



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
CATANIA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI
Dottorato di Ricerca in Scienze Biochimiche e Biomolecolari
XXIV Ciclo

ANNA MARIA PAPPALARDO

**“DNA BARCODING E BIODIVERSITA' MOLECOLARE:
CASI DI STUDIO NEL SETTORE ITTICO”**

TESI DI DOTTORATO IN
SCIENZE BIOCHIMICHE E BIOMOLECOLARI

XXIV ciclo

Tutor: PROF. VITO DE PINTO

Coordinatore: PROF. ANGELO VANELLA

Triennio 2008 –2011

1. INTRODUZIONE

1.1. Biodiversità e crisi della tassonomia

Per biodiversità si intende l'insieme di tutti gli organismi viventi inclusi quelli terrestri, marini e di altri sistemi acquatici, e gli ecosistemi di cui essi fanno parte”(Convenzione Internazionale sulla Biodiversità, Rio de Janeiro 1992). Una diversità biologica adeguata limita gli effetti di alcuni rischi ambientali quali il cambiamento climatico e le invasioni di parassiti. La diversità è essenziale per la redditività a lungo termine delle attività agricole e alieutiche ed è alla base di numerosi processi industriali. La conservazione e l'utilizzo sostenibile della diversità biologica sono quindi due elementi indispensabili per conseguire uno sviluppo sostenibile e per realizzare gli obiettivi di sviluppo in materia di povertà, salute e ambiente (i cosiddetti Millennium Goals). Le informazioni e le conoscenze relative alla diversità biologica sono in genere insufficienti. È quindi necessario sviluppare capacità scientifiche, tecniche ed istituzionali per ottenere le conoscenze basilari grazie alle quali programmare ed attuare opportuni provvedimenti per conservare la diversità biologica. La tassonomia è la scienza che si occupa della definizione, caratterizzazione, descrizione e denominazione degli organismi viventi, organizzando tali informazioni in un sistema di classificazione (Lipscomb 2003). L'identificazione della specie è essenziale per il monitoraggio e la conservazione della biodiversità su ampia scala, e la misura della ricchezza delle specie è un utile indicatore di tale biodiversità.

Inizialmente, la maggior parte delle specie sono state differenziate grazie ai caratteri morfologici dell'adulto, ma nel tempo si sono sviluppati approcci molto più sofisticati per questo scopo. Il microscopio elettronico, l'analisi di caratteristiche comportamentali e marker biochimici sono divenuti tutti strumenti che i tassonomi hanno acquisito ed utilizzato per migliorare la scienza della tassonomia. (<http://www.barcoding.si.edu>).

Il primo sistema di catalogazione di specie è stato fondato più di 250 anni fa dal naturalista svedese Carl von Linné (1707-1778) che ha iniziato la tassonomia formale attraverso l'introduzione della nomenclatura binomiale della specie, principalmente basata sui caratteri morfologici per descrivere la biodiversità (Linneo, 1756).

Il suo lavoro pionieristico ha rappresentato una pietra miliare come sistema di classificazione della specie, anche se egli ha in effetti sottostimato la reale diversità biologica sulla Terra. Attualmente la conoscenza tassonomica è lungi dall'essere completa. Nel corso di oltre due secoli, utilizzando osservazioni morfologiche e comportamentali e, più recentemente marcatori biochimici, i tassonomi sono stati in grado di individuare, descrivere e classificare circa 1.700.000 specie esistenti, un numero che probabilmente rappresenta solo una piccola parte della biodiversità esistente in quanto si stima che il numero di specie attuali possa raggiungere i 10 milioni. Il “deficit tassonomico” totale (rapporto fra taxa attesi e taxa identificati) è quindi circa 6 (Fig. 1).

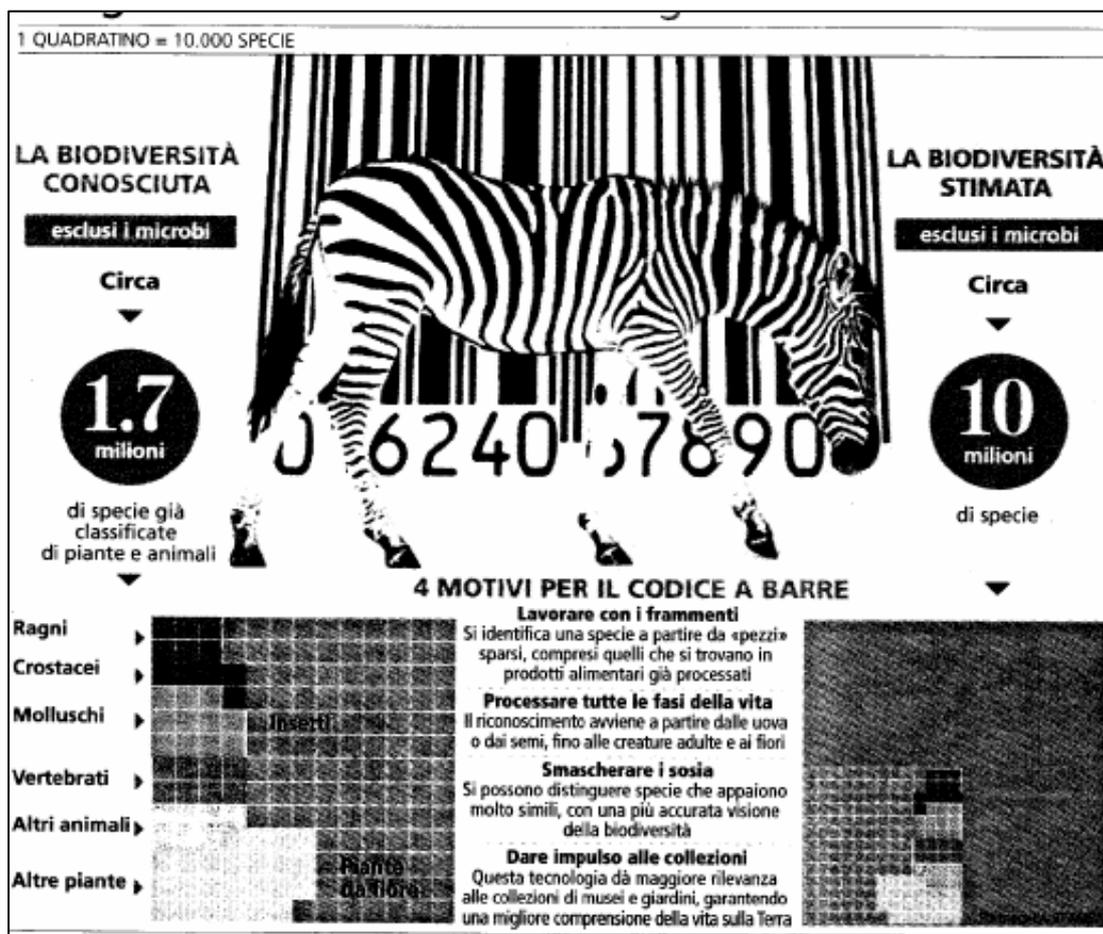


Fig. 1 - (<http://rassegnastampa.unipi.it/rassegna/archivio/2007/05/16SIL3034.PDF>)

Sfortunatamente la biodiversità globale sta scomparendo ad un ritmo senza precedenti, 50-100 volte il tasso naturale, come conseguenza delle attività umane che sono responsabili di un aumento dei tassi di estinzione di molte specie (www.cbd.int; Newmaster et al, 2006). Allo stesso tempo, stiamo assistendo ad una "crisi tassonomica": una parte della biodiversità rimarrà sconosciuta perché il lavoro di catalogazione delle specie con i tradizionali metodi morfologici è lungo, laborioso e richiede un elevato livello di competenza, non comune (Hebert et al., 2003a). Inoltre, la "tassonomia morfologica", ha rivelato di essere inadeguata per stimare l'intera biodiversità della Terra a causa di tre principali limitazioni. In primo luogo, l'omoplasia (Vences et al., 2005) e la plasticità fenotipica (Saunders, 2005) di un dato carattere diagnostico utilizzato per il riconoscimento delle specie può portare a un'identificazione errata. In secondo luogo, questo approccio trascurava taxa morfologicamente criptici, come le specie fratello (cioè specie morfologicamente identiche, ma geneticamente diverse) che sono comuni in molti gruppi (Knowlton, 1993; van Velzen et al, 2007). In terzo luogo, poichè le chiavi morfologiche (dicotomiche) sono spesso efficaci solo per una particolare fase di vita, molti individui, soprattutto nei loro stadi giovanili, non possono essere identificati (Pegg et al., 2006). Pertanto, anche se il sistema di denominazione binomiale di Linneo è ben consolidato e ampiamente utilizzato, la sua incapacità di superare tali limiti, ha portato a cercare nuovi e più adeguati strumenti di identificazione delle specie per la catalogazione della sconfinata biodiversità esistente sul nostro pianeta. Così la tassonomia basata sul DNA si è rivelata un prezioso supporto alla tassonomia classica permettendo di far fronte al crescente bisogno di accurate e accessibili informazioni tassonomiche (Tautz et al., 2003).

Negli ultimi decenni, notevoli progressi nel campo della biologia molecolare e bioinformatica hanno contribuito a incrementare la scoperta di nuovi taxa attraverso lo sviluppo di metodi standardizzati, rapidi ed economici e anche facilmente accessibili ai non-specialisti. Così l'applicazione su ampia scala di dati molecolari ha progressivamente portato ad una rivoluzione della tassonomia (Savolainen et al., 2005) fornendo evidenze dell'esistenza di centinaia di nuove specie candidate.

Si evince come la crescente complessità degli studi ecologici richieda un bagaglio cognitivo difficilmente cumulabile da parte di singoli specialisti: quali strumenti possono dunque assistere la ricerca nel campo della biodiversità? Un gruppo di ricercatori dell'università di Guelph (Canada) ha sviluppato, qualche anno fa, una metodica di "classificazione universale" basata sulle differenze a carico della sequenza del gene mitocondriale per la citocromo ossidasi I (COI) basandosi sul cosiddetto "codice universale di prodotto", noto anche come "codice a barre". Questi scienziati hanno infatti osservato che alcune brevi sequenze di DNA nell'ambito della stessa specie presentano una variabilità limitata, mentre il grado di variabilità aumenta quando si confrontano sequenze di individui appartenenti a specie diverse. Applicando tecniche di analisi bioinformatica a sequenze di geni specifici provenienti da campioni ignoti quest'ultimi possono essere facilmente classificati ascrivendoli a specifici taxa. Si riesce così a dare un *nome e cognome* a qualunque essere vivente. L'uso di codici a barre specifici richiede la costituzione di banche dati universali, che permettano di attribuire un codice distinto a ciascuna specie.

Prima di tale approccio molecolare, l'identificazione delle specie animali utilizzava metodologie diverse basate sulle analisi istologiche dei tessuti, l'analisi della composizione dei grassi, la reazione di precipitazione e di diffusione in gel del complesso antigene-anticorpo, l'impiego di anticorpi mono-policonali in sistemi ELISA o la focalizzazione isoelettrica delle proteine (IEF). Tali metodiche, benché largamente utilizzate, presentano vantaggi e svantaggi. I vantaggi riguardano la possibilità di ottenere risposte rapide e di trovare facilmente in commercio specifici kit d'analisi. Gli svantaggi si associano all'impossibilità mediante ELISA di differenziare specie affini o vicine e di utilizzare le metodiche basate sull'IEF quando il campione, soprattutto ittico, non sia "freschissimo". In questi casi si possono avere risultati dubbi a causa di proteine specie-specifiche alterate o degradate. In particolare, l'IEF si è rivelata di scarsa utilità nell'identificazione di specie da prodotti trasformati, dove alla perdita dell'integrità anatomica si aggiunge, ad esempio, l'azione denaturante del trattamento termico a danno delle proteine (es. nel caso delle conserve a lunga scadenza) o l'azione denaturante dovuta a fattori fisici e/o chimici nelle semiconserve (prodotti ittici sotto vuoto, marinati, affumicati,

salati ed essiccati) a scadenza relativamente breve. Altri limiti nell'applicazione dell'isoelettrofocalizzazione sono dati dall'omologia delle proteine in specie filogeneticamente correlate e dall'elevato polimorfismo di alcune proteine frequentemente osservato in alcune specie (Rehnbein *et al.*, 1995). L'identificazione di specie animali nei prodotti alimentari ha applicazioni rilevanti non solo a fini ispettivi e nella lotta contro le frodi alimentari, ma anche nel monitoraggio degli allevamenti e della fauna selvatica. Lo sviluppo di sistemi di tracciabilità molecolare per risalire dalla vendita al dettaglio di un prodotto di origine animale alla sua origine di specie, di razza, di individuo ed eventualmente geografica, assume oggi una funzione importante nel garantire l'origine e la sicurezza dei prodotti alimentari e nel valorizzare ampi settori del comparto produttivo zootecnico nazionale.

