

1222·2022
800
ANNI



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e
Ambiente

Dipartimento di Biologia

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e il
Territorio

CARNI di SPECIE SELVATICHE e PRODOTTI DERIVATI: identificazione, caratterizzazione, etichettatura

Relatore:

Prof.ssa Elisa Boscari

Dott.ssa Antonia Anna Lettini

Laureando:

Matteo Garon

Matricola: 2017358

RIASSUNTO

Le frodi alimentari sono state da sempre un problema sia sanitario che commerciale ma fino a poco tempo fa gli strumenti per affrontarle e scagionarle erano obsoleti e inadeguati. Con lo sviluppo della genomica e delle analisi basate sullo studio del DNA l'identificazione delle frodi ha subito un'importante evoluzione. Le frodi alimentari per sostituzione, per esempio, consistono nello scambio di una specie pregiata, destinata al commercio, con una meno pregiata allo scopo di trarre un vantaggio economico da parte del venditore, a scapito del consumatore. Ad oggi esistono molte tecniche di identificazione di specie partendo da quella che si basa sull'aspetto morfologico dell'animale. Tuttavia, nel momento in cui l'animale viene macellato e la materia prima lavorata per produrre prodotti composti anche da più specie, come i salami, l'identificazione di specie basata sulla morfologia del prodotto risulta impossibile da attuare. Ed è in questo contesto che, le tecniche basate sull'analisi del DNA, hanno mostrato maggiore affidabilità, riproducibilità e specificità. Esistono molti metodi di identificazione che si basano principalmente sulla tecnica di reazione a catena della polimerasi (PCR), tra cui il DNA barcoding. Lo scopo di questo progetto è infatti l'identificazione di un metodo basato sul DNA barcoding utile per individuare le specie animali in prodotti a base di carne di selvaggina nelle zone della Provincia Autonoma di Bolzano e la verifica di quanto dichiarato in etichetta. Dai risultati ottenuti mediante sequenziamento diretto dei prodotti di PCR, sono stati rilevati tre possibili casi di frodi alimentari in 52 campioni analizzati ma, considerando la frequenza di doppi picchi nei cromatogrammi ottenuti, non è possibile escludere la presenza di ulteriori discrepanze tra prodotto ed etichettatura, senza procedere con ulteriori approfondimenti (es. clonaggio). Il sequenziamento del gene *COI* tramite DNA barcoding è risultato un metodo efficace per quanto riguarda i campioni composti da una singola specie e, come atteso, ha evidenziato criticità nell'analisi di prodotti multispecie.

ABSTRACT

Food fraud could be represent an health concern as well as a commercial and ethical problem. Thanks to the development of DNA-based method and genomics, the fraud defence has made great strides and is still making progress. Food fraud by substitution, for example, consists in the exchange of a valuable species, destined for trade, with a less valuable one in order to draw an economic advantage from the seller without the consumer's knowledge. Many approaches are available for identifying species; first of all morphology. However, at the time when the animal is slaughtered and the raw material processed to produce products consisting of several species, such as salami, species identification based on "animal" morphology is not achievable. In this context, DNA-based approaches must be adopted. Most of species identification methods are based on the polymerase chain reaction (PCR) technique, including DNA barcoding. This project is aimed to identify the animal species in game meat products and to verify the animal species declared on the product label. We analysed game meat products in the areas of the Autonomous Province of Bolzano by amplifying and sequencing the mitochondrial *COI* gene. The results showed 3 cases of possible food fraud out of 52 samples analysed but, given the high frequency of double peaks in the chromatograms obtained, excluding the presence of further discrepancies between product and labelling is not possible without proceeding with further investigations (e.g. cloning). The sequencing of the DNA barcoding gene resulted efficacious to correctly identify samples composed of a single species and, as expected, showed to be limited on the identification of multi-species products.

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE.....	9
1.1 LE SPECIE SELVATICHE DI INTERESSE ALIMENTARE.....	9
1.1.1 NORMATIVA E LINEE GUIDA: CACCIA, MACELLAZIONE E CONTROLLI DI FILIERA	11
1.1.2 RISCHI DA AGENTI ZOONOTICI.....	15
1.2 ETICHETTATURA ED IDENTIFICAZIONE.....	17
1.3 IL DNA MITOCONDRIALE	18
1.3.1 IL DNA BARCODING	21
1.3.2 IL DNA BARCODING GAP	25
1.4 LA PCR NELL'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE.....	26
2. SCOPO DELLA TESI.....	30
3. MATERIALI E METODI.....	31
3.1 CAMPIONI.....	31
3.2 ESTRAZIONE.....	35
3.3 QUANTIFICAZIONE DEL DNA.....	38
3.4 AMPLIFICAZIONE DEL GENE <i>COI</i>	38
3.5 ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO.....	41

3.6 SEQUENZIAMENTO SANGER.....	44
3.7 ANALISI BIOINFORMATICA DEI DATI.....	44
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	46
4.1 ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DEL DNA.....	46
4.2 AMPLIFICAZIONE, SEQUENZIAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DI SPECIE.....	49
4.3 ANALISI BIOINFORMATICA.....	57
5. CONCLUSIONI.....	67
Allegato 1.....	71
6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	73

1. INTRODUZIONE

1.1 LE SPECIE SELVATICHE DI INTERESSE

ALIMENTARE

Il settore delle carni di selvaggina ha dimostrato negli ultimi anni un costante incremento della domanda e dell'offerta. In particolare, la preparazione di piatti a base di carne di selvaggina nella ristorazione pubblica si ritrova con sempre maggior frequenza anche al di fuori delle aree tradizionalmente interessate. A seguito di questa crescente richiesta, il commercio globale si è “aperto” alle specie selvatiche e le norme che regolano questo settore sono complesse, variano sia tra i diversi gruppi tassonomici cacciati, che all'interno degli stessi (Hughes, 2021). Parallelamente è in atto una notevole crescita demografica di talune popolazioni di animali selvatici poiché la progressiva urbanizzazione della popolazione umana ha consentito il ripristino di aree boschive, habitat ideale per molti animali selvatici (Conferenza Permanente per i Rapporti Tra Lo Stato, Le Regioni e Le Province Autonome Di Trento e Bolzano – Repertorio Atto n. 34/CSR, 2021). Tra le specie animali selvatiche più diffuse nel commercio alimentare c'è il gruppo degli ungulati, non ancora ben definito tassonomicamente. Gli ungulati sono mammiferi che appartengono a due ordini: i Perissodattili e gli Artiodattili. Al primo gruppo tassonomico appartengono specie selvatiche come rinoceronti, cavalli selvatici e tapiri che non sono presenti nel territorio

italiano. Il secondo, invece, si divide in tre sottordini: quello dei *Suiformi* che comprende anche il cinghiale, quello dei *Tilopodi*, che comprende i cammelli e i dromedari (non presenti in Italia), e quello dei Ruminanti che si dividono a loro volta in diverse famiglie tra cui quella dei *Cervidi* (cervo, capriolo e daino) e quella dei *Bovidi* (stambecco, camoscio e muflone), entrambe presenti sul territorio nazionale. Nonostante l'incremento delle popolazioni avvenuto per gran parte degli ungulati negli ultimi anni prevalentemente nelle zone alpine e nell'Appennino settentrionale, l'attuale distribuzione a livello nazionale non interessa tutto il territorio ad eccezione del cinghiale che occupa tutto l'areale potenziale (Meneguz P. G., 2019). In particolare, nelle zone centro-meridionali le popolazioni di cervidi rimangono ridotte e frammentate. Il camoscio popola le Alpi e gli Appennini, i caprioli e i cervi i rilievi del Centro e del Nord della penisola, mentre il daino, introdotto dall'uomo, presenta una distribuzione puntiforme, disconnessa e non omogenea nel territorio (Meneguz P. G., 2019).

L'uso della carne di selvaggina come fonte alimentare è attualmente una tendenza in crescita nel nostro Paese (Giuggioli *et al.* 2018). Questi prodotti hanno un legame forte e storico con la tradizione culturale e culinaria, ma sono anche apprezzati per le loro caratteristiche sensoriali e nutrizionali. Un importante contributo per la fornitura di questo tipo di prodotto è la caccia. Praticata da sempre per la sopravvivenza, la caccia si è evoluta in un'attività ricreativa con notevoli interessi commerciali e l'incremento nelle aree boschive della taglia delle popolazioni degli ungulati ha inevitabilmente messo in contatto questi ultimi con l'uomo. A causa di questi incontri sempre più

frequenti e per i diversi servizi ecosistemici che questi animali offrono all'uomo, è evidente la necessità di attuare il prima possibile delle norme di sicurezza relative alla caccia e al consumo di selvaggina (Giuggioli *et al.* 2018). La complessità nelle catene di approvvigionamento alimentare, che potrebbe coinvolgere anche il mercato della selvaggina, è emersa chiaramente in occasione della cosiddetta crisi “*Horsegate*” del 2013, in cui la carne di manzo è stata adulterata in modo fraudolento con carne di cavallo coinvolgendo addirittura 19 Paesi e provocando l'avvio di indagini e la predisposizione di piani di campionamento *ad hoc* sia nei mercati al dettaglio che nei servizi di ristorazione nell'Unione Europea (Brooks *et al.* 2017).

1.1.1 NORMATIVA E LINEE GUIDA: CACCIA, MACELLAZIONE E CONTROLLI DI FILIERA

La maggior parte della selvaggina può essere oggetto di prelievo venatorio ai sensi della normativa di settore e alcune specie sono sottoposte a specifici piani di abbattimento per un maggiore controllo demografico. In materia di caccia, con la legge quadro n. 157/1992 decade l'impostazione precedente che configurava l'esercizio dell'attività venatoria come un diritto soggettivo assoluto e qualificava la fauna selvatica come *res nullius*, rendendola così soggetta al libero abbattimento, cattura e appropriazione senza imposizione di alcun limite. La legge del '92, invece, assicura la prevalenza dell'interesse pubblico alla conservazione del patrimonio faunistico e alla protezione

dell'ambiente rispetto all'interesse privato all'esercizio della caccia. Essa qualifica la fauna come “patrimonio indisponibile dello Stato [...] tutelata nell'interesse della comunità nazionale ed internazionale”. Inoltre afferma che “l'esercizio dell'attività venatoria è autorizzato, purché non contrasti l'esigenza di conservazione della fauna selvatica e non arrechi danno effettivo alle produzioni agricole” (Mancini M. 2018).

Il regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo, che contiene le specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, definisce i requisiti igienico-sanitari in materia di macellazione.

Nello specifico, le carni di selvaggina d'allevamento, non necessitano di particolari attenzioni rispetto alle carni di ungulati domestici ma a differenza di quest'ultimi, possono arrivare al macello anche esemplari non vivi. La selvaggina d'allevamento può essere macellata anche nel luogo d'origine a patto che l'allevamento sia periodicamente sottoposto ad ispezione veterinaria, l'azienda disponga di strutture per la macellazione e dissanguamento dell'animale, siano rispettate le disposizioni relative al benessere degli animali. Inoltre, se trasportati al macello, lo siano in condizioni igieniche soddisfacenti, venga fornita una dichiarazione da parte dell'operatore che attesti l'identità dell'animale e indichi le cure veterinarie somministrate. Nel caso di macellazioni in stabilimenti riconosciuti per la macellazione è necessario prestare attenzione a non incorrere in contaminazioni di alimenti di specie diverse, provvedendo a separare le operazioni riguardanti specie diverse.

Nella sezione IV del medesimo regolamento, sono contenute le indicazioni specifiche per le carni di selvaggina selvatica. La normativa, punta molto sulla formazione dei

cacciatori, i quali devono obbligatoriamente acquisire delle conoscenze in merito al riconoscimento di alterazioni anatomiche e fisiologiche riconducibili ad agenti zoonotici potenzialmente trasmissibili all'uomo e nozioni di carattere igienico-sanitarie e relativi regolamenti e disposizioni legislative inerenti la commercializzazione di selvaggina selvatica.

La carcassa può essere immessa sul mercato solamente se è trasportata immediatamente in un centro di lavorazione della selvaggina accompagnata da una dichiarazione che attesti l'assenza di eventuali patologie, la data, l'ora e il luogo dell'abbattimento.

La carcassa deve essere presentata all'autorità competente per ispezione una volta pervenuta al centro di lavorazione della selvaggina.

Le disposizioni contenute nel Reg. 853/2004 e sopra riassunte, non si applicano ai piccoli quantitativi di selvaggina destinata al consumo diretto o a piccole distribuzioni locali.

La caccia non è sempre consentita, esistono infatti dei periodi dettati, di competenza di ciascuna regione, in cui l'attività venatoria è consentita e altri periodi in cui è vietata, in modo da consentire alle varie specie di riprodursi e poter così assicurare la conservazione sia delle specie stesse sia della biodiversità. In particolare, la Figura 1 mostra le stagioni di caccia distribuite in periodi definiti dell'anno 2022, per le diverse specie selvatiche presenti nella regione del Trentino-Alto Adige. Di fronte ad una sempre più elevata richiesta da parte dei consumatori e dei ristoratori e in un contesto di ampia disponibilità di carni di selvaggina, sono state istituite delle linee guida riferite alle norme di produzione igienica delle carni e alla modalità di controllo ufficiale delle

stesse (Conferenza Permanente per i Rapporti Tra Lo Stato, Le Regioni e Le Province Autonome Di Trento e Bolzano - Repertorio Atto n. 34/CSR, 2019). In particolare, il cacciatore è tenuto a sottoporre tutti i capi di specie sensibili alla trichinellosi (*Sus scrofa*) all'esame per la ricerca della *Trichinella spp.* e a fornire evidenza della rintracciabilità della carne. Il dettagliante (macellaio o ristoratore) è tenuto, invece, a documentare la provenienza delle carni fornite e ad acquisire l'esito favorevole dell'analisi per *Trichinella* per le specie sensibili. La selvaggina, le cui carni sono destinate alla commercializzazione, deve essere lavorata e sottoposta ad ispezione veterinaria.

Periodi di caccia delle specie contingentate 2022		
	Caccia primaverile estiva*	Caccia autunnale
Capriolo maschio	dal 2/5 al 30/6	dal 4/9 al 20/10
Capriolo femmina	dal 2/5 al 30/6	dal 4/9 al 31/12
Capriolo piccolo	-----	dal 4/9 al 31/12
Cervo maschio e femmina	dal 2/5 al 30/6	dal 4/9 al 31/12
Pernice bianca	caccia sospesa	caccia sospesa
Cervo piccolo	-----	dal 4/9 al 31/12
Cinghiale	caccia sospesa	caccia sospesa
Camoscio	dal 17/8 al 15/12	
Mufone nelle riserve con piano di abbattimento	dal 1/10 al 30/11	
Mufone nella riserve senza piano di abbattimento	-----	dal 1/10 al 22/10
Coturnice	-----	dal 1/10 al 22/10
Fagiano di monte	-----	dal 1/10 al 14/11
Fagiano di monte nelle riserve con piano di abbattimento pari ad un solo capo	-----	dal 1/10 al 22/10

*nei mesi di maggio, giugno e agosto è vietato esercitare la caccia la domenica.

Figura 1 Periodi di caccia per ciascuna specie contingentata dell'anno 2022 nel Trentino-Alto Adige (Fonte: <https://forestefauna.provincia.tn.it/Fauna/Caccia/Stagione-venatoria-corrente>)

1.1.2 RISCHI DA AGENTI ZOONOTICI

Salmonella spp. e Yersinia enterocolitica

Data l'elevata richiesta di prodotti di selvaggina da parte dei consumatori, la valutazione della loro salubrità, in particolare dei rischi zoonotici legati al loro consumo, assume maggior rilievo. I rischi microbiologici riguardanti gli alimenti derivati da animali selvatici cacciati, possono essere diversi in modo qualitativo e/o quantitativo, rispetto ai rischi associati al consumo di alimenti a base di carne di animali da reddito (Ricerca corrente IZS VE 05, 2015). La carne di selvaggina cacciata, rispetto alle carni di animali

allevati, è spesso lavorata con metodi artigianali basati su procedure tradizionali e non standardizzate. Le informazioni relative a tali procedure, soprattutto per quanto riguarda l'igiene di questi prodotti, risultano scarse. Un classico esempio italiano è la contaminazione delle carcasse di cinghiale (*Sus scrofa*) da *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica*. Il cinghiale è una delle specie più comuni di ungulati in Italia (Bonardi *et al.* 2021) e la loro presenza è stata ben documentata in tutto il territorio con un'alta prevalenza negli Appennini del centro-Italia. Grazie al loro incremento di popolazione il consumo di carne di cinghiale è aumentato proporzionalmente. Come riportato da Bonardi *et al.* (2021), la ricerca di *Salmonella* spp. è considerata prioritaria nelle analisi anatomo-patologiche finalizzate a garantire un'alta qualità della carne di cinghiale dal punto di vista sanitario. A conferma di quanto detto, anche il recente Report EFSA relativo al 2020 ("The European Union One Health 2020 Zoonoses Report," 2021) colloca la salmonellosi e la yersiniosi tra le prime quattro zoonosi più frequentemente rilevate in Europa.

