-length* del Pyrosequencing™.

In base al numero di cicli ed al volume di template caricato, il software PyroMark™ ID SW suggerisce i volumi dei reagenti **E-mix** (miscela dei 4 enzimi coinvolti catalizzanti la reazione di sequenziamento), **S-mix** (substrati per gli enzimi) e dei 4 deossinucleotidi (**dATP, dCTP, dGTP, dTTP**) da caricare successivamente nella cartuccia di corsa. Tali volumi devono perciò essere annotati.

3.6.3 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER PYROSEQUENCING™

La preparazione dei campioni per il sequenziamento con il PyroMark™ ID instrument (Biotage AB) prevede le seguenti fasi:

- I. immobilizzazione dei prodotti di amplificazione;
- II. preparazione della piastra di sequenziamento;
- III. denaturazione dei prodotti di amplificazione immobilizzati;
- IV. annealing del primer di sequenziamento.

I. Immobilizzazione dei prodotti di amplificazione

I prodotti di amplificazione biotinilati sono stati posti in una piastra da 96 pozzetti ed immobilizzati sulle biglie di sefarosio mediante incubazione degli stessi in agitazione con la Binding-mix. Per ogni amplicone da sequenziare sono stati preparati, e dispensati nel pozzetto assegnato della Piastra di *Binding*, 40 µL di *Binding-mix* contenente 4 µL di biglie di sefarosio accuratamente agitate per evitarne la sedimentazione e 36 µL di Binding Buffer 1X ; in ciascun pozzetto si sono poi aliquotati 30 µL di prodotto di amplificazione portato a volume di 40 µL con DEPC water nella *Binding-mix* in modo tale che:

Volume DEPC water + volume amplificato = volume biglie + volume *Binding buffer*

In genere si suggerisce di caricare un volume di amplificato variabile tra i 20 µL ed i 40 µL in base alla quantità di amplificato ottenuta, valutata come intensità delle bande degli amplificati su gel di agarosio.

La Piastra di *Binding* così preparata è stata sigillata con la pellicola adesiva Clear seal film e trasferita su di un agitatore per micropiastre (TMix, Diatech®) dove è stata incubata in costante agitazione a 1400 rpm per 30 minuti a temperatura ambiente al fine di evitare la sedimentazione delle biglie.

II. Preparazione della piastra di sequenziamento

Durante la fase di immobilizzazione dei prodotti di amplificazione sulle biglie di sefarosio si è proceduto con la predisposizione della piastra di sequenziamento PSQ™

96 Plate Low dispensandovi, in ciascun pozzetto, 40 μL di Annealing-Mix accuratamente mescolata contenente il primer di sequenziamento dissolto nell'Annealing buffer ad una concentrazione pari a 0.5 μM ; i pozzetti utilizzati per ogni amplicone occupano la posizione corrispondente allo stesso amplicone nella Piastra di Binding.

III. Purificazione e denaturazione dei prodotti di amplificazione immobilizzati

Affinchè possa avvenire la reazione di sequenziamento sul filamento biotinilato catturato dalle biglie di sefarosio ricoperte di streptavidina è necessaria la denaturazione dei prodotti di amplificazione immobilizzati, che si ottiene per via chimica sfruttando le proprietà della Denaturation solution 1X.

L'esecuzione di questa fase è accoppiata alla purificazione (tramite etanolo) ed al lavaggio (tramite Washing buffer) del templat e richiede l'utilizzo del sistema accessorio PyroMark™ Vacuum Prep Workstation 220-240V (Fig. 3.8) costituito da due elementi: la PyroMark™ Vacuum Prep Worktable ed il PyroMark™ Vacuum Prep Tool (Fig. 3.9).

La Worktable è il supporto di lavoro sul quale sono posizionate le vaschette "Vacuum Prep Tool Throughs" contenenti i reagenti necessari allo step di denaturazione degli ampliconi (150 mL circa di soluzioni fresche o riciclate fino alla terza volta di etanolo al 70%, Washing buffer 1X e SEQ water nelle vaschette "Ethanol", "Washing buffer" e "Water"; 120 mL circa di soluzione fresca Denaturation solution 1X nella vaschetta "Denaturation solution"). Il Vacuum Prep Tool (Fig. 3.8), è una sorta di "spazzola", collegata ad una pompa a vuoto, costituita da 96 aghi filtranti ciascuno dei quali è in grado di purificare il templat dai reagenti della PCR aspirando l'intero contenuto di ogni pozzetto della Piastra di Binding, eccetto le biglie di sefarosio con legato il templat, che vengono trattenute sul filtro.



Fig. 3.8. PyroMark™ Vacuum Prep Tool mentre si avvicina per aspirare il contenuto dalla 96-well preparation plate.

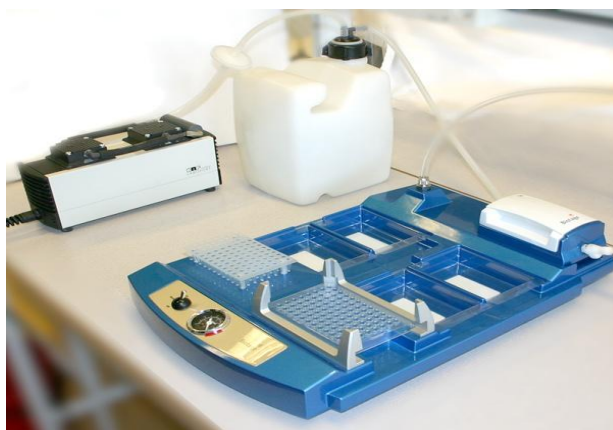


Fig. 3.9. PyroMark™ Vacuum Prep Workstation 220-240V con la Worktable (in blu) su cui poggiano le due piastre, a sinistra la piastra di binding ed a destra la piastra di sequenziamento, le quattro vaschette contenenti etanolo, denaturante, washing buffer ed acqua, e il Vacuum Prep Tool nella parking position.

Data la tendenza delle biglie a sedimentare velocemente, per una buona cattura è necessario che non siano trascorsi più di 3 minuti dalla fine dell'agitazione della Piastra di *Binding*. Una volta terminata la fase di *binding* del templatato, le biglie sono state catturate introducendo il "Vacuum Prep Tool", cui è stato applicato il vuoto, nella Piastra di *Binding*; ad aspirazione completata il "Vacuum Prep Tool" è stato spostato ed ivi agitato delicatamente per 5 secondi dapprima nella vaschetta contenente etanolo al 70%, successivamente nella vaschetta contenente la "Denaturation solution" ed infine nella vaschetta contenente il "Washing buffer". A questo punto il "Vacuum Prep Tool" è stato posizionato sopra la Piastra di *Annealing*; interrompendo il vuoto le biglie di sefarosio sono state rilasciate nei corrispondenti pozzetti, in cui era già stata dispensata l'*Annealing-Mix*, agitando delicatamente il "Vacuum Prep Tool" all'interno degli stessi.

IV. Annealing del primer di sequenziamento

Per favorire l'*annealing*, la Piastra di *Annealing* contenente il templatato è stata incubata per 4 minuti ad 80°C per sciogliere ogni possibile struttura secondaria sia del templatato che dei primer; la piastra è stata successivamente lasciata raffreddare a temperatura ambiente prima di iniziare la reazione di sequenziamento, in quanto il primer di sequenziamento si lega alla sua posizione specifica sull'amplicone solo quando la temperatura si abbassa al di sotto della temperatura di *melting* del primer stesso.

3.6.4 REAZIONE DI PYROSEQUENCING

Durante il raffreddamento della "Piastra di *Annealing*" sono stati portati a temperatura ambiente i reagenti del kit **PyroMark™ Gold Q96 Reagents** (Explera) da caricare nella cartuccia **PSQ™96 Reagent Cartridge**, la quale provvede a dispensarne un volume prestabilito ad ogni ciclo durante la sessione di pyrosequencing tramite l'applicazione di una leggera pressione; tali reagenti, tutti precedentemente risospesi in 620 µL di "DEPC water", sono la miscela enzimatica **E-mix** (composta da DNA polimerasi, ATP-sulfurilasi, luciferasi e apirasi), la miscela di substrati **S-mix** (composta da APS e D-luciferina) ed infine i nucleotidi (**A, C, G, T**). La cartuccia viene quindi caricata con i volumi di reagenti suggeriti in precedenza dal software "PyroMark™ ID SW"; cartuccia e Piastra di *Annealing* sono state quindi posizionate negli appositi alloggiamenti sullo strumento e si è proceduto con la reazione di sequenziamento.

3.7 ANALISI DELLE SEQUENZE

Le sequenze, accertatane la buona qualità, sono state allineate contro un database locale di sequenze di riferimento attraverso il software **IdentiFire™ SW**, che fornisce come risultato una percentuale d'identità tra la sequenza ottenuta e le sequenze di riferimento più simili presenti nel database locale. Nel caso una sequenza risulti avere la stessa omologia con più di una sequenza del database, il software fornisce più risultati tra loro equivalenti. Si può scegliere di allineare contro il database l'intera sequenza od una sua finestra, ad esempio una sua parte qualitativamente migliore.

Il database locale è molto flessibile potendo facilmente essere aggiornato in qualunque momento, le sequenze ivi inserite sono costituite da tutte le varianti, presenti nelle banca dati primaria GenBank®, relative a porzioni dei geni codificanti per l'rRNA 16S e per il citocromo B delle specie ittiche oggetto rispettivamente dell'Indagine primaria e dell'Indagine secondaria per la discriminazione delle specie di pleuronectoidei, oltre ai genomi mitocondriali dei due isolati di *Engraulis encrasicolus* ed *Engraulis japonicus* utilizzati per il disegno dei primer EngraJEF, EngraJER e EngraJES. Alcune sequenze sono state accorciate per circoscrivere la ricerca alla porzione genica adiacente al primer di sequenziamento, al fine di non appesantire eccessivamente il software.

Per quanto riguarda le specie ittiche per le quali non era presente alcuna sequenza relativa ai geni in esame in GenBank®, sono state prodotte delle sequenze di riferimento sequenziando, con metodo classico, i campioni a nostra disposizione.

3.8 SEQUENZIAMENTO, CON METODO CLASSICO, DI ALCUNI CAMPIONI PER L'OTTENIMENTO DI SEQUENZE DI RIFERIMENTO

Data la mancanza, per alcuni campioni (4, 39, 95, 108) di sequenze di riferimento in GenBank® per quanto riguarda i geni 16S e/o CYTB, sono state prodotte le sequenze necessarie tramite sequenziamento classico seguendo il protocollo seguente:

1. gli amplificati sono stati dapprima purificati per rimuovere primer e nucleotidi non incorporati durante la reazione di amplificazione. Questo passaggio è stato condotto grazie all'utilizzo del **kit ExoSAP-IT** (usb cod. 78200) adatto a purificare, senza alcuna perdita, piccole quantità di prodotti di PCR, a partire da 5 µL, tra 100 pb e 20 Kb;

2. utilizzando il kit **Big Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing** (Applied Biosystems cod.4336919), è stata allestita la **reazione di sequenza** in un volume finale di 20 µl miscelando i reagenti secondo le quantità indicate in **Tab. 3.12**. Ogni amplificato è stato sequenziato sia con il primer *forward*, sia con il primer *reverse*;

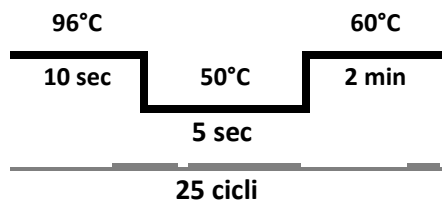
DNA	3 µL (secondo le indicazioni illustrate in Tab 3.13)
Primer forward o reverse	0.165 µM (0.33 µl dallo stock 10 µM)
Sequencing Buffer 5X	3 µL
TRRM	2 µL
H₂O bidistillata	11 µL

Tab. 3.12. Volumi dei reagenti utilizzati nella reazione di sequenza con il kit "Big Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing".

pb di template	Quantita`
Prodotto di PCR:	
100–200 bp	1–3 ng
200–500 bp	3–10 ng
500–1000 bp	5–20 ng
1000–2000 bp	10–40 ng
>2000 bp	20–50 ng

Tab. 3.13. La quantità di template purificato da usare nella reazione di sequenza dipende dalla lunghezza, espressa in pb, e dalla purezza del prodotto (Protocollo BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems).

3. la **reazione di sequenza** è stata poi condotta utilizzando il seguente ciclo termico:



4. si è poi proceduto alla **purificazione del prodotto della reazione di sequenza** secondo le specifiche del **kit AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal** (Amersham cod. 27-5340-02);
5. si è successivamente allestita la piastra da caricare nel sequenziatore aliquotandovi, in ogni pozzetto, 10 o 20 µl di acqua bidistillata sterile e 5 o 10 µl di prodotto di reazione di sequenza purificato seguendo lo schema di caricamento predeterminato. La piastra così preparata è stata chiusa con l'apposito coperchio e caricata nel sequenziatore automatico **ABI PRISM™ 3130xl Genetic Analyzer** (Applied Biosystems cod. 4336919);

6. gli elettroferogrammi ottenuti sono stati analizzati con i software **Sequencing Analysis 5.2** e **SeqScape v2.5** (Applied Biosystems);
7. per ciascun campione, utilizzando il software MEGA 4.1, si è infine allineata la sequenza, ottenuta tramite il primer *reverse*, con l'inverso complementare della sequenza ottenuta tramite il primer *forward* e dalle due è stata creata un'unica sequenza consenso da depositare nella libreria per il software Identify™.

4. **RISULTATI**

Attualmente il settore ittico europeo trova urgente la necessità di implementare metodi di analisi del DNA affidabili per l'identificazione di specie a sostegno dell'analisi morfologica.

Visti i limiti di costo e di affidabilità intrinseci ai metodi biomolecolari identificativi messi a punto in precedenza presso l'IZSve [(PCR-RFLP (Boscolo, 2007) e Real-time PCR (Rampazzo, 2008)] ci si è indirizzati alla tecnica del sequenziamento. In particolare si è preferito utilizzare la tecnologia Pyrosequencing™ in luogo del metodo di sequenziamento classico, in quanto il Pyrosequencing™ è un sistema facilmente scalabile, rapido e dai costi contenuti.

Si puntava inizialmente ad un approccio universale, cioè al disegno di una coppia di primer di PCR e di un primer di sequenziamento capaci di discriminare la totalità delle specie ittiche oggetto di frode. Tale approccio universale non era applicabile a causa della notevole diversità delle sequenze in esame e della loro scarsità numerica. E' stata perciò esplorata la possibilità di disegnare primer dalle caratteristiche volute restringendo l'analisi a singoli gruppi di pesci d'interesse commerciale ed alle relative frodi. A tal fine è stata valutata la variabilità intraspecifica ed interspecifica associata ai diversi geni disponibili in banca dati per ciascun gruppo di pesci.

La metodica era stata inizialmente messa a punto sul gene CYTB dei Gadidi. Tuttavia, vista l'alta variabilità interspecifica di tale gene, era stato necessario disegnare un primer biotinilato altamente degenerato, il quale ha causato complicanze in sede di Pyrosequencing™.

La scelta è perciò ricaduta su altri due gruppi di pesci in cui sono presenti frodi di interesse commerciale: i **Clupeiformi** ed i **Pleuronectiformi** con la loro principale frode di sostituzione, il Pangasio, e su di un perciforme dall'alto valore commerciale ed evolutivamente correlato ai pesci piatti, il **Pesce persico**, oltre alla sua principale frode di sostituzione, il Persico africano.

In una prima indagine (Indagine primaria) con le sequenze a disposizione, reperite nella banca dati GenBank®, è stato disegnato, sul gene 16S, un set di primer per *pyrosequencing* capace di ibridarsi a tutte le specie suddette e discriminante la maggioranza di esse. In una seconda indagine (Indagine secondaria) sono stati disegnati altri due set di primer, su porzioni genomiche differenti da quelle utilizzate per l'indagine primaria, nel tentativo di discriminare le specie precedentemente non rilevate.

L'efficienza dei primer è stata valutata sia in PCR che in Pyrosequencing™ su campioni di riferimento identificati morfologicamente dai veterinari dell'IZSVE, sezione di Adria. Il DNA è stato estratto dai vari campioni nel corso di tre distinte estrazioni, per ciascuna delle quali si è prodotto il corrispondente bianco d'estrazione.

Le sequenze ottenute sono state confrontate mediante il software Identifire™ con sequenze di riferimento presenti nella banca dati GenBank® o, se assenti, prodotte nel nostro laboratorio tramite sequenziamento, con metodo classico, di amplificati di alcuni campioni di riferimento. Per confermare i risultati ottenuti tramite Identifire™ le pyrosequenze ottenute sono state sottoposte anche ad analisi BLAST. L'analisi BLAST ha servito il solo scopo di confermare i risultati ottenuti mediante Identifire™ ai fini della validazione dell'analisi Identifire™ stessa, e non vuole perciò costituirne un'alternativa dato che la sua applicazione sarebbe troppo laboriosa nell'attività di routine, nella quale peraltro non si è interessati al confronto con la variabilità totale presente in natura, ma soltanto all'identificazione univoca di quel ristretto numero di specie le quali costituiscono oggetto di frode.

4.1 INDAGINE PRIMARIA, CONDOTTA SUL GENE 16S

4.1.1 AMPLIFICAZIONE DEL GENE 16S

Utilizzando i primer 16SForBio e 16SRev, unitamente al protocollo di PCR illustrato in **Tab. 3.10** e **Tab. 3.11**, sono stati sottoposti ad amplificazione i DNA estratti da ciascuno dei campioni ittici elencati in **Tab. 3.8** e **Tab. 3.9**; la specificità della coppia di primer e l'efficienza della PCR sono state valutate in gel di agarosio, rispettivamente, come assenza di amplificati aspecifici e come intensità della banda ottenuta da ciascun campione.

I gel presentati in **Fig. 4.1** e **Fig. 4.3** dimostrano la specificità di tali primer, data la presenza di una sola banda in corrispondenza di ogni campione. Tale banda, se confrontata con le bande generate dalla migrazione del *marker* di peso molecolare "Marker V" (**Fig. 4.2**), è situata in una posizione leggermente superiore alla banda di lunghezza 267 bp, confermando si tratti del frammento target, della lunghezza di 289 pb.

Le bande sono chiaramente presenti, anche per quanto riguarda i campioni per i quali non avevamo a disposizione la sequenza al momento del disegno dei primer, ovvero i campioni 39, 60, 108 e 109. Questo conferma che i primer 16SForBio e 16SRev

sono universali ed offrono maggiori garanzie di applicabilità nel caso di frodi alimentari che vedano protagoniste specie di recente introduzione sul mercato e poco studiate a livello biomolecolare.

Infine, l'avvenuta amplificazione dei campioni lavorati 107, A e B dimostra come i primer rimangano efficaci anche in condizioni in cui il DNA si trovi fortemente degradato e su tessuti diversi (**Fig. 4.1**).

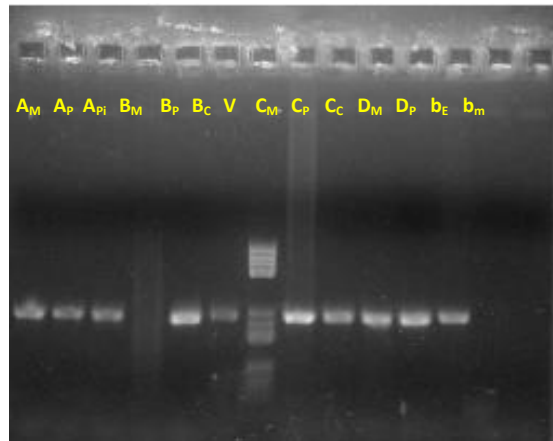


Fig. 4.1. Gel elettroforesi in agarosio al 2% degli ampliconi del gene 16S amplificati con i primer 16SForBio e 16SRev ed appartenenti ai campioni lavorati A (Aringa fermentata) e B (missultino) ed ai campioni congelati da freshi C (Agone) e D (Cheppia) elencati in **Tab. 3.9**. I pedici che accompagnano i nomi dei campioni si riferiscono al tessuto da cui il DNA è stato estratto ("M": muscolo; "P": pelle; "Pi": pinna; "C": coda. La mancata amplificazione del campione B_M è da imputarsi ad un errore in fase di estrazione.