In tal contesto si inserisce l'innovativa tecnica biomolecolare del DNA barcode che consente di tracciare una vera e propria impronta digitale di un individuo o di una specie. L'analisi biomolecolare consente di lavorare con frammenti, a differenza dell'analisi morfologica che richiede l'esame di interi individui e non di minuscole parti di essi; processare tutte le fasi della vita; smascherare sosia e quindi individuare facilmente e rapidamente le frodi di sostituzione di specie. Ulteriore vantaggio dell'utilizzo dell'analisi biomolecolare risiede nella conservazione degli acidi nucleici i quali, rispetto ad altri target, quali le proteine, restano identificabili anche in seguito ai numerosi trattamenti che si mettono in atto nel processamento dei cibi quali affumicatura, salagione, acidificazione e trattamento termico. Anche se è bene tenere presente che gli acidi nucleici possano degradarsi, in frammenti di lunghezza variabile, quando il trattamento termico è severo (Momcilovic & Rasooly, 2000).

L'analisi biomolecolare costituisce perciò una metodica sicuramente in grado di garantire una piena tracciabilità all'interno delle filiere dei prodotti animali. Inoltre, la forte automazione che caratterizza soprattutto le più recenti tecniche biomolecolari le rende particolarmente adatte alle analisi di routine richieste dagli enti preposti alla salvaguardia della sicurezza e della qualità in campo alimentare. Gli scopi del codice a barre basato sul DNA, operando uno *screening* molto ampio e utilizzando pochi geni di riferimento, sono quelli di assegnare gli esemplari studiati alle specie e di agevolare la scoperta di nuove. Lo scopo ultimo è quello di ottenere un *database* del

codice a barre delle specie per permettere l'identificazione sicura degli esemplari via via raccolti. Un ulteriore vantaggio del *DNA barcode* è rappresentato dalla possibilità di identificare specie criptiche ovvero di distinguere come appartenenti a specie diverse organismi che, essendo morfologicamente simili, sono stati erroneamente determinati come appartenenti ad un'unica specie.

I sistemi di tracciabilità basati sulle analisi molecolari costituiscono un vantaggio rispetto al sistema attuale basato sull'uso di marche auricolari e di documentazione cartacea che segue l'animale lungo la filiera di produzione, poiché il DNA rappresenta una etichetta indelebile e inalterabile.

1.2. Il DNA Barcoding

Il DNA barcoding è una metodica molecolare, nata da un'iniziativa di Paul D.N. Hebert dell'Università di Guelph (Canada), che sfrutta la variabilità di un marcatore molecolare per l'identificazione di identità biologiche. Il nome di questo approccio si riferisce metaforicamente al modo in cui uno scanner distingue i vari prodotti commerciali utilizzando i codici a barre lineari o "UPC" (*Universal Product Code*). Allo stesso modo il DNA barcoding si basa sul presupposto che ogni specie, con molta probabilità, possiede un unico codice a barre di DNA; anzi esistono 4^{650} possibili combinazioni ATGC rispetto a circa 10 milioni di specie stimate ancora da scoprire (Fig. 2).

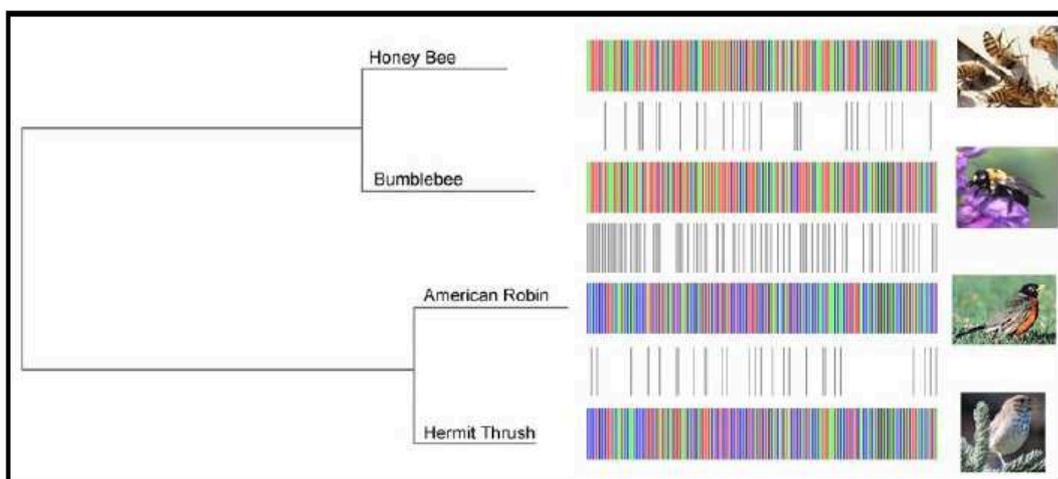


Fig. 2 – Rappresentazione schematica delle differenze nelle sequenze barcode di differenti gruppi animali (es. insetti e uccelli). Ciascuna barra colorata sulla destra corrisponde ad un nucleotide (A,G,T,C) presente in una particolare posizione all'interno della regione barcode amplificata (es. COI). Le barre nere rappresentano i siti variabili tra le coppie di sequenze barcode confrontate. A sinistra è riportata la ricostruzione NJ. (Immagine modificata da http://www.eurekalert.org/pub_releases/2004_09/plos-act092104.php).

Un ideale DNA barcode prevede due fondamentali caratteristiche per funzionare correttamente: un'ampia copertura tassonomica e un'alta risoluzione (Ficetola et al. 2010): l'alta copertura tassonomica (anche detta universalità) permetterebbe l'applicabilità del gene scelto come DNA barcode ad un numero di taxa il più ampio possibile (incluse specie non descritte o rare). Una capacità ad alta risoluzione si riferisce invece all'abilità di un dato barcode di differenziare le specie e si basa sulla quantità di differenze interspecifiche tra le sequenze di DNA. Un altro presupposto è

che il marker molecolare scelto come barcode dovrebbe mostrare una variabilità interspecifica più alta di quella intraspecifica. Di conseguenza, un'ideale analisi di DNA barcoding presuppone che le distribuzioni della variabilità inter e intraspecifica siano separate una distanza detta "DNA Barcoding gap" (Meyer & Paulay, 2005; Wiemers et al. 2005; vedi anche Fig. 3).

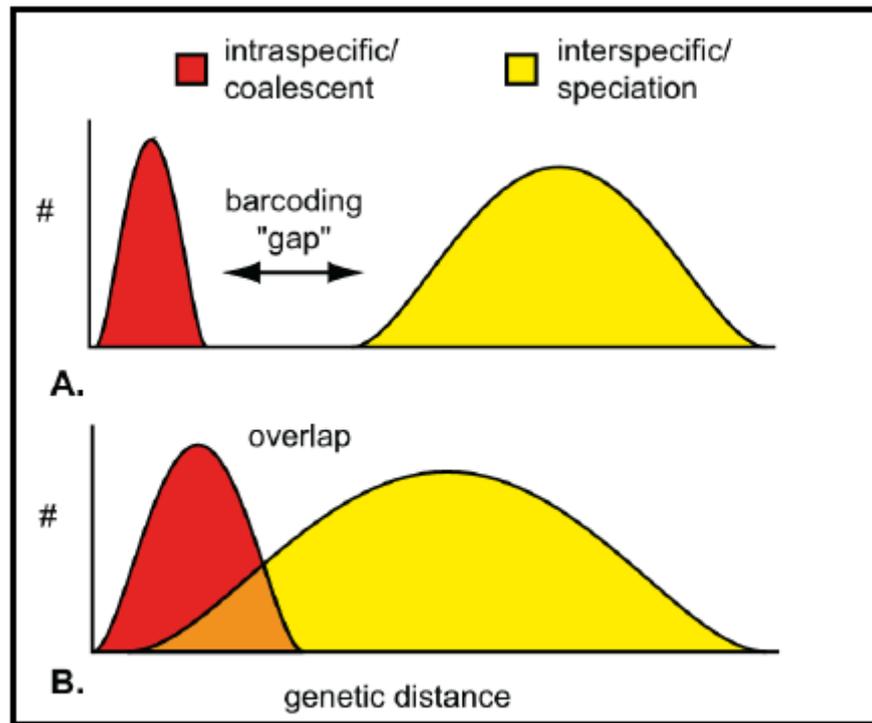


Fig. 3 - Schema del "Barcoding gap" second Meyer & Paulay (2005). In rosso è mostrata la distribuzione della variabilità intraspecifica mentre in giallo la divergenza interspecifica. A) Situazione ideale per il barcoding con le distribuzioni discrete non sovrapposte. B) Situazione alternative con assenza di gap e sovrapposizione tra le due distribuzioni.

Seppure non rivoluzionario dal punto di vista metodologico, la grande novità del DNA barcoding è la scala di analisi e la standardizzazione del metodo. Utilizzando un tratto molto breve del genoma mitocondriale sarebbe possibile determinare la specie di appartenenza di animali e piante raccolti in natura, anche in assenza di specifiche conoscenze tassonomiche. Nonostante si tratti di una minuscola frazione del DNA contenuto in ogni cellula, mostra una variabilità sufficiente a distinguere fra loro la maggior parte delle specie. Poiché il tasso di mutazione è inversamente

proporzionale alle dimensioni del genoma si è ritenuto conveniente utilizzare il DNA mitocondriale come oggetto di studio, anche per la sua abbondanza all'interno di ogni cellula rispetto al DNA nucleare, e quindi più facilmente recuperabile, soprattutto quando i campioni sono minuscoli o parzialmente degradati.

In particolare è stata analizzata la regione del genoma mitocondriale che codifica per la subunità I della Citocromo C ossidasi (COI), una proteina transmembrana mitocondriale che gioca un ruolo fondamentale nella fosforilazione ossidativa e mostra un alto grado di conservazione tra le specie < 10% rispetto a quella osservata tra specie differenti. Inserzioni e delezioni in tale regione sono rare. La variazione intraspecifica della COI è minore rispetto a quella interspecifica e questo fornisce la chiave che permette la differenziazione delle specie. La percentuale di mutazione di tale sequenza deve essere abbastanza lenta in modo tale che le variazioni intraspecifiche siano minimizzate, ma sufficientemente rapida da accentuare le variazioni interspecifiche. Recenti studi hanno individuato 648bp al terminale 5' del gene COI utili per generare un opportuno barcode (Fig. 4).

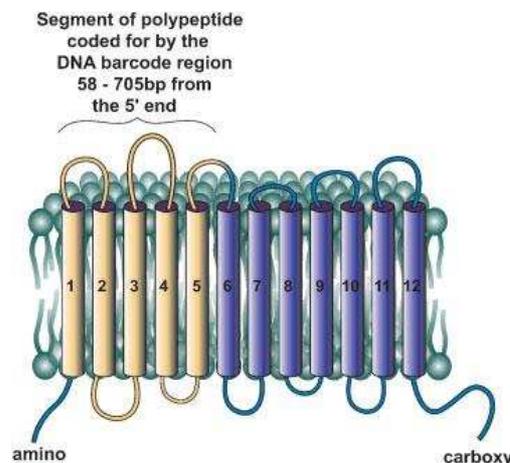


Fig. 4 – Struttura della citocromo C ossidasi I (COI). La parentesi indica il segmento denominato regione barcode all'estremità 5' del polipeptide.