Trichinellosi

Un altro fattore di rischio che può causare zoonosi è senza dubbio la già citata Trichinellosi. Essa è una malattia parassitaria causata da un parassita del genere *Trichinella* in grado di colonizzare mammiferi, uccelli e rettili. La *Trichinella* passa dall'animale all'uomo tramite l'ingestione di carne fresca contaminata di alcune specie, come il cinghiale. Il rischio di zoonosi è quindi associato al consumo di carne poco

cotta, per esempio gli insaccati freschi o stagionati, che andrebbero consumati solo se provenienti da animali preventivamente controllati dal punto di vista sanitario (Mattiello & Gazzaroli, 2016).

Inoltre, da uno studio di Grassi *et al.* (2019), è emerso che diverse specie di ungulati tra cui capriolo, cinghiale, cervo, camoscio e muflone, *reservoir* di malattie trasmesse da zecche come la meningoencefalite (TBE) e la malattia di Lyme, possono fungere da potenziali vettori nei confronti dell'uomo. Dallo studio si evince che le positività riscontrate nelle zecche comportino un problema emergente soprattutto per il Friuli Venezia Giulia. Si conferma dunque mandatorio prestare molta attenzione per quanto riguarda il commercio delle carni di selvaggina.

1.2 ETICHETTATURA ED IDENTIFICAZIONE

Data l'insorgenza di un aumento da parte dei consumatori della domanda di carni di animali selvatici cacciati e della presenza dei rischi sanitari annessi, negli ultimi anni è aumentato l'interesse per la genuinità della carne (Ballin N. Z. 2010). Il consumatore è molto più attento alla qualità dei prodotti che consuma e ripone fiducia nelle informazioni riportate in etichetta, la cui accuratezza è quindi fondamentale per una scelta informata e consapevole da parte del consumatore. Parallelamente all'aumento della domanda, tuttavia, alcuni studi hanno evidenziato un incremento anche delle frodi commerciali che interessano i prodotti a base di carne. Il più delle volte le frodi interessano un'incompatibilità tra il prodotto commercializzato e quanto riportato

nell'etichettatura (Kaltenbrunner *et al.* 2019). Nel dettaglio, spesso accade che la specie indicata sia presente in proporzioni diverse da quelle riportate in etichetta o, ancor più grave, il prodotto commercializzato non sia della specie indicata, ma appartenga ad una specie diversa, magari meno pregiata, commercializzata sotto falsa etichetta (Moreira *et al.* 2021). Questo pone degli interrogativi anche sul rispetto di tutti i protocolli sanitari per i cibi commercializzati sotto falsa etichetta e di conseguenza apre il problema della tutela del consumatore rispetto anche ad eventuali impatti etico/religiosi che possono interessare il consumo di carne. Oltre quindi ad effettuare controlli sulla filiera produttiva e stilare normative per il controllo sanitario, negli anni si è reso necessario (almeno a campione per i lotti prodotti) affiancare una caratterizzazione genetica del prodotto commercializzato al fine di verificare la corrispondenza della specie identificata con quanto riportato sull'etichetta. Attualmente, i metodi più utilizzati per gli alimenti sfruttano diverse tipologie di marcatori molecolari per l'identificazione di specie di appartenenza. In particolare per i prodotti a base di carne, il metodo più utilizzato è l'analisi di marcatori mitocondriali quali il DNA barcoding.

1.3 IL DNA MITOCONDRIALE

Nelle cellule eucariotiche oltre al genoma nucleare presente nel nucleo della cellula, è presente anche il genoma mitocondriale (mtDNA) che si localizza all'interno dei mitocondri a livello citoplasmatico. Il DNA mitocondriale è un genoma piccolo (lungo circa 16000 bp), aploide, compatto (per lo più privo di sequenze non codificanti), e

presente in un numero elevato di copie, caratteristiche che lo rendono più facilmente analizzabile anche a partire da quantità ridotte di materiale di partenza o da cellule anucleate. Presenta una struttura circolare non organizzata in cromosomi (Figura 2), molto più resistente alla degradazione anche in condizioni estreme, motivo per cui i marcatori mitocondriali sono i target più spesso analizzati nei reperti antichi (es. reperti museali) o in prodotti sottoposti ad alte temperature o processati (es. carne, pesce etc). Il mtDNA non presenta ricombinazioni e viene ereditato in modo clonale per via uniparentale (matrilineare) (Korpelainen H., 2004), perciò tutte le differenze rispetto al mtDNA della madre sono ricondotte unicamente a mutazione. Il mtDNA mostra un tasso di mutazione eterogeneo e mediamente dieci volte più elevato rispetto al DNA nucleare. Ciò dipende anche da un'assenza di attività esonucleasica 3'-5' della DNA polimerasi mitocondriale. Al suo interno si possono quindi distinguere regioni a lenta e a rapida evoluzione (Pesole *et al.* 1999). Il differente tasso di mutazione delle singole regioni rende il mtDNA un perfetto esempio di codice genetico utile all'analisi della variabilità genetica sia intra-specie che inter-specie a seconda della regione presa in considerazione. In particolare, ai fini dell'analisi inter-specie, le possibilità di riscontrare sostituzioni nucleotidiche giunte a fissazione a livello di specie è maggiore rispetto al genoma nucleare e questo rende il genoma mitocondriale particolarmente apprezzato per l'identificazione di specie, soprattutto animali.

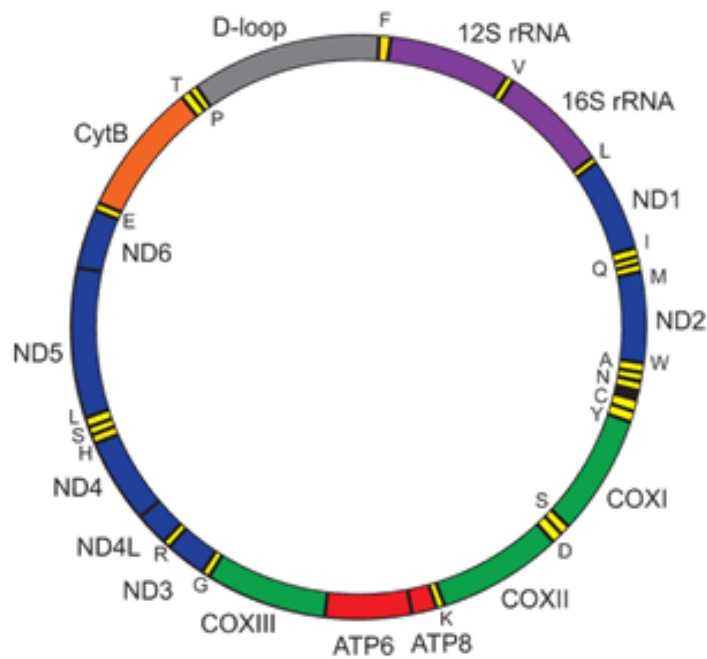


Figura 2 Rappresentazione della suddivisione del mtDNA nelle varie regioni codificanti (Fonte: Quiros *et al.*, 2017)

Dalla letteratura si evince che le regioni del mtDNA più utilizzate per l'identificazione di specie animali, sono il “*cytb*” (Silva *et al.* 2015), gene codificante per una proteina facente parte della catena di trasporto degli elettroni, il Citocromo Ossidasi I, *COI* (Bhaskar *et al.* 2020), anch'esso un gene codificante per la subunità I della catena di trasporto degli elettroni e il gene *16S rRNA* codificante per una componente della subunità 30S di un ribosoma (Simon *et al.* 1994). Per quanto riguarda l'identificazione di individui all'interno della stessa specie, il target utilizzato più frequentemente è l'unica regione non codificante del genoma mitocondriale chiamata D-loop o Control Region. È un tratto del genoma molto variabile ed il punto di apertura del mtDNA affinché la DNA polimerasi possa iniziare la duplicazione del DNA. Data la sua elevata variabilità non è possibile utilizzarlo per l'identificazione di specie diverse poiché

specie troppo distanti tra loro accumulano un numero così elevato di mutazioni da andare incontro a saturazione e non è più possibile osservare le mutazioni intermedie andando a sottostimare il grado di divergenza.

I geni mitocondriali, intesi come target della PCR, rappresentano quindi il “gold standard” per l’identificazione di specie animali e, di conseguenza, lo strumento impiegato per il presente progetto. Sulla base dei precedenti studi e delle conoscenze finora ottenute in letteratura, è stato scelto come gene target per il presente progetto il Citocromo c ossidasi I.

1.3.1 IL DNA BARCODING

Il DNA barcoding è un metodo che sfrutta l’amplificazione e il sequenziamento di una porzione del gene codificante per la subunità I della Citocromo Ossidasi utilizzato per l’identificazione di specie della maggior parte delle specie animali (Chen *et al.* 2015).

Il nome si riferisce metaforicamente alla modalità con la quale uno scanner identifica qualsiasi prodotto commerciale attraverso la lettura di un codice a barre che lo identifica in maniera univoca. Analogamente il DNA barcoding si basa sul principio che ogni specie animale possieda un suo codice a barre di DNA. Un ambito in cui l’utilizzo di questo metodo è ormai consolidato è nell’identificazione di specie ittiche. Nel 2005 ha avuto inizio una campagna chiamata “Fish Barcode of Life” (FISH-BOL), un progetto su scala internazionale finalizzato a creare una libreria di sequenze di DNA di riferimento per tutte le specie ittiche. Il metodo analitico predisposto permette

l'amplificazione di una regione di circa 648 bp del gene mitocondriale *COI*. Ad oggi sono state codificate circa 8000 delle 31000 specie di pesci attualmente riconosciute, includendo la maggioranza delle specie più importanti dal punto di vista commerciale (Ward R. D. 2012; Ward *et al.* 2009). Il vantaggio nell'utilizzo di questi marcatori risiede nelle caratteristiche intrinseche proprie del genoma mitocondriale viste precedentemente.

L'analisi del DNA barcoding prevede l'iniziale estrazione degli acidi nucleici dal tessuto muscolare, l'amplificazione dei tratti di genoma riconosciuti universalmente per l'identificazione di quasi tutte le specie animali e una successiva corsa elettroforetica tramite la quale si verifica l'avvenuta amplificazione. A seguito dell'amplificazione del gene di interesse, nell'analisi del DNA barcoding, si procede con il sequenziamento. Il sequenziamento ad oggi più utilizzato è il metodo Sanger che consente di ottenere la sequenza nucleotidica corrispondente al gene target di singoli campioni per volta. Le sequenze ottenute vengono analizzate interrogando dei database per il confronto con altre sequenze disponibili di specie note (Kress & Erickson, 2012). In questo contesto, la completezza delle banche dati disponibili ha un ruolo fondamentale per la corretta assegnazione delle sequenze alla specie di appartenenza (Neto *et al.*, 2021). Questo approccio ha riscosso grande successo in molte discipline come la biologia della conservazione, l'ecologia e le scienze forensi (Bhaskar *et al.* 2020). Come riporta lo studio di Silva *et al.* (2015), nonostante l'utilità del mtDNA, l'identificazione delle specie dovrebbe essere rafforzata dall'uso complementare di un gene nucleare superando così alcuni limiti dell'uso del genoma mitocondriale tra cui l'impossibilità di

identificare individui ibridi o fenomeni di introgressione (trasferimento di genoma mitocondriale tra specie attraverso un ibrido) dal momento che il genoma mitocondriale è in grado di fornire informazioni esclusivamente sulla linea materna. Un chiaro esempio di applicazione del DNA Barcoding è riportato dallo studio realizzato da D'Amato *et al.* (2013), dove è stata verificata l'autenticità delle etichette commerciali in Sud Africa in prodotti a base di carne nei mercati locali. La sequenza genetica identificata come target, è stata quella codificante per l'enzima citocromo ossidasi I ed alcune regioni geniche codificanti per il citocromo b. Tale metodo si è rivelato efficace nell'identificazione di specie, ed ha consentito di evidenziare la presenza di carne di specie animali non dichiarate nel 69,2% (101/146) dei prodotti analizzati. Il procedimento del metodo DNA barcoding è riassunto in Figura 3.

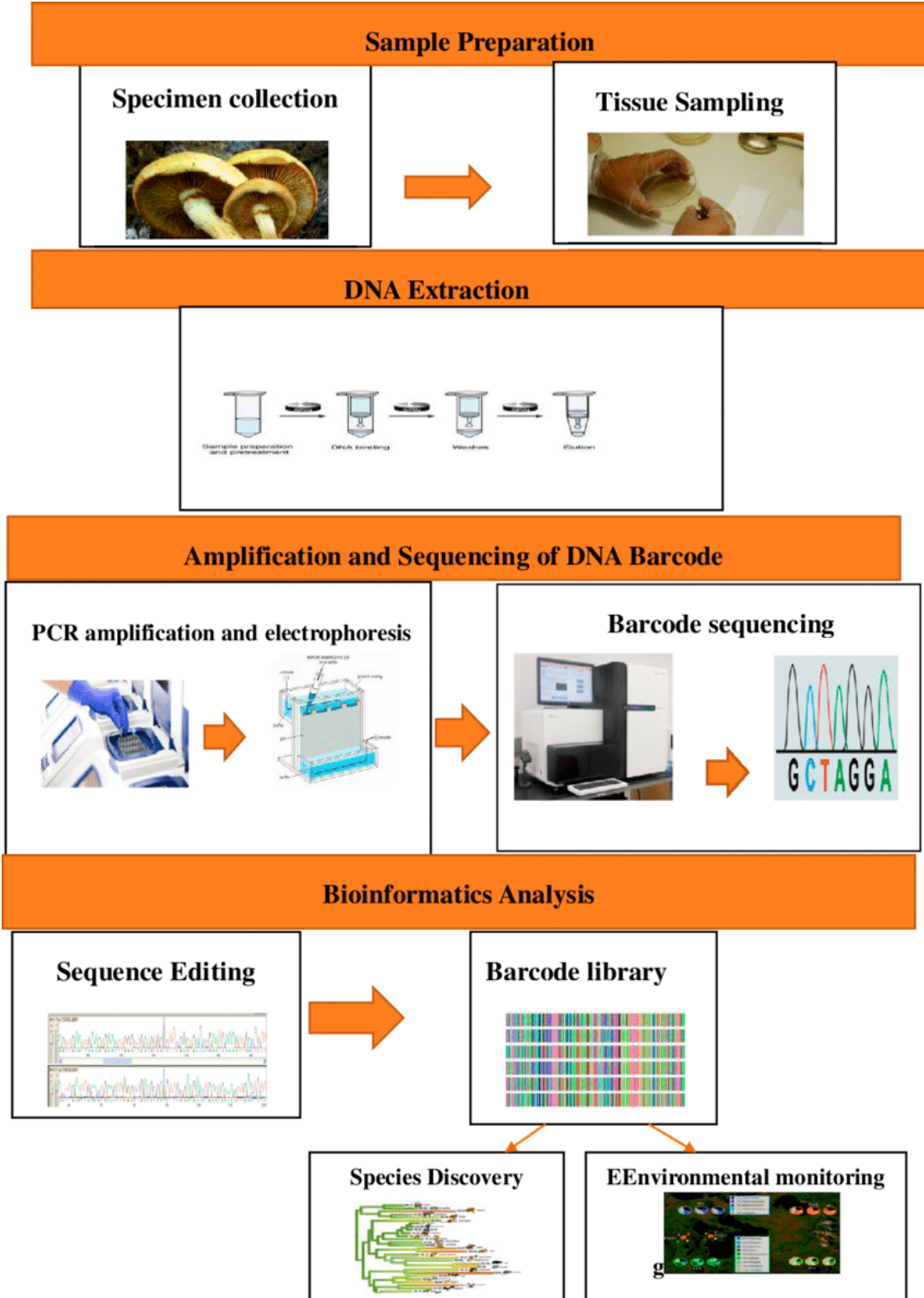


Figura 3 Schema riassuntivo del procedimento del metodo DNA barcoding

1.3.2 II DNA BARCODING GAP

Il target genico del DNA barcoding, per poter essere universalmente efficace, dovrebbe avere tre caratteristiche fondamentali: poter essere applicabile in quasi la totalità delle specie (metodo universale) in modo da poter essere utilizzabile anche per le specie non ancora scoperte, presentare un protocollo semplice di analisi, essere altamente riproducibile tra laboratori, e dovrebbe essere caratterizzato da una elevata risoluzione. Una capacità ad alta risoluzione si riferisce all'abilità di differenziare due specie diverse basandosi sulle differenze interspecifiche tra le sequenze di DNA. Il marker molecolare selezionato dovrebbe mostrare una variabilità interspecifica molto più elevata di quella intraspecifica (Meyer & Paulay, 2005; Wiemers & Fiedler, 2007). L'esistenza di una distanza interspecifica media di almeno 10 volte maggiore rispetto alla distanza genetica intraspecifica media viene definito come "DNA barcoding gap" (Čandek & Kuntner, 2015). La Figura 4 mostra un esempio di un grafico in due situazioni diverse: la prima indica una situazione ideale in cui è presente una differenza sostanziale tra divergenza intraspecifica e divergenza interspecifica. In questo caso è possibile distinguere le specie. La seconda rappresenta una situazione in cui il DNA barcoding gap non è presente, perciò non è possibile distinguere le specie.