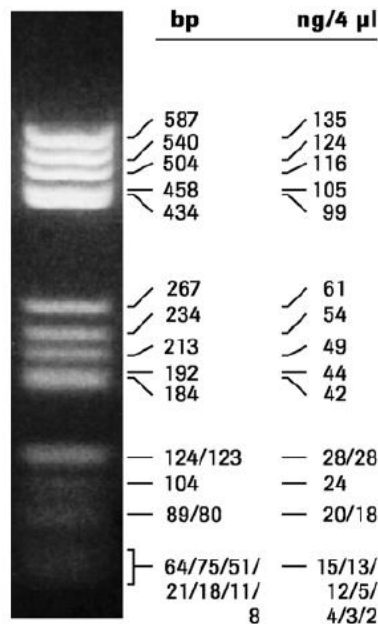


Fig. 4.2. Separazione di 1µg di DNA Molecular Weight Marker V in gel di agarosio al 2%, colorazione con etidio bromuro

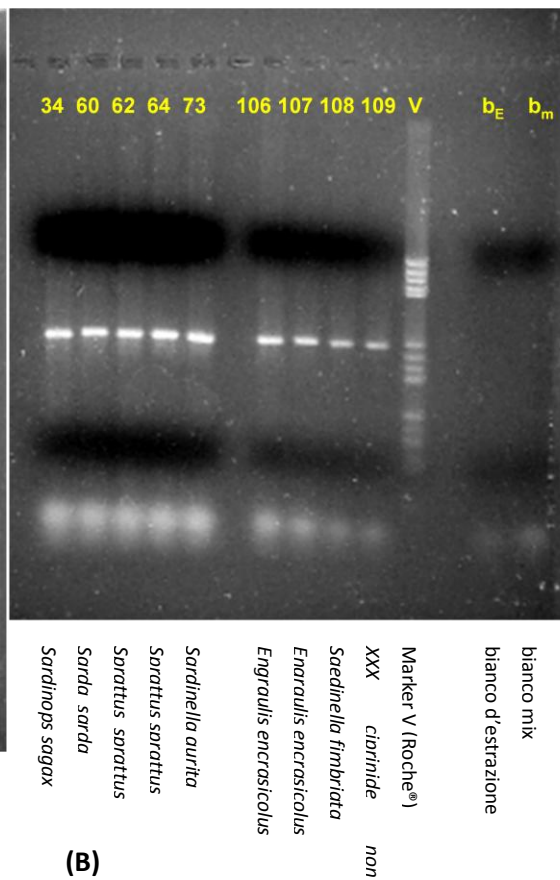
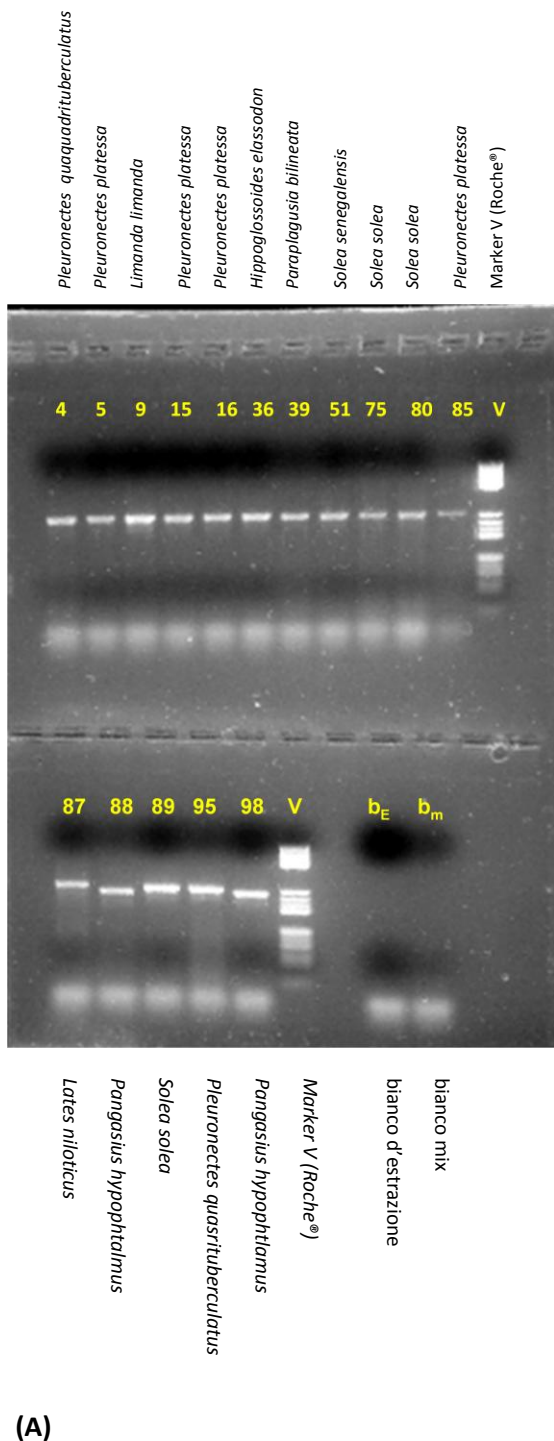


Fig. 4.3. Gel elettroforesi in agarosio al 2% degli ampliconi del gene 16S di appartenenti ai campioni di Pleuronectiformi, *Lates niloticus* e *Pangasius hypophthalmus* (A); Clupeiformi e *Sarda sarda* (B). Tutti i campioni sono stati amplificati tramite i primer 16SFor Bio e 16SREv. Il campione presente in ciascun pozzetto è indicato tramite il numero identificativo del campione assegnato in **Tab. 3.8** e **Tab. 3.9**.

4.1.2 PYROSEQUENCING™ SUGLI AMPLIFICATI DEL GENE 16S DEI CLUPEIFORMI ED ANALISI DELLE PYROSEQUENZE TRAMITE SOFTWARE IDENTIFIRE™

Le sequenze generate sottoponendo gli ampliconi a Pyrosequencing™ (pyrosequenze) sono state confrontate con sequenze di riferimento, dapprima allineandole contro il database locale creato sul sequenziatore tramite il software Identifire™, in seguito sottoponendole all'algoritmo di allineamento BLAST contro il database *nr* della banca dati GenBank®, al fine di confermare i risultati ottenuti tramite Identifire™.

Il software Identifire™ fornisce, come risultato dell'analisi, un report riassuntivo a 3 colonne o campi (esempio in **Fig. 4.4**). Il primo campo da sinistra riporta il codice identificativo del campione, il campo centrale riporta il nome della sequenza hit del database locale con la quale si verifica il punteggio più alto di allineamento riportato, il punteggio, nel terzo campo accanto al link per il report dettagliato. Il codice identificativo di ogni sequenza viene scelto arbitrariamente al momento della costruzione del database Identifire, in questo caso è stato scelto il nome della specie cui la sequenza appartiene ed il codice *Accession* GenBank® della sequenza stessa.

Il **punteggio di allineamento** è associato a 3 diversi colori:

- colore **blu** quando si verifica completa identità di sequenza tra la query e la migliore hit;
- colore **giallo** quando si verifica una certa deviazione tra la query e la migliore hit, nonostante la similarità di sequenza sia comunque alta;
- colore **rosso** quando l'analisi fallisce perché non vengono trovate hit simili o perché la sequenza ottenuta era qualitativamente mediocre.

Il **report dettagliato** riporta gli allineamenti tra la query e le migliori hit, oltre al pirogramma, ossia lo schema dei picchi di fluorescenza rilevati dal pyrosequenziatore, in corrispondenza ad ogni evento di dispensazione nucleotidica. Il pirogramma è molto utile nel valutare l'attendibilità di un *mismatch* che si verifichi tra la query e la migliore hit. E' il software stesso a giudicare l'**attendibilità di ogni picco**, in base ai suoi parametri, come **good**, **uncertain** e **failed** anche in questo caso tramite un sistema colorimetrico in cui:

- il **blu** è associato alla porzione della sequenza in cui si verificano la massima efficienza di lettura (**good**) e conseguentemente la massima attendibilità della sequenza;
- il **giallo** è associato alla porzione in cui comincia a verificarsi una diminuzione di efficienza a causa dell'aumento della fluorescenza di fondo (**uncertain**), ma è

ancora possibile distinguere i picchi, anche se conviene usare cautela nell'interpretazione di quelli corrispondenti a regioni omopolimeriche;

- il **rosso** è associato alla porzione della sequenza in cui l'aumento della fluorescenza di fondo rischia di rendere ambigua la distinzione sia dei picchi singoli che di quelli multipli (*failed*).

Nell'analisi Identify™, si può scegliere di allineare l'intera sequenza prodotta dal software dopo 15 cicli di dispensazione nucleotidica (*full-sequence*), ma molto più spesso la porzione da allineare va scelta di volta in volta in base alla qualità della sequenza valutata in base al pirogramma, in modo da escludere soprattutto la parte finale, dove l'interpretazione dei picchi di fluorescenza diventa più difficoltosa. Nella fattispecie, nel condurre l'analisi tramite Identify™ sulle sequenze di clupeiformi (**Fig. 4.4**) si è deciso di allineare le porzioni della sequenza classificate come *good e uncertain*.

I campioni di clupeiformi a nostra disposizione sono stati estratti in tempi diversi e quindi sottoposti a Pyrosequencing™ in due diverse sedute entrambe riportate nel report in **Fig. 4.4**, la prima (I seduta) ha riguardato i campioni del gel in **Fig. 4.3**, la seconda (II seduta) i campioni del gel in **Fig. 4.1**.

Secondo il report Identify™ presentato in **Fig. 4.4** l'indagine primaria sul gene 16S dei clupeiformi è risultata sufficiente a discriminare univocamente e correttamente tutti i campioni della prima seduta (anche dove si sono verificati dei polimorfismi tra la sequenza ottenuta e quella depositata nel database) eccetto, come atteso, il campione 106 appartenente alla specie *Engraulis encrasicolus* a causa dell'identità di sequenza tra questo isolato e la sequenza di *Engraulis japonicus*. Per il campione 106 infatti il software ha fornito più di un risultato con la stessa omologia; questo è evidenziato a livello del corrispondente record del report riassuntivo con la dicitura "+ n more" nel secondo campo del report stesso, accanto al nome della hit migliore. Con n s'intende il numero delle ulteriori hit che condividono con la query la stessa omologia della hit segnalata nel report, nel tratto di sequenza che si è scelto di allineare. Poiché il database locale non è ridondante ogni qualvolta s'incontra in un report la dicitura "+ n more" significa che la sequenza ottenuta non ha permesso una discriminazione univoca per quel campione.

Il sequenziamento del campione 109, controllo negativo ha fornito una sequenza che, secondo i parametri dello strumento, è qualitativamente mediocre (*failed*) e proprio perché molto corta (della lunghezza di 2 nt), ha trovato un numero esagerato di hit con *score* del 100%, il risultato che si ottiene è perciò privo di qualunque significatività statistica, come si può riscontrare grazie al valore *E-value* attribuito nel

report dettagliato all'allineamento con la prima hit (**Fig. 4.5**). Questo ha confermato la specificità del primer di sequenziamento per i gruppi tassonomici dei Clupeiformi e dei Pleuronectiformi. Per quanto riguarda i controlli negativi, ovvero il bianco *mix* con o senza il primer di sequenziamento (rispettivamente “bianco mix + PS” e “bianco mix – PS), essi non hanno fornito alcuna sequenza confermando l'assenza di contaminazioni e dimostrando l'incapacità del primer di sequenziamento di formare strutture secondarie che fungano da innesco per l'incorporazione nucleotidica.

La seconda seduta (II seduta) ha riguardato i campioni A (Aringa fermentata), B (missoltino), C (Agone), D (Cheppia). L'aringa è risultata univocamente e correttamente identificata come *Clupea harengus*, mentre non sono risultati discriminabili tra loro Agone e Cheppia (*Alosa fallax*). Poichè la sostituzione di Agone con Cheppia è una frode di interesse solo locale non si dispone per ora di dati molecolari sufficienti a progettare un'analisi *in silico* per discriminarli.

Anche in questa seconda seduta il bianco *mix* non ha fornito alcuna sequenza confermando l'assenza di contaminazioni.

Identifire Summary Report



	Sample Id	Result	Score	
I SEDUTA	34c	Sardinops_sagax_Si7b_	96.5	Details ⚠
	60c	Sarda_sarda	92.9	Details ⚠
	62c	Sprattus_sprattusAM911201.1	100	Details
	64c	Sprattus_sprattusAM911201.1	95.6	Details ⚠
	73c	Sardinella_auritaDQ912067.1	100	Details
	106c	Engraulis_japonicusAB246181.1 (+2 more)	100	Details ⓘ
	107c	Engraulis_encrasicolusAM911212.1	100	Details
	108c	Sardinella_fimbriata_16S	100	Details
	109c	Reinhardtius_hippoglossoides 16S (+49 more)	100	Details ⓘ ⚠
	b mix +PS	No hits found.	0	Details
	b mix -PS	No hits found.	0	Details
II SEDUTA	Aringa muscolo	Clupea_harengusEU552769.1	100	Details
	aringa pelle	Clupea_harengusEU552769.1	100	Details
	missoltino pelle	Alosa_fallax_EU552737.1	95.4	Details ⓘ ⚠
	missoltino coda	Alosa_fallax_EU552737.1	95.4	Details ⓘ ⚠
	agone muscolo	Alosa_fallax_EU552737.1	95.4	Details ⓘ ⚠
	agone pelle	Alosa_fallax_EU552737.1	95.4	Details ⓘ ⚠
	agone coda	Alosa_fallax_EU552737.1	95.4	Details ⓘ ⚠
	cheppia muscolo	Alosa_fallax_EU552737.1	95.4	Details ⓘ ⚠
	cheppia pelle	Alosa_fallax_EU552737.1	95.4	Details ⓘ ⚠
	bianco	No hits found.	0	Details

Settings

PSQ sequence length:	Good and uncertain quality
Fixed left alignment position:	False
Pyro optimized scoring:	True
Consider raw data quality:	False

Fig. 4.4. Report riassuntivo del software Identifire™ SW ottenuto allineando, contro il database locale, le pyrosequenze ottenute a partire dagli amplificati di clupeiformi mostrati nel gel in Fig. 4.3 (I seduta) ed in Fig. 4.1 (II seduta).

Sample ID: 109c

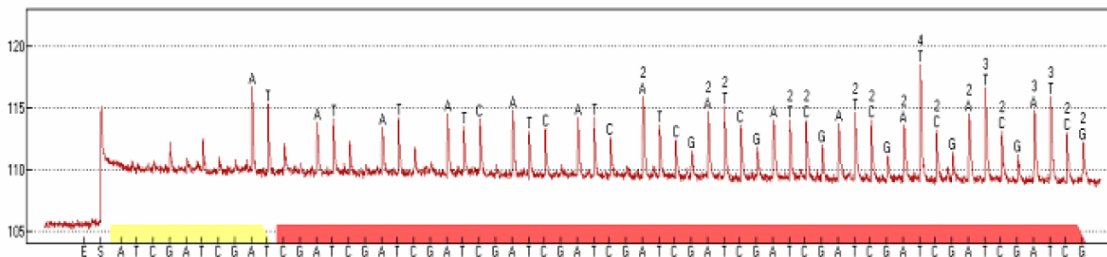
Well: C9
Notes: 30+4beads
PSQ run: 20090728 PPIattiClup+Rabbia
Entry ID: SQA 15
Sequence library: tutti i pesci nr (2009-12-01, 7:12:39 PM)
Query sequence: AT

Result: Reinhardtius hippoglossoides 16S, Sardinops sagax ocellatus H36, Score: 100

Sardinops_sagax_Si7b_, Pleuronectoidei spp. gruppoII,
Sardinops_sagax_, Hippoglossus_hippoglossus,
Pleuronectes_platessa_, Paraplagusia bilineata, Pleuronectoidei spp.
gruppoI, Dicologlossa cuneata 16S (+40 more)

Quality:**Information**

Failed
Top result contains multiple hits (50).
Multiple homologous areas found in Reinhardtius_hippoglossoides 16S,
Sardinops_sagax_ocellatus_H36, Sardinops_sagax_Si7b_, Pleuronectoidei spp. gruppoII,
Sardinops_sagax_, Hippoglossus_hippoglossus, Pleuronectes_platessa_, Paraplagusia bilineata,
Pleuronectoidei spp. gruppoI, Dicologlossa cuneata 16S , Sardinella_fimbriata_16S, Sarda_sarda,
Pangasius_macronema_Pm01, Pangasius_macronema_Pm02, Pangasius_sanitwongsei_Ps01,
Solea_lasclariis_Mediterraneo_16S, Solea_lasclariis_Golfo_di_Cadice_(Spagna),
Solea_kleinii_Golfo_di_Cadice, Pangasius_sp.16S, Pangasius_conchophilus_Pc02,
Pangasius_bocourti_haplotype_Pb09_16S, Pangasius_bocourti_Pb08_16S,
Solea_senegalensis_Ionian_type, Solea solea , Solea_solea_Mediterraneo_16S,
Pangasius_larnaudii_PI01, Pangasius_conchophilus_Pc03, Solea solea Atlantico occidentale 16S,
Solea_senegalensis(Golgo_di_Cadice), Solea_lasclariis_16S, Lates_niloticus_16S,
Sardina_pilchardus_EU410421.1, Sardina_pilchardusDQ912088.1, Sardinella_auritaDQ912067.1,
Sardina_pilchardus_EU419754.1, Engraulis_ringensAM911210.1, Clupea_harengusEU552769.1,
Sardinella_auritaAM911207.1, Sardinella_auritaEU552782.1, Engraulis_australisEU848445.1,
Engraulis_encrasicolusAM911211.1|, Engraulis_encrasicolusAM911212.1|, Alosa_fallaxEU552738.1,
Engraulis_anchoitaAM911215.1, Engraulis_japonicusAB246181.1, Alosa_fallax_EU552737.1, Alosa
fallaxEU552739.1, Sprattus_sprattusAM911201.1, Sarda sarda_JJ7:12 and Solea impar 16S .
Warnings: The answer is not statistically significant (expectation value: 1.02e+003).

**Warnings:****Hit 1: Reinhardtius_hippoglossoides 16S**

Score: 100
Identities: 2/2 (100%)
Gaps: 0/2 (0%)
E-value: 1.02e+003

Query 1 AT 2
||
Library 1 AT 2

Fig. 4.5. Report dettagliato Identifire™ relativo alla pyrosequenza ottenuta sul gene 16S del controllo negativo, il campione 109, nella seduta di Pyrosequencing™ il cui report riassuntivo è riportato in **Fig. 4.4.**

4.1.3 SEQUENZIAMENTO CON METODO CLASSICO SUL GENE 16S

Per le specie di appartenenza dei campioni 39 (*Paraplagusia bilineata*) e 108 (*Sardinella fimbriata*) non era presente in GenBank® alcuna sequenza relativa al gene 16S. Per questo motivo questi campioni sono stati sottoposti a sequenziamento con metodo classico al fine di ottenere delle sequenze di riferimento da inserire nel database locale.

E' stato sottoposto a sequenziamento classico anche il campione 16 appartenente a *Pleuronectes platessa* poiché, secondo quanto sarà riportato in seguito, la sequenza ottenuta in Pyrosequencing™ per questo campione si è rivelata essere unica. In **Fig. 4.6** si illustrano graficamente le sequenze, ottenute tramite sequenziamento classico da ciascun campione, confrontate con le sequenze *full-sequence* ottenute in Pyrosequencing™ sullo stesso campione. Le sequenze ottenute in Pyrosequencing™ occupano la regione compresa tra la posizione 172 e la posizione 216. L'allineamento permette di apprezzare come la sequenza completa ottenuta in Pyrosequencing™ sia del tutto identica alla sequenza ottenuta tramite sequenziamento classico per lo stesso campione.



Fig. 4.6. Allineamento delle sequenze ottenute con sequenziamento tradizionale tramite i primer 16SForBio e 16SRev dagli ampliconi dei campioni 16, 39 e 108 a confronto con le sequenze ottenute tramite pyrosequencing dagli stessi campioni. Il riquadro giallo evidenzia la zona conservata del primer di sequenziamento 16Sseq.

4.1.4 ANALISI BLAST SULLE PYROSEQUENZE DEL GENE 16S DEI CLUPEIFORMI

Infine le sequenze ottenute tramite Pyrosequencing™, usate come query, sono state sottoposte ad analisi BLAST. Riguardo alle specie per le quali si disponeva di più isolati per campione e le pyrosequenze ottenute fossero identiche, è stato scelto un solo campione da sottoporre all'analisi BLAST.

Le sequenze sono state allineate, mediante l'algoritmo BLAST, contro il database *nr* di Genebank® per verificare la corrispondenza tra i risultati dell'allineamento contro il database locale e l'allineamento contro il database *nr* e quindi la solidità della sequenza ottenuta ai fini del *barcoding*. Nell'analisi BLAST sono state usate le seguenti condizioni: è stata usata la funzione di BLAST "Automatically adjust parameters for short input sequences", un punteggio pari a +2 per ogni identità ed un punteggio pari a -3 per ogni *mismatch*, e penalità a carico dei gap pari a 5 per l'apertura e pari a 2 per l'estensione.

Un report di BLAST si compone di un numero di righe o record pari al numero delle hit, e di 7 colonne o campi denominati, in ordine da sinistra a destra: *Accession*, *Description*, *Max score*, *Total score*, *Query coverage*, *E-value*; *Max ident*.

Il primo campo (**Accession**) identifica univocamente la hit tramite il suo codice *Accession* in GenBank®, mentre il secondo campo (**Description**) indica l'organismo ed il gene cui la sequenza hit appartiene. Gli altri campi forniscono dei parametri riguardanti l'allineamento e rispettivamente, nell'ordine, i punteggi di allineamento (campi *Max score* e *Total score*), la percentuale della lunghezza della query omologa alla hit (**Query coverage**), la probabilità che l'allineamento sia avvenuto per caso (**E-value**) e l'identità nella porzione corrispondente al query coverage (**Max ident**). Ciò che va' tenuto in maggiore considerazione, nell'identificazione della query come appartenente all'organismo specificato nel campo *Description*, è la combinazione dei parametri *Query coverage* e *Max ident*, i quali saranno perciò evidenziati in ciascun report BLAST tra quelli riportati di seguito, i quali si riferiscono ad alcuni campioni significativi. Un altro parametro importante è l'*E-value*, in quanto definisce l'attendibilità statistica dell'omologia.

Per alcuni campioni la corrispondente pyrosequenza ottenuta non ha permesso una discriminazione univoca a livello di specie; a questi campioni sarà rivolta maggiore attenzione e sarà riservato a ciascuno un sottoparagrafo dedicato, mentre i campioni che sono risultati univocamente discriminabili saranno trattati di seguito agli altri in un unico sottoparagrafo.

Analisi BLAST sui campioni 106 e 107 di Acciuga (*Engraulis encrasicolus*)

I report BLAST in **Fig. 4.7** e **Fig. 4.8** hanno confermato, come già visto nell'analisi Identifire™, che le sequenze dei campioni di **Acciuga** 106 e 107 non sono identiche in quanto condividono identità di sequenza con differenti hit; si differenziano infatti per uno SNP C/T a livello della settima posizione a valle del primer di sequenziamento. Il campione 107 di *Engraulis encrasicolus* presenta, in tale posizione, una citosina e la sua sequenza risulta perciò identica a quella di una specie non presa in considerazione durante l'analisi *in silico*, *Engraulis eurystole*.

Il campione 106 di *Engraulis encrasicolus* presenta invece una timina a livello della posizione suddetta e risulta perciò identica alle corrispondenti sequenze delle specie *Engraulis japonicus* ed *Engraulis australis*, altra specie, quest'ultima, non considerata durante l'analisi *in silico*. *Engraulis australis* ed *Engraulis eurystole* sono specie di interesse minore nei mercati della pesca ed assenti nel D.M. MIPAAF del 31/01/2008. Vista la loro scarsa importanza commerciale, vi è anche una scarsa

disponibilità di dati molecolari su queste specie e risulta perciò difficoltosa la messa a punto di un metodo basato sull'analisi del DNA che ne permetta la discriminazione dall'*Engraulis encrasicolus*.

NCBI Blast:106c ACCIUGA <i>Engraulis encrasicolus</i> 30nt						
GQ412304.1	<i>Engraulis australis</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	60.0	60.0	100%	2e-08	100%
AP009137.1	<i>Engraulis encrasicolus</i> mitochondrial DNA, complete genome	60.0	60.0	100%	2e-08	100%
AB246181.1	<i>Engraulis japonicus</i> mitochondrial gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	60.0	60.0	100%	2e-08	100%

Fig. 4.7. Parte del report relativo all'analisi BLAST sui primi 30 nt della pyrosequenza del campione 106 di *Engraulis encrasicolus*.