Il gold standard per qualsiasi sistema di tassonomico sta nella sua capacità di fornire un'accurata identificazione delle specie. Hebert et al (2004b) proposero che sarebbe stato possibile validare la tecnica del DNA barcoding andando a considerare le distanze genetiche tra e all'interno delle specie esaminate attraverso un metodo di

clustering come ad es. la costruzione di un fenogramma Neighbour-Joining basato sul calcolo delle distanze. La capacità del DNA barcoding di identificare un organismo incognito potrebbe dipendere da una soglia di divergenza (divergence-threshold) per es. l'osservazione del barcoding gap tra la variabilità intra e interspecifica. Il valore standard di tale soglia di divergenza per definire una specie utilizzando come barcode il gene della COI è 10 volte più alto del valore medio della variabilità intraspecifica (10-fold rule). Il valore di divergenza tra le specie è generalmente > del 3%, con qualche eccezione, come nel caso di specie congeneriche geneticamente distinte ma con bassi valori di divergenza (0.6-2.0%), probabilmente dovuti alla loro recente origine. Il "10-fold rule" è risultato efficace in diversi gruppi tassonomici del regno animale, come ad es. gli uccelli del Nord America ((Hebert *et al.*, 2004a; Hajibabaei *et al.*, 2006a), le sardine (Grant and Bowen, 1998), i pesci (Ward *et al.*, 2005), le falene (Hebert *et al.*, 2004b), i crostacei (Lefebure *et al.*, 2006) e i ragni (Paquin and Hedin, 2004), ma è risultato poco risolutivo in altri taxa quali gli Cnidari (Shearer *et al.*, 2002), i gasteropodi (Meyer and Paulay, 2005) e le farfalle (Wiemers and Fiedler, 2007). La possibilità di utilizzare una soglia standard della COI per identificare una specie potrebbe essere davvero interessante in quanto potrebbe superare la necessità di un'analisi morfologica, ma la sua definizione dovrebbe essere testata anche in altre regioni geografiche e in altri gruppi tassonomici per coprire tutta la biodiversità esistente per le specie in esame (Hebert *et al.*, 2004a). Il problema nell'utilizzo del barcoding gap consiste nel fatto che manca un forte supporto biologico e può generare errori: in particolare falsi positivi, se popolazioni all'interno di una specie mostrano alti tassi di divergenza intraspecifica, per es. in popolazioni allopatriche con flusso genico interrotto; d'altra parte può anche generare falsi negativi, se non c'è variazione di sequenza nella regione barcode tra differenti specie riproduttivamente isolate (definizione di specie in accordo con il concetto di specie biologica di Mayr).

In questi casi, si comincia distinguendo le popolazioni all'interno della stessa specie da quelle di specie diverse e considerando il concetto di specie. Meyer and Paulay (2005) hanno dimostrato che l'esistenza del barcoding gap potrebbe dipendere fortemente dal campionamento delle specie. Gli individui scelti per rappresentare

ciascun taxon nel database di riferimento potrebbero coprire la maggior parte della diversità esistente, diversamente un campionamento incompleto potrebbe condurre ad un “barcoding gap” non corrispondente alla realtà. Il DNA barcode assicura una “robusta” identificazione dell’esemplare in cladi di cui si conosce bene la tassonomia e gli individui rappresentativi sono ampiamente campionati (DeSalle *et al.*, 2005), mentre si incontrano difficoltà nell’identificazione nei casi in cui gli esemplari incogniti appartengono a taxa non ben descritti (Rubinoff *et al.*, 2006). E’ quindi auspicabile effettuare un estensivo campionamento con esemplari appartenenti a popolazioni allopatriche per ciascuna specie in esame, per quantizzare la variabilità intraspecifica (Frezal and Leblois, 2008). Oltre a questa regola, un secondo criterio utile per stimare la validità dell’analisi è la costruzione di un albero delle distanze (Neighbour-Joining, NJ) per avere una rappresentazione grafica delle distanze genetiche. L’albero NJ non dipende infatti dal barcoding gap, ma si basa sul principio della coalescenza di popolazioni con specifiche, per es. individui appartenenti alla stessa specie tendono a clusterizzare insieme o separatamente se appartengono a specie diverse, e i valori di bootstrap danno una stima della accuratezza del raggruppamento.

In ogni modo, anche l’albero NJ può fallire a causa di un campionamento incompleto, o quando viene costruito con specie strettamente correlate e nelle situazioni in cui si hanno bassi valori di divergenza.

Notevoli e svariati risultano comunque essere le applicazioni pratiche del DNA barcoding: i biologi potrebbero identificare velocemente gli organismi sul campo, per ottenere una rapida valutazione della biodiversità; le autorità sanitarie potrebbero identificare le zanzare portatrici di malattie infettive, per esempio il West Nile virus, e altri organismi vettori di malattie, permettendo la tempestiva adozione di metodi di controlli mirati; proprietari di ristoranti e consumatori potrebbero controllare il pesce acquistato, per accertare che corrisponda a quello pubblicizzato dal venditore; gli esperti di tassonomia potrebbero individuare esemplari geneticamente distinti, accelerando la catalogazione delle nuove specie prima che si estinguano; i coltivatori potrebbero identificare specie di animali nocivi che invadono i loro campi, e gli ispettori portuali potrebbero fermare alle frontiere le spedizioni che ospitano specie

dannose; i medici potrebbero rapidamente identificare funghi patogeni e parassiti, come quello che provoca la malaria, e diagnosticare le relative malattie; i musei potrebbero usare la tecnica per analizzare vaste collezioni di esemplari che hanno accumulato nel tempo, come ausilio per la scoperta di nuove specie che si nascondono nelle loro teche; enti di controllo istituzionali potrebbero cercare nei mangimi animali componenti vietati che potrebbero diffondere malattie come la mucca pazza.

Attualmente sono attivi numerosi progetti di DNA barcode, sia di vertebrati che di invertebrati, che hanno messo a disposizione della comunità scientifica enormi quantità di dati.

Nel 2004, sotto il patrocinio della Alfred P. Sloan Foundation, nasce l'iniziativa *Barcode of Life*, un consorzio con sede a Washington.

Barcode of Life Data Systems (Fig. 5) è una banca dati pubblica, che conta oltre 460000 schede provenienti da oltre 46000 specie di tutto il regno animale, soprattutto uccelli, pesci, farfalle e falene. Ciascuna scheda contiene il nome della specie, la sequenza del suo codice a barre, il luogo in cui è stata raccolta, riferimenti all'esemplare tipo, fotografie e altri dati biologici.

Per coordinare gli enormi sforzi necessari a costruire una simile biblioteca, nel 2005 è stato istituito il *Consortium for the Barcode of Life* che raccoglie 150 istituzioni di 45 paesi che utilizzano i codici a barre genetici come standard per l'identificazione delle specie.

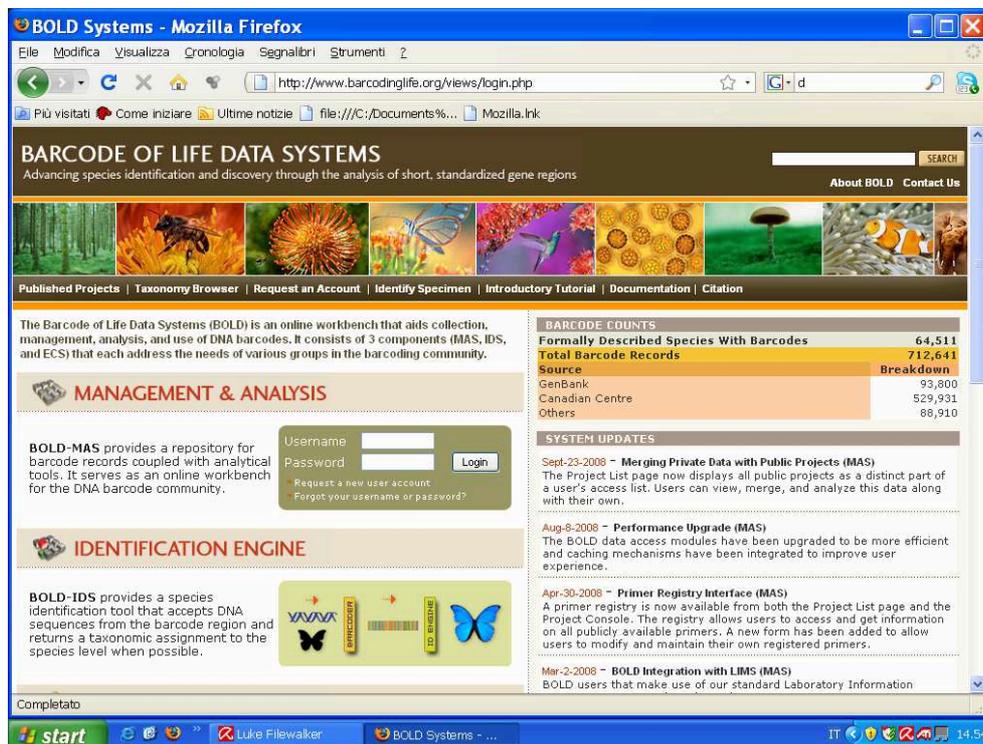


Fig. 5 – Home page del Barcode of Life Data Systems (<http://www.barcodinglife.org>)

Nella tabella che segue è possibile visualizzare una lista delle più importanti campagne sul DNA barcoding (Tab. 1)

| PROJECT NAME | LOGO | TARGET ORGANISMS | SPECIES BARCODED | EXTANT SPECIES | PROJECT WEBSITE |
|-----------------------------|---|------------------|------------------|----------------|---|
| ABBI |  | Birds | 3,445 | 9,933 | http://www.barcodingbirds.org/ |
| Formicidae barcode of Life |  | Ants | 798 | 12,205 | http://www.formicidaebol.org/index.php |
| Trichoptera Barcode of Life |  | Caddisflies | 2,474 | 13,165 | http://trichopteraebol.org/ |

| PROJECT NAME | LOGO | TARGET ORGANISMS | SPECIES BARCODED | EXTANT SPECIES | PROJECT WEBSITE |
|-----------------------------|--|-----------------------|------------------|----------------|---|
| Coral Reef Barcode of Life |  | Coral Reef fauna | 5,431 | 16,807 | http://www.reefbarcoding.org/ |
| Fish-BOL |  | Fishes | 7,989 | 31,220 | http://www.fishbol.org/ |
| Lepidoptera Barcode of Life |  | Butterflies and Moths | 48,676 | 165,000 | http://www.lepbarcoding.org/index.php |
| Mammalia Barcode of Life |  | Mammals | 858 | 5,426 | http://www.mammaliabol.org/index.php |
| Marine Barcode of Life |  | Marine fauna | 6199 | 55451 | http://www.marinebarcoding.org/ |

Tab. 1 - Lista delle più importanti campagne di DNA Barcoding a livello mondiale.

Il grande sforzo di assemblaggio delle schede sarà guidato dall'*International Barcode of Life Project*, di cui fanno parte 25 paesi, il cui obiettivo è trattare cinque milioni di esemplari provenienti da 500000 specie entro il 2014. Nel caso di specie ittiche, il progetto *Fish & Chips*, finanziato dall'Ue, si propone di attribuire un codice a tutte le specie ittiche, disponendo le sequenze specie-specifiche su un "microarray" utilizzabile per la rapida identificazione di campioni ignoti.

La determinazione dei codici a barre genetici sta contribuendo ad una più rapida catalogazione della biodiversità. Uno dei principali risultati è l'esistenza di un numero di specie maggiore di quanto si credesse. Tale scoperta si deve allo studio dei codici a barre offerti dalle *criptospecie*, organismi che pur essendo fenotipicamente uguali presentano differenze genetiche tali da farli ascrivere a specie diverse. Una delle iniziali scoperte più notevoli è il ridotto livello di diversità genetica mitocondriale presente nella maggior parte delle specie.