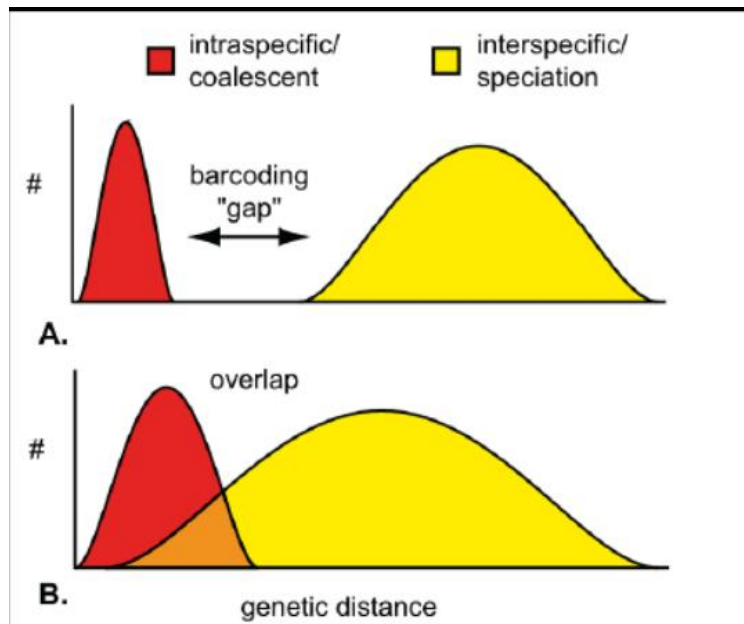


Figura 4 Schema del "Barcoding gap". In rosso la variabilità intraspecifica, in giallo la variabilità interspecifica.

1.4 LA PCR NELL'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE

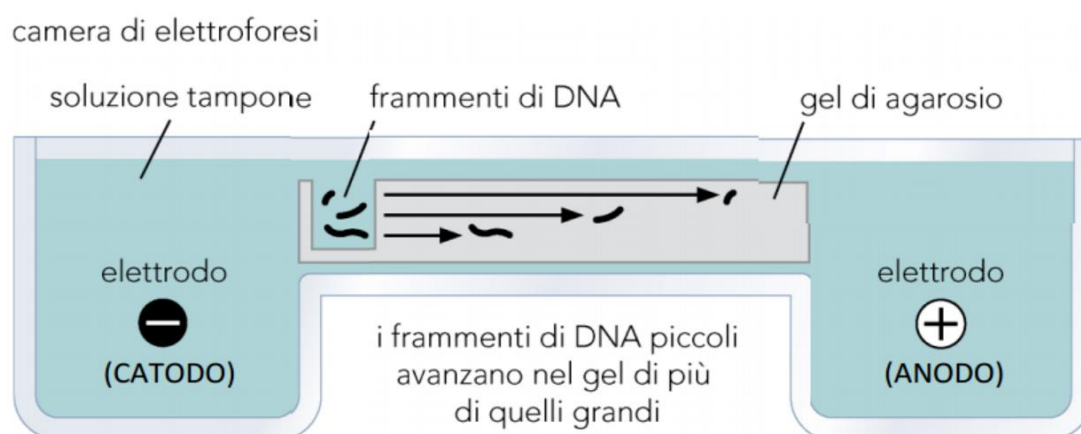
La Polymerase Chain Reaction (PCR), è un metodo enzimatico in vitro che consente l'amplificazione (teoricamente esponenziale) di una specifica sequenza target di DNA.

La PCR standard si articola in tre fasi:

- i) Denaturazione (per permettere l'apertura della doppia elica);
- ii) Fase di attacco o annealing ad una temperatura variabile in relazione ai primer utilizzati (che permette l'attacco di oligonucleotidi a singolo filamento alle regioni target che delimitano la regione da amplificare);
- iii) Allungamento (la DNA polimerasi sintetizza il filamento stampo in direzione 5'-3').

Queste fasi vengono ripetute ciclicamente per un certo numero di volte, circa 30-35 (Rahman *et al.* 2013).

L'avvenuta amplificazione (presenza degli ampliconi della dimensione attesa e stima delle concentrazioni del prodotto amplificato) può essere rilevata effettuando un'elettroforesi su gel d'agarosio che sfrutta la capacità di molecole acide a carica negativa (quali il DNA e di conseguenza gli ampliconi di PCR) di migrare attraverso un campo elettrico verso il polo positivo a velocità inversamente proporzionali alle dimensioni determinando una separazione visiva delle molecole per dimensioni (Figura 5). Tali bande, ovvero gli ampliconi, sono poi visualizzabili ai raggi UV grazie all'utilizzo di intercalanti del DNA.



Il DNA, carico (-) a pH neutro, migra verso il polo positivo (anodo)

Figura 5 Schema della migrazione del DNA nel gel d'agarosio

(FONTE: <http://elettroforesi.weebly.com/elettroforesi-su-gel-di-agarosio.html>)

Questa metodica ha permesso l'analisi di diversi marcatori molecolari e ha trovato ampio utilizzo negli ultimi decenni in svariati ambiti della diagnostica umana, veterinaria e della sicurezza alimentare. Oltre alla PCR standard, per lo più qualitativa

e a cui deve seguire necessariamente il sequenziamento degli ampliconi, molte sue varianti (non oggetto di questo studio) sono ad oggi diversamente utilizzate per l'identificazione di specie e permettono o di evitare il sequenziamento o una valutazione quantitativa. Ad esempio:

- PCR-RFLP: consiste in un taglio enzimatico degli ampliconi di PCR e nella visualizzazione dei pattern di restrizione su gel. Data la conoscenza a priori dei siti di taglio nel gene in analisi, sono attesi pattern di bande specie-specifici che permettono l'identificazione delle specie senza necessità di procedere al sequenziamento. È un approccio meno costoso, ma anche meno accurato. Rimane tuttavia utilizzato in molti ambiti come ad esempio nello studio di Vaithyanathan *et al.* (2021), dove è stato amplificato il gene rRNA mitocondriale *16S* ed è stata applicata la tecnica RFLP per l'identificazione di carne di cammello non dichiarata.
- Real Time PCR: tecnica di amplificazione di brevi tratti di DNA che permette una quantificazione in tempo reale ad ogni ciclo delle molecole prodotte mediante la rilevazione di fluorescenza data da un intercalante introdotto durante la reazione. L'amplificazione del DNA mitocondriale con questa metodica risulta essere molto efficace anche per l'identificazione di mammiferi come per esempio i cervidi. Dallo studio condotto da Pan *et al.* (2020), la sensibilità della Real-time PCR, combinata con l'elevata velocità, robustezza e affidabilità ha confermato l'adeguatezza di questo metodo per l'identificazione delle corna di cervo.

- Multiplex-PCR: è una tecnica multilocus che permette l'amplificazione simultanea di più loci. Viene in genere utilizzata quando si hanno diverse coppie di primer diagnostiche per specie diverse in grado di generare bande di dimensioni riconoscibili tramite elettroforesi. Riduce drasticamente i tempi di analisi permettendo di effettuare un'unica amplificazione su più loci per campione. La multiplex PCR risulta molto efficace nell'identificazione di specie animali in prodotti a base di carne cruda in quanto riesce a distinguere in modo accurato, con un'elevata sensibilità e con un minor dispendio di tempo ciascuna specie, in particolare: cavalli, asini, suini e diversi ruminanti (Alikord *et al.* 2017).
- ddPCR (Droplet Digital PCR): reazione di amplificazione quantitativa in droplets che avviene in goccioline date dall'emulsione di acqua in olio. Deconinck *et al.* (2021) hanno descritto l'utilizzo di questa tecnica per l'identificazione del salmone in prodotti di origine mista o omogeneizzati. Pur avendo buone potenzialità, questo metodo rappresenta ancora elevati limiti nella messa a punto, a causa della sua complessità oltre che per i costi elevati.

2. SCOPO DELLA TESI

La necessità di verificare l'autenticità dell'etichettatura in prodotti di origine animale destinati al consumo umano e di indagare la presenza di eventuali frodi commerciali ha promosso negli ultimi anni lo sviluppo di metodi e la realizzazione di piani di campionamento volti ad identificare le specie animali in taluni prodotti alimentari. Il presente progetto ha lo scopo di individuare l'approccio metodologico migliore per l'identificazione delle specie animali in alimenti contenenti carni di selvaggina commercializzati nell'area geografica della provincia autonoma di Bolzano e di verificare l'autenticità delle etichette. L'approccio metodologico utilizzato è basato sull'amplificazione e il sequenziamento diretto del gene *COI*, quindi tramite metodologia basata sul DNA Barcoding. Le attività analitiche si sono svolte presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE) in collaborazione con l'Azienda Sanitaria Provinciale di Bolzano nel periodo maggio-settembre 2022.

3. MATERIALI E METODI

3.1 CAMPIONI

Tutti i campioni analizzati provengono dal territorio della Provincia Autonoma di Bolzano, e le materie prime animali provengono sia da allevamenti che da attività venatorie.

I campioni presi in esame, sono stati suddivisi in:

- **campioni di riferimento**: carne fresca la cui specie è stata identificata morfologicamente dal Veterinario ufficiale al momento dell'ispezione igienico-sanitaria. Le specie di riferimento prese in esame sono: Cervo (*Cervus elaphus*), Capriolo (*Cervus capreolus*), Camoscio (*Rupicapra rupicapra*), Cinghiale (*Sus scrofa*) e Daino (*Dama dama*). Per ogni specie sono stati inviati due campioni di riferimento (tranne per il daino che presenta solamente un campione di riferimento a causa della difficile reperibilità della specie dovuto al divieto di caccia per gran parte del periodo estivo) per un totale di 9 campioni.
- **campioni incogniti**: porzioni di animali fresche o prodotti lavorati reperiti in commercio o alla produzione che presentano in etichetta una o più specie. Totale campioni analizzati 43: 25 monospecie (20 Cervo, 3 Capriolo, 2 Cinghiale), 18 multispecie (9 Cervo, 4 Capriolo, 3 Cinghiale, 2 Camoscio).

Per la raccolta dei dati è stato creato un modello di accompagnatoria *ad hoc* da compilare e allegare a ciascun prodotto inviato contenente informazioni riguardo al campione in modo da distinguere ciascun prodotto in maniera univoca. Un esempio del modulo definito è riportato in Figura 7.

Il campione, una volta pervenuto in Istituto, viene identificato univocamente da un n° di registro (22BIO/#CAMPIONE).

Per collezionare e monitorare lo stato di avanzamento delle analisi effettuate su ogni campione è stata creata una tabella in un file Excel contenente tutte le informazioni necessarie ed i metadati associati. In particolare, sono state trascritte le seguenti informazioni:

- n° di registro con il quale è stato accettato il campione;
- la specie dichiarata in etichetta;
- composizione del prodotto (Monospecie/Multispecie);
- la matrice del prodotto (muscolo, affumello, salame...);
- il paese di provenienza dell'animale;
- il kit di estrazione con il quale è stato estratto il DNA dalla matrice;
- la data in cui è stato estratto il DNA;
- la qualità di estrazione (rapporto A_{260}/A_{280});
- la quantità di DNA estratta, espressa in ng/ μ L;
- la data in cui è stato amplificato il campione;
- se il campione è stato sequenziato (espresso con SI/NO)

- la data di sequenziamento;
- la specie a cui corrisponde la sequenza incognita dopo averla confrontata con la banca dati online BOLD;
- se l'etichettatura è concorde o meno con la specie identificata (espresso con SI/NO).

In Figura 6 viene riportata un'estrapolazione di tale tabella.

N° registro	Specie in etichetta	Composizione prodotto	Nome specie Blast	Etichettatura Concorde?
22BIO/683	Capriolo	Monospecie	Cervus capreolus	Si
22BIO/694	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/695	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/696	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/697	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/698	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/699	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/700	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/703	Capriolo	Monospecie	Cervus capreolus	Si
22BIO/715	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/716	Camoscio	Monospecie	Rupicapra rupicapra	Si
22BIO/717	Capriolo	Monospecie	Cervus capreolus	Si
22BIO/718	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/719	Cervo (68g), Suino (68g)	Multispecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/786	Cinghiale	Monospecie	Sus scrofa	Si
22BIO/787	Cinghiale	Monospecie	Sus scrofa	Si
22BIO/788	Cinghiale	Monospecie	Sus scrofa	Si
22BIO/789	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/790	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/791	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/792	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/793	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/795	Cervo (50%), suino (36%), Bovino (7%)	Multispecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/796	Suino (101g), Cervo (44g)	Multispecie	Cervus elaphus & Sus scrofa	Si
22BIO/797	Camoscio (67g), Bovino (52g)	Multispecie	Cervus elaphus	NO
22BIO/798	Cervo (67g), Bovino (52g)	Multispecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/814	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si
22BIO/815	Suino (129g), Cervo (35g)	Multispecie	Sus scrofa	Si
22BIO/837	Capriolo	Monospecie	Cervus capreolus	Si
22BIO/838	Cervo	Monospecie	Cervus elaphus	Si

Figura 6 Tabella di registrazione dei campioni, le celle in giallo corrispondono ai campioni di riferimento. Immagine estrapolata dalla tabella in Allegato 1 (Fonte propria)

Informazioni Generali

Richiedente ASBU ASBR ASBZ ASME
Motivo Accertamento Ricerca - progetto N° 11 SABES
Verbalizzante _____
Telefono _____
Indirizzo di posta elettronica _____

Informazioni del campione

1) Carne di selvaggina

Specie indicata _____
 Selvatico D'allevamento
Stato di conservazione Refrigerato T ambiente Congelato
Abbattuto il _____
Luogo prelievo _____ **Data Prelievo** _____
Origine _____
(se presente allegare foto attestato persona formata)

2) Selvaggina lavorata

Descrizione prodotto
(affumello, salame, ragù) _____

Figura 7 Accompagnatoria contenente informazioni relative ad un determinato campione (Fonte propria)

3.2 ESTRAZIONE

Una volta registrati i campioni, sono state allestite delle prove preliminari finalizzate ad identificare il metodo di estrazione di DNA più efficace, utilizzando campioni di riferimento.

A questo proposito sono state eseguite delle estrazioni di DNA da 6 matrici differenti di carne di cervo e capriolo con 3 kit diversi (*Blood&Tissue*[®] Qiagen, *Wizard*[®] *Magnetic DNA Purification System for Food* Promega, *Mini kit*[®] Qiagen) e si sono valutate le relative efficienze. Il criterio di valutazione si è basato sulla quantità di DNA estratta misurata attraverso analisi spettrofotometrica.