NCBI Blast:107_ACCIUGA_salata_sott'olio_Engraulis_encrasicolus_35nt						
AM911212.1	<i>Engraulis encrasicolus</i> mitochondrial partial 16S rRNA gene, isolate EeG1	71.9	71.9	100%	1e-10	100%
EU410420.1	<i>Engraulis encrasicolus</i> voucher Engenc/78 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	71.9	71.9	100%	1e-10	100%
DQ912085.1	<i>Engraulis euryostole</i> isolate C24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	71.9	71.9	100%	1e-10	100%
.....						
AM911214.1	<i>Engraulis japonicus</i> mitochondrial partial 16S rRNA gene	56.0	56.0	100%	6e-06	94%

Fig. 4.8. Parte del report relativo all'analisi BLAST sui primi 35 nt della pyrosequenza del campione 107 di *Engraulis encrasicolus*.

Analisi BLAST sul campione B di Agone (*Alosa fallax lacustris*)

Il report di Blast in Fig. 4.9 ha dimostrato che il gene 16S è inadatto a discriminare non solo la frode di sostituzione dell'**Agone** (*Alosa fallax lacustris*) con la Cheppia (*Alosa fallax nilotica*), ma anche con altre specie di *Alosa* (*Alosa sapidissima* e *Alosa alosa*) presenti nella banca dati GenBank®, le quali tuttavia non rientrano nel D.M. MIPAAF del 31/01/2008. Le corrispondenti hit trovate con queste specie dimostrano identità del 100% con la pyrosequenza. *Alosa sapidissima* è una specie commerciale di scarso pregio presente sulla costa atlantica del Nord-America, mentre *Alosa alosa* è una specie presente nell'Atlantico orientale e anch'essa di importanza minore nei mercati della pesca.

NCBI Blast:B_missoltino_Alosa_fallax_lacustris_39nt						
EU552739.1	<i>Alosa fallax</i> voucher H50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	77.8	77.8	100%	2e-12	100%
EU099511.1	<i>Alosa sapidissima</i> voucher SIO 05-88 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	77.8	77.8	100%	2e-12	100%
AP009131.1	<i>Alosa alosa</i> mitochondrial DNA, complete genome	77.8	77.8	100%	2e-12	100%
EU552737.1	<i>Alosa fallax</i> voucher H48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	69.9	69.9	100%	5e-10	97%

Fig. 4.9. Parte del report BLAST relativo all'analisi sulla pyrosequenza del campione B di missoltino (*Alosa agone*).

Analisi BLAST sui campioni di clupeiformi discriminabili come frodi

L'indagine BLAST sulla pyrosequenza ottenuta per l'Alaccia (report in **Fig. 4.10**) ha dimostrato che l'Indagine primaria consente l'identificazione dell'Alaccia come frode di sostituzione nonostante non consenta un'identificazione univoca a livello di specie. Tale pyrosequenza non trova infatti alcuna hit con specie di clupeiformi di pregio commercializzati sul territorio nazionale poiché condivide identità soltanto con le sequenze di tre specie di clupeiformi i quali non sono di alcun interesse commerciale sui nostri mercati e la cui denominazione non è inclusa nel D.M. MIPAAF del 31/01/2008; si tratta dell'Alaccia brasiliana (*Sardinella janeiro*), specie di buon interesse sui mercati d'origine, dell'Alaccia di Bali (*Sardinella lemuru*), specie di discreto interesse commerciale nel luogo d'origine, e della specie *Amblygaster clupeioides*, presente in Oceania, che al pari dell'Alaccia viene spesso usata come esca. Queste identità non pregiudicano perciò il riconoscimento della presenza di una frode nel caso la pyrosequenza ottenuta si rinvenga in prodotti etichettati con il nome di "Acciuga" o "Sardina".

NCBI Blast:73c_ALACCIA_Sardinella_aurita_38nt						
AM911206.1	Sardinella janeiro mitochondrial partial 16S rRNA gene	75.8	75.8	100%	8e-12	100%
DQ912067.1	Sardinella aurita isolate C06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	75.8	75.8	100%	8e-12	100%
DQ660421.1	Sardinella lemuru 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	75.8	75.8	100%	8e-12	100%
DQ660420.1	Amblygaster clupeioides isolate 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	75.8	75.8	100%	8e-12	100%
DQ660419.1	Amblygaster clupeioides isolate 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	75.8	75.8	100%	8e-12	100%
EU552782.1	Sardinella aurita voucher H97 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	67.9	67.9	100%	2e-09	97%
AM911207.1	Sardinella aurita mitochondrial partial 16S rRNA gene	67.9	67.9	100%	2e-09	97%
AC012599.9	Homo sapiens 12 PAC RP5-1185J21 (Roswell Park Cancer Institute Human PAC Library) complete sequence	38.2	38.2	50%	1.7	100%

Fig. 4.10. Parte del report relativo all'analisi BLAST sulla pyrosequenza completa del campione 73 di *Sardinella aurita*.

Il report BLAST in **Fig. 4.11** ha confermato l'unicità della pyrosequenza di *Sardinella fimbriata* (la cui sequenza è tuttora assente in Genbank®) e perciò la possibilità di discriminare come frode questa specie, da poco entrata nei nostri mercati, da tutte le altre specie di Clupeiformi finora sequenziate a livello del gene 16S; la differenza minima nella percentuale d'identità con la specie più simile (*Mene maculata*) è infatti pari all'8%, se si considera la combinazione di *Max-ident* e *Query-coverage*, ed equivalente a 4/46 nt nel tratto considerato.

NCBI Blast:108c ALACCIA ASIATICA Sardinella fimbriata 46nt

AM911205.1	Sardinella maderensis mitochondrial partial 16S rRNA gene	52.0	52.0	100%	2e-04	89%
AP009143.1	Sardinella maderensis mitochondrial DNA, complete genome	52.0	52.0	100%	2e-04	89%
EF990632.1	Mene maculata 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	46.1	46.1	93%	0.010	88%

Fig. 4.11. Parte del report relativo all'analisi BLAST sulla pyrosequenza completa del campione 108 di *Sardinella fimbriata*.

Il report di Blast in Fig. 4.12 conferma l'identificabilità di *Clupea harengus* tramite Pyrosequencing™ sul gene 16S, anche in rapporto alle altre specie del genere *Clupea* finora sequenziate. Secondo quanto riportato nel report potrebbe sembrare sussista una differenza lieve, pari al 3% e corrispondente ad 1 nt, nelle identità tra la sequenza meno omologa tra quelle appartenenti alla specie *Clupea harengus* (hit AM911204.1) e la sequenza più omologa tra quelle appartenenti ad altre specie (*Clupea pallasii*, hit AP0091334.1); tuttavia l'allineamento tra la query ed entrambe queste due hit dimostra che questa differenza è invece pari ad almeno 2 nt nel tratto considerato e la discriminazione che si ottiene è perciò accurata. *Clupea pallasii* (Aringa del Pacifico, denominazione non inclusa nel D.M. MIPAAF del 31/01/2008) è una specie altamente commercializzata nelle zone d'origine, ma di scarso pregio.

NCBI Blast:A_ARINGA_Clupea_harengus_39nt

X99191.1	C.harengus mitochondrial 16S rRNA gene	77.8	77.8	100%	2e-12	100%
EU552767.1	Clupea harengus voucher H78 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	69.9	69.9	100%	5e-10	97%
AM911204.1	Clupea harengus mitochondrial partial 16S rRNA gene	69.9	69.9	100%	5e-10	97%
AP009134.1	Clupea pallasii mitochondrial DNA, complete genome	61.9	61.9	100%	1e-07	94%

> [emb|AM911204.1|](#) Clupea harengus mitochondrial partial 16S rRNA gene
Length=567

Score = 69.9 bits (35), Expect = 5e-10
Identities = 38/39 (97%), Gaps = 0/39 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1      CGTTTGTGCCAGTATCACGTTGTTTGGGAAGTCTGTTGAG 39
             |||
Sbjct 282     CGTTTGTGCCAGTATCAGGTTGTTTGGGAAGTCTGTTGAG 244
```

> [dbj|AP009134.1|](#) Clupea pallasii mitochondrial DNA, complete genome
Length=16700

Score = 61.9 bits (31), Expect = 1e-07
Identities = 37/39 (94%), Gaps = 0/39 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1      CGTTTGTGCCAGTATCACGTTGTTTGGGAAGTCTGTTGAG 39
             |||
Sbjct 2327    CGTTTGTGCCAGTATCACGTTGTTTGGGGGTCTGTTGAG 2289
```

Fig. 4.12. Parte del report relativo all'analisi BLAST sulla pyrosequenza completa del campione A di *Clupea harengus*.

Il report BLAST in **Fig. 4.13** relativo al campione 34 di *Sardinops sagax* ha confermato che questa specie risulta pienamente identificabile mediante la metodica Pyrosequencing™ poichè la pyrosequenza ottenuta si è rivelata identica soltanto a porzioni del gene 16S appartenenti alla medesima specie, mentre l'*E-value* che si è ottenuto con la hit più simile tra quelle appartenenti ad altre specie (*Alosa fallax*) è decisamente basso e pari a 0,12.

NCBI Blast:34c_SARDINA_della_CALIFORNIA_Sardinops_sagax_40nt						
GQ412303.1	Sardinops sagax 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	67.9	67.9	85%	2e-09	100%
GQ365310.1	Sardinops sagax isolate 257-fish 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	54.0	54.0	85%	3e-05	97%
EU552737.1	Alosa fallax voucher H48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	42.1	42.1	92%	0.12	89%

Fig. 4.13. Parte del report relativo all'analisi BLAST sulla pyrosequenza completa del campione 34 di *Sardinops sagax*.

Infine il report BLAST in **Fig. 4.14** ha confermato che la pyrosequenza, ottenuta sul campione 64 di *Sprattus sprattus* è sufficiente a garantirne la piena identificazione in quanto differente non solo dalle sequenze di ogni altra specie di Clupeiformi ma anche da ogni altra specie di pesci, poichè la specie trovata più simile, con un *Query-coverage* pari al 66%, appartiene alla specie *Homo sapiens*.

NCBI Blast:64c_SPRATTO_Sprattus_sprattus_39nt						
AP009234.1	Sprattus sprattus mitochondrial DNA, complete genome	77.8	77.8	100%	2e-12	100%
AM911201.1	Sprattus sprattus mitochondrial partial 16S rRNA gene	69.9	69.9	100%	5e-10	97%
AF001025.6	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 18 clone:RP11-838N2, complete sequence	52.0	52.0	66%	1e-04	100%

Fig. 4.14. Parte del report BLAST relativo all'analisi BLAST sulla pyrosequenza completa ottenuta del campione 64 di *Sprattus sprattus*.

4.1.5 PYROSEQUENCING™ SUGLI AMPLIFICATI DEL GENE 16S DI PLEURONECTIFORMI ED ALTRI PESCI ED ANALISI DELLE PYROSEQUENZE TRAMITE SOFTWARE IDENTIFIRE™

Nell'analisi condotta tramite Identifire™ sui campioni dei pleuronectiformi (**Fig 4.15**) si è deciso di allineare la regione corrispondente ai primi 41 nucleotidi della *full-sequence*, invece dei primi 30 normalmente utilizzati, in quanto la seduta di Pyrosequencing™ sui pleuronectiformi ha fornito sequenze qualitativamente molto buone.

Secondo tale report, la seduta di Pyrosequencing™ sul gene 16S è risultata in grado di discriminare univocamente tutti i campioni analizzati eccetto, come atteso quelli appartenenti al subordine Pleuronectoidei, cioè i campioni 4, 5, 15, 36, 85, 95. Tra i campioni di Pleuronectoidei è tuttavia stato identificato univocamente e correttamente il campione 16 come *Pleuronectes platessa*.

Il risvolto pratico dell'identità di sequenza tra i membri del subordine Pleuronectoidei è l'impossibilità di identificare le frodi di sostituzione a carico della Platessa e dell'Halibut della Groenlandia. Questo è comunque vero solo per alcune specie del subordine Pleuronectoidei poiché l'analisi Identifire™ ha permesso di suddividere grossolanamente i membri di questo subordine in due gruppi di specie, Gruppo I e Gruppo II, in base alla sequenza che presentano nella porzione sequenziabile mediante Pyrosequencing™. Nel presente lavoro sono state classificate come appartenenti al Gruppo I le specie che fanno capo ai generi *Hippoglossoides*, *Limanda* e *Reinhardtius* e come appartenenti al Gruppo II le specie che fanno capo ai generi *Pleuronectes*, *Platichthys*, *Lepidopsetta*, *Isopsetta* e *Liopsetta*.

Questa suddivisione in due gruppi permette già con l'Indagine primaria l'identificazione delle frodi di sostituzione della **Platessa** (*Pleuronectes platessa*) con specie del Gruppo I così come l'identificazione di frodi di sostituzione dell'Halibut della Groenlandia con specie appartenenti al Gruppo II, mentre si è meno interessati all'identificazione univoca delle specie sostitutive. Al fine di distinguere la Platessa anche dalle altre specie del Gruppo II si è ricorsi all'Indagine secondaria sul gene CYTB, specifica per il subordine Pleuronectoidei.

IdentiFire Summary Report



Sample Id	Result	Score	
4p	Pleuronectoidei spp. gruppoII	100	Details
5p	Pleuronectoidei spp. gruppoII	100	Details
9p	Pleuronectoidei spp. gruppoI	100	Details
15p	Pleuronectoidei spp. gruppoII	100	Details
16p	Pleuronectes_platessa_	100	Details
36p	Pleuronectoidei spp. gruppoII	100	Details
39p	Paraplagusia bilineata	100	Details
51p	Solea_senegalensis(Golgo_di_Cadice)	100	Details ⓘ
75p	Solea solea	100	Details ⓘ
88p	Pangasius_sp.16S	100	Details
89p	Solea solea	100	Details ⓘ
95p	Pleuronectoidei spp. gruppoII	100	Details
98p	Pangasius_sp.16S	100	Details
80p	Solea solea	100	Details ⓘ
85p	Pleuronectoidei spp. gruppoII	100	Details
87p	Lates_niloticus_16S	100	Details
b mix +PS	No hits found.	0	Details
b mix -PS	No hits found.	0	Details

Settings

PSQ sequence length:	User defined (41)
Fixed left alignment position:	False
Pyro optimized scoring:	True
Consider raw data quality:	False

Fig. 4.15. Report riassuntivo del software IdentiFire™ riguardante l'allineamento, contro il database locale, delle pyrosequenze ottenute a partire dagli amplificati di pleuroncetiformi riportati nel gel in Fig. 4.3.

4.1.6 ANALISI BLAST SULLE PYROSEQUENZE DEL GENE 16S DI PLEURONCTIFORMI ED ALTRI PESCI

Si riportano nei sottoparagrafi seguenti i report di BLAST ottenuti allineando contro il database *nr* di GenBank® le sequenze ottenute da ciascuna specie mediante Pyrosequencing™ (pyrosequenze). Riguardo alle specie per le quali si disponeva di più isolati per campione e le pyrosequenze ottenute fossero state identiche, è stato scelto un solo campione da sottoporre all'analisi BLAST. I report sono presentati in ordine di numero identificativo del campione assegnato in **Tab. 3.8**; analogamente all'analisi BLAST sui clupeiformi si presentano per primi i report delle specie non discriminabili univocamente e successivamente i report relativi alle specie univocamente discriminabili, all'interno di un unico sottoparagrafo.

In generale l'analisi BLAST sui campioni di pleuronectiformi ha confermato quanto previsto in fase di progettazione dell'analisi primaria, e quanto visto nell'analisi Identifire™, ovvero la possibilità di identificare univocamente mediante tecnica Pyrosequencing™, tutte le specie di Soleoidei (*Solea solea* e *Solea senegalensis*) come anche le specie cosiddette di altri pesci (*Pangasius hypopthalmus* e *Lates niloticus*) a nostra disposizione. Le pyrosequenze di tutte queste specie si sono infatti rivelate chiaramente identificabili con differenze evidenti nell'identità di sequenza minima che si è verificata di volta in volta con specie diverse e soprattutto con specie di pregio.

L'analisi BLAST ha infine confermato la suddivisione del subordine Pleuronectoidei in due gruppi di specie in base all'identità di sequenza con la specie *Pleuronectes platessa* o con le specie *Limanda* e *Hippoglossoides*.

Analisi BLAST sulle pyrosequenze di Pleuronectoidei

I report di BLAST in **Fig. 4.16** e **Fig. 4.17** hanno confermato l'impossibilità di discriminare tra loro i membri del subordine Pleuronectoidei e la suddivisione degli stessi nei due gruppi precedentemente discussi. L'analisi BLAST ha dimostrato inoltre che il Gruppo I dei pleuronectoidei (report BLAST in **Fig. 4.16**) non comprende, diversamente dall'atteso, la specie *Reinhardtius hippoglossoides* (Halibut della Groenlandia) poiché l'ottenimento di pyrosequenze così lunghe ha permesso lo sfruttamento di zone polimorfiche discriminanti a valle della regione di 30 nt sulla quale si è valutata la variabilità interspecifica in fase di disegno dei primer. Un altro genere compreso in questo gruppo è *Cleisthenes*, genere che ha distribuzione geografica ridotta alle sole coste del Giappone e quindi non è di alcun interesse ai fini della nostra analisi; inoltre la sequenza del gene CYTB di questo genere è assente in GenBank® e quindi non è stato possibile includere questa specie nel disegno di primer per l'indagine secondaria.

Osservando l'ultimo record del report in **Fig. 4.16** si nota che il Gruppo I dei pleuronectoidei si differenzia dal Gruppo II per un 5% di divergenza a livello della pyrosequenza, equivalente a 2/41 nt nel tratto considerato.

NCBI Blast:9p_LIMANDA_Limanda_limanda_41nt									
FJ870418.1	Cleisthenes herzensteini voucher UW 118098 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	81.8	81.8	100%	1e-13	100%			
FJ870410.1	Hippoglossoides robustus voucher UW 117291 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	81.8	81.8	100%	1e-13	100%			
FJ870408.1	Limanda sakhalinensis voucher UW 117279 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	81.8	81.8	100%	1e-13	100%			
.....									
AM749130.1	Reinhardtius hippoglossoides complete genome, isolate Rh-1	69.9	69.9	85%	6e-10	100%			
AF488435.1	Psettichthys melanostictus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product	69.9	69.9	85%	6e-10	100%			
FJ870412.1	Pseudopleuronectes americanus voucher KU 5419 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	65.9	65.9	100%	9e-09	95%			

Fig. 4.16. Parte del report relativo all'analisi BLAST sulla pyrosequenza completa del campione 9 di *Limanda limanda*.

Il Gruppo II di specie nel subordine Pleuronectoidei (Fig. 4.17) tramite analisi BLAST ha dimostrato di comprendere oltre ai generi *Pleuronectes* e *Platichthys*, anche i generi *Pseudopleuronectes*, *Isopsetta*, *Lepidopsetta*, *Liopsetta*, *Parophrys* e *Psettichthys*. Tali generi sono stati perciò inclusi nell'allineamento per il disegno di primer sul gene Cytb. Tra i generi sopracitati figurano molte specie la cui denominazione non è inclusa nel D.M. MIPAAF del 31/01/2008, tra cui alcune specie di alto valore commerciale le quali non sono tuttavia commercializzate nei nostri mercati, quali *Pseudopleuronectes herzensteini* diffusa nel Pacifico Nord-occidentale, *Pseudopleuronectes americanus*

NCBI Blast:15p PLATESSA Plaeuronectes platessa 42nt									
FJ870412.1	Pseudopleuronectes americanus voucher KU 5419 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	83.8	83.8	100%	4e-14	100%			
FJ870407.1	Liopsetta pinnifasciata voucher UW 044943 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	83.8	83.8	100%	4e-14	100%			
FJ870406.1	Pleuronectes quadrituberculatus voucher UW 118094 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	83.8	83.8	100%	4e-14	100%			
FJ870405.1	Psettichthys melanostictus voucher UW 047683 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	83.8	83.8	100%	4e-14	100%			
FJ870401.1	Platichthys stellatus voucher UW 047679 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	83.8	83.8	100%	4e-14	100%			
FJ870399.1	Parophrys vetulus voucher UW 047297 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	83.8	83.8	100%	4e-14	100%			
FJ870393.1	Lepidopsetta polyxystra voucher UW 110225 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	83.8	83.8	100%	4e-14	100%			
FJ870392.1	Lepidopsetta bilineata voucher UW 048833 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	83.8	83.8	100%	4e-14	100%			
FJ870390.1	Isopsetta isolepis voucher UW 110490 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	83.8	83.8	100%	4e-14	100%			
.....									
EF119261.1	Hippoglossoides elassodon voucher UW<USA-WA>.047315 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	65.9	65.9	97%	9e-09	95%			
AY368897.1	Limanda limanda 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product	65.9	65.9	97%	9e-09	95%			

Fig. 4.17. Parte del report relativo all'analisi BLAST sulla pyrosequenza completa del campione 15 di *Pleuronectes platessa*.

Come visto in precedenza nel paragrafo 4.1.5, il campione 16 di *Pleuronectes platessa* è apparso non corrispondere ad alcuna delle sequenze di *P. platessa* finora sequenziate e presenti nel nostro database Identifire; lo stesso campione è stato inoltre sottoposto ad indagine BLAST per confermare o smentire che la sequenza di questo isolato fosse unica. Il report BLAST in **Fig. 4.18** ha confermato la singolarità di tale sequenza all'interno degli isolati di *P. platessa* finora sequenziati ma d'altra parte ha smentito la singolarità di tale sequenza a livello generale in quanto essa risulta identica alla sequenza di un isolato di *Platichthys stellatus*, un membro del Gruppo II dei pleuronectoidei.

NCBI Blast:16p_PLATESSA_Plaeuronectes_platessa_42nt						
EF458340.1	Platichthys stellatus voucher UW<USA-WA>:048003 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	83.8	83.8	100%	4e-14	100%
FJ870412.1	Pseudopleuronectes americanus voucher KU 5419 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	75.8	75.8	100%	1e-11	97%
FJ870407.1	Liopsetta pinnifasciata voucher UW 044943 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	75.8	75.8	100%	1e-11	97%

Fig. 4.18. Parte del report relativo all'analisi BLAST sulla pyrosequenza completa del campione 16 di *Pleuronectes platessa*.