Si tratta di una scoperta che mette in crisi una previsione della genetica di popolazione, secondo cui le popolazioni più antiche o più vaste dovrebbero esibire una maggiore diversità. Spesso si ritiene che un basso livello di variabilità indichi che la popolazione è passata di recente attraverso un evento di “collo di bottiglia”.

L'uso dei codici a barre genetici è funzionale alla realizzazione di una mappa della diversità a livello del DNA, e rappresenterà la base per la scoperta di nuove specie.

Ma quali potranno essere le implicazioni di questa iniziativa? I difensori del *DNA barcoding* asseriscono che questa tecnologia darà impulso alle collezioni biologiche, abbreviando i tempi richiesti per l'identificazione delle nuove specie. I detrattori, invece, restano scettici obiettando che l'identificazione effettuata su basi genetiche contribuirà a metter definitivamente in soffitta la sistematica tradizionale, già in crisi, e sarà facile preda di speculazioni commerciali. Certamente sussistono aspetti metodologici ancora irrisolti. Ad esempio, il gene COI non rappresenta il marcatore ideale per le piante, dato che il suo tasso di sostituzione è troppo lento e non sempre consente il riconoscimento di specie affini. Inoltre, il *DNA barcoding* permette di affrontare un ambito molto circoscritto della tassonomia, in quanto si limita ad attribuire determinate sequenze di DNA a specie note, identificate attraverso metodologie tradizionali (basate, ad esempio, su caratteristiche morfologiche e fisiologiche). In tale contesto la sua funzione è quella di assegnare campioni ignoti a specie già tradizionalmente caratterizzate. Laddove la specie sia ancora indefinita, la tecnica del DNA barcoding potrebbe rivelare i propri limiti, sebbene sarebbe sicuramente in grado di scoprire nuove specie “criptiche”. Il DNA barcoding non sostituisce il sistema linneano di classificazione; il suo scopo non è creare un sistema di classificazione basato esclusivamente sul DNA. Lo scopo è di aiutare l'identificazione di nuove specie nell'ambito di *taxa* ancora non ben definiti. Le nuove specie scoperte dovranno sempre possedere un nome in base al sistema linneano di classificazione, essere studiate accuratamente con immagini ad alta risoluzione di alcuni esemplari, ed essere accompagnate da informazioni precise sui siti di raccolta. Il DNA barcoding non segna pertanto la fine dell'*alfa* tassonomia ma la assiste e la coadiuva: il DNA barcoding ha pertanto valore solo se accompagnato da una corretta tassonomia tradizionale (Hebert *et al.* 2004a). Lo studio molecolare è

efficiente, infatti, solo quando è possibile il confronto tra l'esemplare sconosciuto oggetto dello studio e un esemplare di riferimento ben descritto dal punto di vista tassonomico, morfologico ed ecologico (Dupont *et al.* 2007). Auspicabile e molto prezioso, è quindi il contributo di tassonomi e naturalisti alla ricerca e possibile risoluzione dei misteri della biodiversità.

1.3. Il genoma mitocondriale.

Nelle cellule eucariotiche, l'informazione genetica viene immagazzinata e trascritta non solo nel nucleo ma anche a livello citoplasmatico. I mitocondri sono dotati di un proprio corredo genetico dove l'informazione è codificata in molecole di DNA. Questi organelli contengono un elevato numero di copie di piccole molecole circolari di DNA a doppio filamento che è omoplasmico e non interrotto da introni o da DNA ripetitivo. La lunghezza del DNA (mtDNA) è fortemente conservata nel regno animale rispetto a quella dei genomi di altri organuli e nei Teleostei di dimensioni più piccole è compresa tra 15.2 - 19.8 kb (Billington & Hebert, 1991). E' chiaro che la dimensione e l'ordine dei geni dell'mtDNA dei pesci è altamente conservato (Moritz *et al.* 1987). Comunque, il genoma mitocondriale di specie strettamente correlate varia spesso in dimensioni, suggerendo un equilibrio di delezioni e inserzioni (Billington & Hebert, 1991).

I geni contenuti nel genoma mitocondriale sono anche relativamente conservati. Nei genomi mitocondriali di tutti gli animali multicellulari e di alcuni protozoi sono presenti geni che codificano per 13 proteine, per 22 tRNAs e per 2rRNAs (Avisé, 1986; Wilson *et al.*, 1985) (Fig. 6). Nella maggior parte degli animali, le due catene polinucleotidiche dell'mtDNA hanno una densità diversa, per cui una è indicata come catena pesante (H, heavy) e l'altra come catena leggera (L, light).

La maggior parte dei geni mitocondriali è localizzata nella catena H, che ha densità maggiore in quanto presenta un elevato contenuto in GC. Soltanto un gene codificante mRNA e otto geni per i tRNA sono localizzati sulla catena L. Nel genoma mitocondriale l'organizzazione è estremamente compatta: non vi sono introni, alcuni geni sono parzialmente sovrapposti, i geni per i tRNA sono inframezzati ai geni che codificano per gli rRNA o per le proteine.

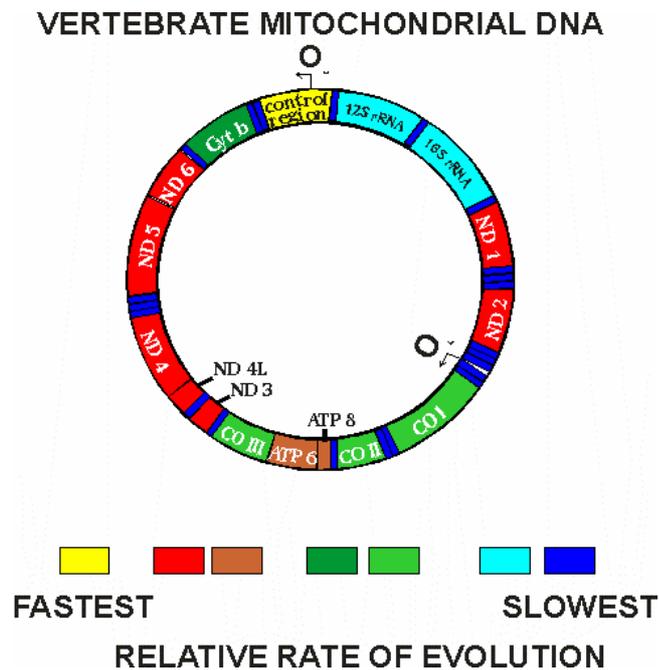


Fig. 6 – Mappa del DNA mitocondriale di Vertebrato con relativi tassi di evoluzione.

L'interposizione dei geni per i tRNA fra le regioni che specificano le proteine e gli rRNA non lascia alcun spazio per promotori paragonabili a quelli presenti nei nuclei eucariotici o nei batteri. Un unico promotore per la trascrizione è localizzato entro la regione dell'ansa D, che è definita regione di controllo (d-loop) in quanto contiene i segnali che controllano la sintesi del mtDNA.

Il d-loop contiene una regione centrale conservata e regioni fiancheggianti che variano in sequenza e in lunghezza e che risultano particolarmente informative per studi interspecifici e intraspecifici (Lee *et al.*, 1995).

L' mtDNA, a differenza del DNA nucleare, è quasi interamente trasmesso per via materna, con qualche eccezione di eredità paterna o biparentale (Korpelain, 2004). Anche i genomi dei cloroplasti sono ereditati per via materna in quasi tutte le angiosperme (Liu & Musial, 2001). Quasi tutte le specie producono una percentuale sostanziale di zigoti uniparentali; eccezioni sono state riscontrate nei lieviti

Saccharomyces cerevisiae e *Schizosaccharomyces pombe* nei quali alcuni incroci producono meno del 10% di zigoti biparentali (Birky Jr., 1995).

Durante la fecondazione, lo spermatozoo contribuisce con il DNA nucleare mentre la cellula uovo contribuisce sia con il DNA nucleare che con il citoplasma contenente organuli. E' stato stimato che in specie in cui è possibile il trasferimento di citoplasma paterno, meno di 1 mitocondrio su mille possiede DNA paterno (Wilson *et al.*, 1985). L'assenza di crossing-over e di ricombinazione nel genoma mitocondriale semplifica ampiamente gli studi sistematici; esso infatti, evolve solo per mutazione.

L'eredità strettamente materna, le restrizioni ai cambiamenti mutazionali, suggeriscono che l' mtDNA si evolve più velocemente della sua controparte nucleare. Brown *et al.*, (1979) hanno stimato che l' mtDNA evolve 10 volte più velocemente del DNA nucleare. Attualmente, è noto che regioni differenti hanno differenti tassi di evoluzione (Brown *et al.*, 1979). Il tasso di evoluzione per il genoma mitocondriale dei primati è stato stimato a circa il 2% per milioni di anni (My). Questa stima però sembra essere più costante tra gli organismi omeotermi (Brown, 1983; Shields & Wilson, 1987) e sembra diminuire tra gli altri vertebrati. (Billington & Hebert, 1991). Non sono completamente chiare le ragioni per cui l' mtDNA animale vada incontro a rapido cambiamento evolutivo, che potrebbe verificarsi in quanto mancano i meccanismi di riparazione del DNA , o perché la DNA polimerasi implicata nella replicazione dell' mtDNA è più soggetta ad errori. Un'altra spiegazione possibile per il tasso evolutivo più elevato a carico dell' mtDNA animale consisterebbe nel fatto che la pressione selettiva, che normalmente elimina molte mutazioni dai geni nucleari, non è così intensa nei mitocondri. In altri termini, cambiamenti nelle proteine, nei tRNA e negli rRNA codificati dalle sequenze dell' mtDNA, potrebbero influire meno negativamente sulla fitness dell'individuo, che non cambiamenti simili nelle proteine, nei tRNA e negli rRNA codificati dai geni nucleari. Secondo studi più recenti il motivo dell'alto tasso evolutivo dell' mtDNA sarebbe imputabile ai frequenti eventi mutazionali causati dall'elevata quantità di specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotti durante la catena respiratoria, che possono alterare chimicamente il DNA, insieme all'assenza di un

complesso compatto proteina-DNA che rende l' mtDNA più accessibile e, allo stesso tempo, più vulnerabile ai danni causati dai ROS (Salgado et al. 2008). Il tasso evolutivo dell' mtDNA non è però omogeneo, varia nelle diverse regioni che sono soggette a forti costrizioni funzionali. In genere, i geni mitocondriali che evolvono più lentamente sono quelli che codificano per i due rRNA e i 22 tRNA, il dominio centrale del dloop e i siti non sinonimi nei geni che codificano per le proteine; mentre le regioni che evolvono più rapidamente sono i domini periferici del dloop, detti rispettivamente CSB e ETAS, le sequenze intergeniche e i siti sinonimi (Pesole et al. 1999). In particolare è stato dimostrato che sebbene il dominio principale del dloop esibisca una grande similarità nucleotidica tra specie differenti e presenti un indice di divergenza simile a quello osservato nei geni mitocondriali che codificano per proteine, le regioni periferiche che delimitano a monte e a valle questo dominio principale, presentano un rapido livello di evoluzione che genera eterogeneità nella lunghezza e nella composizione di basi (Sbisà *et al.*, 1997).