Come riportato in Tabella 1, si evince che il kit *Blood&Tissue*[®] Qiagen permette di ottenere una maggiore quantità di DNA, tuttavia, dopo aver amplificato ed effettuato l'elettroforesi le bande non erano ben visibili. Il grado di purezza del DNA estratto, in tal caso, è basso e verosimilmente contiene sostanze che inibiscono la reazione di PCR. Lo stesso risultato è stato osservato per il *Mini kit*[®]. Al contrario, con il kit *Wizard*[®] *Magnetic DNA Purification System for Food*, anche se la resa di DNA è risultata inferiore, le bande ottenute erano ben visibili e i risultati delle amplificazioni non venivano compromessi. Quest'ultimo è stato perciò scelto come metodo di estrazione per tutti i campioni.

Il protocollo di estrazione prevede una pesata di 200 mg di materiale, preventivamente omogenato, a cui sono aggiunti 500 µL di *Lysis Buffer A*, un buffer lisante, e 5 µL di *Rnase-A* che degrada l'RNA. Successivamente vengono aggiunti 250 µL di *Lysis Buffer*

B, si vortexa per 10-15 secondi e poi si lascia per 10 minuti ad incubare a temperatura ambiente (22-25°C). Si aggiungono poi 750 µL di *Precipitation Solution*, si mescola vigorosamente e si centrifuga per 10 minuti a 13000 rpm.

Si trasferisce 1 mL di surnatante su una nuova provetta eppendorf e si aggiungono 50 µL di *Magnesil PMOs*, contenente delle piccole sfere magnetiche in grado di legarsi al DNA. Infine, si mescola per inversione aggiungendo poi un volume di 0,8 mL di isopropanolo, si mescola la provetta per inversione per 10-15 volte e si lascia incubare per 5 minuti a temperatura ambiente.

I tubi Eppendorf vengono quindi posizionati su un apposito supporto magnetico chiamato *MagneSphere Technology Magnetic Separation Stand*[®] e lasciate a riposo per un minuto in modo che le sfere abbiano il tempo di depositarsi sulla parete della provetta, in prossimità di un magnete. Una volta che le sfere sono adese si elimina la soluzione.

Prelevato il liquido si trasferisce la provetta su un supporto non magnetico e si aggiungono altri 250 µL di *Lysis Buffer B*, per eliminare eventuali contaminanti o

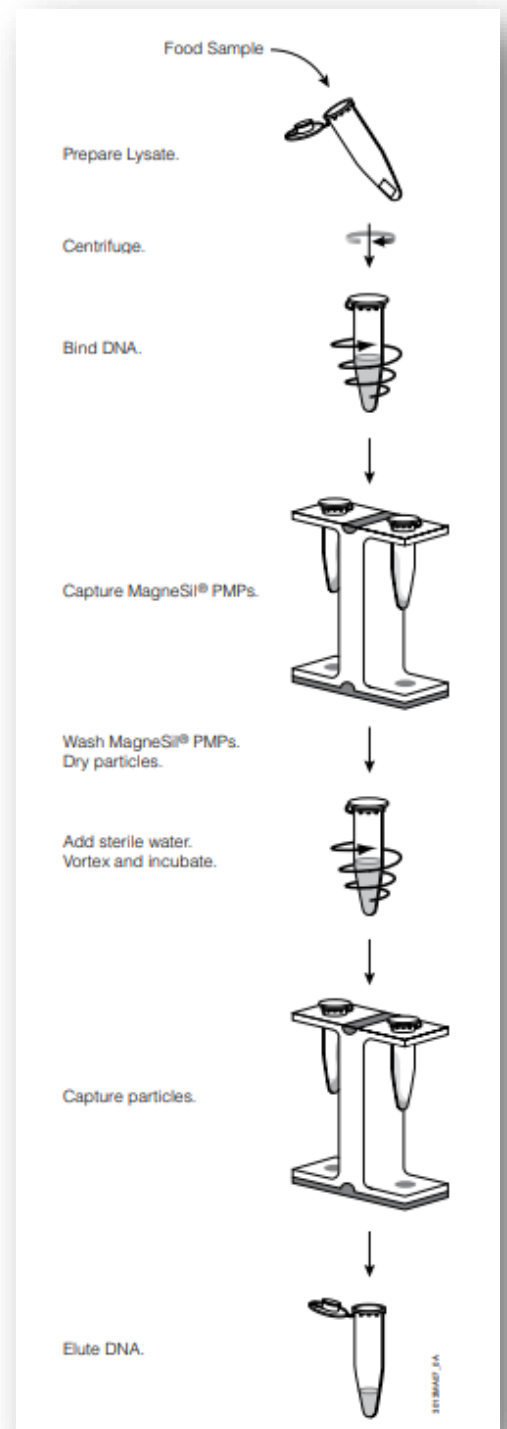


Figura 6 Schema riassuntivo del protocollo di estrazione del kit Promega (Fonte: Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food)

inibitori. Si riposiziona nuovamente la provetta nel supporto magnetico, si aspetta un altro minuto e si rimuove la parte liquida. Lo stesso procedimento appena descritto viene effettuato con 1 mL di etanolo al 70% per 3 volte in modo da lavare ed eliminare proteine, polisaccaridi e ulteriori contaminanti. Si lascia quindi evaporare ogni residuo di etanolo a 65°C in un termoblocco per 10 minuti. Il DNA che sarà ancora legato alle sfere magnetiche viene eluito in 100 µL di nuclease-free water attraverso mescolamento e incubazione nuovamente a 65°C per 5 minuti. Si riposiziona la provetta nel supporto magnetico, si aspetta un minuto e si trasferisce il liquido, questa volta contenente il DNA, in una nuova provetta, ottenendo così il campione di DNA estratto dalla matrice organica di origine animale.

	<u>Blood&Tissue®</u>	<u>Wizard®</u>	<u>Mini kit®</u>
	Quantità ng/µL	Quantità ng/µL	Quantità ng/µL
<u>Cervo 1</u>	96,95	22,81	43
<u>Cervo 2</u>	51,68	13,83	35,22
<u>Cervo 3</u>	93,78	14,78	27,98
<u>Cervo 4</u>	241,17	31,32	53,51
<u>Cervo 5</u>	58,13	69,47	56,27
<u>Capriolo</u>	25,01	33,06	29,27

Tabella 1 Rappresentazione delle quantità estratte dai campioni di prova (5 cervi, 1 capriolo) espressi in ng/µL per i diversi kit di estrazione

3.3 QUANTIFICAZIONE DEL DNA

In seguito all'estrazione, è stata determinata la concentrazione del DNA mediante la spettrofotometria di assorbanza degli UV utilizzando lo strumento *Bio-Rad SmartSpec Plus UV/Vis Spectrophotometer 200-800 nm DNA RNA*[®]. Il DNA assorbe la radiazione ad una lunghezza pari a 260 nm (A_{260}) e il valore di assorbanza di 1,0 corrisponde a 50 µg di DNA a doppio filamento per mL, ovvero 50 ng/µL. La purezza del DNA calcolata attraverso il rapporto di assorbanza a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) che deve variare tra 1,8 e 1,9 (Hyung *et al.* 2005). Un rapporto inferiore a 1,8 indica contaminazioni da proteine e fenoli o un'errata estrazione.

3.4 AMPLIFICAZIONE DEL GENE *COI*

Una volta estratto e quantificato il DNA, viene preparata la miscela di reazione per ciascun campione da amplificare. I volumi dei reagenti da utilizzare per un singolo campione, sono stati calcolati a partire dalle concentrazioni consigliate dall'Azienda produttrice della Taq-Polimerasi utilizzata e sono schematizzati in tabella 2.

<u>Reagente</u>	<u>Concentrazione iniziale</u>	<u>Concentrazione finale</u>	<u>µL per una reazione</u>
<u>Acqua MBG</u>	-	-	36
<u>Buffer (senza MgCl₂)</u>	10X	1X	5
<u>MgCl₂</u>	50 µM	3 µM	3
<u>dNTPs mix</u>	10 µM	0,2 µM	1
<u>Primer: COIfishF1</u>	10 µM	0,2 µM	1
<u>Primer: COIfishR1</u>	10 µM	0,2 µM	1
<u>Gold Taq DNA Polymerase</u>	5 U/µL	0,025 U/µL	0,25
<u>VOLUME TOT MIX</u>			47,25
<u>DNA</u>			2,75
<u>VOLUME TOTALE</u>			50

Tabella 2 Composizione della miscela di reazione (Fonte: AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, LD, 2007)

I primer universali utilizzati permettono di amplificare un tratto del gene *COI* specie-specifico. Le sequenze sono riportate in Tabella 3 (Baldwin *et al.* 2009).

Primer Forward: COIfishF1	5'- TCA ACY AAT CAY AAA GAT ATY GGC AC - 3'
Primer Reverse: COIfishR1	5'- ACT TCY GGG TGR CCR AAR AAT CA - 3'

Tabella 3 Primer universali utilizzati per l'amplificazione dei campioni (Fonte: Baldwin *et al.* 2009).

Preparata la miscela di reazione, per ogni singolo campione vengono aliquotati 47,25 μL in provette in cui verranno aggiunti 2,75 μL di DNA del campione estratto. L'analisi prevede il caricamento dei campioni e di 4 controlli ovvero:

- **Positive Process Control (PPC)**: controllo di processo che viene co-estratto in ogni seduta di estrazione ed attesta la qualità della fase di estrazione;
- **Negative Process Control (NPC)**: controllo che verifica che durante la fase di estrazione non ci siano state contaminazioni;
- **Positive Template Control (PTC)**: controllo di amplificazione che verifica il corretto funzionamento dello strumento durante l'amplificazione del campione e l'avvenuta amplificazione;
- **Negative Template Control (NTC)**: controllo che verifica che non ci siano state contaminazioni durante la fase di caricamento e di amplificazione dei campioni.

Le provette vengono quindi inserite nel termociclatore (*S1000 Thermal Cycler*[®]) e si impostano le condizioni di amplificazione come rappresentato in Tabella 4 (Baldwin *et al.* 2009).

<u>FASE</u>	<u>TEMPERATURA/TEMPO</u>	<u>N° CICLI</u>
<u>ATTIVAZIONE POLIMERASI</u>	95°/ 2 min	1
<u>DENATURAZIONE</u>	94°/ 30 sec	35
<u>ANNEALING</u>	52°/ 30 sec	
<u>ESTENSIONE</u>	72°/ 1 min	
<u>ESTENSIONE FINALE</u>	72°/ 10 min	1
<u>REFRIGERAZIONE</u>	4°/ ∞	1

Tabella 4 Illustrazione del programma suddiviso tra le fasi caratterizzate dalla temperatura, la tempistica e il numero di cicli (Fonte: Baldwin et al. 2009).

3.5 ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO

Una volta amplificati, i campioni vengono separati attraverso una corsa elettroforetica. Sono preparate delle aliquote di ciascun campione e dei quattro controlli su una piastra da 96 pozzetti. Al loro interno vengono inseriti 10 µL di campione e 3 µL di una soluzione ottenuta con 100 µL dell'intercalante Midori Green Direct e una soluzione composta da un addensante e coloranti. L'intercalante si lega al DNA e grazie ad esso gli amplificati sono visualizzabili come bande; l'addensante permette la sedimentazione del DNA nei pozzetti del gel in modo che non si disperda durante la fase di caricamento. Una volta preparata la miscela si procede con l'aggiunta di 12,5 µL di soluzione all'interno degli appositi pozzetti del gel e grazie allo strumento *Bio Rad Power Pac 200* si applica un potenziale di 110 V per circa 45/50 minuti. Oltre ai campioni si

inserisce in un pozzetto anche un Marker composto da frammenti di lunghezze note e diverse con lo scopo di poter verificare a fine corsa la lunghezza dei frammenti presenti nelle bande dei campioni. Terminata la corsa elettroforetica con uno strumento che consente, attraverso l'utilizzo di UV, di fotografare l'intero gel identificando la posizione delle bande, si acquisisce l'immagine del gel (*Molecular Imager Gel Doc XR+ System with Image Lab Software*[®], Biorad). Un esempio di corsa elettroforetica è rappresentato in Figura 8. Secondo quanto ci si aspetta, si dovrebbero visualizzare nell'immagine un numero di bande pari al numero di campioni inseriti, più i due controlli positivi. La mancata amplificazione dei controlli positivi, può essere attribuibile a problemi verificatisi o nella fase di amplificazione o nella fase di estrazione. Si ripete l'analisi a partire dalla fase identificata dal controllo non conforme. Se i campioni dovessero risultare nuovamente negativi, si procede con un'analisi *ex novo* del campione. Per poter essere sequenziato, un campione deve quindi mostrare una banda ben distinta con una lunghezza di circa 650 bp.

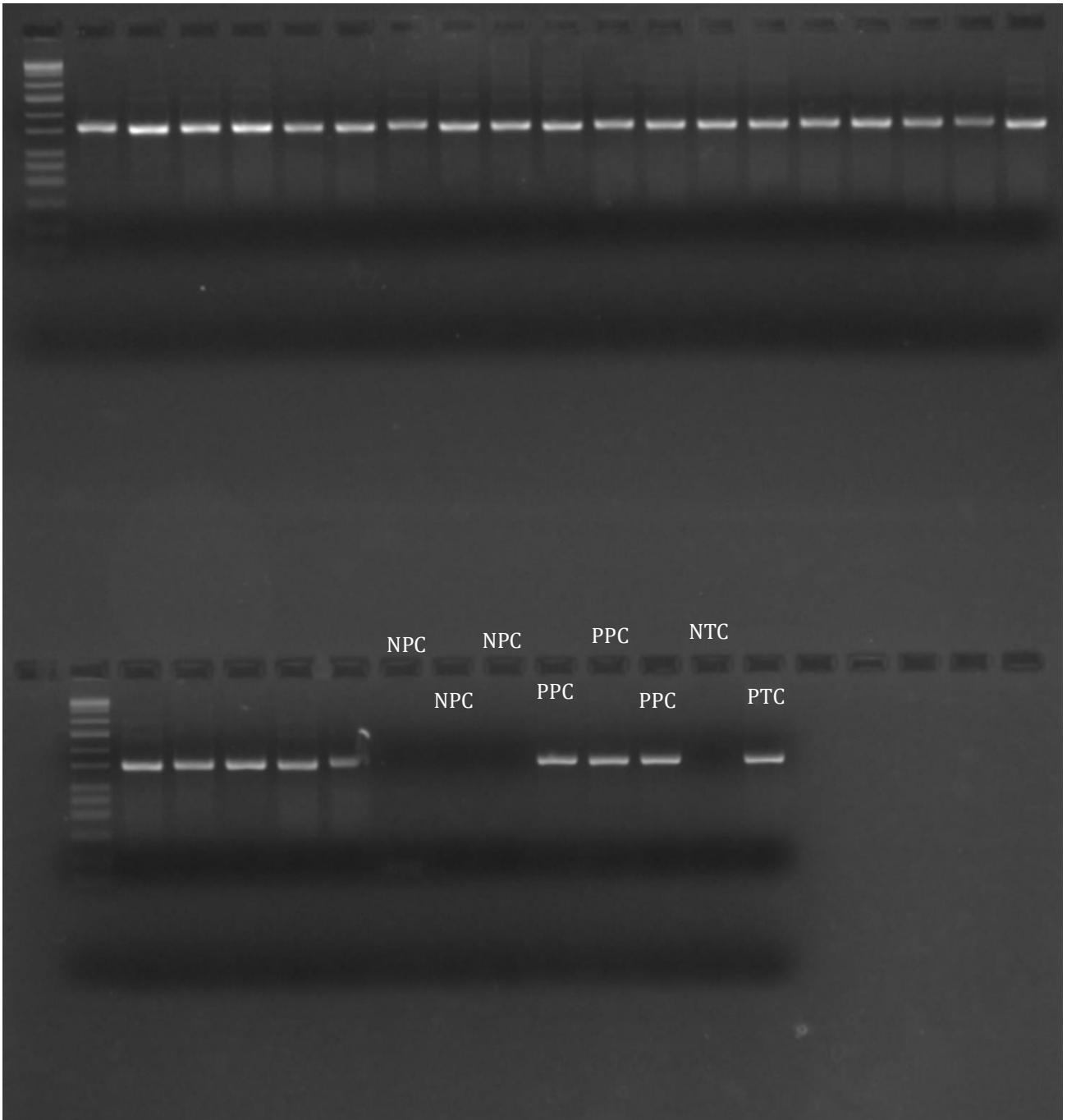


Figura 8 Corsa elettroforetica di 24 campioni (prima riga di pozzetti più i primi 5 della seconda) con i relativi NPC (3), PPC (3), PTC, NTC (Tot. 32 caricamenti su gel, Fonte propria)

3.6 SEQUENZIAMENTO SANGER

La purificazione dell'amplificato ed il successivo sequenziamento Sanger vengono eseguiti nel Laboratorio dell'IZSVe preposto a tali analisi, previa predisposizione dei campioni come richiesto da procedura ovvero:

- predisposizione aliquota del campione amplificato;
- aliquota dei primer forward e reverse a concentrazione nota (3,3 μM);
- allegato foto gel con amplificato.