Analisi BLAST sui campioni delle specie di Pleuronectiformi ed altri pesci identificabili come frodi

Il report BLAST riportato in **Fig. 4.19** dimostra che l'Indagine primaria consente l'identificazione della Sogliola Indo-Pacifica come frode di sostituzione nonostante non consenta un'identificazione univoca a livello di specie. Il report BLAST ha messo infatti in luce l'identità della pyrosequenza del campione 39 di *Paraplagusia bilineata* con la sola sequenza della specie *Eopsetta jordani*, la quale è un pleuronectoideo diffuso nell'Oceano pacifico che al pari della Sogliola Indo-Pacifica presenta un discreto valore commerciale, ristretto alla zona d'origine, e la cui denominazione è perciò assente nel D.M. MIPAAF del 31/01/2008. L'indagine BLAST ha perciò confermato che la sequenza di *Paraplagusia bilineata* si discosta dalle sequenze di Pleuronectoidei e Soleoidei di pregio, rendendo possibile la sua identificazione come frode mediante Pyrosequencing™.

NCBI Blast:39p SOGLIOLA INDO PACIFICA Paraplagusia bilineata 37nt						
FJ870387.1	Eopsetta jordani voucher UW 048807 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	73.8	73.8	100%	3e-11	100%
FJ870386.1	Eopsetta jordani voucher UW 048805 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	73.8	73.8	100%	3e-11	100%
FJ870423.1	Reinhardtius hippoglossoides voucher UW 047290 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	60.0	60.0	81%	4e-07	100%

Fig. 4.19. Parte del report relativo all'analisi BLAST sulla pyrosequenza completa del campione 39 di *Paraplagusia bilineata*.

Per quanto riguarda il campione 75 di *Solea solea*, l'indagine BLAST (report in **Fig. 4.20**) condotta sulla corrispondente pyrosequenza ha confermato la possibilità di discriminare la specie *Solea solea* da tutte le altre specie di sogliola oltre che da tutte le altre specie di pesci piatti tramite differenze consistenti soprattutto a livello del *Query-coverage*.

NCBI Blast:75p_SOGLIOLA_Solea_solea_48nt						
(Click headers to sort columns)						
AF122825.1	Solea solea large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product	95.6	95.6	100%	9e-19	100%
AB125247.1	Solea solea mitochondrial gene for 16S rRNA, partial sequence	87.7	87.7	91%	2e-16	100%
AF148802.1	Solea senegalensis large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product	60.0	60.0	87%	5e-08	92%
AB125248.1	Solea kleinii mitochondrial gene for 16S rRNA, partial sequence	52.0	52.0	54%	1e-05	100%
AF112847.1	Solea kleinii 16S large subunit ribosomal RNA gene, mitochondrial gene for mitochondrial RNA, partial sequence	52.0	52.0	54%	1e-05	100%
AL929013.9	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-77015, complete sequence	40.1	40.1	41%	0.049	100%

Fig. 4.20. Parte del report di relativo all'analisi BLAST sulla pyrosequenza completa del campione 75 di *Solea solea*.

L'analisi BLAST sulla pyrosequenza ottenuta sul campione 98 di *Pangasius hypophthalmus* (**Fig. 4.21**) ha dimostrato l'identificabilità del genere *Pangasius* mediante Pyrosequencing™ sul gene 16S in quanto la differenza minima nel *Query-coverage* con hit appartenenti ad altri generi (*Heteropneustes*) è pari al 24%.

NCBI Blast:98p_PANGASIO_Pangasius_hypophthalmus_41nt						
AF072751.1	Pangasius sp. 16S ribosomal RNA gene, mitochondrial gene for mitochondrial RNA, partial sequence	81.8	81.8	100%	1e-13	100%
DQ334289.1	Pangasianodon hypophthalmus haplotype Ph08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	81.8	81.8	100%	1e-13	100%
....						
DQ307046.1	Pangasianodon gigas haplotype Pg01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	67.9	67.9	92%	2e-09	97%
FJ432687.1	Heteropneustes fossilis voucher UOK-DOZ-HF2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	56.0	56.0	68%	9e-06	100%

Fig. 4.21. Parte del report relativo all'analisi BLAST sulla pyrosequenza completa del campione 98 di *Pangasius hypophthalmus*.

Infine, il report BLAST in **Fig. 4.22** relativo alla pyrosequenza del campione 87 di *Lates niloticus* ha dimostrato l'identificabilità di tale specie mediante Pyrosequencing™ con una differenza minima nello score molto consistente e pari a 21.7 con le sequenze di altre specie presenti nella banca dati GenBank®, nella fattispecie con la sequenza di *Alepes kleinii*, pesce della famiglia Carangidae diffuso in Oceania.

NCBI Blast:87p_PERSICO_AFRICANO_Lates_niloticus_44nt						
AB122030.1	Lates niloticus mitochondrial gene for 16S rRNA	87.7	87.7	100%	3e-15	100%
EF613264.1	Alepes kleinii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	56.0	56.0	81%	1e-05	94%

Fig. 4.22. Parte del report relativo all'analisi BLAST sulla pyrosequenza completa del campione 87 di *Lates niloticus*.

4.2 INDAGINE SECONDARIA PER LA DISCRIMINAZIONE DI *ENGRAULIS ENCRASICOLUS* TRAMITE UNA PORZIONE GENOMICA VARIABILE

4.2.1 AMPLIFICAZIONE DI *ENGRAULIS ENCRASICOLUS* CON L'IMPIEGO DEI PRIMER EngraJEF ED EngraJER

L'amplificazione di una porzione genomica mitocondriale variabile sui campioni 106 e 107 di *Engraulis encrasicolus* e sul controllo negativo, il campione 109, con i primer EngraJEF ed EngraJER è riportata in **Fig. 4.23**. Tali primer hanno dimostrato di amplificare in maniera poco efficiente (banda di intensità lieve) il campione 109, controllo negativo, mostrando perciò specificità per il genere *Engraulis*, nonché specificità per la porzione genomica target, dato che l'amplificazione ha generato un solo frammento della lunghezza prevista di 291 pb; la banda degli amplificati si trova infatti al di sopra della banda del marker di lunghezza pari a 267 nt. I primer hanno dimostrato altresì di essere efficaci anche su un campione di acciuga lavorato quale il 107. Non è stato purtroppo possibile valutare l'efficacia della coppia di primer su campioni di *Engraulis japonicus* perché tale specie è di difficile reperibilità sui nostri mercati; abbiamo perciò inoltrato delle richieste di invio di campioni di tale specie, le quali tuttavia non sono ancora state evase.

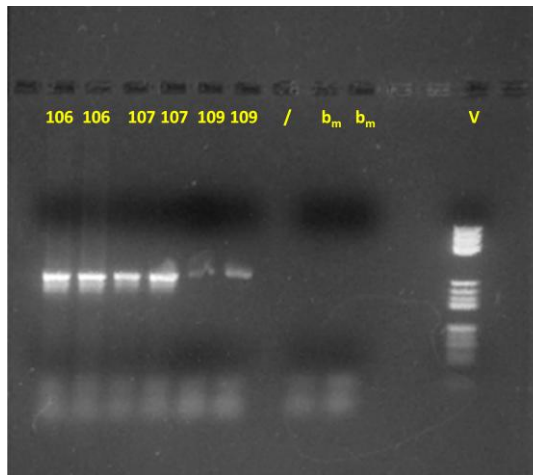


Fig. 4.23. Gel elettroforesi in agarosio al 2% degli ampliconi del gene cytb amplificati con i primer EngraJEF ed EngraJER.

4.2.2 PYROSEQUENCING™ SUI CAMPIONI 106 E 107 TRAMITE IL PRIMER EngraJES ED ANALISI DELLE PYROSEQUENZE TRAMITE SOFTWARE IDENTIFIRE™

Il report riassuntivo Identifire mostrato in **Fig. 4.24** si riferisce all'allineamento delle sequenze ottenute sottoponendo a Pyrosequencing™ gli amplificati mostrati in **Fig. 4.21**. Si è deciso di allineare soltanto la porzione della sequenza la cui qualità è giudicata


good secondo i parametri del software Pyro Mark™ ID. Le pyrosequenze ottenute sono state inequivocabilmente identificate come appartenenti ad *Engraulis encrasicolus*, questo si nota ancora meglio nel report dettagliato relativo al campione 106 riportato in **Fig. 4.24**, nel quale ben 5 SNP differenziano la sequenza ottenuta da quella di *Engraulis japonicus*, nonostante questo non si raggiunge un'identità del 100% tra la query e le hit depositate nel database locale. Questo si deve alla variabilità della regione considerata, a causa della quale, le sequenza degli isolati di cui disponiamo si discostano da quelle degli isolati finora sequenziati; in particolare si può notare in **Fig. 4.25** la presenza di uno SNP a livello del secondo nt della pyrosequenza nell'allineamento con la hit appartenente ad *Engraulis encrasicolus*.










Infine, l'assenza di hit per la sequenza corrispondente al campione 109 in presenza del primer di sequenziamento, ha dimostrato ancora una volta la specificità dell'analisi per il genere *Engraulis*.

2009-11-04

IdentiFire

Summary Report



Sample Id	Result	Score
 ENGRA106 PS	Engraulis_encrasicolus	91.6 Details 
 ENGRA 107 PS	Engraulis_encrasicolus	80.4 Details  
 ENGRA 109 PS	No hits found.	0 Details
 ENGRA B MIX PS	No hits found.	0 Details
 ENGRA B MIX NO PS	No hits found.	0 Details
 106 NO PS	No hits found.	0 Details

Settings

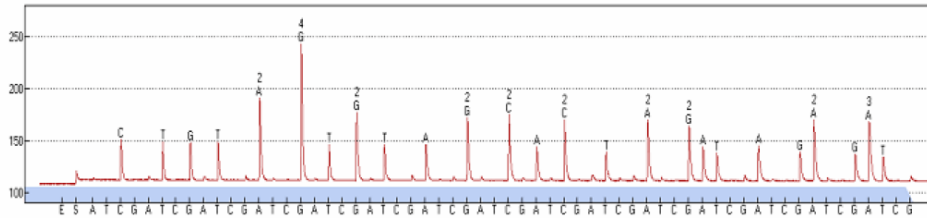
PSQ sequence length:	Good quality
Fixed left alignment position:	False
Pyro optimized scoring:	True
Consider raw data quality:	False

Fig. 4.24. Report riassuntivo della seduta di Pyrosequencing™ condotta con il primer di sequenziamento EngraJES sugli amplificati di una porzione genomica variabile del genere *Engraulis*, sui campioni 106 e 107 riportati nel gel in **Fig. 4.23**.

Sample ID: ENGRA106 PS

Well: B1
Notes: 20+3
PSQ run: 20090925 PLEU/ENGRA/PP
Entry ID: SQA 15
Sequence library: engraulis identifier (2009-11-04, 10:33:24 AM)
Query sequence: CTGTAAGGGGTGGTAGGCCACCTAAGGATAGAAGAA

Result: *Engraulis encrasicolus* **Score: 94.8**
Quality: Uncertain
Warnings: Low homology between query and best hit.



Hit 1: *Engraulis encrasicolus*
Score: 94.8
Identities: 35/36 (97%)
Gaps: 0/36 (0%)
E-value: 5.03e-032
Query 1 CTGTAAGGGGTGGTAGGCCACCTAAGGATAGAAGAA 36
Library 164 CCTAAGGGGTGGTAGGCCACCTAAGGATAGAAGAA 199

Hit 2: *Engraulis iaponicus*
Score: 74.2
Identities: 31/36 (86%)
Gaps: 0/36 (0%)
E-value: 3.49e-017
Query 1 CTGTAAGGGGTGGTAGGCCACCTAAGGATAGAAGAA 36
Library 164 CTGTAAGGGGCAGGCCACCTAAGGATAGAAGAA 199

Fig. 4.25. Report dettagliato relativo alla pyrosequenza completa del campione 106 di *Engraulis encrasicolus* ottenuta durante la seduta di Pyrosequencing™ il cui report riassuntivo è riportato in Fig. 4.24.

4.2.3 SEQUENZIAMENTO CON METODO CLASSICO SULLA PORZIONE GENOMICA DISCRIMINANTE DI *ENGRAULIS*

Poiché nell’indagine secondaria per la discriminazione di *Engraulis encrasicolus* l’analisi Identifire™ ha messo in luce la presenza di incorgenze tra le pyrosequenze ottenute e le sequenze depositate nel database locale, entrambi i campioni 106 e 107 sono stati sottoposti a sequenziamento con metodo tradizionale per verificare la corrispondenza, per lo stesso campione, tra la pyrosequenza *full-sequence* e la sequenza ottenuta mediante sequenziamento con metodo classico. Per il campione 106 il sequenziamento classico ha avuto successo su entrambi i filamenti mentre è stato efficace sul solo filamento *reverse* nel caso del campione 107.

In Fig. 4.26 viene presentato l’allineamento tra le sequenze ottenute con metodo classico su entrambi i campioni di engraulidi 106 e 107, a confronto con le sequenze

ottenute in Pyrosequencing™ sul corrispondente campione. Questo permette di apprezzare l'assoluta corrispondenza di entrambe le pyrosequenze con le corrispondenti sequenze da sequenziamento classico, eccetto a livello del penultimo nucleotide della pyrosequenza 106 in corrispondenza del quale si verifica un *plus-frameshift*, si tratta comunque di un errore trascurabile dato che avviene 36 nt *downstream* al primer di sequenziamento, cioè al di fuori della regione di massima efficienza del Pyrosequencing™ ed anche al di fuori della regione polimorfica discriminante.

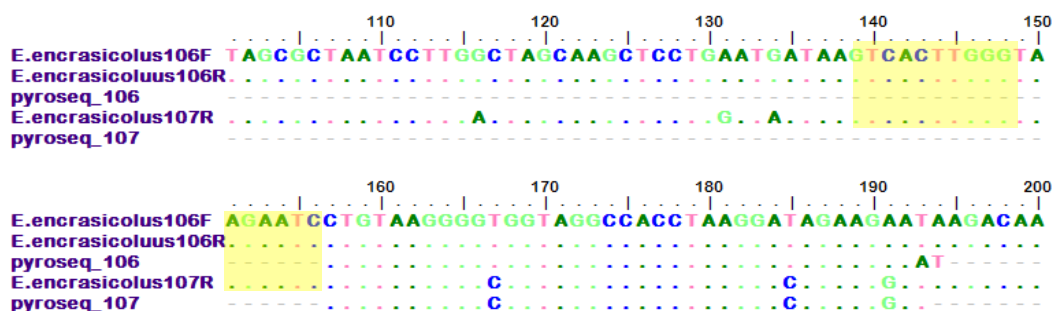


Fig. 4.26. Allineamento tra le sequenze ottenute con metodo classico su entrambi i campioni di engraulidi 106 e 107, a confronto con le corrispondenti sequenze ottenute in Pyrosequencing™. In giallo si evidenzia la regione relativa al primer di sequenziamento EngraJES.

4.2.4 ANALISI BLAST SULLE PYROSEQUENZE DEGLI ENGRAULIDI OTTENUTE TRAMITE IL PRIMER EngraJES

La sequenza riportata nel pirogramma in Fig. 4.25 privata della regione terminale in cui si verifica come visto una riduzione nell'efficienza, è stata sottoposta ad analisi BLAST, il cui report è riportato in Fig. 4.27. Tale report ha confermato che la pyrosequenza ottenuta discrimina univocamente il corrispondente isolato come appartenente ad *Engraulis encrasicolus*. Il *Query-coverage* che si ottiene per la hit migliore è pari 94% poiché la presenza di uno SNP a livello del secondo nucleotide ha indotto l'algoritmo ad escludere dall'allineamento i primi 2 nucleotidi della query. Tale hit migliore appartiene ad *Engraulis encrasicolus* ed è anche l'unica che si ottiene per il genere *Engraulis*. Questo dimostra che l'Indagine secondaria progettata per la discriminazione di *Engraulis encrasicolus* da *Engraulis japonicus* è molto specifica e non viene pregiudicata dalla comparsa di mutazioni.

NCBI Blast:106c_Engraulis_encrasicolus_porzione genomica...

AP009137.1	Engraulis encrasicolus mitochondrial DNA, complete genome	69.9	69.9	94%	3e-11	100%
EF027189.1	Etheostoma collettei voucher STL 1137.01 NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) gene, complete cds; mitochondrial	42.1	42.1	78%	0.008	93%
EF017603.1	Priapella compressa 16S ribosomal RNA gene, partial	42.1	42.1	100%	0.008	89%

> [dbj|AP009137.1|](#) Engraulis encrasicolus mitochondrial DNA, complete genome
Length=16674

Score = 67.9 bits (34), Expect = 2e-09
Identities = 34/34 (100%), Gaps = 0/34 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 3      GTAAGGGGTGGTAGGCCACCTAAGGATAGAAGAA 36
          |||
Sbjct 4822   GTAAGGGGTGGTAGGCCACCTAAGGATAGAAGAA 4789

```

Fig. 4.27. Parte del report relativo all'analisi BLAST sulla pyrosequenza completa ottenuta con il primer EngraJES sul campione 106 di *Engraulis encrasicolus* ed allineamento a coppie con l'unica hit di *Engraulis encrasicolus*.

L'analisi BLAST (report in **Fig. 4.28**) sulla pyrosequenza *full-sequence* del campione 107 conferma l'appartenenza anche di questo campione alla specie *Engraulis encrasicolus*, nonostante in questo caso si verificano due ulteriori SNP nella regione fino dei primi 34 nt a valle del primer di sequenziamento.

La discriminazione dalla sequenza di *Engraulis japonicus* avviene grazie a 3 SNP a livello della stessa regione fino al 34^{esimo} nucleotide; poiché tali SNP cadono tutti e tre in regioni diverse rispetto ai due visti nell'allineamento con la hit AP009137, questo permette una discriminazione univoca tra le due specie.

NCBI Blast:107 porzione genomica 37nt

AP009137.1	Engraulis encrasicolus mitochondrial DNA, complete genome	48.1	48.1	86%	0.002	93%
FJ381294.1	Etheostoma uniporum isolate EuniR NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) gene, complete cds; mitochondrial	44.1	44.1	91%	0.026	91%
EF027228.1	Etheostoma uniporum voucher STL 180.09 NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) gene, complete cds; mitochondrial	44.1	44.1	91%	0.026	91%
AB040676.1	Engraulis japonicus mitochondrial DNA, complete genome	44.1	44.1	91%	0.026	91%

> [dbj|AP009137.1|](#) Engraulis encrasicolus mitochondrial DNA, complete genome
Length=16674

Score = 48.1 bits (24), Expect = 0.002
Identities = 30/32 (93%), Gaps = 0/32 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 3      GTAAGGGGCGGTAGGCCACCTAAGGACAGAAG 34
          |||
Sbjct 4822   GTAAGGGGCGGTAGGCCACCTAAGGACAGAAG 4791

```

> [dbj|AB040676.1|](#) Engraulis japonicus mitochondrial DNA, complete genome
Length=16675