Tra le regioni funzionali nei Mammiferi, il più alto grado di conservazione è stato trovato nei geni che codificano per le 3 subunità della citocromo c ossidasi, per il citocromo b, per l'rRNA 16S e per alcuni tRNA (Saccone et al. 1999). Inoltre, poiché la maggior parte dei geni mitocondriali sono altamente conservati a livello aminoacidico, di solito le mutazioni sono limitate alla terza posizione del codone, poiché questa è meno soggetta alla pressione selettiva (Hebert et al. 2003a). Inoltre, le transizioni si verificano con una frequenza maggiore rispetto alle transversioni e mostrano una saturazione più rapida delle transversioni. La saturazione si riferisce al caso in cui le mutazioni si verificano con una frequenza tale, ad un singolo locus, che il segnale viene perduto (una singola base può mutare da una base ad un'altra diverse volte, ma solo una mutazione viene letta) e non è filogeneticamente informativa. (Fitch, 1967; Brown et al., 1982; Aquadro & Greenberg, 1983; Li *et al.*, 1984; Irwin *et al.*, 1991; Meyer, 1994; Simon *et al.*, 1994; Kocher *et al.*, 1995). Le mutazioni di solito sono silenti e neutrali (Brown et al., 1979) costituendo così dei caratteri filogeneticamente informativi. E' stato anche visto che alcuni nucleotidi sono più sensibili alle mutazioni di altri e che la frequenza di mutazione per tutti i nucleotidi non è uguale. Inoltre, l' mtDNA è presente in multiple copie nella cellula e ciò

fornisce la possibilità di amplificare molecole stampo anche in presenza di DNA altamente degradato, a differenza dei geni a singola copia del genoma nucleare. La mancanza di introni e la bassa frequenza di delezioni e inserzioni dell' mtDNA rende più semplici gli allineamenti di sequenza di specie differenti poiché i gaps di sequenza sono rari (Saccone et al. 1999). A causa delle sue ridotte dimensioni, esso è stato il primo genoma eucariotico ad essere completamente sequenziato nell'uomo (Anderson *et al.*, 1981) e molti altri genomi mitocondriali di diversi organismi sono stati recentemente sequenziati e attualmente disponibili sul sito MitBASE (<http://www.ebi.ac.uk/htbin/Mitbase/mitbase.pl>), un database integrato ed esauriente del DNA mitocondriale. La conoscenza di diversi mtDNA completi ha permesso non solo di disegnare set robusti di primer universali in grado di coprire specifici segmenti del cromosoma mitocondriale in un ampio range di Eucarioti (Folmer *et al.*, 1994; Simmons and Weller, 2001), ma anche primer specifici in grado di amplificare in alcune specie, senza la necessità di ulteriori step di sequenziamento o altre tecniche basate sulla PCR (Montiel-Sosa *et al.*, 2000; Lin and Hwang, 2008).

1.4. La tracciabilità molecolare nel settore ittico

I notevoli progressi conseguiti dalla biologia molecolare nei vari settori della ricerca scientifica hanno aperto nuove prospettive nel campo della sicurezza alimentare, consentendo l'attuazione di controlli analitici in grado di innalzare i livelli di qualità igienico-sanitaria (*food safety*) e merceologica (*food authenticity*) dei prodotti destinati al consumo umano. Sul versante della *food authenticity*, gli standards qualitativi proposti dalla recente normativa europea, in tema di sicurezza alimentare, hanno reso sempre più attuale il concetto di “tracciabilità degli alimenti, dei mangimi, e dei loro ingredienti” (regolamento CE n. 178/2002), lungo tutta la filiera produttiva. In questo caso la “tracciabilità molecolare” derivante dall'identificazione di specie animali e vegetali, diventa uno strumento indispensabile per smascherare eventuali frodi perpetrate ai danni del consumatore, e per la certificazione di autenticità dei prodotti di origine controllata. Nella rosa delle possibili applicazioni le più comuni sono:

- identificazione delle specie animali nell'industria dell'allevamento e nei prodotti base di carni;
- identificazione di specie nel comparto ittico (tecnica DNA-*barcoding* o codice a barre genetico);
- controllo di autenticità delle varietà di uve e olive utilizzate nella produzione di vino e olio;
- identificazione delle semole di produzione della pasta tipica *made in Italy*;
- identificazione varietale, ovvero la verifica che la varietà commercializzata corrisponda a quella dichiarata (finalizzata alla protezione del costituente da possibili frodi);
- la tracciabilità di tossine batteriche o contaminanti fungini (le micotossine);
- la tracciabilità di OGM (Organismi Geneticamente Modificati).

Lo sviluppo dei marcatori molecolari e del “DNA profiling” fornisce uno screening rapido e a costi ridotti, oltre che potente, affidabile e ad alto contenuto informativo. Si parla quindi oggi di “**tracciabilità molecolare**” per indicare la possibilità di investigare la natura e l'origine di un prodotto finito tramite analisi del DNA,

proteine o metaboliti. Grazie alla completa indipendenza da fattori epigenetici, comuni invece agli altri approcci, l'analisi del DNA risulta essere la strategia più promettente. Il successo o meno di tali analisi è spesso dipendente dalla scelta del marcatore molecolare utilizzato. La scelta deve infatti necessariamente tener conto del contenuto informativo e della distribuzione nel genoma del marcatore utilizzato, oltre che della riproducibilità, dei tempi e dei costi richiesti. Oggi gli AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e gli SSR (Single Sequences Repeat) sono tra i marcatori che forniscono un indice di diversità genetica maggiore e che pertanto sono maggiormente adatti ai fini di un fingerprinting in quanto in grado di discriminare anche varietà essenzialmente derivate (EDV) o razze piuttosto simili. Lo sviluppo dei progetti di sequenziamento di genomi interi o parziali ha inoltre introdotto la possibilità di sviluppare nuovi marcatori, gli SNP (Single Nucleotide Polymorphism). A questa nuova tecnologia è abbinabile l'utilizzo di DNA chip per la produzione di profili genetici relativi ad un numero elevatissimo di sequenze contemporaneamente. Spesso ai fini della tracciabilità molecolare si ricorre anche a marcatori SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) che consentono di amplificare una sequenza nucleotidica specifica in grado ad esempio di rilevare la presenza di OGM o di un contaminante fungino o un patogeno. A tal fine si è di recente sviluppata un'intensa attività di ricerca di "codici a barre del DNA" o DNA Barcode ovvero sequenze specifiche (solitamente geni ortologi) che consentano di scoprire, caratterizzare e discriminare specie diverse. Tale interesse ha portato ad un'importante iniziativa internazionale volta allo sviluppo del DNA barcode: il CBOL (The Consortium of Barcode of Life, 2004).

L'industria ittica è poi particolarmente interessata alla tracciabilità delle diverse specie ittiche, che poiché possono essere commercializzate sfilettate e possono avere un valore commerciale anche molto diverso tra loro, si possono prestare a frodi. I nuovi strumenti messi a disposizione dalle tecniche biomolecolari consentono l'identificazione con un grado di affidabilità e sensibilità di gran lunga superiore a tutti gli altri metodi diagnostici già precedentemente utilizzati, dal momento che si basano sullo studio del patrimonio genetico da cui deriva l'univocità che caratterizza ogni essere vivente. In questi ultimi anni la richiesta di prodotti della pesca è

notevolmente aumentata a tal punto che l'andamento dei prodotti ittici ha registrato una tendenza alla crescita nei mercati di tutto il mondo e rappresenta oggi una delle voci più importanti del contesto produttivo alimentare.

Ciò è dovuto a diversi fattori:

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

In particolare questa vasta diversificazione dell'offerta associata al settore ittico lo espone, più facilmente rispetto ad altri comparti produttivi, a frodi commerciali da sostituzione di specie pregiate con altre di minor valore. Questo tipo di frode, la più comune nel settore ittico, è denominata, in gergo legale, "falsificazione". In generale, una frode che si verifichi in un comparto alimentare è denominata "frode alimentare" e costituisce un atto in base al quale viene posto in commercio un alimento "diverso" da quello atteso dal consumatore, sorprendendone la buona fede e configurando una diminuzione del valore della merce, economico e/o nutritivo. Attualmente la diminuzione delle risorse di pesca nelle acque europee continua a far registrare da anni un rapporto deficitario negli scambi dei prodotti ittici con l'estero, questo anche per effetto della globalizzazione, che vede il mondo asiatico e quello africano in una veste concorrenziale. In particolare l'Italia dimostra una spiccata subordinazione commerciale estera, in quanto importa oltre il 50% dei prodotti ittici. Il riconoscimento di specie assume un'importanza sempre maggiore non solo per la rilevazioni di frodi commerciali da sostituzione di specie, e le implicazioni economiche correlate, ma anche per le molteplici implicazioni di carattere ecologico e sanitario in quanto può capitare che specie potenzialmente tossiche, prima assenti nei nostri mari, entrino nei nostri circuiti commerciali.

In ambito sanitario, la possibilità di identificare con sicurezza le specie potenzialmente tossiche od allergeniche (vari crostacei e molluschi), oltre alle specie provenienti da areali inquinati o non controllati per la presenza di biotossine termoresistenti, assume un gran significato dal punto di vista della sicurezza alimentare. In ambito ecologico-legale, il corretto riconoscimento favorisce la tutela di specie protette ed il rispetto del fermo biologico.

E' inoltre il consumatore stesso a richiedere di accedere a prodotti sicuri dal punto di vista igienico sanitario e, soprattutto, "sicuri" riguardo alla provenienza e alle garanzie di sostenibilità, manipolazione e gestione con procedure atte a garantire qualità nell'ambito dell'intera filiera di produzione. La rintracciabilità a livello di filiera è garantita mediante l'etichettatura, disciplinata secondo tutta una serie di norme elencate nel paragrafo seguente. La mancata rispondenza del prodotto a quanto dichiarato in etichetta è classificata come reato.

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

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

cattura o di allevamento. Al contrario, gli stessi prodotti sono esclusi dal campo di applicazione dei regolamenti comunitari quando sono cotti o altrimenti preparati.

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

Infine v'è ricordato che, a norma dell'Art. 4, par. 1 del Reg. (CE) n. 104/2000, le disposizioni del regolamento non si applicano ai piccoli quantitativi di prodotti venduti direttamente al consumatore finale da parte dei pescatori o delle aziende di acquacoltura ovvero alle quantità il cui prezzo di mercato non superi i 20 Euro per vendita individuale, senza possibilità di cumulo. Inoltre, per i prodotti esposti alla vendita al dettaglio "preincartati" le suddette informazioni possono essere inserite in un "cartello" apposto in prossimità del comparto relativo, in maniera tale da non indurre in errore il consumatore.

La metodica che, attualmente in Italia, ha valore a livello legale nell'identificazione di specie ittiche è l'**identificazione morfologica** delle caratteristiche anatomiche macroscopiche del pesce intero, secondo chiavi dicotomiche proposte dalla *Food and Agriculture Organization* (FAO). Tuttavia quasi la metà dell'attuale consumo domestico di prodotti ittici in Italia (48,6 % nel 2005, dati Ismea) riguarda prodotti lavorati e trasformati, per i quali può risultare difficile riconoscere l'origine e la provenienza da parte dei Servizi Veterinari tramite l'identificazione morfologica (ad esempio, nel caso di filetti di pesce, attraverso la forma del prodotto, lo spessore e l'andamento di miomeri e di miofibrille, il colore del muscolo, il colore e tipologia di eventuali residui di pelle o peritoneo rimasti adesi al muscolo). Per i motivi precedentemente descritti, e in virtù dell'ampia differenziazione dell'offerta di prodotto "lavorato" che caratterizza il mercato, è fondamentale identificare in maniera inequivocabile e rapida le specie oggetto di commercializzazione anche quando le caratteristiche morfologiche identificative non sono più presenti. Si rende pertanto necessario il ricorso a tecniche di laboratorio che siano di supporto all'ispettore sanitario e diventino garanzia per il consumatore. A tal scopo, in passato, in prodotti lavorati, si è spesso ricorso a **metodi di identificazione delle proteine**, in particolare all'isoelettrofocalizzazione (IEF) delle proteine

sarcoplasmatiche di pesce (Berrini *et al.*, 2006), ufficializzata nel 1995 negli Stati Uniti dalla *Food & Drug Administration* (FDA) come metodo d'identificazione delle specie ittiche, ma non ufficializzata nell'Unione Europea. Tuttavia L'IEF si è rivelata di scarsa utilità nell'ancora più problematica identificazione di specie in prodotti trasformati, dove alla perdita dell'integrità anatomica si aggiunge, ad esempio, l'azione denaturante del trattamento termico a danno delle proteine, nel caso delle conserve a lunga scadenza, o l'azione denaturante dovuta a fattori fisici e/o chimici nelle semiconserve (prodotti ittici sotto vuoto, marinati, affumicati, salati ed essiccati) a scadenza relativamente breve. Altri limiti nell'applicazione dell'isoelettrofocalizzazione sono dati dall'omologia delle proteine in specie filogeneticamente correlate e dall'elevato polimorfismo di alcune proteine frequentemente osservato in alcune specie (Rehnbein *et al.*, 1995). Per superare queste difficoltà si sono cercate metodiche di analisi più efficaci che potessero risolvere i limiti delle metodiche precedentemente utilizzate. Tra le procedure attualmente disponibili per queste analisi, le metodiche biomolecolari stanno avendo notevole sviluppo negli ultimi anni e sembrano le più promettenti. Le tecniche biomolecolari si basano sull'analisi di sequenze di DNA, le quali consentono di tracciare una vera e propria impronta digitale di un individuo o di una specie. I vantaggi principali dell'analisi biomolecolare stanno nella sensibilità, grazie all'amplificazione delle sequenze stesse mediante PCR, nella specificità, dovuta alla singolarità delle sequenze di DNA, diverse da specie a specie, e in particolare in campo ittico, nella conservazione del materiale bersaglio dell'analisi, gli acidi nucleici i quali, rispetto ad altri target, rimangono identificabili anche in seguito ai numerosi trattamenti che si mettono in atto nel processamento dei cibi. L'analisi biomolecolare costituisce perciò una metodica sicuramente in grado di garantire una piena tracciabilità all'interno delle filiere dei prodotti animali. Notevole contributo viene fornito dall'innovativa metodica del DNA Barcoding che consente di tracciare una vera e propria impronta digitale di un individuo o di una specie, in modo semplice, standardizzato ed economico.