Il prodotto di PCR viene sequenziato in entrambe le direzioni mediante *Cycle Sequencing Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems)*[®] ed elettroforesi capillare su sequenziatore automatico *ABI3130 (Applied Biosystems)*[®].

3.7 ANALISI BIOINFORMATICA DEI DATI

Gli aplotipi mitocondriali ottenuti dall'unione dei sequenziamenti in *forward* e *reverse* di ogni campione sono stati confrontati con quelli presenti nel database GenBank, già attribuiti a specie precedentemente identificate, mediante un'analisi Blast. Si ottiene così un'identificazione sulla base della percentuale di similarità tra la sequenza incognita e quelle presenti online. Oltre alle sequenze, vengono inviati dal laboratorio di competenza anche i relativi cromatogrammi. Le sequenze sono state poi analizzate attraverso il programma MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versione 11 (Tamura *et al.*, 2021). Le stesse sono state allineate mediante ClustalW

(Kimura M. 1980). Il calcolo delle distanze intra e inter-specifiche è stato eseguito mediante la funzione Distance, utilizzando il modello Kimura a 2 parametri (K2P). In seguito, sono stati creati due cladogrammi Neighbor Joining con modello Kimura a 2 parametri (K2P), uno per i campioni monospecie, l'altro per i campioni multispecie (Kimura M. 1980). Una volta identificate, si confronta il risultato ottenuto con quanto dichiarato in etichetta.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Le frodi alimentari non solo possono rappresentare un rischio per la salute e la sicurezza del consumatore, ma possono violare quelle che sono le credenze religiose, le scelte alimentari e lo stile di vita di ciascun consumatore avente il diritto di essere informato e conoscere la composizione e l'origine di ciascun alimento acquistato. Il DNA barcoding ha già riscontrato molto successo in altri settori alimentari, soprattutto in quello ittico (D. C. Carvalho *et al.*, 2011; S. C. de Carvalho *et al.*, 2020; Gomes *et al.*, 2019; Nehal *et al.*, 2021; Pereira *et al.*, 2011). L'obiettivo di questa tesi è l'individuazione di un metodo biomolecolare efficace, veloce ed economico per l'identificazione di specie in prodotti a base di carne di selvaggina e la verifica della corretta etichettatura su tali prodotti.

4.1 ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DEL DNA

I campioni sono stati estratti utilizzando il kit *Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food Promega*. Il DNA estratto è stato quantificato e ne è stata verificata la purezza tramite lettura spettrofotometrica. I risultati sono riportati per tutte e tre le tipologie di campioni:

1) MATERIALE DI RIFERIMENTO:

<u>N° registro</u>	<u>Quantità ng/μL</u>	<u>Purezza del DNA estratto (A_{260/280})</u>
22BIO/683	30	2,5
22BIO/716	24,74	1,45
22BIO/718	30,88	1,67
22BIO/717	24,47	1,96
22BIO/715	25,32	1,79
22BIO/787	11,14	1,47
22BIO/786	10,44	1,52
22BIO/839	20,26	1,6
22BIO/1144	23,12	1,73

Tabella 5 Quantificazione e qualità dei campioni di riferimento estratti (Fonte propria)

2) MONOSPECIE:

<u>N° registro</u>	<u>Quantità ng/μL</u>	<u>Purezza del DNA estratto (A_{260/280})</u>
22BIO/703	33,06	1,38
22BIO/700	69,47	1
22BIO/699	31,32	1,7
22BIO/698	14,78	1,2
22BIO/697	13,83	2,5
22BIO/696	22,81	1,81
22BIO/694	27,26	2,63
22BIO/695	19,75	2,95
22BIO/788	19,63	1,84
22BIO/789	19,38	1,43
22BIO/790	17,73	1,58
22BIO/791	11,05	1,51
22BIO/792	10,72	1,38
22BIO/793	29,21	1,17
22BIO/814	23,48	1,61
22BIO/842	40,2	1,61
22BIO/841	43,78	1,79
22BIO/840	65,19	1,52

22BIO/838	23,27	1,48
22BIO/837	23,67	1,67
22BIO/1093	85,55	1,81
22BIO/1092	23,25	1,58
22BIO/1142	13,49	1,54
22BIO/1143	17,25	1,53
22BIO/1145	15,24	1,60

Tabella 6 Quantificazione e qualità dei campioni monospecie (Fonte propria)

3) MULTISPECIE:

<u>N° registro</u>	<u>Quantità ng/μL</u>	<u>Purezza del DNA estratto (A_{260/280})</u>
22BIO/719	62,62	1,88
22BIO/798	32,56	1,31
22BIO/795	96,11	1,81
22BIO/796	62,5	1,78
22BIO/797	18,52	1,27
22BIO/815	47,89	1,4
22BIO/848	85,68	1,72
22BIO/846	99,22	1,84
22BIO/847	1,82	37,91
22BIO/845	108,04	1,79
22BIO/844	70,45	1,71
22BIO/843	5,73	1,85
22BIO/962	35,37	1,66
22BIO/1091	61,28	1,67
22BIO/1090	177,9	1,31
22BIO/1089	103,88	1,77
22BIO/1088	165,42	1,4
22BIO/1087	112,33	1,75

Tabella 7 Quantificazione e qualità dei campioni multispecie (Fonte propria)

La quantità di DNA estratto dai campioni monospecie è nettamente inferiore rispetto a quella dei multispecie. Questo risultato dimostra che il kit *Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food* potrebbe essere più efficiente nell'estrazione del DNA da matrici lavorate.

4.2 AMPLIFICAZIONE, SEQUENZIAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DI SPECIE

Campioni monospecie

I materiali di riferimento sono stati amplificati e sequenziati e le sequenze ottenute sono state confrontate con il database BOLD. La stessa procedura è stata applicata per i campioni incogniti monospecie per i quali la contraffazione è stata rilevata per un solo campione (1 di 25, 4%).

In particolare, il campione 22BIO/840 dichiarava in etichetta la presenza della specie *Cervus capreolus* (Capriolo) mentre il confronto con la banca dati ha rilevato la presenza della specie *Cervus elaphus* (Cervo). I risultati sono riassunti nella Tabella 8.

Questa bassa percentuale di prodotti non conformi era parzialmente attesa per i campioni monospecie in quanto si trattava per lo più tagli di carne per i quali la contraffazione è più difficile. Essi possono infatti avere dimensioni, consistenze e tratti morfologici più riconoscibili tra specie diverse. Resta interessante che la contraffazione abbia interessato un prodotto di capriolo, specie che si ritrova più raramente e che è

apparentemente stata sostituita con una specie più presente a livello commerciale (e probabilmente meno costosa).

N° registro	Specie in etichetta	Specie rilevata	Etichettatura Concorde?
22BIO/716*	Camoscio	<i>Rupicapra rupicapra</i>	✓
22BIO/718*	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/717*	Capriolo	<i>Cervus capreolus</i>	✓
22BIO/715*	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/787*	Cinghiale	<i>Sus scrofa</i>	✓
22BIO/786*	Cinghiale	<i>Sus scrofa</i>	✓
22BIO/839*	Camoscio	<i>Rupicapra rupicapra</i>	✓
22BIO/683*	Capriolo	<i>Cervus capreolus</i>	✓
22BIO/1144*	Daino	<i>Dama dama</i>	✓
22BIO/703	Capriolo	<i>Cervus capreolus</i>	✓
22BIO/700	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/699	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/698	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/697	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/696	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/694	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/695	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/788	Cinghiale	<i>Sus scrofa</i>	✓
22BIO/789	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/790	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/791	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/792	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/793	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓

22BIO/814	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/842	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/841	Cinghiale	<i>Sus scrofa</i>	✓
22BIO/840	Capriolo	<i>Cervus elaphus</i>	✗
22BIO/838	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/837	Capriolo	<i>Cervus capreolus</i>	✓
22BIO/1093	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/1092	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/1142	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/1143	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/1145	Cervo	<i>Cervus elaphus</i>	✓

Tabella 8 Rappresentazione dei campioni monospecie dei quali è stata verificata la conformità dell'etichetta (* materiali di riferimento) Fonte propria.

Campioni multispecie

Per i campioni multispecie o altamente lavorati i risultati ottenuti sono preliminari e richiederanno ulteriori approfondimenti in quanto oltre ad alcuni problemi riscontrati, il sequenziamento diretto non è esaustivo nell'identificazione della possibile frode.

I maggiori problemi riscontrati riguardavano la qualità del materiale genetico purificato. Questi prodotti infatti subiscono molte modifiche nel corso delle lavorazioni; ad esempio, nei prodotti pastorizzati, la matrice viene trattata a temperature vicino ai 120°C (Fabrizio Anniballi *et al.* 2014). A questi valori di temperatura il DNA viene degradato e frammentato e gli estratti purificati presentavano in elettroforesi il caratteristico *smear*.

Le amplificazioni perciò hanno fornito rese molto eterogenee sulla base di quante molecole template integre erano disponibili negli estratti purificati.

Inoltre, nei prodotti multispecie non sempre le diverse carni hanno una distribuzione omogenea per questa ragione, i campioni sono stati omogenati in piastre (Figura 9) in

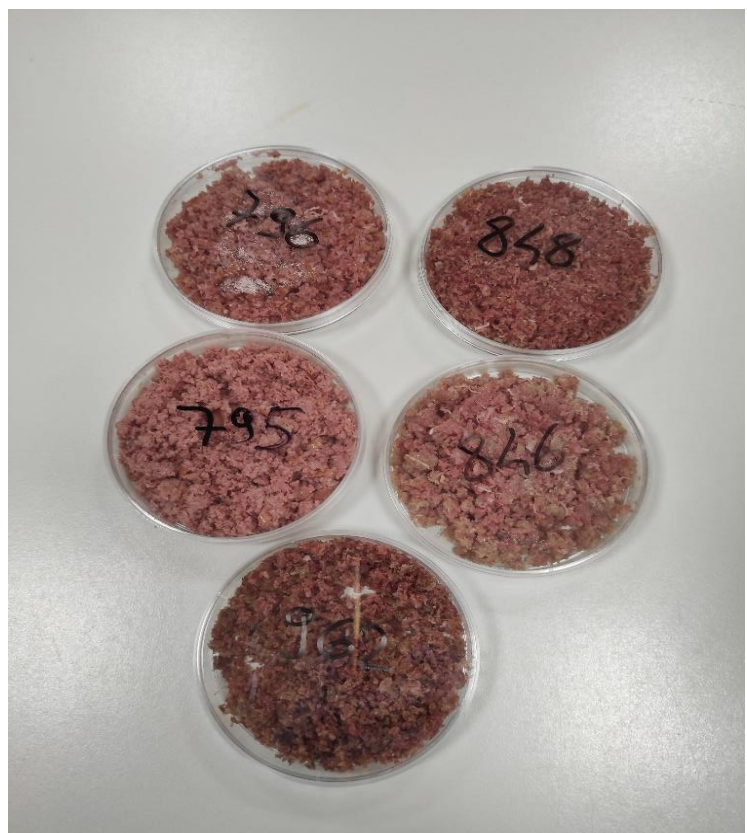


Figura 9 Campioni multispecie tritati pronti per la fase di estrazione (Fonte propria).

modo da renderli il più omogenei possibile.

Dall'analisi Blast delle sequenze consenso è stato possibile identificare una sola specie di quelle dichiarate in etichetta in quanto il sequenziamento diretto degli ampliconi di PCR produce un'unica sequenza per campione. Tuttavia, la presenza di altre specie viene ben evidenziata dalla presenza di doppi picchi (di intensità ridotta lungo il cromatogramma). Si potrebbe ipotizzare che i primer, nella fase di annealing, abbiano più probabilità di legarsi al frammento appartenente alla specie predominante, presente presumibilmente in quantità maggiore, ottenendo la sequenza di quest'ultima. Tuttavia, per alcuni campioni multispecie, la specie sequenziata non corrispondeva alla specie più abbondante, e quindi dichiarata in etichetta come prima specie. Per verificare l'ipotesi che durante l'amplificazione e il sequenziamento venga identificata la sequenza della specie più abbondante, è stata effettuata una prova sperimentale, utilizzando tale metodo, su matrici miste a titolo noto. In particolare sono stati preparati nove campioni contenenti concentrazioni note di DNA di carne di Cervo e di Suino, secondo lo schema raffigurato in Tabella 9.

% <i>Sus scrofa</i>	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%
% <i>Cervus elaphus</i>	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%

Tabella 9 Rappresentazione delle concentrazioni di ciascuna specie (*Sus scrofa*, *Cervus elaphus*) allestite per la prova di sensibilità del metodo su campioni multispecie (Fonte propria).

I campioni così allestiti sono stati amplificati e sequenziati, secondo il protocollo definito in questo progetto.

La specie identificata in 8 campioni (combinazioni diverse delle due specie) su 9 è *Sus scrofa* mentre solamente nel campione contaminato per il 90% da *Cervus elaphus* è stata identificata quest'ultima specie. Questo risultato, per quanto preliminare e parziale (visto che prende in considerazione soltanto due specie animali), supporta l'ipotesi che la corretta identificazione di specie con il protocollo identificato possa essere influenzata dall'efficienza di legame dei primer tra le regioni geniche delle diverse specie (Giusti *et al.* 2017) e che non consenta di identificare correttamente la specie prevalente in un campione multispecie.

Altro limite dell'analisi di campioni multispecie è imputabile alla presenza di inibitori coestratti insieme al DNA, oltre che il grado di processazione elevato, che caratterizza alcuni preparati (Wilson I. G. 1997). Come si può notare dalla Tabella 6, il campione 22BIO/843 pur essendo caratterizzato da un buon grado di purezza del DNA estratto ($A_{260/280}$ pari a 1,85), ha una concentrazione di acidi nucleici totali molto bassa (5,73 ng/ μ L). Si tratta infatti di un campione di ragù ed in quanto tale molto processato.

Di seguito sono riportati i risultati dei campioni multispecie: in 17 campioni su 18 è stato possibile ottenere le sequenze, mentre per un campione (ragù di carne sterilizzato) non è stato ottenuto alcun amplificato.

Dei campioni sequenziati, due di 17 (11,8%) sono risultati contenere come prima specie una diversa da quella dichiarata in etichetta. Nello specifico, nei campioni 22BIO/797 e 22BIO/1091 la specie dichiarata era *Rupicapra rupicapra* (Camoscio), tuttavia la

specie identificata è la specie *Cervus elaphus*. Non si può escludere che la sostituzione delle specie sia avvenuta anche tra *Cervus elaphus* e *Bos taurus* per il campione 22BIO/797, dal momento che non è stata individuata nessuna delle due specie dichiarate in etichetta (*Rupicapra rupicapra* o *Bos taurus*), ma è stata rilevata solamente la specie *Cervus elaphus* non dichiarata. Lo stesso ragionamento vale per il campione 22BIO/1091, non è possibile dichiarare se la sostituzione sia avvenuta tra *Cervus elaphus* e *Rupicapra rupicapra* o tra *Cervus elaphus* e *Sus scrofa*.