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.026
Identities = 31/34 (91%), Gaps = 0/34 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      CTGTAAGGGGCGGTAGGCCACCTAAGGACAGAAG 34
          |||
Sbjct 4825   CTGTAAGGGGCGGCAGGCCCTAAGGACAGAAG 4792

```

Fig. 4.28. Parte del report relativo all'analisi BLAST sulla pyrosequenza completa ottenuta con il primer EngraJES sul campione 107 di *Engraulis encrasicolus* ed allineamento a coppie della query con le hit di *Engraulis japonicus* ed *Engraulis encrasicolus*.

4.3 INDAGINE SECONDARIA PER LA DISCRIMINAZIONE DELLE SPECIE APPARTENENTI AL SUBORDINE PLEURONECTOIDEI APPLICATA AL GENE CYTB

4.3.1 AMPLIFICAZIONE DEL GENE CYTB

L'amplificazione del gene CYTB è stata condotta utilizzando i primer PleuFbio e PleuRseq sui campioni di DNA estratto usati in precedenza anche per l'indagine primaria. Tali primer sono stati disegnati su tutte le sequenze del gene CYTB disponibili in GenBank® per i generi di *Pleuronectoidei* i quali si sono dimostrati, tramite analisi BLAST, condividere il 100% di identità di sequenza a livello del gene 16S con la specie *Pleuronectes platessa*.

Secondo quanto si nota in **Fig. 4.29**, i primer PleuFbio e PleuRseq, si sono dimostrati essere specifici per il frammento target, poiché hanno dato luogo all'amplificazione di un solo frammento della lunghezza prevista di 520 pb. Si sono dimostati inoltre efficaci anche sulle sequenze della specie (*Pleuronectes quadrituberculatus*) non inclusa nell'allineamento per il disegno degli stessi, ovvero i campioni 4 e 95, nonché lievemente anche sul controllo negativo 109, dimostrando la flessibilità all'applicazione del metodo su specie di recente introduzione sul mercato.

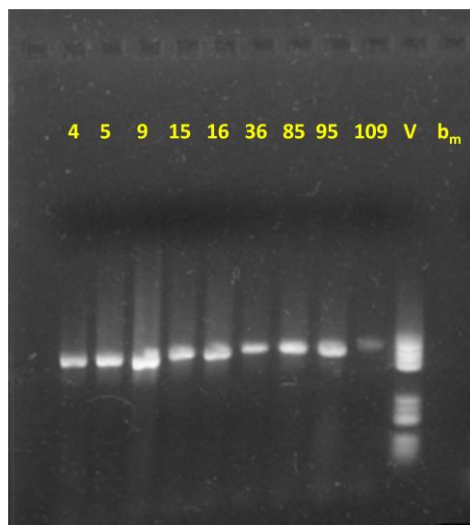


Fig. 4.29. Gel elettroforesi in agarosio al 2% degli ampliconi del gene Cytb amplificati con i primer **PleuFbio** e **PleuRseq** appartenenti ai campioni di pleuronectoidei considerati nel presente lavoro ed indicati con il numero identificativo assegnato in **Tab 3.8**.

4.3.2 PYROSEQUENCING™ SUGLI AMPLIFICATI DEL GENE CYTB DEI PLEURONECTOIDEI ED ALTRI PESCI E ANALISI DELLE PYROSEQUENZE TRAMITE SOFTWARE IDENTIFIRE™

Il report riassuntivo Identifire™ riportato in **Fig. 4.30** si riferisce all'allineamento delle sequenze ottenute sottoponendo a Pyrosequencing™ gli amplificati riportati in **Fig. 4.29**. E' stato scelto di allineare le porzioni di sequenza che ricadono nei giudizi di qualità *good* e *uncertain* della sequenza in luogo dei primi 30 nt poiché la regione polimorfica che distingue *Hippoglossoides elassodon*, specie di discreto pregio e *Hippoglossus hippoglossus*, specie pregiata, si trova in questo caso nella regione compresa tra la posizione 37 e la posizione 41 a valle del primer di sequenziamento. La decisione di includere nell'allineamento anche regioni così *downstream* nella pyrosequenza ha portato a delle incongruenze tra le pyrosequenze e le sequenze depositate nel database, dato che nella maggioranza dei casi non sussiste un'identità di sequenza del 100% tra la query e la hit migliore, ma ha portato anche ad innegabili vantaggi dal punto di vista della discriminazione poiché tutti i campioni analizzati sono stati univocamente e correttamente identificati eccetto il campione 4, la cui pyrosequenza si è rivelata identica a quella della specie *Limanda limanda*. Il reciproco non è accaduto, ovvero il campione 9 di *Limanda limanda* è stato univocamente discriminato perché la sequenza ottenuta su questo campione presenta una lunghezza sufficiente a consentire la discriminazione.

L'identità riscontrata tra *Pleuronectes quadrituberculatus* e *Limanda limanda* non era prevedibile a priori poiché non era nota la sequenza della porzione utilizzata del gene CYTB per la specie *Pleuronectes quadrituberculatus*; comunque non costituisce un problema dato che queste specie sono entrambe di discreto e paragonabile pregio commerciale e poiché l'obiettivo unico dell'indagine secondaria è quello di differenziarle dalla Platessa di cui spesso costituiscono una frode, tale obiettivo può perciò dirsi raggiunto.

IdentiFire Summary Report



Sample Id	Result	Score	
PLEU 4 PS	L.limandaEU492118.1 (+1 more)	89.4	Details ⓘ
PLEU5 PS	P.platessaEU109751.1	97	Details ⚠
PLEU9 PS	L.limandaEU224010.1	93.6	Details ⚠
PLEU15 PS	P.platessaEU109751.1	100	Details
PLEU 16 PS	P.platessaEU109751.1	97	Details ⚠
PLEU 36 PS	Hippoglossoides_elassodon_36forRT	93	Details ⚠
PLEU 85 PS	P.platessaEU109751.1	96.7	Details ⚠
PLEU5 NO PS	No hits found.	0	Details
PLEU B MIX PS	No hits found.	0	Details
PLEU B MIX NO PS	No hits found.	0	Details

Settings

PSQ sequence length:	Good and uncertain quality
Fixed left alignment position:	False
Pyro optimized scoring:	True
Consider raw data quality:	False

Fig. 4.30. Report riassuntivo della seduta di Pyrosequencing™ condotta sugli amplificati del gene CYTB riportati nel gel in Fig. 4.29.

4.3.3 SEQUENZIAMENTO CON METODO CLASSICO SUL GENE CYTB DEI PLEURONECTOIDEI

Per la specie di appartenenza dei campioni 4 e 95 (*Pleuronectes quadrituberculatus*) non era presente in GenBank® alcuna sequenza relativa al gene CYTB. Per questo motivo questi campioni sono stati sottoposti a sequenziamento con metodo classico al fine di ottenere delle sequenze di riferimento da inserire nel database Identifire™. Sono stati sottoposti a sequenziamento classico anche alcuni dei campioni appartenenti alle altre specie per valutare l'efficacia del set di primer anche su tali specie, ovvero il campione 5 di *Pleuronectes platessa* ed il campione 36 di *Hippoglossoides elassodon* la cui pyrosequenza, come sarà chiaro nell'analisi BLAST, si era rivelata diversa da tutte le sequenze di CYTB depositate in GenBank® per questa specie e veniva perciò identificata in Identifire™ come *Hippoglossus hippoglossus* (dati non riportati). Il sequenziamento classico è stato condotto al fine di verificare o smentire le incongruenze viste in Identifire™ con le sequenze del database.

Nel caso del gene CYTB, data la coincidenza del primer di amplificazione *reverse* con il primer di sequenziamento per Pyrosequencing™, il sequenziamento con metodo classico non è stato condotto sullo stesso amplificato utilizzato per il Pyrosequencing™ poiché, data la bassa efficienza del sequenziamento classico nella regione immediatamente a valle del primer di sequenziamento stesso, questo avrebbe portato a perdere nel sequenziamento proprio la regione polimorfica della pyrosequenza. E' stato

perciò utilizzato un amplificato diverso, presentato nel gel in **Fig. 4.31**, i cui primer di amplificazione (CytbFseq e tRNAproRseq) sono stati disegnati *ad hoc*. Il gel in **Fig. 4.31** dimostra la specificità dei primer utilizzati poiché essi hanno dato luogo ad un unico frammento della lunghezza prevista di circa 1200 pb, in quanto la banda di DNA nel gel si trova leggermente al di sotto della banda del frammento pari a 1230 pb del Marker VI (**Fig. 4.32**). Le bande ottenute presentano intensità diversa per i diversi campioni; l'intensità maggiore si è ottenuta con il campione 36 (*Hippoglossoides elassodon*), mentre l'intensità più lieve si è verificata con il campione 5 (*Pleuronectes platessa*).

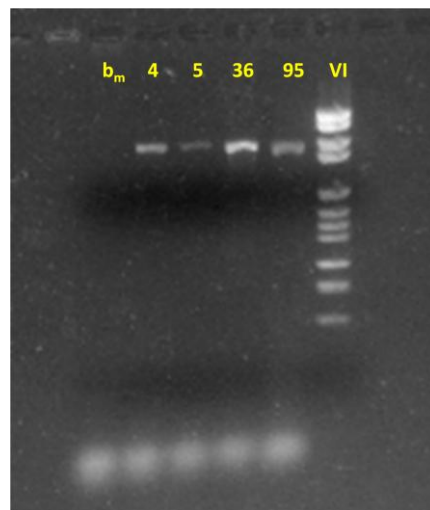


Fig. 4.31. Gel elettroforesi in agarosio al 2% degli ampliconi del gene Cytb amplificati con i primer **CytbFbio** e **tRNAproRseq** appartenenti ai campioni di pleuronectoidi 4, 5, 36 e 95 considerati nel presente lavoro, in presenza del marker di peso molecolare Marker VI (Roche®) (**Fig. 4.30**).

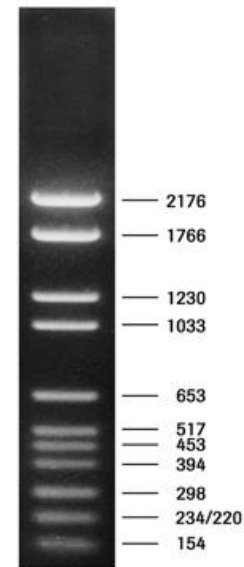


Fig. 4.32. Separazione di 1 µg di Marker VI (roche®) su gel di agarosio al 2%.

In **Fig. 4.33** si riporta parte delle sequenze ottenute tramite sequenziamento classico sui campioni 4, 95 e 36 a confronto con le sequenze *full-sequence* ottenute per i corrispondenti campioni nella seduta di Pyrosequencing™ il cui report è riportato in **Fig. 4.34**. Le sequenze ottenute in Pyrosequencing™ occupano la regione compresa tra la posizione 589 e la posizione 632 nell'allineamento, immediatamente a valle del primer di sequenziamento, la cui regione è evidenziata in giallo. Si può notare, come in qualche modo atteso, che il sequenziamento classico non confermi completamente le sequenze ottenute in Pyrosequencing™ sui corrispondenti campioni a causa di due *frameshift*. Il primo dei due ha avuto luogo alla prima dispensazione nucleotidica dove, in corrispondenza ai campioni 4 e 36, la fluorescenza rilevata è stata interpretata come derivante dall'incorporazione di quattro residui di adenina, mentre la lunghezza dello

stretch poliadenilico è stata dimostrata essere pari a tre residui secondo il sequenziamento classico. Il secondo ha avuto luogo sul campione 4 per il quale si è verificata una diminuzione di efficienza del Pyrosequencing™ in corrispondenza ad una seconda regione poliadenilata sita al termine della pyrosequenza; in corrispondenza di tale regione poliadenilica viene commesso un *minus-frameshift* a livello della posizione 625 dell'allineamento in Fig. 4.33, 36 nt a valle del primer di sequenziamento PleuRseq, cioè al di fuori della regione di massima efficienza del Pyrosequencing™.

Il sequenziamento con metodo classico ha avuto successo su entrambi i filamenti nel caso della specie *Hippoglossoides elassodon* e sul solo filamento *forward* su entrambi i campioni di *Pleuronectes quadrituberculatus*.

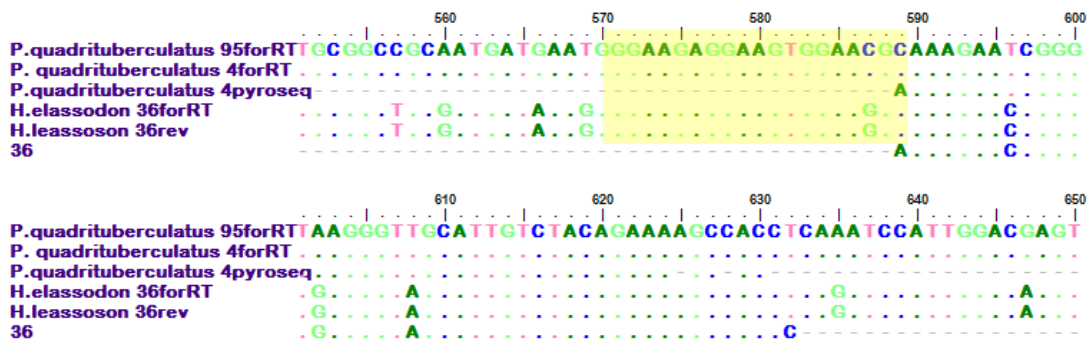


Fig. 4.33. Allineamento tra le sequenze ottenute con metodo classico sui campioni di pleuronectoidei 4, 36 e 95 a confronto con le sequenze ottenute dagli stessi campioni mediante Pyrosequencing™. In giallo si evidenzia la regione relativa al primer di sequenziamento PleuRseq.

4.3.4 ANALISI BLAST SULLE PYROSEQUENZE DEL GENE CYTB DEI PLEURONECTOIDEI

Si riportano nei sottoparagrafi seguenti i report relativi alle indagini BLAST condotte sulle pyrosequenze ottenute nel corso dell'Indagine secondaria sulle specie di pleuronectoidei a nostra disposizione. Delle specie per le quali si disponeva di più isolati, si riporta il report relativo ad un solo campione.

In linea generale, l'indagine BLAST condotta sul gene CYTB per la discriminazione dei Pleuronectoidei ha dimostrato di essere sufficiente a discriminare, seppur in maniera lieve, la totalità delle frodi di sostituzione della Platessa con pleuronectoidei di minor pregio; il BLAST ha confermato anche che l'Indagine secondaria non garantisce una discriminazione univoca delle specie utilizzate in sostituzione della Platessa stessa le quali tuttavia, essendo comunque tra loro paragonabili in quanto a valore commerciale, non richiedono di essere discriminate in maniera così fine.

La discriminazione che si ottiene tra la Platessa e le specie sostitutive è, tuttavia, lieve poichè la pyrosequenza di *Pleuronectes platessa* è differenziabile grazie ad un

unico *indel* dalle sequenze di ciascuna delle specie *Hippoglossoides elassodon* e *Microstomus kitt* (Limanda, denominazione obbligatoria secondo il D.M. MIPAAF del 31/01/2008), si differenzia invece per 2 nt dalla sequenza della specie *Pleuronectes quadrituberculatus*, i quali però si trovano nella regione terminale della pyrosequenza, dove più facilmente si verifica una diminuzione dell'efficienza di sequenziamento.

I report BLAST sono riportati in ordine di numero identificativo del campione analizzato, assegnato in **Tab. 3.8**.

Analisi BLAST sul campione 4 di Platessa del Pacifico (*Pleuronectes quadrituberculatus*)

Sulla pyrosequenza del campione 4 è stata condotta una duplice analisi BLAST, nella quale si è valutata la percentuale d'identità della query con le hit appartenenti a *Pleuronectes platessa* a diverse lunghezze della query.

Nel caso si ipotizzi che, mediante ottimizzazione del Pyrosequencing™, la pyrosequenza giunga correttamente a completare i 3 cicli di dispensazione nucleotidica immediatamente successivi al *minus-frameshift* per fornire una lunghezza di 39 nt, come dimostrato nel report in **Fig. 4.34** la regione polimorfica che se ne ricaverebbe riuscirebbe a discriminare *Pleuronectes quadrituberculatus* da *Pleuronectes platessa* grazie ad una differenza pari al 6% nel *Max ident*, corrispondente a 2 nt su 39. In entrambi i casi la pyrosequenza di *Pleuronectes quadrituberculatus* ha dimostrato comunque identità di sequenza con hit di *Limanda limanda*.

Se invece la query viene accorciata a 35 nt per eliminare la regione finale nella quale non si ha più corrispondenza tra la pyrosequenza e la sequenza ottenuta mediante sequenziamento classico, si elimina anche una zona polimorfica tra le due specie e la discriminazione non è perciò possibile (**Fig. 4.35**).

NCBI Blast:4 P. quadrituberculatus cytb 39 nt						
EU109751.1	Pleuronectes platessa isolate 69G cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	61.9	61.9	100%	1e-07	94%

Fig. 4.34. Parte del report relativo ad analisi BLAST sulla pyrosequenza del campione 4 di *Pleuronectes quadrituberculatus* corretta secondo la sequenza ottenuta mediante sequenziamento classico.

NCBI Blast:4 P. quadrituberculatus cytb 35 nt						
EU492118.1	Limanda limanda voucher MNHN 2005-1590 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial	77.8	77.8	100%	2e-12	100%
EF424428.1	Platichthys stellatus mitochondrion, complete genome	69.9	69.9	100%	5e-10	97%
EU492288.1	Limanda limanda voucher NRM 52881 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial	69.9	69.9	100%	5e-10	97%
EU109750.1	Pleuronectes platessa isolate 68G cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	54.0	97.1	100%	2e-10	100%

Fig. 4.35. Parte del report relativo ad analisi BLAST sulla pyrosequenza del campione 4 di *Pleuronectes quadrituberculatus* privata della regione terminale polimorfica.

Analisi BLAST sul campione 9 di *Limanda (Limanda limanda)*

Il report in **Fig. 4.41** relativo ad indagine BLAST sulla pyrosequenza di 44 nt ottenuta sul campione 9 di *Limanda limanda* ha confermato che questa specie è univocamente discriminabile tramite metodica Pyrosequencing®. Tale pyrosequenza si è rivelata altresì unica tra tutte le sequenze di *Limanda limanda* finora sequenziate a livello del gene CYTB in quanto il *Query-coverage* ed il ed il *Max ident* raggiunti con la hit migliore sono entrambi pari al 97% a causa di due gap: il primo si verifica a livello del primo nucleotide a valle del primer di sequenziamento, mentre il secondo ha luogo 33 nucleotidi a valle dello stesso primer, nella stesso *stretch* poliadenilico in cui troviamo un *frameshift* coinvolgente la pyrosequenza del campione 4, per cui è imputabile ad una diminuzione di efficienza del Pyrosequencing™. La presenza dei gap porta ad un falso positivo facilmente identificabile come tale: si tratta infatti di *Themira flavicoxa*, un esapode. In ogni caso, non si verificano hit con Pleuronectoidei e Soleoidei di pregio e nemmeno con altri pesci d'interesse commerciale, permettendo di ricondurre con certezza il campione 9 alla specie *Limanda limanda*.

NCBI Blast:9p_LIMANDA_Limanda_limanda_cytb_44nt						
EU224010.1	Limanda limanda isolate LimLim-CB-01 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	71.9	71.9	97%	2e-10	97%
EU435962.1	Themira flavicoxa voucher su65 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	63.9	63.9	72%	4e-08	100%
EU492118.1	Limanda limanda voucher MNHN 2005-1590 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial	63.9	63.9	97%	4e-08	95%
EU160902.1	Artibeus planirostris haplotype Apl_68 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial	61.9	61.9	95%	2e-07	95%


```
> gb|EU492288.1 Limanda limanda voucher NRM 52881 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial
Length=1141

Score = 71.9 bits (36), Expect = 2e-10
Identities = 43/44 (97%), Gaps = 1/44 (2%)
Strand=Plus/Minus

Query 2 AAAGAATCGGGTAAGGGTTGCATTATCTACAG-AAAGCCACCTC 44
      |||
Sbjct 537 AAAGAATCGGGTAAGGGTTGCATTATCTACAGAAAAGCCACCTC 494
```

Fig. 4.41. Parte del report relativo ad analisi BLAST sulla pyrosequenza completa del campione 9 di *Limanda limanda* ed allineamento con la hit EU492288.1, appartenente a *Limanda limanda*.

Analisi BLAST sul campione 15 di *Platessa (Pleuronectes platessa)*

L'analisi BLAST relativa alla pyrosequenza completa del campione 15 di *Pleuronectes platessa* (report in **Fig. 4.42**) ha confermato la possibilità di discriminare questa specie, mediante l'Indagine secondaria, da tutte le specie la cui sequenza del gene CYTB è rappresentata in GenBank® poiché la hit più omologa tra quelle

appartenenti ad altre specie, cioè *Microstomus kitt*, presenta non solo un *indel* con la query tale da far scendere il *Max-ident* al 97%, ma anche un *Query-coverage* minore, pari al 95% di quello massimo.

NCBI Blast:15p_PLATESSA_Pleuronectes_platessa_cytb_44nt						
EU109750.1	Pleuronectes platessa isolate 68G cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	87.7	87.7	100%	3e-15	100%
AY164472.1	Pleuronectes platessa cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial gene for mitochondrial product	79.8	79.8	100%	7e-13	97%
EU492117.1	Microstomus kitt voucher MNHN 2005-1611 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial	75.8	75.8	95%	1e-11	97%

```

> gb|EU492117.1 Microstomus kitt voucher MNHN 2005-1611 cytochrome b (cytb) gene,
complete cds; mitochondrial
Length=1141

Score = 75.8 bits (38), Expect = 1e-11
Identities = 41/42 (97%), Gaps = 0/42 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 AAAGAACCGGGTGAGGGTTGCATTGTCTACAGAAAAGCCACC 42
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 537 AAAGAACCGGGTGAGGGTAGCATTGTCTACAGAAAAGCCACC 496

```

Fig. 4.26. Parte del report di BLAST relativo alla pyrosequenza completa del campione 15 di *Pleuronectes platessa* ed allineamento della query con la hit EU492177.1, appartenente a *Microstomus kitt*.

Analisi BLAST sul campione 36 di Passera del Pacifico (*Hippoglossoides elassodon*)

La sequenza ottenuta sottoponendo a Pyrosequencing™ il campione 36 di *Hippoglossoides elassodon* si è rivelata nell'analisi BLAST (**Fig. 4.41**) identica alla sequenza di *Microstomus kitt* (Limanda secondo il D.M. MIPAAF del 31/01/2008), mentre solo a causa di uno SNP si differenzia dalla sequenza di *Pleuronectes platessa*. Questo SNP cade comunque all'interno della regione di massima efficienza di *base-calling*.

NCBI Blast:36p_Hippoglossoides_ellasonon_42nt						
AF165076.1	Microstomus kitt cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial gene for mitochondrial product	83.8	83.8	100%	4e-14	100%
EU109751.1	Pleuronectes platessa isolate 69G cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	75.8	75.8	100%	1e-11	97%
EU109750.1	Pleuronectes platessa isolate 68G cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	75.8	75.8	100%	1e-11	97%

```

> gb|EU109751.1 Pleuronectes platessa isolate 69G cytochrome b (cytb) gene, partial
cds; mitochondrial
Length=906