2.OBIETTIVO DELLA TESI E CASI DI STUDIO

Obiettivo principale

L'obiettivo principale della tesi è quello di testare l'efficacia e l'applicabilità del gene della Citocromo Ossidasi I (COI) come DNA barcode per l'identificazione molecolare di specie nel settore ittico sia in campo applicativo (tracciabilità molecolare), sia nella ricerca di base (tassonomia, identificazione di stock ittici).

Tracciabilità molecolare

A tal scopo la prima fase della ricerca ha previsto la compilazione di una biblioteca di riferimento di sequenze di DNA barcode, partendo da esemplari la cui identità fosse già stabilita. In una fase successiva è stato effettuato uno screening su diverse specie ittiche di interesse commerciale, anche come prodotti trasformati, tra le più soggette a rischio di frode (pesce spada, pesci piatti), fornendo così un notevole contributo alla loro tracciabilità molecolare. In questi ultimi anni, infatti, il settore ittico ha subito una notevole trasformazione a cui hanno concorso diversi fattori, tra cui il graduale aumento dei consumi (24 kg pro capite), la difficoltà di approvvigionamento di prodotto locale (Indice di approvvigionamento negativo) a cui si è aggiunto un notevole aumento dell'importazione di prodotti ittici. In questa situazione le frodi hanno trovato nuovo spazio, e la furberia più diffusa consiste nella sostituzione di specie e/o nell'errata denominazione di origine. Il trucco è abbastanza semplice: si importano specie di minor pregio che saranno poi vendute con una denominazione di maggior valore commerciale. Ovviamente questa pratica è ancor più diffusa e la situazione si complica quando i pesci sono smerciati in tranci o filetti, per la difficoltà oggettiva del riconoscimento. La soluzione al problema sarà possibile solo quando sarà disponibile un metodo di analisi rapido, semplice e poco costoso.

Tassonomia, identificazione di stock ittici

- Altro ambizioso obiettivo del presente lavoro è stato quello di testare l'ipotesi dell'utilizzo del gene della COI nella specie *Xiphias gladius* come marcatore molecolare per l'identificazione dello stock Mediterraneo.

- Il DNA Barcoding è stato applicato anche per l'identificazione di stadi larvali di pesci mesopelagici della famiglia Myctophidae a scopo tassonomico, anche nei casi in cui l'approccio morfologico è risultato poco efficace.
- Infine, è stata condotta un'analisi del grado di strutturazione genetica di vari stock di *Engraulis encrasicolus* dell'area Mediterranea utilizzando come marcatore molecolare il frammento ipervariabile della regione di controllo mitocondriale.

Diversi sono stati i casi di studio considerati per l'applicazione delle strategie molecolari in ciascun campo di applicazione e qui di seguito verranno fornite le principali informazioni sui dataset di specie esaminate.

2.1. Il pesce spada (*X. gladius*, Fam. Xiphidae)

La specie *Xiphias gladius*, comunemente nota come pesce spada è uno dei pesci pelagici più ampiamente distribuiti nelle zone tropicali, subtropicali e temperate di tutti gli oceani, nonché nel Mar Mediterraneo, nel Mar Nero, nel Mare di Marmara e Mar d'Azov, dove tende a concentrarsi quando sono presenti correnti marine o oceaniche, che attirano le sue prede. Le caratteristiche biologiche e l'elevata vagilità di questa specie suggeriscono un elevato flusso genico e un lieve grado di strutturazione genetica tra gli individui, rendendo difficile l'identificazione degli stocks. Sebbene *X. gladius* sia considerata una specie altamente migratoria, le convenzionali analisi di sequenziamento e di RFLP hanno rivelato la presenza di strutturazione non solo tra ma anche all'interno dei bacini oceanici (Kotoulas et al. 1995; Rosel et al. 1996; Alvarado Bremer et al. 1996; Chow et al. 1997). Diversi studi hanno dimostrato che le popolazioni di *X. gladius* sono ben differenziate, evidenziando la presenza di uno stock nel Mar Mediterraneo, due stocks nell'Oceano Atlantico (Nord e Sud) e uno nell'Oceano Indiano (Kotoulas et al. 1995; Rosel et al. 1996; Alvarado Bremer et al. 1996; Chow and Takeyama 2000). Studi genetici recentemente condotti hanno esaminato la struttura di popolazione globale del pesce

spada e hanno evidenziato la presenza di alcune differenze su larga scala. L'analisi di sequenze della regione di controllo mitocondriale effettuata da Alvarado Bremer et al. (1997) ha permesso di identificare due cladi principali: un clade I, comprendente esemplari dei vari bacini oceanici e del Mediterraneo e un clade II invece caratterizzato esclusivamente da esemplari del Mediterraneo. Questi risultati sono stati confermati anche da studi effettuati tramite RFLP o analisi di sequenze di geni nucleari (Greig et al. 1999; Chow and Takeyama 2000). Limitata è risultata finora, l'attenzione rivolta allo studio della struttura genetica di popolazione all'interno del Mar Mediterraneo, oggetto di uno studio su base allozimica effettuato da Pujolar et al. (2002). Tuttavia risulta ancora controversa la struttura di popolazione degli esemplari del Mediterraneo. *X. gladius* è anche una specie ampiamente commercializzata nell'industria ittica e una delle frodi commerciali più comune in Sicilia è la sostituzione di questa specie con altre di minor valore commerciale come ad esempio esemplari appartenenti a diverse famiglie di squali o ancora la vendita di tranci di pesce spada importato e scongelato spacciandolo per pesce fresco del Mediterraneo.

2.2. I “pesci piatti” (Ord. Pleuronectiformes)

I pesci piatti analizzati in questo lavoro sono appartenenti a specie diverse: *Pleuronectes platessa*, *Solea vulgaris*, *Arnoglossus laterna*.

Pleuronectes platessa

La specie *Pleuronectes platessa* è conosciuta comunemente come platessa. È un pesce d'acqua salata appartenente alla famiglia Pleuronectidae, diffuso nell'Atlantico orientale (dalla Groenlandia fino al Marocco), nel Mar Baltico e nel Mar Bianco. È una specie rara nel Mediterraneo, abita fondali sabbiosi, dove può mimetizzarsi. Gli esemplari giovani vivono in prossimità della riva, gli adulti si spingono più in profondità. Il corpo ha forma romboidale, molto schiacciato ai fianchi, con pinne dorsale e anale simmetriche e opposte, rette da spessi raggi. Presenta entrambi gli

occhi sul lato destro e una livrea mimetica, mentre il lato sinistro presenta una colorazione biancastra a volte macchiata di nero e una pinna pettorale di piccole dimensioni. La platessa è oggetto di un'ambita pesca intensiva da parte dell'uomo, che trova le sue carni leggere e delicate e meno costose di quelle della sogliola il cui prezzo si aggira intorno ai 22 €/kg. La frode commerciale di sostituzione di specie più diffusa che interessa *Pleuronectes platessa* consiste nella vendita di una specie morfologicamente simile ad essa, *Platichthys flesus*. La passera pianuzza (*Platichthys flesus*) è un pesce di mare della famiglia Pleuronectidae. Questa specie ha una distribuzione di tipo disgiunto, infatti ha un areale principale nel Nord Atlantico dal mar Bianco allo stretto di Gibilterra, compresi il mar Baltico occidentale e il mar del Nord ed uno secondario o relitto nel nord Adriatico e nei mari Nero e d'Azov. Vive su fondi sabbiosi e fangosi, a basse profondità, essendo una specie assai eurialina si trova nelle lagune e può risalire i fiumi per diversi chilometri, soprattutto in estate. Ha il non comune aspetto tipico di tutti i pesci piatti, entrambi gli occhi sono sul lato destro del corpo. Il lato cieco è in genere bianco. Raggiunge al massimo i 40 cm di lunghezza. Si nutre di invertebrati e di piccoli pesci. È una preda ambita sia dai pescatori professionisti che da quelli sportivi, che la insidiano a fondo a causa delle ottime carni anche se il prezzo di queste risulta essere inferiore alla ben più commercializzata platessa. Quest'ultima ha carni di colore da bianco lattiginoso, delicate e tenere, molto apprezzate; invece la sosia *Platichthys flesus* presenta carni di colore biancastro-rosato con sfumature scure; dal gusto alquanto tenue e di discreta qualità. Per quanto concerne i costi la passera viene venduta ad un prezzo medio di 10€/kg, costo inferiore a quello della platessa che raggiunge i 19 €/kg (Tab.2)

| Filetti di: Fillets of: | Aspetto macroscopico Macroscopic appearance | Giudizio sensoriale Sensory evaluation |
|---|---|--|
|  <i>Pleuronectes platessa</i> | Carni di colore da bianco lattiginoso | Delicate e tenere, molto apprezzate |
| | Milky white coloured meat | Delicate and tender, very appreciated |
|  <i>Platichthys flesus flesus</i> | Carni di colore biancastro-rosato con sfumature scure | Discrete, dal gusto alquanto tenue |
| | White-pinkish coloured meat with dark shading | Fair, very soft taste |

Tab. 2 - Filetti: aspetto macroscopico e giudizio sensoriale.

Solea vulgaris

La specie *Solea vulgaris* (o *Solea solea*) comunemente noto come sogliola, è un pesce d'acqua salata appartenente alla famiglia Soleidae. Come tutti i pesci piatti è privo di pigmenti colorati sul lato cieco (il sinistro), ed occhi entrambi sul lato oculare (il destro). Il muso, arrotondato, ha la mascella superiore prominente. La pinna dorsale è unica, più lunga della pinna anale; queste due pinne sono unite alla pinna caudale (che è abbastanza piccola, arrotondata e con un bordo scuro) da una membrana ben visibile; la pinna pettorale ha spesso la punta nera. Il colore del lato destro è beige o grigiastro con minuti punti scuri. Misura fino a 30 cm nel Mar Mediterraneo mentre nell'Oceano Atlantico si catturano spesso esemplari di oltre 50 cm. Si tratta di una specie variamente diffusa sulle nostre coste, presente nell'Atlantico orientale: comune dalla Scandinavia a Capo Verde (Senegal). Specie molto pregiata, assai ricercata su tutti i nostri mercati, ove regolarmente presente ed commercializzata fresca o congelata sia intera che in filetti. Le carni di questa specie sono ottime e sono ai primi posti tra i più apprezzati pesci mediterranei.