N° registro	Specie in etichetta	Specie rilevata	Etichettatura Concorde?
22BIO/719	Cervo (68g), Suino (68g)	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/798	Cervo (67g), Bovino (52g)	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/795	Cervo (50%), suino (36%), Bovino (7%)	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/796	Suino (101g), Cervo (44g)	<i>Cervus elaphus</i> , <i>Sus scrofa</i>	✓
22BIO/797	Camoscio (67g), Bovino (52g)	<i>Cervus elaphus</i>	✗
22BIO/815	Suino (129g), Cervo (35g)	<i>Sus scrofa</i>	✓
22BIO/848	Cervo (87g), Suino (66g)	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/846	Cinghiale (67g), Suino (65g)	<i>Sus scrofa</i>	✓
22BIO/847	Suino (68g), Capriolo (66g)	<i>Sus scrofa</i>	✓
22BIO/845	Capriolo (50%), Suino (40%)	<i>Sus scrofa</i>	✓
22BIO/844	Cervo (68g), Suino (68g)	<i>Cervus elaphus</i>	✓

22BIO/843	Cervo	Non amplificabile	-
22BIO/962	Suino (112g), Cervo (53g)	<i>Cervus elaphus</i>	✓
22BIO/1091	Camoscio (111g), Suino (48g)	<i>Cervus elaphus</i>	✗
22BIO/1090	Suino (97g), Cinghiale (41g)	<i>Sus scrofa</i>	✓
22BIO/1089	Suino (97g), Capriolo (41g)	<i>Sus scrofa</i>	✓
22BIO/1088	Suino (66%), Cinghiale (33%)	<i>Sus scrofa</i>	✓
22BIO/1087	Suino (66%), Capriolo (33%)	<i>Capreolus capreolus</i>	✓

Tabella 10 Rappresentazione dei campioni multispecie dei quali è stata verificata la conformità dell'etichetta; la quantità delle diverse specie viene riportata tale e quale a quanto scritto in etichetta. In alcuni campioni la quantità viene descritta in "grammi per 100 grammi di prodotto" anche se, spesso, la quantità di grammi riportata supera di gran lunga i 100 grammi. Questo perché i grammi si riferiscono al prodotto ancora ricco di acqua, che con la stagionatura andrà ad essere eliminata arrivando ai 100 grammi dichiarati in etichetta (Fonte propria).

Il metodo adottato per l'analisi dei campioni si è rivelato utile e affidabile per l'identificazione di prodotti composti da singola specie, mentre per l'identificazione di prodotti multispecie rappresenta solo il primo step di un'analisi che deve necessariamente essere approfondita con ulteriori metodiche molecolari che permettano la separazione degli ampliconi differenti co-amplificati e una loro quantificazione (es. clonaggio dei prodotti di PCR).

4.3 ANALISI BIOINFORMATICA

Costruzione cladogrammi Neighbor Joining

Le sequenze sono state allineate attraverso ClustalW ed è stato costruito un cladogramma Neighbor Joining (NJ) con l'obiettivo di verificare se effettivamente i campioni analizzati ed identificati rientrassero ognuno nel cluster della specie corrispondente. I nodi, che connettono le sequenze di individui della stessa specie, sono stati supportati da valori bootstrap elevati (99-100), convalidando così la coerenza e l'efficacia del DNA barcoding. Sono stati costruiti due cladogrammi rispettivamente per i campioni monospecie e multispecie, come raffigurato rispettivamente in Figura 10 e 11, dove le specie indicate sono quelle dichiarate in etichetta. È possibile osservare per il cladogramma dei monospecie la suddivisione in 5 cluster ben distinti aventi valori di bootstrap intorno al 99. In ogni clade sono presenti tutti individui della stessa specie, tranne il campione 22BIO/840 che, come evidenziato dalla Figura 10, nonostante fosse dichiarato essere un camoscio (*Rupicapra rupicapra*) è inserito nel clade contenente il Cervo (*Cervus elaphus*), dimostrando l'entità della frode alimentare per sostituzione di cervo con camoscio. Questo conferma l'applicabilità del DNA barcoding per quanto riguarda le matrici monospecie.

Per quanto riguarda le matrici multispecie, dai risultati che sono stati ottenuti, tenendo conto dei limiti del metodo, è stato possibile identificare tre cluster (uno per *Cervus elaphus*, uno per *Cervus capreolus* e uno per *Sus scrofa*), nonostante siano state dichiarate quattro specie diverse totali nelle etichette dei campioni multispecie. Come

si può vedere in Figura 11, i due campioni 22BIO/797 e 22BIO/1091 appartenenti alla specie *Rupicapra rupicapra* secondo quanto dichiarato, clusterizzano insieme al *Cervus elaphus* e non separatamente come è avvenuto per i materiali di riferimento 22BIO/839 e 22BIO/716 in Figura 10. In questa analisi preliminare sembra che i due campioni multispecie dichiarati di contenere la specie *Rupicapra rupicapra*, in realtà contengano per lo più la specie *Cervus elaphus*. Questi rappresentano due possibili casi di frode che andrebbero ulteriormente approfonditi. Nonostante la bassa risoluzione del metodo per i multispecie è stato comunque possibile trovare due casi di frode alimentare.

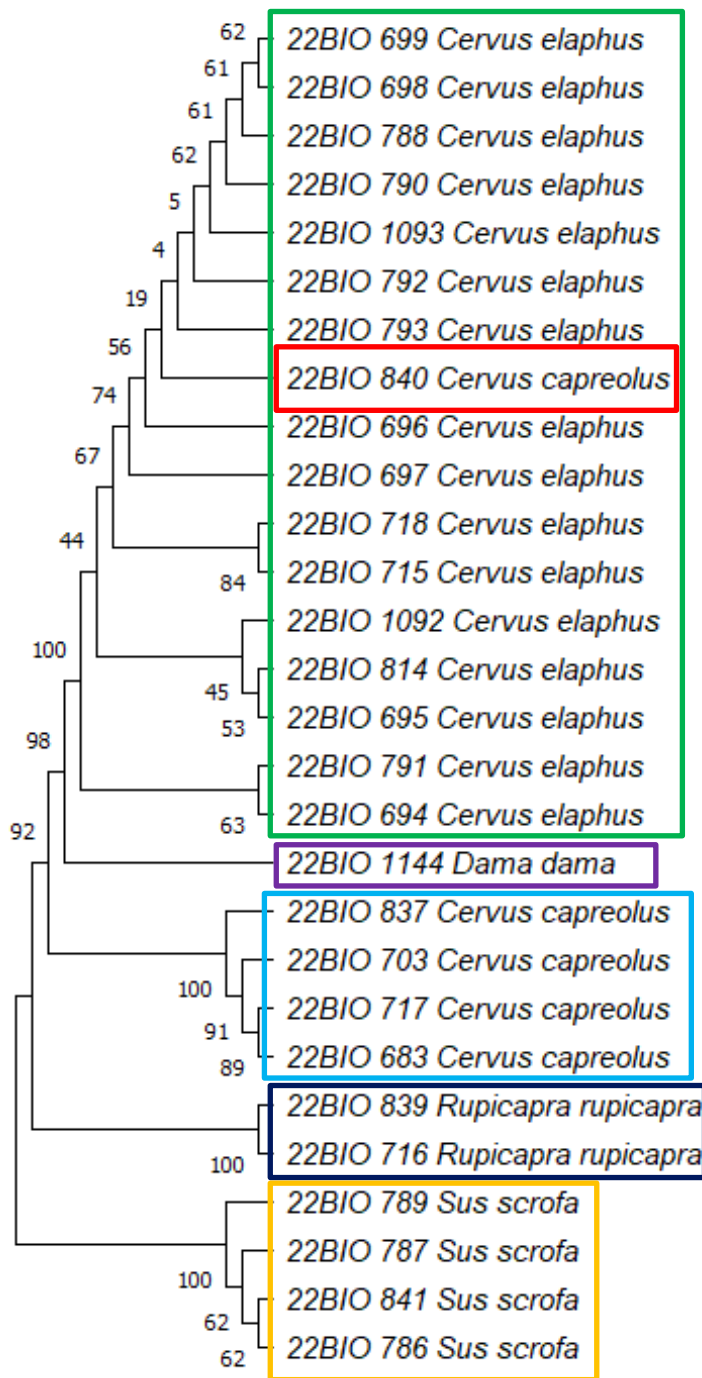


Figure 10 Cladogramma riferito ai campioni monospecie suddiviso in 5 cluster (in rosso evidenziata la frode alimentare, Fonte propria), a destra in ordine le immagini delle specie relative a ciascun cluster (Fonte: immagini Google)

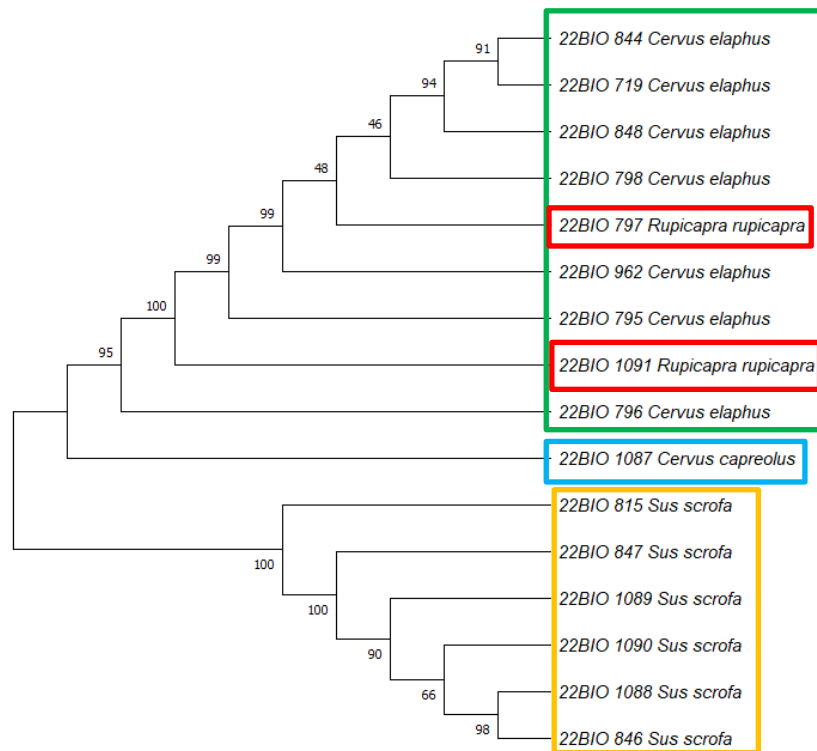


Figura 11 Cladogramma riferito alle matrici multispecie suddiviso in tre cluster (in rosso evidenziate le frodi alimentari, Fonte Propria)

Distanza inters-pecifica

Le sequenze ottenute dai materiali di riferimento più una sequenza di stambecco proveniente dal database BOLD, sono state utilizzate per valutare l'efficacia del metodo del DNA barcoding per identificare le specie oggetto di studio. La Tabella 11 mostra la distanza genetica interspecifica confrontando tutte le specie tra loro. Le distanze genetiche, variano tra il 0,129 e il 0,277 dove la massima divergenza interspecifica è stata osservata tra *Sus scrofa* e *Cervus elaphus*. È possibile osservare come specie evolutivamente distanti tra loro abbiano un valore elevato (es. *Cervus elaphus* vs *Sus scrofa*: 0,277). Specie appartenenti alla stessa famiglia, come *Capra ibex* e *Rupicapra*

rupicapra (*Bovidae*), presentano invece, un valore inferiore a 0,2 (0,133), ciò sta a significare che dal punto di vista tassonomico le due specie sono più affini tra loro. Come previsto, confrontando sequenze di individui della stessa specie, per esempio *Sus scrofa*, la distanza interspecifica scende drasticamente (0,006). I risultati ottenuti sono conformi con quanto individuato attraverso la metodica del DNA barcoding. Data la presenza del “barcoding gap” come criterio di delimitazione e indicatore della differenziazione delle specie, è stato constatato che le distribuzioni delle distanze interspecifiche e intraspecifiche non si sovrappongono.

	Dama dama	Capra ibex	Sus scrofa (2)	Sus scrofa (1)	Cervus elaphus (2)	Rupicapra rupicapra (2)	Rupicapra rupicapra (1)	Cervus elaphus (1)	Cervus capreolus (2)	Cervus capreolus (1)
Dama dama	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Capra ibex	0,177	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Sus scrofa (2)	0,182	0,204	0	-	-	-	-	-	-	-
Sus scrofa (1)	0,182	0,211	0,006	0	-	-	-	-	-	-
Cervus elaphus (2)	0,231	0,200	0,272	0,277	0	-	-	-	-	-
Rupicapra rupicapra (2)	0,231	0,133	0,239	0,238	0,208	0	-	-	-	-
Rupicapra rupicapra (1)	0,089	0,129	0,237	0,239	0,195	0,026	0	-	-	-
Cervus elaphus (1)	0,079	0,183	0,259	0,261	0,019	0,185	0,174	0	-	-
Cervus capreolus (2)	0,149	0,194	0,248	0,255	0,150	0,222	0,216	0,147	0	-
Cervus capreolus (1)	0,149	0,200	0,253	0,248	0,163	0,220	0,214	0,158	0,019	0

Tabella 11 Confronto della distanza genetica tra le specie (Fonte propria).

Analisi dei cromatogrammi nei campioni multispecie

Il sequenziamento diretto del gene *COI* nell'analisi dei campioni multispecie presenta dei limiti nell'identificazione di specie. In particolare, con il metodo Sanger vengono sequenziati in contemporanea tutti gli ampliconi prodotti per un campione. Tuttavia, essendo attesi ampliconi differenti nei prodotti multispecie, questi verranno cosequenziati generando dei doppi picchi a livello del cromatogramma (Figura 12). a differenza del cromatogramma di un campione monospecie in cui non sono presenti doppi picchi (Figura 13). Questo vuol dire che il sequenziatore, in una stessa posizione, ha rilevato due nucleotidi diversi, corrispondenti probabilmente a due specie diverse. A questo proposito, è stata effettuata un'analisi per verificare detta ipotesi. Sono state scaricate dal database BOLD 20 sequenze per ciascuna specie (*Cervus elaphus*, *Sus scrofa*, *Cervus capreolus*, *Rupicapra rupicapra*, *Dama dama*) per un totale di 100 sequenze. Grazie al software MEGA è stato effettuato un multiallineamento e si è identificato un numero variabile di SNPs diagnostici per ciascuna specie (Figura 14 e 15). Gli SNPs diagnostici sono delle mutazioni puntiformi all'interno di una sequenza nucleotidica presenti in tutti gli aplotipi mitocondriali di una certa specie e non nelle altre specie. La loro presenza perciò permette di confermare la presenza di quella specie nel campione. Una volta individuati, insieme alle sequenze di riferimento sono state inserite e allineate le sequenze di tre campioni multispecie (22BIO/848, 22BIO/719, 22BIO/796). Facendo riferimento a quanto dichiarato in etichetta si sono prese in considerazione le sequenze di riferimento delle specie confermate esserci nel campione

e si è verificata la tipologia del nucleotide in corrispondenza dello SNP diagnostico sia delle sequenze di riferimento tramite l'allineamento, sia del campione attraverso l'analisi del cromatogramma. A seconda del numero di nucleotidi diversi osservati nelle sequenze di riferimento, ci si aspetta un numero uguale di picchi nella posizione di quel determinato SNP. Grazie a questo metodo di analisi è possibile avanzare una prima ipotesi sull'effettiva presenza di altre specie oltre a quella rilevata.