Score = 75.8 bits (38), Expect = 1e-11
Identities = 41/42 (97%), Gaps = 0/42 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 AAAGAACCGGGTGAGGGTAGCATTGTCTACAGAAAAGCCACC 42
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 308 AAAGAACCGGGTGAGGGTTGCATTGTCTACAGAAAAGCCACC 267

```

Fig. 4.41. Parte del report relativo all'analisi BLAST sulla pyrosequenza completa del campione 36 di *Hippoglossoides elassodon*, con l'allineamento a coppie tra la query e la hit EU109751.1, appartenente a *Pleuronectes platessa*.

5. **DISCUSSIONE**

Vista la crescente urgenza di metodi affidabili che consentano la tutela della rintracciabilità di filiera nel comparto ittico, lo scopo del presente lavoro è stato la messa a punto di una metodica biomolecolare per l'identificazione di specie ittiche, che sia affidabile, economica e veloce, per far fronte ai limiti dell'unica metodica attualmente riconosciuta a livello legale in Italia, ossia l'identificazione morfologica, in materia di riconoscimento di frodi commerciali per sostituzione di specie. L'identificazione morfologica non è infatti applicabile a prodotti trasformati e lavorati, i quali tuttavia costituiscono oggi la maggior parte dei prodotti ittici consumati e, proprio per il fatto di poter evadere il controllo morfologico, risultano maggiormente passibili di frode.

Si è perciò scelto di ricorrere alle tecniche biomolecolari per la loro alta sensibilità e specificità, nonché per la conservazione del materiale oggetto dell'analisi, gli acidi nucleici, i quali possono resistere anche ai processi chimico-fisici che hanno luogo nella trasformazione dei cibi, quali trattamento termico, salagione, acidificazione, ecc., nonostante durante questi processi il DNA possa frammentarsi in segmenti di lunghezza variabile.

Inoltre il notevole sviluppo delle tecniche biomolecolari negli ultimi anni le ha rese molto competitive a livello economico nelle indagini di routine, anche grazie all'alto grado di automazione che le caratterizza.

Tra le tecniche biomolecolari precedentemente messe a punto presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie ai fini dell'identificazione di specie si annoverano la PCR-RFLP e la PCR-RealTime. Tuttavia queste tecniche presentano entrambe dei limiti: la prima, oltre a presentare lunghi tempi di esecuzione, viene compromessa da mutazioni che coinvolgano i siti di restrizione, la seconda presenta invece costi elevati e permette la discriminazione soltanto a livello di famiglia filogenetica e non invece a livello di specie.

E' stato scelto di utilizzare il Pyrosequencing™, una tecnica di sequenziamento del DNA in tempo reale a partire da ampliconi di PCR. Tale tecnica ha avuto notevole sviluppo negli ultimi anni e sembra molto promettente in materia di *barcoding* per una serie di motivi:

- alta specificità e tolleranza alla mutazione in quanto metodo di sequenziamento;
- costi minori rispetto al sequenziamento classico con metodo di Sanger;

- alta velocità di esecuzione dovuta ad un altissimo grado di automazione, che lo rende applicabile ad analisi di routine su piastra da 96 pozzetti;
- *base-calling* già a partire dal primo nucleotide a valle del primer di sequenziamento, il quale permette l'analisi anche di campioni in cui il DNA si trovi in forma fortemente degradata, condizione che si verifica facilmente negli alimenti trasformati.

Nonostante i molti vantaggi, il Pyrosequencing™ presenta la massima efficienza di *base-calling* soltanto a livello dei primi 30 nt a valle del primer di sequenziamento, dopo i quali l'efficienza inizia a diminuire a causa dei limiti stessi delle reazioni a catalisi enzimatica, le quali non portano ad una conversione completa dei reagenti in prodotti, quanto piuttosto ad un loro equilibrio. Perciò l'accumulo di reagenti col procedere della reazione di sequenziamento pregiudica l'ottenimento di sequenze di lunghezza maggiore ai 45-50 nt.

La tecnologia *pyrosequencing* deve il suo nome alla molecola utilizzata per seguire l'incorporazione nucleotidica durante il sequenziamento, ossia il pirofosfato. A seguito di ogni nucleotide incorporato nel template viene infatti rilasciata una molecola di pirofosfato che innesca una cascata enzimatica che si conclude con la produzione di un segnale luminoso proporzionale al numero di nucleotidi incorporati.

Nel Pyrosequencing™ è il software stesso associato al sequenziatore, tramite un indice colorimetrico (blu, giallo e rosso), a giudicare in base ai suoi parametri l'attendibilità della corrispondenza tra l'aumento del segnale di fluorescenza ed il numero di nucleotidi incorporati.

La scarsa lunghezza delle sequenze ottenibili mediante tecnologia *pyrosequencing* rende maggiore lo sforzo durante la fase di progettazione dell'analisi, in quanto la zona conservata su cui disegnare il primer di sequenziamento deve trovarsi immediatamente adiacente ad una zona variabile e discriminante tra le varie specie. Perciò un particolare sforzo è stato posto, nel corso del presente lavoro, nella ricerca di geni adatti al disegno di un set di primer di PCR e di sequenziamento per *pyrosequencing*.

Si è puntato inizialmente ad un approccio universale per la discriminazione della totalità delle specie oggetto di frode. Tale approccio universale non era applicabile a causa della notevole diversità delle sequenze in esame e della loro scarsità numerica. E' stata perciò esplorata la possibilità di disegnare primer dalle caratteristiche volute restringendo l'analisi a singoli gruppi di pesci d'interesse commerciale ed alle relative frodi. A tal fine è stata valutata la variabilità intraspecifica ed interspecifica associata ai diversi geni disponibili in banca dati per ciascun gruppo di pesci tra quelli maggiormente

sottoposti a lavorazione e/o trasformazione: Gadidi, Tonni, Squaliformi, Clupeiformi, Pleuronectiformi.

La scelta è ricaduta sui due ordini tassonomici dei **Clupeiformi** e **Pleuronectiformi**, *in primis* a causa del coinvolgimento degli stessi in una vasta serie di frodi commerciali, in secondo luogo poiché l'analisi *in silico* su entrambi questi gruppi ha permesso di identificare la regione del gene 16S come possibile target in grado di discriminare tra loro le diverse specie, mentre allo stesso tempo la conservazione di certe regioni all'interno del gene stesso permetteva il disegno di un set di primer comune a tutte le sequenze, requisito essenziale per la messa a punto di una metodica standardizzabile e versatile.

L'analisi *in silico* ha dimostrato che il primer disegnato sul **gene 16S** permetteva di discriminare tra loro la quasi totalità delle frodi commerciali oggetto d'indagine ad eccezione di due casi in particolare, data la mancanza di polimorfismi nel tratto sequenziabile mediante Pyrosequencing™.

Il primo caso riguardava, all'interno dell'ordine dei Clupeiformi, la sostituzione di ***Engraulis encrasicolus*** con ***Engraulis japonicus***, mentre il secondo caso coinvolgeva il subordine dei **Pleuronectoidei** all'interno dell'ordine dei Pleuronectiformi: l'identità di sequenza tra i membri del subordine Pleuronectoidei non rendeva infatti possibile discriminare le frodi di sostituzione di due specie di largo interesse commerciale, la **Platessa (*Pleuronectes platessa*)** e l'**Halibut della Groenlandia (*Reinhardtius hippoglossoides*)**, con altri membri del subordine Pleuronectoidei, ma di minor pregio.

Questo primo test (detto "**Indagine primaria**") consente un rapido *screening* su molte specie ittiche contemporaneamente e permette una tipizzazione accurata della maggioranza delle stesse sulla base dei loro polimorfismi.

Per le specie sopracitate non tipizzabili univocamente si è reso necessario il disegno di un set di primer specifici per un'indagine mirata (detta "**Indagine secondaria**") al fine di superare i limiti incontrati nella discriminazione mediante Indagine primaria.

Come target per l'Indagine secondaria si è scelta, per la discriminazione dei due sopracitati engraulidi, una **porzione genomica variabile** individuata tramite allineamento dei genomi mitocondriali completi di entrambe le specie. Poiché per la discriminazione dei Pleuronectoidei non si disponeva, per tutte le specie, delle sequenze mitocondriali complete, ci si è avvalsi di un gene mitocondriale maggiormente variabile rispetto al 16S, ovvero il **gene CYTB**.

Le sequenze ottenute sono state confrontate, tramite analisi **Identifire™** con sequenze di riferimento presenti nella banca dati GenBank® o prodotte presso il

Laboratorio di Biologia Molecolare dell'IZSve tramite sequenziamento, con metodo classico, di amplificati di alcuni campioni di riferimento, le cui sequenze risultavano assenti in GenBank® per le specie di appartenenza. Nel corso dell'Indagine primaria sono perciò state prodotte le sequenze parziali del gene 16S dei campioni 39 (*Paraplagusia bilineata*) e 108 (*Sardinella fimbriata*).

Le sequenze di riferimento, sono state depositate all'interno del database locale interrogabile tramite il software Identifire™, il quale permette in tal modo di effettuare un vero e proprio BLAST locale su di un database costruito *ad hoc*, e perciò non ridondante, in modo automatico e quindi estremamente veloce.

Le pyrosequenze ottenute da ciascuna seduta di Pyrosequencing™, utilizzate come query dal software Identifire™, sono quindi state allineate contro il database locale per fornire, come punteggio, una percentuale d'identità tra la sequenza query e le hit che hanno riscosso un punteggio maggiore nell'allineamento con la query stessa.

Discussione sui risultati ottenuti mediante l'Indagine primaria

Per quanto riguarda l'**Indagine primaria**, l'analisi Identifire™ sulle pyrosequenze ottenute ha discriminato in modo univoco la quasi totalità delle frodi oggetto d'indagine.

All'interno dell'ordine dei **Clupeiformi** l'Indagine primaria ha incontrato dei limiti nella discriminazione di sole due frodi la prima delle quali, come atteso in fase di progettazione della metodica, riguarda la falsificazione dell'**Acciuga** (*Engraulis encrasicolus*) con l'Acciuga giapponese (*Engraulis japonicus*) e poichè la sua discriminazione è molto importante dato che il consumo di *Engraulis japonicus* è stato talvolta associato ad intossicazione da ciguatera, la risoluzione della discriminazione di questa frode viene demandata all'Indagine secondaria; la seconda frode consiste nella falsificazione dell'**Agone** (*Alosa fallax lacustris*) con la Cheppia (*Alosa fallax nilotica*) e questo risultato non era prevedibile sulla base dell'analisi *in silico* data l'assoluta mancanza di sequenze di *Alosa fallax lacustris* in GenBank®. Per lo stesso motivo l'identificazione in una eventuale Indagine secondaria della frode di sostituzione dell'**Agone** con Cheppia non è stata considerata per il momento poichè, data la mancanza di sequenze disponibili per questa specie di interesse solo locale, risulta impossibile progettare *in silico* un'indagine secondaria per discriminare la stessa; quindi ogni approccio atto all'identificazione di questa frode non può che essere meramente sperimentale e deve necessariamente partire da un progetto di sequenziamento di più largo respiro.

La discriminazione univoca delle specie ha avuto luogo, anche nei casi in cui le pyrosequenze ottenute non corrispondevano del tutto alle sequenze depositate nel database locale a causa di polimorfismi intraspecifici, come accaduto nel caso del campione 64 di *Sprattus sprattus*: questo dimostra come la tolleranza alla mutazione sia una qualità intrinseca alla metodica Pyrosequencing™.

Anche nel caso dei **Pleuronctiformi** l'Indagine primaria è risultata discriminare univocamente la quasi totalità delle frodi ovvero la falsificazione di Soleoidei con Pleuronectoidei, la falsificazione della Sogliola (*Solea solea*) con sogliole di minor pregio (*Solea senegalensis* e *Paraplagusia bilineata*) ed infine la frode di sostituzione dei Pleuronctiformi con Pangasio (*Pangasius spp.*) e con Persico africano (*Lates niloticus*); fanno eccezione la falsificazione dei pleuronectoidei Platessa (*Pleuronectes platessa*) ed Halibut della Groenlandia (*Reinhardtius hippoglossoides*) con le molte altre specie appartenenti al subordine Pleuronectoidei, ma contraddistinte da minor pregio commerciale; l'identificazione di tali frodi, al pari dell'identificazione dell'Acciuga, è stata demandata all'Indagine secondaria.

L'identità di sequenza delle specie del subordine Pleuronectoidei con l'una o l'altra specie, *Pleuronectes platessa* o *Reinhardtius hippoglossoides*, ha permesso comunque di suddividere i Pleuronectoidei in due grandi gruppi di specie in base alla sequenza che presentano nel tratto sequenziabile mediante Indagine primaria; questo può rappresentare un vantaggio ai fini discriminatori come supporto all'Indagine secondaria.

A conclusione dell'Indagine primaria le pyrosequenze ottenute sono state sottoposte ad **analisi BLAST** al fine dare un'ulteriore conferma ai dati ottenuti tramite analisi Identifire™ valutando la specie-specificità delle pyrosequenze stesse mediante il confronto con un panorama di sequenze che fosse più rappresentativo della variabilità naturale rispetto alla variabilità presente nel database locale.

L'analisi BLAST sul gene 16S dei **Clupeiformi** ha confermato quasi del tutto i risultati ottenuti tramite Identifire fatta eccezione per due specie:

- Acciuga (*Engraulis encrasicolus*): i campioni analizzati di questa specie sono risultati perciò identici ad altre due specie di engraulidi oltre all'*Engraulis japonicus*, in questo caso si tratta di specie di importanza minore nei mercati della pesca: *Engraulis australis* ed *Engraulis eurystole*. Questo ha dimostrato ancora una volta la necessità dell'Indagine secondaria per l'identificazione univoca di *Engraulis encrasicolus* nei prodotti ittici;

- Alaccia (*Sardinella aurita*): se l'analisi Identifire™ riportava l'Alaccia come univocamente discriminabile, l'Indagine BLAST ha dimostrato come la sequenza di questa specie non sia specie-specifica per la *Sardinella aurita* ma sia invece identica alla sequenza di altre tre specie di clupeidi: *Sardinella janeiro*, *Sardinella lemuru* ed *Amblygaster clupeioides*. Poichè si tratta in tutti e tre i casi di specie assenti sui nostri mercati e di valore commerciale paragonabile a quello dell'Alaccia, queste identità non pregiudicano la possibilità di poter attribuire a frode il rilevamento della sequenza dell'Alaccia in prodotti etichettati come "Acciuga" o "Sardina".

Per quanto riguarda i **Pleuronectiformi e le altre specie** (Pangasio e Persico Africano) l'analisi Identifire™ sulle pyrosequenze ottenute nell'Indagine primaria ha dimostrato che la metodica Pyrosequencing™ applicata al gene 16S è adatta alla discriminazione di tutte le frodi oggetto d'indagine eccetto quelle previste sulla base dell'analisi *in silico* e riguardanti perciò la falsificazione della **Platessa** e dell'Halibut della Groenlandia con Pleuronectoidei di minor pregio.

L'analisi BLAST ha confermato quanto visto nell'analisi Identifire™ poichè le specie analizzate, eccetto quelle appartenenti al subordine Pleuronectoidei, hanno infatti riportato differenze consistenti nell'identità di sequenza minima che si verificava di volta in volta con specie diverse; ha fatto tuttavia eccezione la specie di discreto pregio commerciale *Paraplagusia bilineata*, la cui pyrosequenza è risultata identica a quella della specie *Eopsetta jordani*, altra specie di discreto pregio; tale sequenza si discostava comunque inequivocabilmente dalle sequenze di pleuronectoidei e soleoidei di pregio, permettendo la sua identificazione come frode in prodotti ittici dichiarati, a titolo di esempio, come appartenenti a Sogliola o Platessa.

L'analisi BLAST ha inoltre confermato la suddivisione delle specie di Pleuronectoidei in due gruppi a seconda della loro identità di sequenza con la specie *Reinhardtius hippoglossoides* (Gruppo I) o con la specie *Pleuronectes platessa* (Gruppo II). Il Gruppo I è costituito dal genere *Reinhardtius* e da due altri generi analizzati nel presente lavoro, ovvero *Limanda* e *Hippoglossoides*, oltre ad un altro genere *Cleisthenes*, che tuttavia non include specie commercializzate sui nostri mercati. Il Gruppo II comprende, oltre al genere *Pleuronectes*, anche i generi *Isopsetta*, *Lepidopsetta*, *Liopsetta*, *Parophrys*, *Platichthys*, *Pleuronectes*, *Platichthys* e *Psettichthys*.

Discussione sui risultati ottenuti mediante l'Indagine secondaria

L'**Indagine secondaria** per l'identificazione univoca dell'**Acciuga** tramite discriminazione degli engraulidi *Engraulis japonicus* ed *Engraulis encrasicolus* è stata condotta su di una porzione genomica variabile e recante la maggiore concentrazione possibile di SNP tra le due specie, ovvero 6 SNP in una zona di circa 25 pb. Tale indagine secondaria è stata condotta soltanto su campioni di *Engraulis encrasicolus*, non disponendo di campioni di *Engraulis japonicus*, ma ha comunque dimostrato che questa porzione genomica è in grado di discriminare univocamente la specie *Engraulis encrasicolus* dalla specie *Engraulis japonicus* anche nel caso intervengano delle mutazioni. Infatti nonostante la sequenza ottenuta in Pyrosequencing™ dal campione 106 evidenziasse uno SNP in meno, confermato mediante sequenziamento classico, rispetto alle sequenze di *E. encrasicolus* sulle quali è stato disegnato il set di primer, questo non ha tuttavia pregiudicato l'identificazione, ottenuta grazie alla presenza di altri 5 SNP.

Anche la sequenza del campione 107 ha evidenziato variabilità rispetto alle sequenze utilizzate per il disegno di primer, con le quali presentava 3 SNP confermati mediante sequenziamento classico; l'insorgenza di tali SNP, in posizioni diverse da quelle che consentivano la discriminazione con *Engraulis japonicus*, ha permesso comunque di identificare con certezza il campione 107 come appartenente alla specie *Engraulis encrasicolus* mediante sequenziamento classico.

La variabilità interspecifica di sequenza che si è riscontrata a livello della porzione genomica oggetto d'analisi tra le specie *E. encrasicolus* ed *E. japonicus* rende plausibile l'utilizzo della stessa porzione genomica nella discriminazione di *E. encrasicolus* dalle specie *E. australis* ed *E. eurystole* per le quali tuttavia non si dispone ancora della sequenza mitocondriale completa. Allo stesso tempo, tuttavia, l'elevato grado di variabilità intraspecifica che si è riscontrata a livello della stessa porzione genomica rende necessaria la tipizzazione di molti isolati di *E. encrasicolus* ed *E. japonicus*, provenienti da vari areali, per escludere la possibile ipotesi di identità di sequenza, a livello di un certo numero di isolati di *E. encrasicolus* e di *E. japonicus*.

L'**Indagine secondaria** per la discriminazione delle frodi a carico della **Platessa** mediante la sua sostituzione con altri Pleuronectoidei non ha potuto avvalersi delle sequenze mitocondriali complete. Nello scegliere il gene su cui mettere a punto l'indagine secondaria considerando la rappresentatività delle sequenze in GenBank®, si disponeva di due alternative: il gene CYTB ed il gene COI, geni più variabili rispetto al 16S. Si è scelto il primo perché, essendo leggermente più conservato, permetteva il

disegno di primer non eccessivamente degenerati, ma i risultati ottenuti hanno rivelato però una capacità discriminante lieve, tale da rendere necessaria la progettazione di un'Indagine secondaria alternativa su porzioni genomiche differenti.

Per quanto riguarda le performance del Pyrosequencing™ in questa indagine, le tre degenerazioni del primer di sequenziamento utilizzato sono state causa, molto probabilmente, dell'efficienza non esemplare che si è ottenuta nel Pyrosequencing™ per l'Indagine secondaria, la quale non è migliorata nemmeno ripetendo l'esperimento in condizioni leggermente diverse (dati non riportati). Questo ha prodotto, a livello delle regioni omopolimeriche, delle incongruenze tra le sequenze ottenute in Pyrosequencing™ e quelle ottenute sugli stessi campioni tramite sequenziamento classico. Si rende perciò necessario un lavoro di ottimizzazione dell'esperimento per la sua applicazione all'Indagine secondaria per la discriminazione dei Pleuronectoidei.

L'Indagine secondaria sui Pleuronectoidei ha dimostrato che la specie *Pleuronectes platessa*, la più pregiata tra i pleuronectoidei considerati, si differenzia in maniera lieve, grazie ad un solo *indel*, dalle sequenze delle specie *Hippoglossoides elassodon* e *Microstomus kitt*, tale *indel* si trova comunque in entrambi i casi a livello di una regione non omopolimerica, e nella regione di massima efficienza del Pyrosequencing™. La discriminazione di *Pleuronectes platessa* sia da *Hippoglossoides elassodon* che da *Microstomus kitt* potrebbe tuttavia giovare del sostegno dell'Indagine primaria, una volta ottenuta la sequenza del gene 16S di *Microstomus kitt*, tuttora assente in GenBank®. Infatti il report BLAST relativo alla pyrosequenza del gene 16S di *Pleuronectes platessa* dimostra che non si verifica in nessun caso un'identità di sequenza pari al 100%, accoppiata ad un *Query-coverage* anch'esso del 100%, tra la sequenza del gene 16S di *Pleuronectes platessa* e la sequenza del gene 16S appartenente a membri dei generi *Hippoglossoides* e *Microstomus*.

La discriminazione tra *Pleuronectes platessa* e *Pleuronectes quadrituberculatus* è invece possibile ottimizzando il Pyrosequencing™ in modo da ottenere un *read-length* di almeno 40 nt, in quanto la regione polimorfica tra le due specie, che consiste in due *indel*, si trova a valle del 35^{esimo} nucleotide *downstream* al primer di sequenziamento.

Infine, nonostante la totalità delle specie analizzate di pleuronectoidei si siano dimostrate discriminabili dalla *Platessa* tramite Indagine secondaria, non è stato tuttavia possibile discriminare tra loro in maniera univoca le specie sostitute della *Platessa* stessa poiché la specie *Pleuronectes quadrituberculatus* è indistinguibile dalla specie *Limanda limanda* così come la specie *Hippoglossoides elassodon* è indistinguibile da *Microstomus kitt*. Questo non costituisce tuttavia un grosso limite poiché in tutti questi casi l'identità di sequenza si è verificata con specie di valore commerciale confrontabile e perciò non