Arnoglossus laterna

Più comunemente nota come suacia, gli individui di tale specie presentano un corpo ovoidale, molto compresso lateralmente, con gli occhi sul lato sinistro separati da

uno spazio molto ristretto o da una cresta ossea. L'occhio inferiore è lievemente più in avanti di quello superiore. La pinna dorsale, che è unica, inizia avanti agli occhi e i suoi primi raggi spesso hanno l'estremità libera per un piccolo tratto. La ventrale e la pettorale sinistra sono più sviluppate di quelle opposte. La coda è tondeggiante. La colorazione è sabbia giallastro più o meno scuro o carnicino. Sulle pinne, tracce di punti più scuri. Altri punti scuri, meno evidenti, si trovano sul corpo. E' una specie bentonica sedentaria che vive sul fango o sulla sabbia a profondità variabile da 40 a 1.000 metri. Raggiunge la dimensione massima di 19 cm, in media raggiunge i 10 cm. Le carni sono buone, specialmente fritte. Il costo di questo pesce è di 3,00 €/kg. La frode commerciale di sostituzione di specie più diffusa che interessa *Arnoglossus laterna* consiste nella vendita di filetti di una specie diversa *Cynoglossus senegalensis*, che presenta un corpo appiattito ed affusolato caudalmente a forma di punta di lancia. Entrambi gli occhi situati sul lato sinistro. Bocca infera con muso a forma di uncino. Una singola pinna ventrale situata sulla linea mediana, confluyente nella pinna anale. Le carni sono discrete, diffuso nel Mediterraneo orientale, Mar Rosso, Atlantico orientale africano ed Indo Pacifico; distribuzione molto più ampia rispetto alla specie *Arnoglossus laterna*, che si trova in tutto il Mediterraneo occidentale ed Adriatico.

3.2. Specie mesopelagiche (Fam. Myctophidae)

I **Myctophidae**, spesso noti comunemente come **pesci lanterna**, sono una famiglia di pesci di mare comprendente 32 generi e annoverano alcuni tra i più comuni e tipici pesci abissali. Sono diffusi in tutti i mari, da quelli equatoriali a quelli dei poli. Le loro abitudini di vita sono pelagiche e si trovano in genere lontano dal fondo, in acque aperte, di solito a profondità elevate (mediamente, in Mediterraneo, tra 200 e 600 m) durante il giorno e più in superficie durante la notte (migrazione nictimerale, comune a molti altri gruppi di organismi abissali). Nelle acque mediterranee sono comuni anche se difficilmente osservati. Questi pesci hanno dimensioni spesso minuscole, con un occhio molto grande e la bocca assai ampia ma munita di denti piccolissimi. Le squame cadono al minimo contatto. Le pinne dorsali sono due: una abbastanza grande seguita da una piccola pinna adiposa. La pinna anale è abbastanza

svilupata, la pinna caudale è ampia e forcuta mentre le pinne ventrali e pettorali sono piuttosto piccole. La caratteristica più notevole di questi pesci è la presenza di fotofori, organi emettitori di luce la cui disposizione è fondamentale per classificare i Mictofidi (Fig. 7).

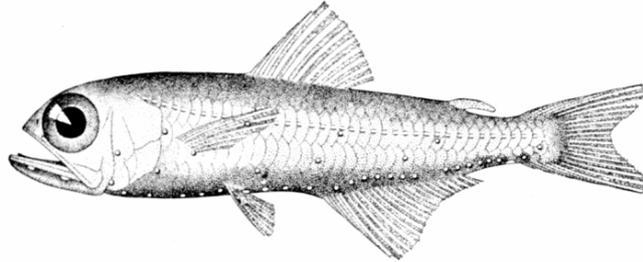


Fig. 7 – Esempio della famiglia Myctophidae

3.4. L'acciuga, *Engraulis encrasicolus* (Fam. Engraulidae)

Appartenente alla famiglia Engraulidae, ordine Clupeiformes, l'acciuga, specie pelagica a breve ciclo di vita, rappresenta una delle risorse più importanti sia dal punto di vista scientifico e sia da quello economico in alcune aree del Mediterraneo. *E. encrasicolus* (Fig. 8) è distribuito lungo le coste orientali dell'Atlantico, dalla Scandinavia fino all'Africa occidentale.

La sua distribuzione lungo le coste del Mediterraneo non è regolare ma è costituita da un set di popolazioni indipendenti o stock concentrate in particolari zone della parte occidentale del Mediterraneo (il Mar Catalano e il Golfo del Leone) o della parte orientale (Mar Adriatico, Mar Egeo) (Garcia *et al.*, 1994).



Fig. 8 - Esempio adulto di *Engraulis encrasicolus* a sinistra; sulla destra vari stadi larvali.

Durante l'autunno e l'inverno vive a profondità maggiori (100-200 m), soggiorna più vicina alla costa per il resto dell'anno. L'acciuga costituisce una componente fondamentale delle catene trofiche pelagiche del Mediterraneo, occupando una posizione intermedia tra i consumatori primari (zooplancton) e quelli terziari (pesci, cetacei, uccelli marini) (Palomera, 2007).

L'acciuga è una specie eurialina (si adatta bene a differenti salinità) e tollera ampie variazioni che le consentono di penetrare, per alimentarsi, in lagune, laghi salmastri ed estuari. Gli individui, giovanili ed adulti, hanno abitudini gregarie (vivono in branchi numerosi) ed effettuano delle migrazioni.

Studi su base allozimica di Garcia et al (1994) hanno riportato un'assenza di strutturazione genetica dell'acciuga del Mediterraneo occidentale. Spanakis et al. 1989 ha differenziato attraverso analisi morfometriche e allozimiche due stock di acciughe, uno del Mar Ionio e l'altro del Mar Egeo. Diversi marcatori mitocondriali sono stati utilizzati per identificare e definire la variabilità intraspecifica negli stock di *E. encrasicolus* (Margoulas & Zouros, 1993). Margoulas e Zouros (1993) e Margoulas et al. (1996) hanno studiato la variabilità del DNA mitocondriale e hanno individuato due principali linee mitocondriali dell'acciuga nel Mediterraneo: una linea A che prevale nel Mar Nero e nel Mar Egeo e una linea B molto più numerosa nei bacini occidentali. E' stato inoltre suggerito che l'attuale coesistenza delle due linee sia stato il risultato di un recente contatto secondario tra popolazioni precedentemente isolate. Recenti studi hanno indicato che il clade A potrebbe aver avuto origine lungo le coste occidentali dell'Africa dove è stato relegato durante il periodo glaciale e successivamente si è diffuso lungo le coste occidentali del Portogallo, nel Mar Mediterraneo e nel Mar Nero (Magoulas et al. 2006). Dal punto di vista socio-economico, lo stock di acciughe rappresenta nel Canale di Sicilia, una risorsa rilevante, storicamente sfruttata dai pescatori della costa NE e S della Sicilia (Patti *et al.*, 2004). Tuttavia, anche questa specie è spesso soggetta a frodi commerciali e una delle più comuni è la sostituzione di acciuga o alice con papalina o spratto, o con altri Engraulidi. Questa frode viene prospettata in virtù delle ridotte dimensioni della Papalina o Spratto (*Sprattus sprattus*), che tra i Clupeiformi è la specie di minor pezzatura, che consente di sostituirla con la più nobile **Acciuga** o

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

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamenti

Per ciascun caso preso in esame sono stati effettuati i seguenti campionamenti di esemplari:

➤ Pesce spada

65 campioni di *Xiphias gladius* di origine nota e certificata e 15 campioni incogniti, impanati o in tranci, acquistati in vari mercati locali (Tab. 3).

Tab. 3 - Campionamenti effettuati per la specie *X. gladius*.

| Regione | Data di campionamento | N | zona FAO (Fig. 9) |
|-----------------------|-----------------------|----|-------------------|
| Mar Mediterraneo | Maggio 08, Giugno 09 | 30 | FAO 37 |
| Oceano Atlantico | Giugno 09 | 20 | FAO27 |
| Oceano Indiano | Maggio- Giugno 09 | 15 | FAO 51 |
| "Esemplari incogniti" | Maggio- Luglio 10 | 15 | incogniti |

Gli "esemplari incogniti" sono campioni di tranci di pesce spada fresco o congelato, acquistati presso mercati locali.

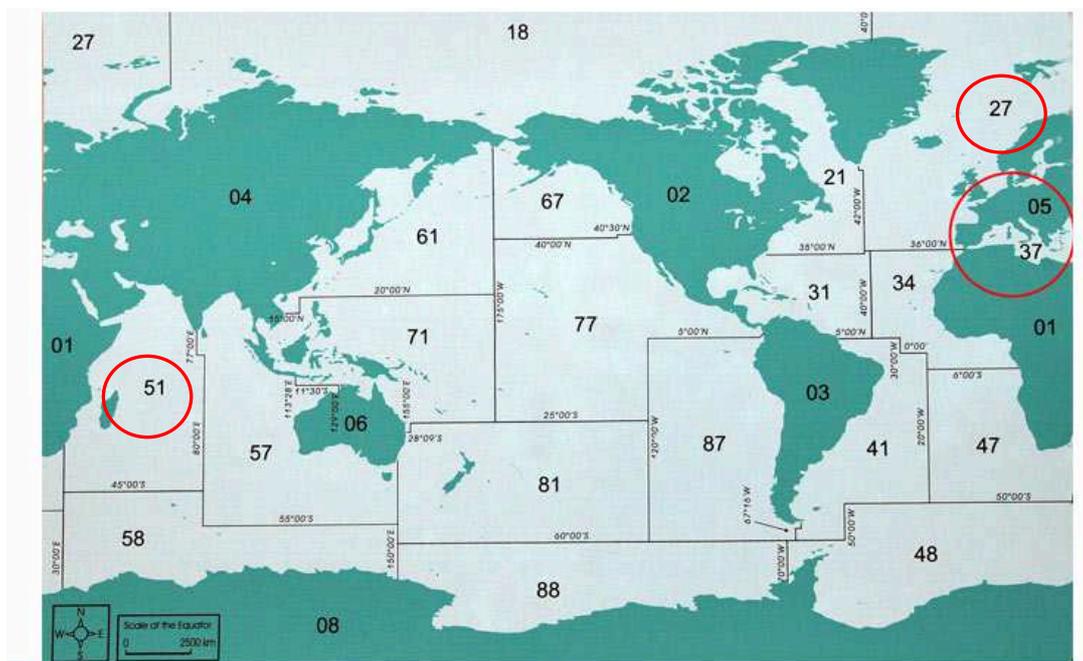


Fig. 9 - Mappa delle zone FAO nel mondo. In rosso le zone di interesse di questo studio.

➤ **Pesci piatti**

7 esemplari in filetti congelati ed etichettati come *Pleuronectes platessa*; 5 esemplari interi e freschi etichettati come *Arnoglossus laterna* e 3 esemplari interi freschi venduti come sogliole (*Solea solea*).

➤ **Specie mesopelagiche**

2 esemplari di 4 diverse specie della famiglia Myctophidae (*Hygophum benoiti*, *Electrona rissoi*, *Myctophum punctatum*, *Ceratoscopelus maderensis*) e 12 esemplari di larve morfologicamente identificate e non.

➤ **Acciuga**

55 larve di *Engraulis encrasicolus* provenienti dal Canale di Sicilia, Malta e Libia.

Esemplari, questi ultimi, reperiti dal Gruppo Interdisciplinare di Oceanografia dell'IAMC-CNR di Mazara del Vallo durante le campagne oceanografiche svolte nel Canale di Sicilia a bordo della nave oceanografica URANIA (Fig. 10) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (Campagna Oceanografica BANSIC 2009-2010).



Fig. 10 - Nave Oceanografica N/O Urania del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) utilizzata per le campagne oceanografiche.