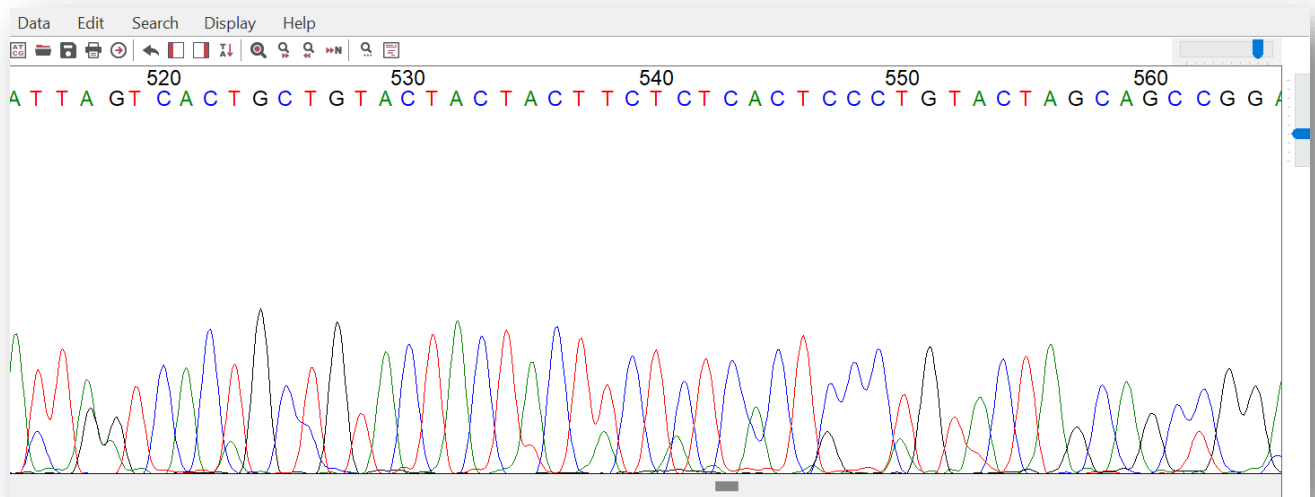


Figura 12 Cromatogramma del campione 22BIO/848 (Fonte propria)

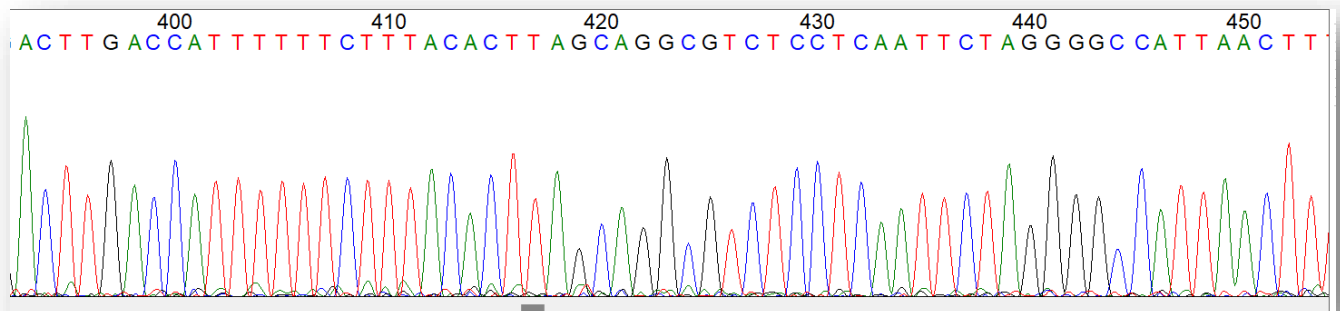


Figura 13 Cromatogramma del campione monospecie 22BIO/718 (Fonte propria)



Figura 14 Esempio di SNP diagnostico per la specie *Dama dama* (evidenziato in giallo, Fonte propria)

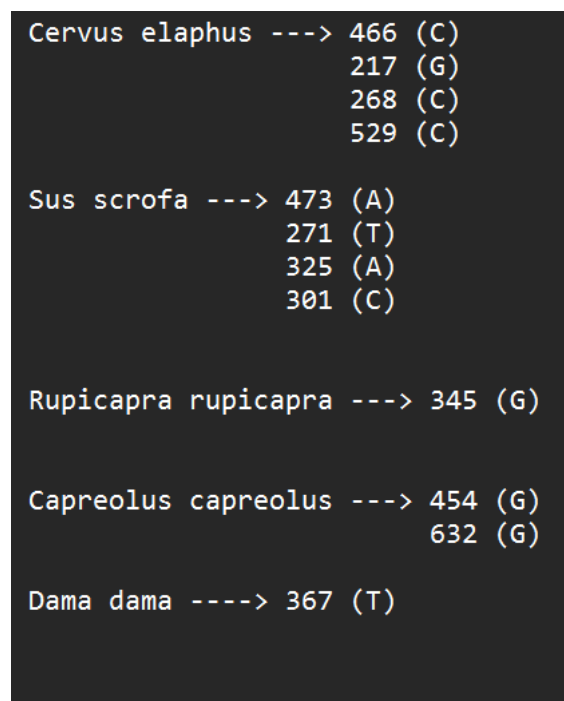


Figura 15 Posizione degli SNPs diagnostici rilevati per ciascuna specie (Fonte propria)

I risultati riassunti in Tabella 12 dimostrano che le specie non rilevate ma comunque dichiarate in etichetta sono state visualizzate grazie alla verifica della presenza dei doppi picchi nei cromatogrammi dei campioni multispecie (Figura 15 e 16).

Species/Abbrv	Δ	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*											
1. CAMPIONE 22BIO/848		C	A	A	C	C	C	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	C	G	T	A	T	T	A	G	T	C	A	C	T
2. CAB088-06 Sus scrofa COI-5P		C	A	A	C	C	C	C	C	G	T	T	G	C	G	A	T	C	A	G	T	A	C	T	A	A	T	C	A	C	A
3. Cervus elaphus (20)		C	A	A	C	C	C	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	C	G	T	A	T	A	G	T	C	A	C	T	
4. Cervus elaphus (19)		C	A	A	C	C	C	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	C	G	T	A	T	A	G	T	C	A	C	T	

Figura 15 Allineamento delle sequenze del campione, *Sus scrofa* e *Cervus elaphus* (evidenziati con riquadri rosso e nero la posizione degli SNPs diagnostici, che si diversificano infatti dalla sequenza appartenente a *Sus scrofa*, Fonte propria)

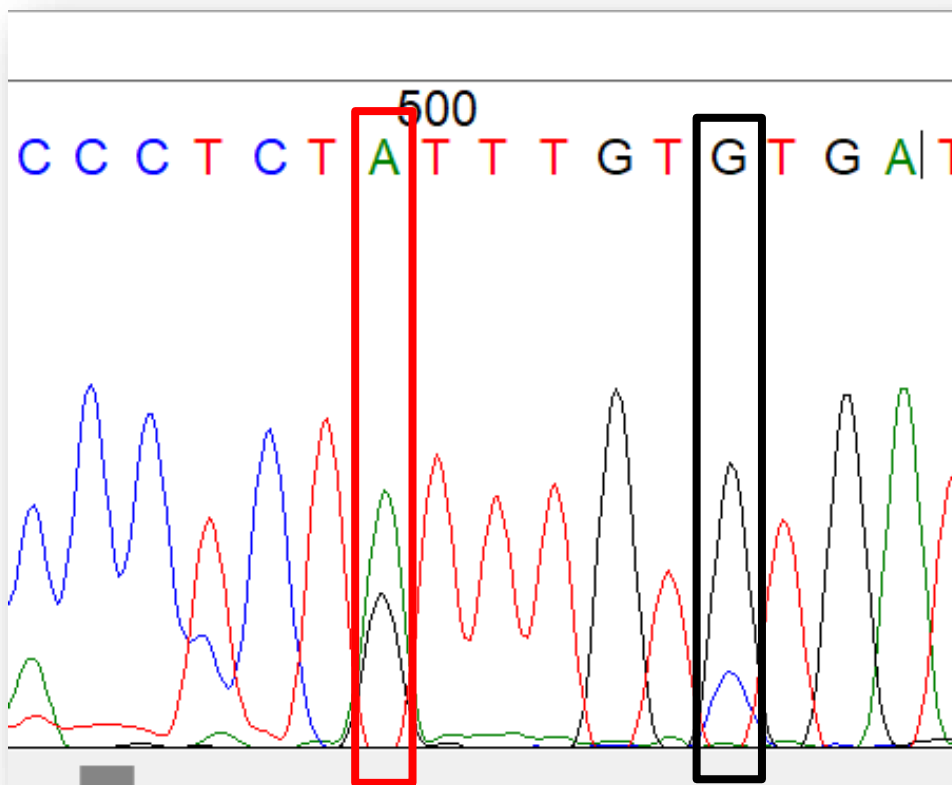


Figura 16 Verifica della presenza dei doppi picchi cromatografici nella posizione degli SNP diagnostici del *Cervus elaphus*, è osservabile anche la tipologia di nucleotidi rilevati in minore concentrazione (G nel riquadro rosso, C nel riquadro nero, appartenenti alla specie *Sus scrofa* come rappresentato in Figura 15, Fonte propria)

CAMPIONE	POSIZIONE	SNPs SPECIE DI RIFERIMENTO		SNPs CAMPIONE	
		SEQUENZE		CROMATOGRAMMA	
		SNPs			
22BIO/848	DIAGNOSTICO	<i>Cervus elaphus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Cervus elaphus</i>	<i>Sus scrofa</i>
Specie rilevata:	466	C	T	C	T
<i>Cervus elaphus</i>	217	G	A	G	A
	268	C	A	C	A
	529	C	A	C	A

CAMPIONE	POSIZIONE	SNPs SPECIE DI RIFERIMENTO		SNPs CAMPIONE	
		SEQUENZE		CROMATOGRAMMA	
		SNPs			
22BIO/719	DIAGNOSTICO	<i>Sus scrofa</i>	<i>Cervus capreolus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Cervus capreolus</i>
Specie rilevata:	473	A	T	A	T
<i>Sus scrofa</i>	271	T	C	T	C
	325	A	T	A	T
	301	C	T	C	T

CAMPIONE	POSIZIONE	SNPs SPECIE DI RIFERIMENTO		SNPs CAMPIONE	
		SEQUENZE		CROMATOGRAMMA	
		SNPs			
22BIO/796	DIAGNOSTICO	<i>Cervus elaphus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Cervus elaphus</i>	<i>Sus scrofa</i>
Specie rilevata:	466	C	T	C	T
<i>Cervus elaphus</i>	616	C	T	C	T
	529	C	A	C	A

Tabella 12 Verifica della presenza di doppi picchi in tre campioni multispecie (22BIO/848, 22BIO/719, 22BIO/796). Nella tabella sono state riportate le posizioni dei rispettivi SNPs diagnostici, il nucleotide in quella posizione delle sequenze di riferimento delle due specie presenti nel campione e i due nucleotidi a cui si riferiscono i due doppi picchi nel cromatogramma.

5. CONCLUSIONI

Lo scopo della tesi è stato raggiunto ed è stato individuato il metodo più appropriato per l'identificazione di specie in prodotti di carne di selvaggina ed è stata verificata l'etichettatura dei campioni monospecie. Sono stati tutti identificati e ne sono state verificate le etichette, ed un solo campione su 25 campioni incogniti, è stato identificato come costituito da una specie non dichiarata in etichetta. Il metodo del DNA barcoding adottato si è confermato essere efficace nell'identificazione di specie animali partendo sia da una matrice non lavorata, come il muscolo, sia da una lavorata, come la bresaola. I campioni multispecie sono stati identificati allo stesso modo, tuttavia i risultati riportati sono da considerarsi preliminari e per una identificazione certa di tutte le specie presenti in ogni prodotto è necessario un approfondimento con altre metodiche. Attraverso l'analisi del DNA barcoding, che si avvale della tecnica del sequenziamento Sanger, è possibile sequenziare solamente i prodotti di amplificazione ottenuti da un individuo per volta. Se questi sono tutti uguali si ottiene un cromatogramma leggibile e l'identificazione della specie è univoca, viceversa, la presenza di ampliconi diversi dovuta alla coamplificazione di specie diverse incluse nello stesso prodotto causa la produzione di cromatogrammi con doppi picchi (o a volte illeggibili). Nel nostro caso, sono state analizzate le sequenze predominanti e sono state identificate le specie dichiarate in etichetta per 15 campioni su 18. È stata evidenziata una possibile contraffazione in due campioni (11%) mentre il campione di ragù è stato dichiarato

come non leggibile. Tuttavia, non è possibile confermare con certezza la presenza di altre specie oltre a quelle evidenziate. Ad una attenta lettura manuale dei cromatogrammi e soffermandosi sull'eventuale presenza di nucleotidi diagnostici è solo possibile ipotizzare la presenza delle diverse specie in un campione, come è stato mostrato per alcuni campioni. Per risolvere completamente l'identificazione dei prodotti multispecie, mantenendo l'utilizzo della medesima tecnica, di fronte ad un cromatogramma con picchi doppi è necessario procedere con la tecnica del clonaggio per identificare correttamente tutti gli ampliconi diversi presenti nel prodotto di amplificazione di ogni campione. Inoltre, l'analisi in replicato per ogni campione avvalorata il risultato ottenuto e incrementa le possibilità di individuare specie presenti a più bassa frequenza.

Questa soluzione deve tenere in considerazione il maggior dispendio economico e di tempo richiesti per tali analisi.

Un altro fattore da tenere in considerazione è la possibilità che i doppi picchi rilevati possano essere dovuti ad una normale variabilità individuale intra-specie. È infatti frequente che i prodotti lavorati siano derivati da individui diversi della stessa specie che potrebbero essere caratterizzati da aplotipi mitocondriali diversi, l'analisi del barcode gap e della distanza genetica media attesa tra ed entro specie, oltre che un'attenta valutazione dei singoli doppi picchi può aiutare nell'individuare per quali campioni sia necessario procedere con il clonaggio. È evidente, quindi, che il metodo DNA barcoding non può essere da solo adottato nell'identificazione di specie in campioni misti ovvero contenenti più specie animali. Tuttavia, è stato dimostrato che è

un buon punto di partenza per ipotizzare la presenza di ulteriori specie in matrici di campioni misti, grazie al quale, dopo averne verificato la presenza/assenza, è possibile procedere con tecniche più specifiche e/o dispendiose in termini economici. Inoltre rimane la tecnica di elezione per l'analisi di un numero limitato di individui o per controlli a campione su lotti in commercio.

Diversamente, l'approccio di analisi del DNA metabarcoding, che si avvale di tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS), potrebbe essere più idoneo quando si richiede un'analisi simultanea di un numero elevato di campioni. Questa tecnica innovativa propone una soluzione a quello che è il limite del sequenziamento Sanger poiché grazie all'utilizzo del sequenziamento NGS, dopo l'amplificazione del gene di interesse individui diversi vengono indicizzati con brevi sequenze univoche che ne permettono il sequenziamento in simultanea (Giusti *et al.* 2017).

Altre soluzioni al problema potrebbero riguardare l'utilizzo di tecniche basate sulla PCR come la PCR- RFLP, la Multiplex PCR con l'utilizzo di primer più specifici a seconda della specie da ricercare, o la Droplet Digital PCR con la quale, oltre ad identificare più specie contemporaneamente, si potrebbero quantificare anche le specie presenti (Bertasi *et al.* 2016). In particolare, la messa a punto di primer specie-specifici in grado di amplificare delle bande di dimensioni diagnostiche per le diverse specie potrebbe essere un buon approccio per evitare la tecnica del clonaggio (altamente dispendiosa in termini economici e di tempo) e permetterebbe al contempo di amplificare frammenti di più piccole dimensioni utili nel processamento di campioni con DNA altamente degradato (es. ragù). L'approccio bioinformatico attraverso la realizzazione di cladogrammi e

tabelle di distanza interspecifica è stato utile per meglio visualizzare quanto analizzato attraverso il confronto con il database online. Un'ulteriore approfondimento basato su analisi bioinformatiche con l'utilizzo di marcatori genici differenti potrebbe essere quello di verificare anche la provenienza della carne utilizzata nei prodotti alimentari al fine di controllare sia l'importazione di carni fresche da aree a rischio per esempio per Peste suina. Così come, potrebbe essere utile per accertare e verificare l'etichettatura in situazioni di potenziali fenomeni di bracconaggio (es. caccia del cervo in periodi non consentiti, perciò identificata, almeno in etichetta per una specie diversa).