pregiudica l'identificazione delle stesse come frode commerciale nel caso la loro presenza si rinvenga in prodotti ittici etichettati come "Platessa".

Il fatto che la maggioranza dei pleuronectoidei si differenzi da *Pleuronectes platessa* grazie ad un solo *indel* potrebbe sembrare un limite dell'indagine secondaria in quanto stiamo considerando un comparto alimentare caratterizzato da un'elevatissima varietà di specie la cui entità è tra l'altro in continuo aumento. Stiamo tuttavia considerando geni mitocondriali con funzione *housekeeping* le cui mutazioni perciò si fissano in maniera estremamente lenta ed inoltre tali geni si mantengono pressoché stabili all'interno di una specie poiché trasmessi per sola via materna.

D'altro canto l'indagine secondaria per la discriminazione di *Engraulis encrasicolus*, effettuata su di una regione genomica variabile, ha fatto sorgere l'ipotesi di un eventuale rischio associato alla scelta di regioni variabili, ossia che la variabilità interspecifica equivalga alla variabilità intraspecifica, rendendo vano ogni tentativo discriminatorio.

La disponibilità, in un futuro prossimo, di un numero sempre maggiore di sequenze, provenienti da diversi isolati, offre grandi prospettive per l'implementazione del Pyrosequencing™ come tecnica di identificazione delle diverse frodi di sostituzione nel comparto ittico, poiché permetterebbe una scelta più oculata delle sequenze da usare a fini del *barcoding*, in modo che presentino un corretto bilanciamento tra variabilità intraspecifica ed interspecifica.

Prospettive future

Sulla base dei risultati ottenuti e dell'esperienza maturata nel corso del presente lavoro si possono identificare altri ulteriori fronti di ricerca relativamente al sequenziamento, sulle porzioni genomiche già considerate (16S, CYTB e porzione genomica utilizzata per *Engraulis*) di specie alloctone e delle specie di più recente introduzione sul mercato in modo da aumentare i dati molecolari disponibili ed arricchire il database Identifire™ di nuova variabilità. In particolare il primer *reverse* già utilizzato per il sequenziamento classico del gene CYTB potrebbe essere utilizzato per esplorare la variabilità nella regione *upstream* ai tRNA della prolina e della treonina, per mettere a punto un saggio di Pyrosequencing™ sui pleuronectoidei ancora più efficiente di quello testato nel presente lavoro.

6. CONCLUSIONI

Il Pyrosequencing™ si attesta come una tecnica promettente per il *barcoding* di specie nella lotta contro le frodi da sostituzione di specie nel comparto ittico e si è dimostrata una tecnica applicabile sia su prodotti freschi che trasformati .

Il limite principale della tecnica sta nel limitato *read-length*, che si verifica a causa dei limiti intrinseci delle reazioni enzimatiche e proprio questo limite non ha reso possibile la discriminazione di tutte le specie di Clupeiformi e Pleuronectiformi in una sola indagine, condotta sul gene 16S, ma ha reso necessaria la messa a punto di due ulteriori indagini, denominate Indagini secondarie.

Per quanto riguarda i **Clupeiformi**, la combinazione dell'Indagine primaria e secondaria porta ad identificare tutte le frodi importanti a livello commerciale eccetto la falsificazione dell'Agone (*Alosa agone*) con altre specie appartenenti al genere *Alosa*. Nel caso dei **Pleuronectiformi** l'Indagine primaria da sola è risultata sufficiente ad identificare tutte le frodi di interesse commerciale, eccetto la falsificazione della Platessa con Pleuronectoidei di minor pregio, la cui identificazione è stata comunque migliorata tramite l'Indagine secondaria, che ha permesso di discriminare la Platessa da tutte le specie sostituite analizzate.

La robusta discriminazione degli engraulidi che si ottiene invece nell'**Indagine secondaria**, progettata *in silico* allineando per intero i genomi mitocondriali di *E. japonicus* ed *E. encrasicolus*, dimostra che la disponibilità della sequenza mitocondriale completa per ogni specie ittica commercializzata sul mercato può rappresentare un grosso fattore di sviluppo per l'implementazione del Pyrosequencing™ da parte degli organi preposti al controllo delle frodi commerciali. Infatti la possibilità di lavorare sul genoma mitocondriale per intero ha permesso la discriminazione di due specie, *E. japonicus* ed *E. encrasicolus*, le cui sequenze geniche prese singolarmente risultano invece pressoché identiche.

Pertanto, un progetto di sequenziamento genomico a largo spettro che coinvolga tutte le specie immesse sul mercato, potrebbe segnare una vera e propria svolta nella possibilità di utilizzare il Pyrosequencing™ come tecnica di routine anche nell'identificazione dei Pleuronectiformi come nell'identificazione di tutti gli altri gruppi di pesci commercializzati sotto forma di prodotti lavorati e trasformati.

7. **BIBLIOGRAFIA**

- **Ahmadian A., Gharizadeh B, O'Meara D, Odeberg J, & Lundeberg J. 2001.** Genotyping by apyrase-mediated allele-specific extension. *Nucleic Acid Research*; 29: 121.
- **Ahmadian A., Ehn M., Hober S. 2005.** Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*; 363: 83-94.
- **Altschul, Stephen F., Gish, Warren, Miller, Webb, Myers, Eugene W., & Lipman, David J. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*; 215: 403-410
- **Arcangeli G., Corrain C., Boscolo S., Fasolato L., Manfrin A., Monne I., Paparella A., Giorgini S. 2007.** Prodotti ittici trasformati. Così si identificano le specie. *Alimenti & bevande*; 11/12: 50-58.
- **Armani A., Trotta M., Olivieri V. Castigliero L., Guidi A. & Gianfaldoni D. 2007.** CYTB gene sequence analysis for identification in fish products: bianchetto, rossetto, pesce ghiaccio. www.aivi.it/atti2007/357.doc.
- **Barrister K.E. 1994.** Carps and their allies. In Encyclopedia of fishes, ed. J.Paxton J. R. & W.N. Eschmeyer, 96-100. W.N. Kensington, N.S.W. : UNSW Press.
- **Bauchot M.L. 1987.** Poissons osseux. In Fiches FAO d'identification pour les besoins de la pêche. (rev. 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Vol. II, ed. W. Fischer, M.L. Bauchot & M. Schneider, 891-1421. Rome: Commission des Communautés Européennes and FAO.
- **Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J. & Wheeler D.L. 2005.** GenBank. *Nucleic Acids Research*; 33: 34-38.
- **Berrini A., Tepedino V., Borromeo V., Secchi C. 2006.** Identification of freshwater fish commercially labelled "perch" by isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *Food Chemistry*; 96: 163-168.
- **Bryant F.R., Johnson K.A, Benkovic S.J. 1983.** Elementary steps in the DNA polymerase I reaction pathway. *Biochemistry*; 22: 3537-46.
- **Boscolo S. 2007.** Approcci biomolecolari per l'identificazione di Merlucidi e Gadidi in prodotti trasformati. Relatore Corrain A. Correlatori Arcangeli G. (I.Z.S.Ve.) e Corrain C. (I.Z.S.Ve.).
- **Cann R. L., Stoneking M., Wilson A. C. 1992.** Mitochondrial DNA and human evolution, *Nature*; 325: 31-36.
- **Chapleau F. & Amaoka K. 1998.** Flatfishes. In Encyclopedia of fishes, ed. J.R. Paxton & W.N. Eschmeyer, 223-227. W.N. Kensington, N.S.W.: UNSW Press.
- **Dalmasso A. & Bottero M.T. 2008.** Identificazione di specie in prodotti ittici. *Industrie*

Alimentari; 47: 117–121.

- **Dammann A.E. 1969.** Study of the fisheries potential of the Virgin Islands. Special Report. Contribution No. 1. Virgin Islands Ecological Research Station.
- **Decreto MIPAAF del 31/01/2008** relativo a modifiche ed integrazioni all'elenco delle denominazioni commerciali dei prodotti ittici, allegato al Decreto ministeriale del 25/07/2005. G.U. n. 45 del 22/02/2008.
- **Decreto MIPAAF del 27/03/2002** relativo all'etichettatura dei prodotti ittici e sistema di controllo. G.U. n. 84 del 10/04/2002.
- **de Wet J.R., Wood K.V., Helinski D.R., DeLuca M. 1986.** Cloning firefly luciferase. *Methods in Enzymology*; 133:3-14 .
- **DeLuca M. 1976.** Firefly luciferase. *Advances in enzymology and related areas of moleculaire biology*; 44: 37-68.
- **Derbyshire V., Freemont P.S., Sanderson M.R. Beese L. & Friedman J.M. 1988.** Genetic and Chrystallographic studies of the 3',5'-exonucleolytic site of DNA polimerasi I. *Science*; 240: 199-201.
- **Espinosa V. et al. 2000.** Fluorescence studies of ATP-diphosphohydrolase from *Solanum tuberosum* var. Desiree. *Phytochemistry*; 54: 995-1001.
- **Eurofishmarket. 2006.** Occhio alla platessa. *Eurofishmarket*; 6: 48-57.
- **Fadeev N.S. 2005.** Guide to biology and fisheries of fishes of the North Pacific Ocean, 366. Vladivostok: TINRO-Center.
- **FAO-FIGIS. 2001.** *Engraulis mordax*. In A world overview of species of interest to fisheries. Retrieved on 30 May 2005, from www.fao.org/figis/servlet/species?fid=2107. 3p. FIGIS Species Fact Sheets. Species Identification and Data Programme-SIDP, FAO-FIGIS;
- **Frey M.W. Sowers L. C., Millar D.P. & Benkovic S.J. 1995.** The nucleotide analog 2-aminopurine as a spectroscopic probe of nucleotide in corporation by the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I and bacteriophage T4 DNA polymerase. *Biochemistry*; 34: 9185-9192.
- **Frimodt C. 1995.** Multilingual illustrated guide to the world's commercial coldwater fish, ed. Fishing News Books, Osney Mead, 215. England: Oxford.
- **Gaggioli D., Tepedino V. & Tepedino G. 2007.** I sosia della platessa. *Eurofishmarket*; 7: 41-49.
- **Gharizadeh B., Nordström T., Ahmadian A., Ronaghi M., Nyrén P. 2002.** Long read Pyrosequencing using pure 2'-deoxyadenosine-5'-O'-(1-thiotriphosphate) Sp-isomer. *Analitical Biochemistry*; 301: 82-90.
- **Gharizadeh B., Eriksson J., Nourizard N., Nordström T. & Nyrén P. 2004.** Improvements in Pyrosequencing technology by employing Sequenase polymerase. *Analitical*

Biochemistry; 330: 272-280.

- **Gharizadeh B., Herman Z. S., Eason R.G., Jejelowo O. & Pourmand N. 2006.** Large-scale Pyrosequencing of synthetic DNA: A comparison with results from Sanger dideoxy sequencing. *Electrophoresis*; 27: 3042-47.
- **Halstead B.W., Auerbach P.S. & Campbell D.R. 1990.** A colour atlas of dangerous marine animals, 192. Cowell Ltd, Ipswich, England: Wolfe Medical Publications Ltd.
- **Hall T.A. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*; 41:95-98.
- **Hart J.L. 1973.** Pacific fishes of Canada. *Bull. Fish. Res. Board Can*; 180: 740.
- **Heemstra P.C. 1986.** Cynoglossidae. In Smiths' sea fishes, ed. M.M. Smith and P.C. Heemstra, 865-868. Berlin: Springer-Verlag.
- **Hopfield J.J. 1974.** Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*; 71: 4135-9.
- **ISMEA. 2009.** Prezzi nazionali.
<http://www.ismea.it/flex/FixedPages/IT/WizardPescaMercati.php/L/IT>;
- **Jiménez Prado P. & Béarez P. 2004.** Peces Marinos del Ecuador continental. Tomo 2: Guía de Especies / Marine fishes of continental Ecuador. Volume 2: Species Guide. SIMBIOE/NAZCA/IFEA.
- **Kajiyama N. & Namako E. 1993.** Thermostabilization of firefly luciferase by a single amino acid substitution at position 217. *Biochemistry*; 32: 13795-9.
- **Karamohamed S, Nillson J, Nourizad K., Ronaghi M. Pettersson B. & Nyrén P. 1999.** Production purification, and luminometric analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* MET3 adenosine triphosphate sulfurylase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*; 15: 381-8.
- **Klenow H., Overgaard-Hansen K., Patkar SA. 1971.** Proteolytic cleavage for native DNA polymerase into two different catalytic fragments. Influence of assay conditions on the change of exonuclease activity and polymerase activity accompanying cleavage. *European Journal of Biochemistry*; 44: 37-68.
- **Komoszynski M. & Wojtczak A. 1996.** Apyrase (ATP diphosphohydrolases EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim biophys*; 1310:233-41.
- **Kuchta R.D., Mizrahi V., Benkovic P.A., Johnson K.A. & Benkovic S.J. 1987.** Kinetic mechanism of DNA polymerase I (Klenow). *Biochemistry*; 26: 8410-7.
- **Lamb A. & Edgell P. 1986.** Coastal fishes of the Pacific northwest, 224. Canada: Harbour Publishing Co. Ltd., B.C.
- **Malandra & Renon, 1998.** Frodi commerciali dei Teleostei. In Le principali frodi dei

prodotti della pesca, 77-130. Milano: VLV Libreria Universitaria – Edizioni VLV

- **Manzoni P. & Tepedino V. 2007.** Repertorio ittico. <http://www.eurofishmarket.it/repertorioittico>
- **Masuda H., Amaoka K., Araga C., Uyeno T., Yoshino T. 1984.** The fishes of the Japanese Archipelago. Vol. 1., 437. Tokyo, Japan: Tokai University Press.
- **Matarese A.C., Kendall A.W., Blood D.M. and Vinter M.V. 1989.** Laboratory guide to early life history stages of Northeast Pacific fishes. NOAA Tech. Rep. NMFS 80: 1-652.
- **Mizrahi V., Henrie R.N., Marlier J.F. Johnson K.A. & Benkovic S.J. 1985.** Rate-limiting steps in the DNA polymerase I reaction pathway. *Biochemistry* 24:4010-8.
- **Momcilovic D. & Rasooly A. 2000.** Detection and analysis of animal materials in food and feed. *Journal of food protection*: 63: 1062-1069;
- **Moore M. J., Dhingra A., Soltis P. S., Regina Shaw R., Farmerie W. G., Kevin M Folta K. M. & Douglas E Soltis D. E. 2006.** Rapid and accurate pyrosequencing of angiosperm plastid genomes. *BMC Plant Biology* 1471-2229: 6-17.
- **Nakamura I., Inada T., Takeda M. and Hatanaka H. 1986.** Important fishes trawled off Patagonia, 369. Tokyo: Japan Marine Fishery Resource Research Center.
- **Nelson G. 1994.** Sardines and their allies. In *Encyclopedia of fishes*, ed. William N. Eschmeyer, 91-95. Kensington, N.S.W: W.N. UNSW Press.
- **Nordström T., Ronaghi M. & Nyrén P. 1999.** Automation of a novel DNA sequencing method. *Bioluminescence and Chemiluminescence: Perspective for the 21st century*, 528-531 (Roda A., Pazzagli M., Kricka L. J., Stanley P. E., eds.), John Wiley and Sons, Hoboken, NJ.
- **Orr, J.W. & Matarese A.C. 2000.** Revision of the genus *Lepidopsetta* Gill, 1862 (Teleostei: Pleuronectidae) based on larval and adult morphology, with a description of a new species from the North Pacific Ocean and Bering Sea. *Fish. Bull*; 98: 539-582.
- **Plesner L., 1995** – Ecto-ATPase: identities and function. *International Reviews on Cytology*; 158: 141-214.
- **Provvedimento del 16 novembre 2006 della Conferenza Permanente del Consiglio dei Ministri per i rapporti tra lo Stato e le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano** in materia di linee guida sui prodotti della pesca e sulla nuova regolamentazione comunitaria. Repertorio atti n. 2674. G.U n. 68 del 22/03/2007.
- **Quinteiro J. Vidal R. Izquierdo M. Sotelo C.G., Chapela M.J., Perez-Martin R.I. Rehbein H., Hold G.L., Russel V.J., Pryde S.E., Rosa C., Santos A.t., Rey-Mendez M. (2001)** – Identification of Hake species (*Merluccius* genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 49: 5108-5114.
- **Rampazzo E. 2009.** Sviluppo e applicazione di un protocollo in PCR per l'identificazione di

specie di Pesce spada (*Xiphias gladius*). Relatore. Correlatore Arcangeli G. (I.Z.S.Ve.).

- **Regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio, del 17 dicembre 1999** relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura. G.U.C.E. n. L217 del 21/01/2000.
- **Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio dell'Unione europea del 28 gennaio 2002** che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. G.U.C.E. n.L31/1 del 1/02/2002.
- **Regolamento (CE) n. 1810/2004 della Commissione Europea del 7 settembre 2004** che modifica l'allegato I del Reg. (CEE) n. 2658/87 del Consiglio relativo alla nomenclatura tariffaria e statistica ed alla tariffa doganale comune. G.U.C.E. n.L327 del 30/10/2004.
- **Regolamento (CE) n. 2065/2001 della Commissione Europea del 22 ottobre 2001** che stabilisce le modalità di applicazione del Regolamento (CE) n. 104/2000 del consiglio per quanto concerne l'informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura. G.U.C.E. n. L278 del 23/10/2001.
- **Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004** che stabilisce norme specifiche in materia di igiene dei prodotti alimentari. G.U.C.E n. L226 del 25/06/2004.
- **Regolamento (CE) n. 854/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 Aprile 2004** che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano. G.U.C.E. n. L139 del 30/04/2004.
- **Rehbein H. 1995.** Electrophoretic techniques for species identification of fishery products, *Zeitschrift für Lebensmittel Utersscheidung und Forschxhung*: 119: 1
- **Ronaghi M., Uhlen M., Nyren P. 1998.** A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*; 281: 363-365.
- **Safran P. 1990.** Drifting seaweed and associated ichthyofauna: floating nursery in Tohoku waters. *La mer* 28(4):225-239;
- **Safran P. & Omori M. 1990.** Some ecological observations on fishes associated with drifting seaweed off Tohoku coast, Japan. *Marine biology*. 105: 395-402;
- **Sala-Newby G.B., Thomson C.M., Campbell A.K. 1996.** Sequence and biochemical similarities between the luciferases of the glow-worm *Lampyris noticula* and the firefly *Photinus pyralis*. *The Biochemical journal*; 32: 13795-9.
- **Segel I.H., Renosto F., Seubert P.A. 1987.** Sulphate-activating enzymes. *Methods in enzymology*; 143: 334-349.
- **Simpson W. J. & Hammond J. R. 1991.** The effect of detergents on firefly luciferase reactions. *Journal of bioluminescence and chemiluminescence*; 6: 97-106.
- **Sommer C., Schneider W. & Poutiers J.M. 1996.** The living marine resources of Somalia. In

FAO species identification field guide for fishery purposes., 376 Rome: FAO.

- **Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. 2007.** *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution*; 24: 1596-1599.
- **Thompson J.F., Hayes L.S. & Lloyd D.B. 1991.** Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene*; 103: 171-7.
- **van der Elst R. 1993.** A guide to the common sea fishes of southern Africa, 398 (3rd Ed.) Cape Town: Struik Publishers.
- **White P.J., Squirrel D.J., Arnaud P., Lowe C.R. & Murray J.A.H. 1996.** Improved thermostability of the North America firefly luciferase: saturation mutagenesis at position 354. *The Biochemical journal*; 319: 343-50.
- **Whitehead P.J.P. 1985.** Part 1 - Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae. In FAO species catalogue. Vol. 7. Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings.. FAO Fish. Synop. 125(7/1):1-303.
- **Whitehead P.J.P., Nelson G.J. and Wongratana T. 1988.** Part 2 – Engraulididae. In FAO species catalogue. Vol. 7. Clupeoid fishes of the world (Suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings.. FAO Fish. Synop. 125(7/2):305-579;
- **Whitehead, P.J.P. and Rodriguez-Sanchez R. 1995.** Engraulidae. Anchoas, anchovetas. p.. In Guia FAO para Identificacion de Especies para lo Fines de la Pesca, Pacifico Centro-Oriental, ed. W. Fischer, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter & V. Niem, 1067-1087. 3 Vols. Rome: FAO.

ALLEGATO I: FAMIGLIA CLUPEIDAE

AGONE (Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Alosa fallax lacustris (Fatio, 1890)

Lunghezza massima: 35 cm.

Caratteri distintivi: sulla parte anteriore dei fianchi, presenza di diverse macchie scure (fino ad una dozzina); mascella superiore con una profonda incisura mediana che accoglie l'apice di quella inferiore; opercolo con striature raggiate; profilo ventrale tondeggiante, con carena prominente ed appuntita; pinna dorsale inserita a metà circa del corpo.

Diffusione: presso i grandi laghi di origine glaciale dell'Italia settentrionale (sottospecie autoctona).

Valore commerciale: specie di notevole interesse commerciale nelle zone rivierasche dei laghi subalpini (in misura variabile da lago a lago) (Manzoni & Tepedino, 2007).



ALACCIA

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/08)

Sardinella aurita (Valenciennes, 1847)

Lunghezza massima: 38 cm.

Caratteri distintivi: profilo ventrale tondeggiante con carena poco prominente; la pinna dorsale inizia un poco anteriormente al punto mediano del corpo.

Diffusione: Mediterraneo eccettuato l'Adriatico settentrionale, molto frequente nelle acque siciliane; Atlantico orientale: dal Portogallo all'Angola, Atlantico occidentale dal Pacifico occidentale.

Valore commerciale: specie di discreta importanza, non frequentissima sui nostri mercati, ma abbondante e di buon interesse economico altrove; commercializzata fresca, congelata, salata, affumicata ed inscatolata; talvolta viene impiegata per la produzione di farine di pesce o di fertilizzanti, o come esca (Manzoni & Tepedino, 2007).



ALACCIA ASIATICA

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Sardinella fimbriata

Lunghezza massima: 13.0 cm SL (maschio/sexo non determinato)

Caratteri distintivi: corpo leggermente compresso in maniera variabile; presenta una macchia scura all'origine della pinna dorsale.

Diffusione: Pacifico Indo-occidentale:

Valore commerciale: può essere venduta fresca, salata ed essicata, bollita o sotto forma di polpette di pesce (Manzoni & Tepedino, 2007).



ARINGA

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008

Clupea harengus

Lunghezza massima: 43 cm.

Caratteri distintivi: mascella inferiore prominente, più lunga di quella superiore; opercolo liscio con il margine posteriore tondeggiante; la pinna dorsale origina circa a metà corpo; colorazione argentea sui fianchi e sul ventre, blu scura, verdastra, dorsalmente; fianchi ed opercoli con sfumature dorate o rosate; assenza di macchie nere.

Distribuzione: comune nell' Atlantico nord – orientale e nord – occidentale.

Valore commerciale: specie apprezzata da un vasto numero di consumatori e di primaria importanza economica (la specie più importante per il Nord - Atlantico) (Manzoni & Tepedino, 2007).



CHEPPIA

(Denominazione obbligatoria: D.M. 31/01/08 MIPAAF)

Alosa fallax nilotica (Geoffroy & Hilaire, 1827).

Lunghezza massima: 60 cm.

Descrizione: del tutto simile all'Agone.

Diffusione: Atlantico (dal Marocco fino all'Islanda, al Mare del Nord ed al Baltico); Specie anadroma. Comune nel Mediterraneo (comunissima nell' Adriatico).

Valore commerciale: specie di scarsa importanza, abbastanza regolarmente presente sui nostri mercati; commercializzata fresca, congelata, essiccata ed affumicata; talvolta impiegata per la produzione di farine di pesce o di fertilizzanti, o come esca (Manzoni & Tepedino, 2007).



PAPALINA o SPRATTO

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008

Sprattus sprattus (Linneo, 1758).

Caratteri distintivi: mascella inferiore leggermente prominente. Profilo ventrale tondeggiante, con carena pronunciata e seghettata. Pinna dorsale interamente situata nella metà caudale del corpo.