N° registro	Specie in etichetta	Composizione prodotto	Matrice	Paese di provenienza	Allevata / Cacciata	Kit di estrazione	Data d'estrazione
22BIO/703	Capriolo	Monospecie	Muscolo	Polonia	-	Promega	7/6/2022
22BIO/700	Cervo	Monospecie	Muscolo	Unione Europea	Cacciata	Promega	7/6/2022
22BIO/699	Cervo	Monospecie	Muscolo	Unione Europea	Cacciata	Promega	7/6/2022
22BIO/698	Cervo	Monospecie	Muscolo	Unione Europea	Cacciata	Promega	7/6/2022
22BIO/697	Cervo	Monospecie	Muscolo	Unione Europea	Cacciata	Mini Kit	7/6/2022
22BIO/696	Cervo	Monospecie	Muscolo	Unione Europea	Cacciata	Promega	7/6/2022
22BIO/694	Cervo	Monospecie	Bocconcini	Unione Europea	Cacciata	Promega	20/6/2022
22BIO/683	Capriolo	Monospecie	Muscolo	Valle di Castes	Cacciata	Promega	20/6/2022
22BIO/695	Cervo	Monospecie	Polpa scelta	Unione Europea	Cacciata	Promega	20/6/2022
22BIO/719	Cervo (68g), Suino (68g)	Multispecie	Affumello	Nuova Zelanda	-	Promega	22/6/2022
22BIO/716	Camoscio	Monospecie	Muscolo	Valle di Castes	Cacciata	Promega	22/6/2022
22BIO/718	Cervo	Monospecie	Muscolo	Monguelto	Cacciata	Promega	22/6/2022
22BIO/717	Capriolo	Monospecie	Muscolo	Monguelto	Cacciata	Promega	22/6/2022
22BIO/715	Cervo	Monospecie	Muscolo	Valle di Castes	Cacciata	Promega	22/6/2022
22BIO/787	Cinghiale	Monospecie	Muscolo	Celanonti riserva	Cacciata	Promega	6/7/2022
22BIO/788	Cinghiale	Monospecie	Rtagli lotto:76461016	Ungheria	Cacciata	Promega	6/7/2022
22BIO/798	Cervo (67g), Bovino (52g)	Multispecie	Affumello	Lanz Dobbiaco	-	Promega	6/7/2022
22BIO/786	Cinghiale	Monospecie	Muscolo	Celanonti riserva	Cacciata	Promega	6/7/2022
22BIO/789	Cervo	Monospecie	Polpa lotto:09821	Slovacchia	-	Promega	7/7/2022
22BIO/790	Cervo	Monospecie	Fesa lotto: 001322	Slovacchia	-	Promega	7/7/2022
22BIO/791	Cervo	Monospecie	Fesa lotto:02022	Slovacchia	-	Promega	7/7/2022
22BIO/792	Cervo	Monospecie	Polpa lotto:512925	Ungheria	-	Promega	7/7/2022
22BIO/793	Cervo	Monospecie	Muscolo lotto:79462816	Ungheria	-	Promega	7/7/2022
22BIO/795	Cervo (50%), suino (36%), Bovino (7%)	Multispecie	Insaccato cotto 72° C	Slovacchia	-	Promega	06/09/2022
22BIO/796	Suino (101g), Cervo (44g)	Multispecie	Affumello	Slovacchia	-	Promega	1/8/2022
22BIO/797	Camoscio (67g), Bovino (52g)	Multispecie	Affumello	Lanz	-	Promega	7/7/2022
22BIO/815	Suino (129g), Cervo (35g)	Multispecie	Salame	Unione Europea	-	Promega	13/7/2022
22BIO/814	Cervo	Monospecie	Muscolo Coscia	Spagna	-	Promega	13/7/2022
22BIO/848	Cervo (87g), Suino (66g)	Multispecie	Salamino	Slovenia	-	Promega	1/8/2022
22BIO/846	Cinghiale (67g), Suino (65g)	Multispecie	Salame	Slovenia	-	Promega	1/8/2022
22BIO/847	Suino (68g), Capriolo (66g)	Multispecie	Salame	Ungheria	-	Promega	21/7/2022

Allegato 1

Data d'estrazione	Qualità del DNA estratto	Quantità µg/ml (A)	Data di Amplificazione	Sequenziato	Data Sequenziamento	Nome specie Blast	Etichettatura Concorde?
7/6/2022	1,38	33,06	16/6/2022	SI	15/7/2022	Cervus capreolus	SI
7/6/2022	1	69,47	16/6/2022	SI	8/7/2022	Cervus elaphus	SI
7/6/2022	1,7	31,32	16/6/2022	SI	8/7/2022	Cervus elaphus	SI
7/6/2022	1,2	14,78	15/6/2022	SI	8/7/2022	Cervus elaphus	SI
7/6/2022	2,5	13,83	21/6/2022	SI	25/7/2022	Cervus elaphus	SI
7/6/2022	1,81	22,81	15/6/2022	SI	8/7/2022	Cervus elaphus	SI
20/6/2022	2,63	27,26	21/6/2022	SI	15/7/2022	Cervus elaphus	SI
20/6/2022	2,5	30	21/6/2022	SI	15/7/2022	Cervus capreolus	SI
20/6/2022	2,95	19,75	21/6/2022	SI	15/7/2022	Cervus elaphus	SI
22/6/2022	1,88	62,62	27/6/2022	SI	19/7/2022	Cervus elaphus	SI
22/6/2022	1,45	24,74	27/6/2022	SI	19/7/2022	Rupicapra rupicapra	SI
22/6/2022	1,67	30,88	27/6/2022	SI	19/7/2022	Cervus elaphus	SI
22/6/2022	1,96	24,47	27/6/2022	SI	19/7/2022	Cervus capreolus	SI
22/6/2022	1,79	25,32	27/6/2022	SI	19/7/2022	Cervus elaphus	SI
6/7/2022	1,47	11,14	11/7/2022	SI	25/7/2022	Sus scrofa	SI
6/7/2022	1,84	19,63	11/7/2022	SI	25/7/2022	Sus scrofa	SI
6/7/2022	1,31	32,56	11/7/2022	SI	25/7/2022	Cervus elaphus	SI
6/7/2022	1,52	10,44	11/7/2022	SI	25/7/2022	Sus scrofa	SI
7/7/2022	1,43	19,38	11/7/2022	SI	25/7/2022	Cervus elaphus	SI
7/7/2022	1,58	17,73	12/7/2022	SI	27/7/2022	Cervus elaphus	SI
7/7/2022	1,51	11,05	13/7/2022	SI	27/7/2022	Cervus elaphus	SI
7/7/2022	1,38	10,72	13/7/2022	SI	27/7/2022	Cervus elaphus	SI
7/7/2022	1,17	29,21	13/7/2022	SI	27/7/2022	Cervus elaphus	SI
06/09/2022	1,81	96,11	06/09/2022	SI	13/9/2022	Cervus elaphus	SI
1/8/2022	1,78	62,5	06/09/2022	SI	13/09/2022	Cervus elaphus & Sus scrofa	SI
7/7/2022	1,27	18,52	12/7/2022	SI	27/7/2022	Cervus elaphus	NO
13/7/2022	1,4	47,89	13/7/2022	SI	27/7/2022	Sus scrofa	SI
13/7/2022	1,61	23,48	13/7/2022	SI	27/7/2022	Cervus elaphus	SI
1/8/2022	1,72	85,68	06/09/2022	SI	13/09/2022	Cervus elaphus	SI
1/8/2022	1,84	99,22	06/09/2022	SI	13/09/2022	Sus scrofa	SI
21/7/2022	1,82	37,91	18/7/2022	SI	2/8/2022	Sus scrofa	SI

6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Alikord, M., Keramat, J., Kadivar, M., Momtaz, H., Eshtiaghi, M. N., & Homayouni-Rad, A. (2017). Multiplex-PCR As a Rapid and Sensitive Method for Identification of Meat Species in Halal-Meat Products. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 8(3).
<https://doi.org/10.2174/2212798409666170113151213>
- *AmpliTaq Gold*® DNA Polymerase, LD. (2007).
- Baldwin, C. C., Mounts, J. H., Smith, D. G., & Weigt, L. A. (2009). *Genetic identification and color descriptions of early life-history stages of Belizean Phaeoptyx and Astrapogon (Teleostei: Apogonidae) with Comments on identification of adult Phaeoptyx*.
<http://repository.si.edu/xmlui/handle/10088/7453>
- Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86(3), 577–587. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2010.06.001>
- Bertasi, B., Tilola, M., Delibato, E., Anniballi, F., Santis, P. de, Varcasia, B. M., Scaramagli, S., Gottardo, S., Medici, D. de, & Losio, M. N. (2016). Identification of species in food: development of qualitative and quantitative molecular methods. *XVII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Pacengo Di Lazise (VR), Italia, 28-30 Settembre 2016*, 69–70.

- Bhaskar, R., Kanaparthi, P., & Sakthivel, R. (2020). DNA barcode approaches to reveal inter-species genetic variation of Indian ungulates. *Mitochondrial DNA. Part B, Resources*, 5(1), 938–944. <https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1719912>
- Bonardi, S., Tansini, C., Cacchioli, A., Soliani, L., Poli, L., Lamperti, L., Corradi, M., & Gilioli, S. (2021). Enterobacteriaceae and Salmonella contamination of wild boar (*Sus scrofa*) carcasses: comparison between different sampling strategies. *European Journal of Wildlife Research*, 67(5). <https://doi.org/10.1007/S10344-021-01531-0>
- Brooks, S., Elliott, C. T., Spence, M., Walsh, C., & Dean, M. (2017). Four years post-horsegate: an update of measures and actions put in place following the horsemeat incident of 2013. *NPJ Science of Food*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/S41538-017-0007-Z>
- Čandek, K., & Kuntner, M. (2015). DNA barcoding gap: reliable species identification over morphological and geographical scales. *Molecular Ecology Resources*, 15(2), 268–277. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12304>
- Carvalho, D. C., Neto, D. A. P., Brasil, B. S. A. F., & Oliveira, D. A. A. (2011). DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22 Suppl 1(SUPPL. 1), 97–105. <https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588219>

- Chen, J., Jiang, Z., Li, C., Ping, X., Cui, S., Tang, S., Chu, H., & Liu, B. (2015). Identification of ungulates used in a traditional Chinese medicine with DNA barcoding technology. *Ecology and Evolution*, 5(9), 1818–1825. <https://doi.org/10.1002/ECE3.1457>
- *Conferenza Permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano - Repertorio atto n. 34/CSR*. (n.d.). Retrieved September 16, 2022, from <https://www.statoregioni.it/it/conferenza-stato-regioni/sedute-2021/seduta-del-25032021/atti/repertorio-atto-n-34csr/>
- D’Amato, M. E., Alechine, E., Cloete, K. W., Davison, S., & Corach, D. (2013). Where is the game? Wild meat products authentication in South Africa: a case study. *Investigative Genetics*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/2041-2223-4-6>
- de Carvalho, S. C., Sampaio, I., & Santos, S. (2020). DNA barcoding reveals mislabeling and commercial fraud in the marketing of fillets of the genus *Brachyplatystoma* Bleeker, 1862, the Amazonian freshwater catfishes economically important in Brazil. *Heliyon*, 6(9). <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E04888>
- Deconinck, D., Hostens, K., Taverniers, I., Volckaert, F. A. M., Robbens, J., & Derycke, S. (2021). Identification and semi-quantification of Atlantic salmon in processed and mixed seafood products using Droplet Digital PCR (ddPCR). *Food and Chemical Toxicology : An International Journal*

Published for the British Industrial Biological Research Association, 154.

<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2021.112329>

- Fabrizio Anniballi Bruna Auricchio Francesca Calvetti Clemencia Chaves Lopez Cosimo Marino Curianò Marco Ianniello Dario De Medici Alfonsina Fiore Sarah Guizzardi Raffaello Lena Carlo Locatelli Davide Lonati Giovanna Morini Antonello Paparella. (2014). *LINEE GUIDA PER LA CORRETTA PREPARAZIONE DELLE CONSERVE ALIMENTARI IN AMBITO DOMESTICO*.
- G., M. P. (2019). Gestione del cervo in Italia: quali prospettive? *Uniwersytet Śląski*, 65–74. <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Giuggioli, G., Olivastri, A., Pennisi, L., Paludi, D., Ianieri, A., & Vergara, A. (2018). The hygiene-sanitary control in the wild game meats. *Italian Journal of Food Safety*, 6(4), 222–224. <https://doi.org/10.4081/IJFS.2017.6875>
- Giusti, A., Tinacci, L., Sotelo, C. G., Marchetti, M., Guidi, A., Zheng, W., & Armani, A. (2017). Seafood Identification in Multispecies Products: Assessment of 16SrRNA, cytb, and COI Universal Primers' Efficiency as a Preliminary Analytical Step for Setting up Metabarcoding Next-Generation Sequencing Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(13), 2902–2912. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.6B05802/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2016-058026_0006.GIF

- Gomes, G., Correa, R., Veneza, I., da Silva, R., da Silva, D., Miranda, J., & Sampaio, I. (2019). Forensic analysis reveals fraud in fillets from the “Gurijuba” *Sciades parkeri* (Ariidae - Siluriformes): a vulnerable fish in Brazilian Coastal Amazon. *Mitochondrial DNA. Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 30(5), 721–729.
<https://doi.org/10.1080/24701394.2019.1622694>
- Hughes, A. C. (2021). Wildlife trade. *Current Biology : CB*, 31(19), R1218–R1224. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2021.08.056>
- Hyung, S. K., Soo, H. B., & Byung, M. L. (2005). Effects of chemical carcinogens and physicochemical factors on the UV spectrophotometric determination of DNA. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 68(23–24), 2081–2095.
<https://doi.org/10.1080/15287390500182503>
- *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie*. (n.d.).
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3267>
- Kaltenbrunner, M., Mayer, W., Kerkhoff, K., Epp, R., Rüggeberg, H., Hochegger, R., & Cichna-Markl, M. (2019). Differentiation between wild boar and domestic pig in food by targeting two gene loci by real-time PCR. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-45564-7>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.

Journal of Molecular Evolution, 16(2), 111–120.

<https://doi.org/10.1007/BF01731581>

- Korpelainen, H. (2004). The evolutionary processes of mitochondrial and chloroplast genomes differ from those of nuclear genomes. *Naturwissenschaften*, 91(11), 505–518. <https://doi.org/10.1007/S00114-004-0571-3/TABLES/2>
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2012). DNA barcodes: methods and protocols. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 858, 3–8. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_1
- Mancini, M. (2018). *La disciplina degli istituti di protezione della fauna selvatica e della biodiversità, nel quadro del riparto delle competenze tra Stato e Regioni*.
- Mattiello, D. S., & Gazzaroli, M. (n.d.). *UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO Corso di Laurea in VALORIZZAZIONE E TUTELA DELL'AMBIENTE E DEL TERRITORIO MONTANO IL CINGHIALE NEL BASSO CHIESE TRENINO*.
- Meyer, C. P., & Paulay, G. (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3(12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0030422>

- Moreira, M. J., García-Díez, J., de Almeida, J. M. M. M., & Saraiva, C. (2021). Consumer Knowledge about Food Labeling and Fraud. *Foods (Basel, Switzerland)*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/FOODS10051095>
- Nehal, N., Choudhary, B., Nagpure, A., & Gupta, R. K. (2021). DNA barcoding: a modern age tool for detection of adulteration in food. *Critical Reviews in Biotechnology*, *41*(5), 767–791. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1874279>
- Neto, L., Pinto, N., Proença, A., Amorim, A., & Conde-Sousa, E. (2021). 4SpecID: Reference DNA Libraries Auditing and Annotation System for Forensic Applications. *Genes*, *12*(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/GENES12010061>
- Pan, J., Feng, R., Hu, Q., Chen, H., Zhang, S., Sun, J., & Ji, S. (2020). TaqMan real-time quantitative PCR for identification of antlers in tradition Chinese medicine. *Mitochondrial DNA. Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, *31*(5), 173–177. <https://doi.org/10.1080/24701394.2020.1741560>
- Pereira, L. H. G., Maia, G. M. G., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2011). DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*, *22 Suppl 1*(SUPPL. 1), 71–79. <https://doi.org/10.3109/19401736.2010.532213>

- Pesole, G., Gissi, C., de Chirico, A., & Saccone, C. (1999). Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 48(4), 427–434. <https://doi.org/10.1007/PL00006487>
- Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1), 30–36. <https://doi.org/10.3329/AKMMCJ.V4I1.13682>
- Silva, T. L., Godinho, R., Castro, D., Abáigar, T., Brito, J. C., & Alves, P. C. (2015a). Genetic identification of endangered North African ungulates using noninvasive sampling. *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 652–661. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12335>
- Silva, T. L., Godinho, R., Castro, D., Abáigar, T., Brito, J. C., & Alves, P. C. (2015b). Genetic identification of endangered North African ungulates using noninvasive sampling. *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 652–661. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12335>
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6), 651–701. <https://doi.org/10.1093/AESA/87.6.651>

- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (n.d.). *MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11*.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. (2021). *EFSA Journal*, 19(2). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2021.6406>
- Vaithiyanathan, S., Vishnuraj, M. R., Narender Reddy, G., & Srinivas, C. (2021). Authentication of camel meat using species-specific PCR and PCR-RFLP. *Journal of Food Science and Technology*, 58(10), 3882–3889.
<https://doi.org/10.1007/S13197-020-04849-W>
- Ward, R. D. (2012). FISH-BOL, a case study for DNA barcodes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 858, 423–439.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_21
- Ward, R. D., Hanner, R., & Hebert, P. D. N. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74(2), 329–356.
<https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.2008.02080.X>
- Wiemers, M., & Fiedler, K. (2007). Does the DNA barcoding gap exist? - a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology*, 4. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-4-8>
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3741–3751. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.10.3741-3751.1997>

<https://forestefauna.provincia.tn.it/Fauna/Caccia/Stagione-venatoria-corrente>

<http://elettroforesi.weebly.com/elettroforesi-su-gel-di-agarosio.html>