Diffusione: Mediterraneo, abbondante nell'Adriatico. Atlantico nord-orientale dal Mare del Nord e dal Mar Baltico, fino al Marocco.

Valore commerciale: specie di discreta importanza, soprattutto sui mercati del Nord - Europa, pescata in notevoli quantitativi anche nel Mediterraneo; commercializzata fresca, congelata, essiccata, salata ed essiccata, affumicata ed inscatolata; talvolta viene impiegata per la produzione di farine di pesce o di fertilizzanti, o come esca (Manzoni & Tepedino, 2007).



SARDINA



(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Sardina pilchardus (Walbaum, 1792).

Lunghezza massima: 25 cm

Caratteri distintivi: squame assenti sulla testa; opercolo striato nella parte inferiore, con 3-5 piccole creste ossee dirette obliquamente verso il subopercolo, con il margine posteriore tondeggiante; la pinna dorsale origina più vicino al muso che all'origine della caudale; colorazione verde azzurra dorsalmente; sui fianchi argenteo - dorata, sul ventre bianco argentea; presenza, talvolta, di una serie di macchiette nerastre, poco accentuate, sulla parte superiore dei fianchi.

Diffusione: Mediterraneo; Atlantico settentrionale dal Mare del Nord, fino al Senegal.

Valore commerciale: specie di primaria importanza per l'industria conserviera europea, pescata in grandi quantitativi anche nel Mediterraneo, molto apprezzata da un vasto numero di consumatori; commercializzata fresca, congelata, affumicata, salata, ma soprattutto inscatolata sott'olio (Manzoni & Tepedino, 2007).

SARDINA di CALIFORNIA

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Sardinops sagax (Jenyns, 1842)

Lunghezza massima: 39,5 cm.

Caratteri distintivi: mascella inferiore prominente; opercolo liscio, con il margine posteriore tondeggiante, la pinna dorsale origina a metà della distanza tra l'estremità anteriore del corpo e la base della caudale; colorazione grigio-azzurra dorsalmente; sui fianchi è argentea, bianco argentea sul ventre. Presenza di una serie di macchiette nerastre su tutto il corpo. Pinna caudale nerastra.

Diffusione: Indo-Pacifico: dall'Africa meridionale al Pacifico orientale, e lungo le coste del Cile.

Valore commerciale: specie raramente presente sui nostri mercati, non presente comunque in modo regolare (Manzoni & Tepedino, 2007).



ALLEGATO II: FAMIGLIA ENGRAULIDAE

ACCIUGA o ALICE

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008 MIPAAF)

Engraulis encrasicolus (Linneo, 1758)

Lunghezza: massima: 20 cm; comune: 11-12 cm.

Caratteri distintivi: muso conico, appuntito, notevolmente prominente; corpo snello, allungato, a sezione ovaliforme; ampia bocca infera, con lunga mascella superiore, prolungata ben all'indietro dell'occhio; pinna dorsale corta, inserita all'incirca a metà del corpo e pinna caudale forcuta; colorazione azzurro - verdastra dorsalmente, sui fianchi e sul ventre argentea con una striscia grigio - azzurra tra il dorso scuro ed i fianchi chiari.

Diffusione: Mediterraneo e Mar Nero, Atlantico orientale nelle acque della Norvegia meridionale e dalle Isole Britanniche fino all'Angola; assente nel Baltico.

Valore commerciale: l'Acciuga o Alice è l'unica specie della famiglia Engraulidi presente nei mari europei; è di notevole interesse sui nostri mercati, ove compare regolarmente; molto importante per l'industria conserviera; commercializzata fresca o congelata, sia intera che in filetti, nonché essiccata, inscatolata sott'olio o sotto salsa e trasformata in pasta (pasta d'acciuga) (Manzoni & Tepedino, 2007).



ACCIUGA CALIFORNIANA

(Denominazione Assente nel D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Engraulis mordax (Hubbs, 1925)

Lunghezza: massima: 24.8 cm SL (maschio, sesso non determinato). (Lamb e Edgell, 1986)

Caratteri distintivi: corpo piuttosto circolare in sezione trasversale; mascella moderata; presenta una striscia argentea lungo i fianchi, che scompare con l'età.

Diffusione: Pacifico Nord – orientale.

Valore commerciale: Viene processato in fishmeal ed usato come esca per i tonni; occasionalmente venduto come scatolame (Whitehead & Rodriguez-Sanchez, 1995).



ACCIUGA GIAPPONESE

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Engraulis japonicus (Temminck & Schlegel, 1846)



Lunghezza: 18cm TL (maschio, sesso non determinato) (Fadeev, 2005).

Caratteri distintivi: differisce molto poco dall'acciuga o alice, dalla quale si distingue per la colorazione argentea.

Diffusione: Pacifico Nord – occidentale e centrale.

Valore commerciale: pescato e commercializzato in Giappone fin dal X secolo; viene commercializzato fresco o come conserva sotto sale, processato in fishmeal ed olio (van der Elst, 1993.)

Pericoli per l'uomo: sono stati riportati eventi di intossicazione da ciguatossina algale associati al consumo di *Engraulis japonicus* (Halsteadl *et al.* 1990).

ACCIUGA PERUVIANA

(Denominazione assente nel D.M. MIPAAF del 31/01/

Engraulis ringens (Jenyns, 1842)



Lunghezza massima: 20.0 cm SL (maschio/sesso non c

Caratteri distintivi: il corpo allungato e sottile si presenta circolare in sezione trasversale; l'alto numero di archi branchiali distingue questa specie da tutte le altre specie di acciuga presenti nel Pacifico.

Diffusione: lungo la costa occidentale del Sudamerica.

Valore commerciale: specie utilizzata nell'alimentazione umana e nella produzione di olio (Frimodt, 1995) (Whitehead *et al.*, 1988).

ALICE ATLANTICA

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Engraulis anchoita (Hubbs & Marini, 1935)



Lunghezza massima: 17.0 cm SL (maschio/sesso non determinato).

Caratteri distintivi: muso prominente ed appuntito; mascella modesta con estremità affusolata o arrotondata che raggiunge il margine anteriore del preopercolo; archi brachiali inferiori lunghi e sottili; colorazione nera tendente al blu dorsalmente, argentea tendente al bianco ventralmente e lateralmente; tutte le pinne si presentano trasparenti.

Diffusione: Atlantico Sud – occidentale lungo le coste subtropicali del Brasile e dell'Argentina.

Valore commerciale: specie largamente commercializzata nei mercati di origine sia fresca che come conserva (Whitehead *et al.*, 1988).

ALLEGATO III: SUBORDINE PLEURONECTOIDEI

HALIBUT

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

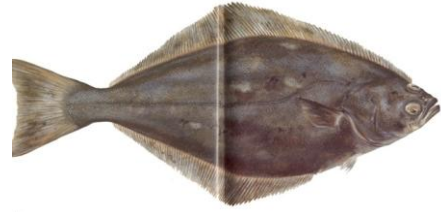
Hippoglossus hippoglossus (Linneo, 1758), PLEURONECTIDAE

Lunghezza massima: 255 cm.

Caratteri distintivi: colorazione bruno-verdastra opaca, talvolta quasi nera; bocca grande, munita di mascelle e denti robusti.

Diffusione: Atlantico settentrionale; in Norvegia questa specie viene da qualche anno allevata con successo.

Valore commerciale: specie pregiata di notevole importanza, commercializzata fresca o congelata, sia intera che in filetti, ed anche affumicata (Manzoni & Tepedino, 2007).



HALIBUT DELLA GROENLANDIA

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Reinhardtius hippoglossoides (Walbaum, 1792), PLEURONECTIDAE

Lunghezza massima: 102 cm.

Caratteri distintivi: colorazione da brunastra, a quasi nerastra; lato cieco un po' più chiaro; bocca con mascelle molto grandi munite di denti lunghi a forma di zanne.

Diffusione: Atlantico e Pacifico settentrionale.

Valore commerciale: specie apprezzata sia in Europa settentrionale che in America; commercializzata fresca, congelata ed affumicata, sia intera che in filetti (Manzoni & Tepedino, 2007).



LIMANDA

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Limanda limanda (Linneo, 1758), PLEURONECTIDAE

Lunghezza massima: 66 cm.

Caratteri distintivi: il lato cieco è ruvido solo sui margini; linea laterale dritta, con una marcata curvatura sopra la pinna pettorale.

Diffusione: Atlantico nord-orientale dal Golfo di Biscaglia al Mar Bianco ed all'Islanda.

Valore commerciale: di notevole importanza in Europa; commercializzata fresca o congelata, ed anche salata ed essiccata, o affumicata (Gaggioli *et al.*).ù



LIMANDA

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008 MIPAAF)

Limanda aspera (Pallas, 1814), PLEURONECTIDAE

Lunghezza massima: 50 cm.

Caratteri distintivi: branca sopratemporale della linea laterale priva di prolungamento posteriore.

Diffusione: Pacifico settentrionale: dalla Corea e dal Giappone fino al Mare di Bering, all'Alaska ed alla Columbia Britannica

Valore commerciale: elevato valore commerciale nelle zone d'origine (Manzoni & Tepedino, 2007).



LINGUATTOLA

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/

Citharus linguatula (Linneo, 1758) CITHARIDAE

Lunghezza massima: 30 cm.

Caratteri distintivi: testa assai appuntita ed allungata; grande bocca terminale, con mascella inferiore prominente; colorazione paglierina chiara, grigio - giallastra, con le squame bordate di scuro; alla base degli ultimi raggi delle pinne dorsale e anale presenza di una macchietta nerastra.

Diffusione: piuttosto comune nel Mediterraneo; presente nell'Atlantico orientale dal Portogallo all'Angola.

Valore commerciale: sui nostri mercati compare saltuariamente frammista ad altri prodotti; specie priva di interesse (Manzoni & Tepedino, 2007).



PASSERA DEL PACIFICO

(Denominazione assente nel D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Hippoglossoides elassodon (Jordan & Gilbert, 1880)

Lunghezza massima: 52 cm.

Caratteri distintivi: la pinna dorsale origina sopra la parte anteriore dell'occhio situato più in alto, la pinna caudale presenta un piccolo prolungamento nel centro mentre la pettorale si presenta piuttosto larga ad estremità arrotondate.

Diffusione: Pacifico settentrionale e Mar di Bering lungo la costa orientale dell'America fino alla California centrale (Gaggioli *et al.*).



PASSERA DEL PACIFICO

(Denominazione assente D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Lepidopsetta bilineata (Ayres, 1855)

Lunghezza massima: 58.0 cm TL (maschio, sesso non determinato) (Hart, 1973).

Caratteri distintivi: la pinna dorsale ha origine al di sopra della parte anteriore degli occhi, la caudale forma con il suo margine posteriore una larga 'V', la pettorale è piccola e asimmetrica; (Hart, 1973); lato cieco bianco con sottolineature lucenti lungo i margini dei miotomi, più marcate anteriormente; spazio interorbitale ristretto.

Diffusione: Pacifico settentrionale ed estremità sud-occidentale del Mar di Bering (Orr & Matarese, 2000).

PLATESSA

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Pleuronectes platessa (Linneo, 1758), PLEURONECTIDAE

Lunghezza massima: 91 cm.

Caratteri distintivi: presenza di una serie di 4-7 piccole prominenze ossee disposte su di una linea curva che origina da dietro gli occhi e giunge fino all'inizio della linea laterale.

Diffusione: rara nel Mediterraneo; Atlantico nord-orientale: presente dal Mar Bianco al Golfo di Cadice.

Valore commerciale: di primaria importanza commerciale in Nord Europa; su tutti i nostri mercati è presente regolarmente ed abbondantemente soprattutto in filetti. (Gaggioli *et al.*).



PLATESSA DEL PACIFICO

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Pleuronectes quadrituberculatus (Pallas, 1814), PLEURONECTIDAE

Lunghezza massima: 60 cm.

Caratteri distintivi: presenza di 5 tubercoli ossei sulla cresta post-orbitale.

Diffusione: Pacifico settentrionale: dal Mar del Giappone al Mare di Bering fino allo Stato di Washington (USA) (Gaggioli *et al.*).



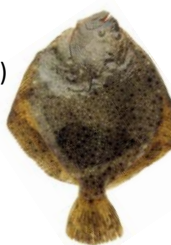
ROMBO CHIODATO e ROMBO TURCO o TUBERCOLATO

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Psetta maxima (Linneo, 1758), SCHOPHTALMIDAE

Psetta maeotica (Pallas, 1814), SCHOPHTALMIDAE

Lunghezza massima: 100 cm.



Caratteri distintivi: corpo ovale, privo di squame; provvisto sul lato oculare di numerosi tubercoli ossei che sono solitamente assenti su quello cieco nella specie *P. maxima* (nella quale sono di diametro minore di quello dell'occhio), ma sono invece presenti nella specie *P. maeotica* (nella quale sono di diametro maggiore di quello dell'occhio). Colorazione del lato oculare grigia - brunastra con macchiette più chiare e più scure del fondo in *P. maxima*, nera con bordi delle pinne rosso scuro in *P. maeotica*.

Diffusione: La specie *P. maxima* (Rombo chiodato) è presente nel Mediterraneo e nell'Atlantico orientale dalla Norvegia e dall'Islanda fino al Marocco; la specie *P. maeotica* (Rombo turco o tubercolato) è presente nel Mar Nero; si tratta di specie eurialine; *P. maxima* viene attualmente allevata.

Valore commerciale: *P. maxima* è una specie pregiata fra le più apprezzate e ricercate; *P. maeotica* è una specie di scarso interesse (Manzoni & Tepedino, 2007).

ROMBO LISCIO o SOASO

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Scophthalmus rhombus (Linneo, 1758), SCOPHTALMIDAE

Lunghezza massima: 75cm.



Caratteri distintivi: corpo ovale con pelle liscia al tatto. I primi raggi della pinna dorsale hanno ramificazioni e, nella parte distale, non sono muniti della membrana interradiatale. Colorazione bruno - grigiastro, con macchiette più chiare e più scure sul fondo.

Diffusione: Mediterraneo: specie rara nel bacino orientale, comune nei nostri mari. Atlantico orientale: dalla Norvegia al Marocco. E' specie eurialina che penetra nelle lagune salmastre.

Valore commerciale: sui nostri mercati specie di buon interesse, normalmente presente Sui nostri mercati specie di buon interesse, normalmente presente (Manzoni & Tepedino, 2007).

ZANCHETTA o SUACIA

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Arnoglossus laterna (Walbaum, 1792), BOTHIDAE

Lunghezza massima: 20 cm.



Caratteri distintivi: occhi molto ravvicinati fra loro; bocca terminale, con mandibola leggermente prominente e munita, su entrambe le mascelle, di 1 o 2 file di dentini acuti; pinna anale preceduta da 2 piccole spine; colorazione grigio - giallastra tendente al carnicino, con punteggiatura più scura sul lato oculare; grigio - biancastra sul lato cieco.

Diffusione: specie comune nel Mediterraneo e molto frequente nei nostri mari; comune nell'Atlantico dalla Norvegia a Gibilterra.

Valore commerciale: sui nostri mercati è presente frequentemente. Specie di scarso pregio (Manzoni & Tepedino, 2007).

ALLEGATO IV: SUBORDINE SOLEOIDEI

SOGLIOLA

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Solea vulgaris (Quensel, 1806), SOLEIDAE *Solea solea* (Fowler, 1936)

Lunghezza massima: 60 cm.

Caratteri distintivi: priva di narice e di macchie sul lato cieco, possiede sul lato oculare un colore bruno tendente al grigio o al rossastro ed una peculiare bordatura scura sull'estremità della pinna caudale.

Diffusione: Mediterraneo; Atlantico orientale dalla Scandinavia a Capo Verde.

Valore commerciale: specie molto pregiata, assai ricercata su tutti i nostri mercati, ove regolarmente presente e commercializzata fresca o congelata sia intera che in filetti (Manzoni & Tepedino, 2007).



SOGLIOLA ATLANTICA

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Solea senegalensis (Kaup, 1858), SOLEIDAE

Lunghezza massima: 60 cm.

Caratteri distintivi: narice anteriore del lato cieco tubuli forme; livrea bruno-grigiasta scura, su cui spiccano numerose macchiette puntiformi azzurre; presenza di linee radiali scure sulla pinna pettorale, dovute alla membrana interradiale nera.

Diffusione: bacino occidentale del Mediterraneo, Atlantico orientale dal Golfo di Guascogna al Senegal

Valore commerciale: specie apprezzata, ormai frequentemente presente su alcuni dei nostri mercati. Commercializzata per lo più fresca, sia intera che in filetti (Manzoni & Tepedino, 2007).



SOGLIOLA CUNEATA

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

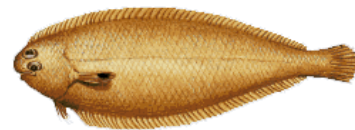
Dicologlossa cuneata SOLEIDAE

Lunghezza massima: 30 cm.

Caratteri distintivi: colorazione bruno - cioccolata o bruno - grigiasta con macchie blu - nerastre che formano linee longitudinali lungo i bordi dorsale e ventrale e lungo la linea mediana del corpo; coda orlata di nero; pettorale con una macchia nera oblunga che non giunge fino al margine posteriore dei raggi.

Diffusione: Mediterraneo occidentale, Atlantico orientale dal Golfo di Guascogna al Sud Africa (abbondante sulle coste di Marocco e Mauritania).

Valore commerciale: buono ma inferiore a quello delle altre sogliole di grossa taglia (Manzoni & Tepedino, 2007).



SOGLIOLA INDO-PACIFICA

(Denominazione assente nel D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Paraplagusia bilineata (Linneo, 1758), CYNOGLOSSIDAE

Lunghezza massima: 30 cm TL (maschio, sesso non determinato) (Sommer *et al.*, 1996).

Caratteri distintivi: lato oculare marmorizzato con linee ondulate scure che racchiudono settori pallidi; presenta entambe le linee laterali sul lato oculare (Heemstra, 1986).

Diffusione: popola il litorale che si estende dal Mar Rosso alle Filippine, presente inoltre lungo la tutta la costa nipponica .

Valore commerciale: riveste un interesse minore nei mercati della pesca (Manzoni & Tepedino, 2007).



SOGLIOLA DEL PORRO

Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

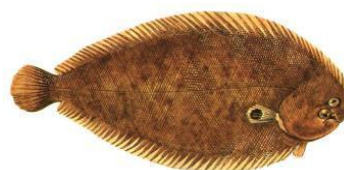
Solea lascaris (Risso, 1810), SOLEIDAE

Lunghezza massima: 40 cm.

Caratteri distintivi: brunastra di varia tonalità, con punti e macchie più scuri; pinna pettorale con macchia nera, con un contorno bianco - giallastro, non estesa fino al margine posteriore dei raggi; narice anteriore del lato cieco a forma di rosetta con setti radiali.

Diffusione: assai frequente nel Mediterraneo, presente anche nell'Atlantico orientale dalle Isole Britanniche al Sud Africa.

Valore commerciale: specie di buon interesse, frequentemente presente sui nostri mercati, anche se in quantitativi alquanto esigui, commercializzata per lo più fresca (Manzoni & Tepedino, 2007).



SOGLIOLA TURCA

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF. Del 31/01/2008)

Solea kleinii (Bonaparte 1833), SOLEIDAE

Lunghezza massima: 40 cm.

Tratti distintivi: narice anteriore del lato cieco a forma di cupola senza setti radiali; colorazione bruno chiara con piccoli punti nerastri e con numerose macchiette biancastre; pinne: pettorale con una macchia nera bordata di bianco posteriormente; dorsale e anale con orlo scuro.

Diffusione: Mediterraneo; frequente nell'Adriatico. Atlantico orientale dal Portogallo al Sud Africa.

Valore commerciale: specie non molto frequente sul mercato, ma comunque apprezzata; commercializzata fresca ed in conserva soprattutto in Grecia (Manzoni & Tepedino, 2007).



ALLEGATO V: ALTRI PESCI

PANGASIO

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF. Del 31/01/2008)

Pangasius hypophthalmus (Sauvage, 1878), PANGASIDAE

Pangasius micronemus (Bleeker, 1847) PANGASIDAE

Lunghezza massima: 130 cm.



Caratteri distintivi: testa piccola, alquanto depressa, muso tronco e bocca terminale attorno alla quale sono presenti due barbigli molto piccoli; corpo compresso, allungato; pinna dorsale corta, pinna caudale con margine concavo, una piccola pinna adiposa è presente tra la dorsale e la caudale; colorazione grigiastra uniforme, più scura dorsalmente, biancastra sul ventre; pinne grigio - scure o nerastre.

Diffusione: specie d'acqua dolce presenti nel Sud est Asiatico nei bacini dei fiumi Mekong e Chao Phraya, ampiamente introdotte anche in altri fiumi a scopo di acquacoltura; la seconda specie è presente anche nelle penisole malese ed indonesiana.

Valore commerciale: una delle specie allevate più importanti in Thailandia; sui nostri mercati sta acquistando crescente interesse. (Manzoni & Tepedino, 2007).

PESCE GHIACCIO

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Neosalanx spp. e Protosalanx spp., SALANGIDAE

Lunghezza massima: 6-7 cm.



Caratteri distintivi: testa molto depressa e bocca terminale piuttosto grande; occhio piuttosto grande e nero, ben evidente; pinna dorsale corta ed inserita molto causalmente, pinna caudale bilobata e forcuta, presenza di una piccola pinna adiposa tra la pinna dorsale e la caudale; corpo molto allungato traslucido; colorazione bianco opaca uniforme, tendente al bianco - latte dopo la morte dell'animale.

Diffusione: presenti nelle acque tropicali salmastre o dolci della Cina.

Valore commerciale: di discreto interesse, sui nostri mercati compaiono comunque sempre più frequentemente (Manzoni & Tepedino, 2007).

PERSICO AFRICANO

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Lates niloticus, LATIDAE

Lunghezza massima: 193 cm



Caratteri distintivi: bocca sub terminale; preopercolo con margine posteriore finemente dentellato, opercolo provvisto di una spina sul margine esterno; corpo moderatamente compresso lateralmente, allungato; colorazione brunastra, grigiastra scura o verde - oliva uniforme dorsalmente, argentea - ventralmente; marmoreggiature e bande marroni sono presenti negli esemplari giovani.

Diffusione: specie ampiamente diffusa nelle acque interne africane, in particolare nei fiumi Nilo, Senegal, Volta, Congo, Niger e nei laghi Ciad, Rodolfo, Alberto e Abaja (Margherita); è stata introdotta alcuni anni fa nel Lago Vittoria con conseguenze disastrose per l'ittiofauna autoctona che stata pesantemente predata.

Valore commerciale: sia sui mercati africani di origine che sui nostri ove regolarmente presente, è una specie di notevole interesse (Manzoni & Tepedino, 2007).

PESCE PERSICO

(Denominazione obbligatoria: D.M. MIPAAF del 31/01/2008)

Perca fluviatilis PERCIDAE

Lunghezza massima: oltre 60 cm.



Caratteri distintivi. muso arrotondato, breve; margine posteriore dell' opercolo terminante a punta e munito di una robusta spina; corpo ovaliforme, compresso; pinna caudale bilobata, con margine posteriore nettamente inciso e gli apici dei lobi acuti, le due pinne dorsali sono contigue; colorazione biancastra sul ventre, verde - brunastra o verde grigiastra dorsalmente; sono presenti sui fianchi 5 - 7 bande verticali nerastre più o meno evidenti, estese dal margine dorsale fin sulla parte inferiore dei fianchi; presenza di una macchia nera sull' estremità posteriore della pinna dorsale.

Diffusione: specie d'acqua dolce autoctona in Italia e ormai presente, a seguito di immissioni, nella quasi totalità dei continenti; in Europa è molto diffusa ovunque, ad eccezione della Penisola Iberica e di buona parte della regione balcanica.

Valore commerciale specie di notevole interesse sui mercati europei; in Italia molto richiesta e qualche volta importata dall' Europa centrale e settentrionale per far fronte alla insufficiente disponibilità interna (Manzoni & Tepedino, 2007).