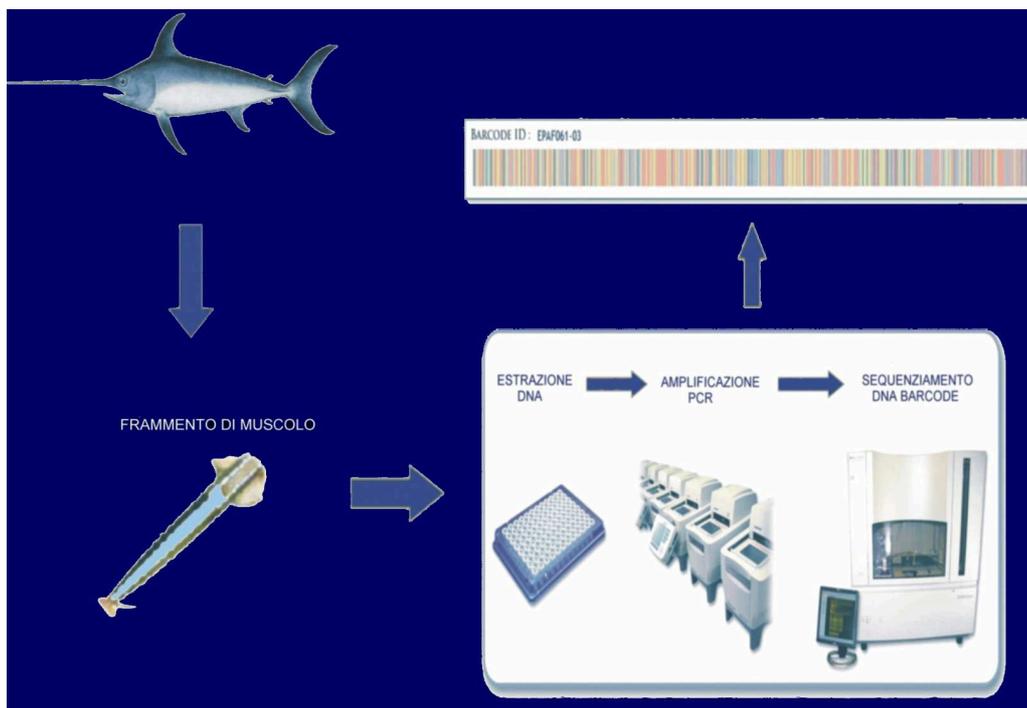


Fig. 11 – Flow chart del DNA Barcoding: dal prelievo del muscolo all'estrazione, amplificazione, sequenziamento e analisi dei dati.

3.2. Estrazione del DNA, amplificazione e sequenziamento

Il DNA genomico totale è stato estratto dal tessuto muscolare di campioni conservati in alcool al 95%, secondo il metodo di Jeffreys & Flavell (1977), utilizzando il DNeasy Tissue kit (Qiagen). Il DNA è stato estratto da 15-20 mg circa di tessuto muscolare prelevato dal dorso dell'esemplare conservato in alcool 95% e a temperatura ambiente (Fig.11). A seconda dei casi studiati sono state amplificate e sequenziate diverse regioni del DNA mitocondriale.

Pesce spada

L'amplificazione di un frammento di circa 682 bp del gene che codifica per la Citocromo Ossidasi I è stata effettuata utilizzando un set di primer universali VF2_t1 e FishR2_t1 descritti in Ward et al. (2005), seguendo il profilo termico proposto nel suddetto lavoro. Per il sequenziamento sono stati utilizzati i primer M13FW e M13REV. Per ogni campione sono stati sequenziati entrambi i filamenti. Gli stessi

campioni di DNA sono stati utilizzati anche per l'amplificazione e il sequenziamento del frammento di 413 bp all'estremità 5' della regione di controllo mitocondriale (5'-dloop). Si tratta di un frammento molto più lungo rispetto a quello già sequenziato in studi precedentemente pubblicati (Magoulas et al. 1993), ottenuto utilizzando i primer L15998 e H235 (Alvarado Bremer et al. 1996).

Pesci piatti e specie mesopelagiche

Anche per gli esemplari di pesci piatti e delle diverse specie della famiglia Myctophidae sono stati utilizzati i primer universali riportati in Ward et al. (2005) per l'amplificazione del gene della Citocromo Ossidasi I.

Acciuga

Per studiare la strutturazione genetica della specie *Engraulis encrasicolus* è stato amplificato e sequenziato il frammento ipervariabile della regione di controllo mitocondriale utilizzando una coppia di primer specifici per la specie, disegnati a partire dalla sequenza completa del DNA mitocondriale (Genbank Accession No. AB040676).

I prodotti di PCR sono stati poi purificati con il kit di purificazione (Qiagen) per eliminare i residui di RNA e dimeri e il DNA purificato è stato poi sequenziato bidirezionalmente utilizzando il sequenziatore automatico ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

3.3. Analisi dei dati

Le sequenze ottenute sono state allineate utilizzando il software ClustalX (Thompson et al. 1997). Eventuali regioni ambigue dell'allineamento sono state rimosse con il programma GBlocks (Castresana, 2000). Le sequenze sono state poi processate con il software Collapse 1.2 (available at <http://darwin.uvigo.es>) allo scopo di selezionare solo gli aplotipi unici. Nell'analisi di popolazione il grado di polimorfismo di ciascuna popolazione è stato determinato utilizzando il programma DNAsp ver 3.0 (Rozas e Rozas 1999) ed espresso come diversità aplotipica (h) e diversità

nucleotidica (π). L'indice di diversità, *haplotype diversity* o *gene diversity* (h), rappresentante l'analogo dell'eterozigosità h per i dati elettroforetici sulle proteine, permette di valutare il grado di diversità genetica di un campione in base alla distribuzione degli aplotipi tra gli individui analizzati.

Come si può notare dalla definizione di h ,

$$h = 1 - \sum f_i^2$$

essendo f la frequenza dell' i -esimo aplotipo presente nella popolazione, se c'è completa omogeneità, tutti gli individui hanno lo stesso aplotipo, il valore di h è nullo, mentre se tutti gli individui del campione sono diversi per aplotipo, h raggiunge il valore massimo unitario. Esprimendo, invece, la distanza tra due aplotipi, i e j con frequenza f_i e f_j , come numero di differenze medie per sito nucleotidico (d_{ij}), si può valutare la *nucleotide diversity*, π (Nei & Miller, 1990):

$$\pi = \sum_{j < i} f_i f_j d_{ij}$$

che risulta quindi come il numero medio di differenze nucleotidiche tra due individui estratti a caso da una popolazione.

Per identificare i nucleotidi diagnostici (NDs) per una specie o per una popolazione target è stato utilizzato il software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) ver. 4.0 (Tamura et al. 2007).

Per descrivere le relazioni evolutive tra gli aplotipi o tra le sequenze di specie identificati è stato costruito un cladogramma utilizzando il metodo del Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987), che fa uso dell'approccio della matrice delle distanze, con il software MEG. Le distanze evolutive sono state calcolate secondo il modello di Kimura-2-parametri (Kimura, 1980), che considera uguali le frequenze nucleotidiche ed i tassi di mutazione (relativi a trasversioni e transizioni) tra nucleotidi; questo modello considera inoltre, i tassi di mutazione non variabili tra siti. E' stato poi utilizzato l'algoritmo bootstrap per verificare l'accuratezza dell'albero costruito (Felsenstein, 1985). La tecnica base applicata è quella del ricampionamento di Efron. Poste m sequenze di n nucleotidi, viene costruito un albero filogenetico con l'algoritmo scelto (NJ). A questo punto il *dataset* viene ricostruito scegliendo a caso con reinserimento n nucleotidi per m righe. Viene proposto un nuovo albero

elaborato con lo stesso metodo del primo. Il percorso è stato ripetuto per un certo numero di volte, 10000 nel caso specifico, ed ogni albero confrontato con il primo ottenuto dal *dataset* originale. Ad ogni ramo interno diverso, per sequenza corrispondente, da quello originale è stato assegnato un punteggio di valore 0 mentre ogni volta che ne compare uno uguale si aggiunge un punto al valore di *bootstrap* (*bootstrap value*). Come regola generale, si assume che se il valore di *Bootstrap* di un ramo interno è pari o superiore al 70 %, allora la sua topologia è considerata corretta.

Il Parsimony Network (Templeton *et al.*, 1992) che mostra le connessioni tra gli aplotipi identificati, è stato ottenuto attraverso il software TCS ver. 1.13 (Clement *et al.*, 2000). L'utilizzo di un *network* invece che di un albero filogenetico, risulta appropriato per dati intraspecifici, poiché consente di mantenere diversi collegamenti alternativi tra aplotipi qualora questi risultino equiprobabili in base al peso delle mutazioni. Il software *T.C.S.* si basa esclusivamente sulle differenze in sequenza associando ad ogni collegamento un'uguale probabilità.

3.4. Ricerca di NUMTS

Gli pseudogeni nucleari mitocondriali, o "numts", sono il risultato del trasferimento di materiale genetico dal genoma mitocondriale al genoma nucleare (Bensasson *et al.* 2001). Inoltre, non essendo funzionali, tali pseudo geni possono anche contenere inserzioni, delezioni o altre mutazioni nonsense. Come riportato in diversi recenti studi, l'uso poco appropriato di sequenze COI-simili come le in un approccio di DNA barcoding potrebbe influenzare le analisi portando a errate identificazioni di linee molecolari non ancora descritte o di specie criptiche (Song *et al.*, 2008; Buhay, 2009). La presenza di numts tra gli eucarioti è stata precedentemente documentata in diversi taxa di animali (Bensasson *et al.*, 2001; Richly & Leister 2004; Kerr, 2010) e piante (Naciri & Manen, 2009).

Seguendo le linee guida proposte da Song *et al.* (2008) e Buhay (2009), e in base alle procedure standard per il DNA barcoding, è richiesto il controllo della qualità delle sequenze prodotte (Ratnasingham & Hebert, 2007). Le sequenze barcode prodotte in

questo studio sono state quindi controllate allo scopo di individuare la presenza di eventuali numts. In particolare ogni sequenza è stata analizzata con diversi metodi: ricerca mediante BLAST su NCBI, controllo della qualità degli elettroferogrammi, traduzione *in silico* (per individuare eventuali indel o codoni di stop), confronto con genomi mitocondriali completi pubblicati e controllo della composizione in basi. Quelle sequenze barcode che non hanno superato le procedure di controllo sopra descritte sono state rimosse dal dataset in esame ed è stata effettuata una nuova amplificazione con primer diversi o diverse condizioni al fine di evitare l'amplificazione di pseudo geni.

3.5. Identificazione di campioni incogniti

L'identificazione di campioni incogniti è stata effettuata utilizzando l' Identification System (IDS) sul sito BOLD. In particolare, questa applicazione lavora con tre library di COI, delle quali, la più utile per la corretta identificazione delle specie è il Reference Barcode Database, che contiene solo sequenze di DNA Barcode che riescono a soddisfare alcune specifiche condizioni (Ratnasingham & Hebert, 2007).

4.1. Identificazione di stock di *X. gladius* su ampia scala geografica attraverso COI- DNA barcode

Analisi delle sequenze della COI

E' stato amplificato e sequenziato un frammento di 682 bp del gene della COI in 65 campioni di DNA di *X. gladius*. Tutte le sequenze sono state depositate in Genbank. In ciascuna di esse non sono state osservate inserzioni, delezioni o codoni di stop. La mancanza di questi ultimi e il fatto che tutte le sequenze amplificate hanno una lunghezza di 682 bp suggerisce che non sono state sequenziate NUMTs (sequenze di DNA nucleare che si sono originate da sequenze di DNA mitocondriale), in quanto nei vertebrati queste sono normalmente più brevi di 600 bp (Bensasson et al. 2001). Nel dataset di sequenze ottenuto sono stati individuati 15 siti variabili, 11 dei quali parsimoniosamente informativi (Tab. 4)(Pappalardo et al. 2011).

| Haplotype | Nucleotide position | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 8 | 24 | 43 | 105 | 116 | 174 | 213 | 270 | 285 | 426 | 483 | 504 | 564 | 648 | 676 |
| HAP1 | T | A | G | G | T | T | A | A | T | A | G | G | G | C | G |
| HAP2 | G | A | C | G | T | T | A | A | T | A | G | G | G | C | G |
| HAP3 | G | A | C | G | T | T | A | A | C | A | G | G | G | C | G |
| HAP4 | T | A | G | G | T | C | A | A | C | G | G | G | A | C | G |
| HAP5 | T | A | G | G | T | T | A | A | T | A | G | G | G | T | G |
| HAP6 | T | A | G | G | T | T | A | A | T | A | G | G | G | C | A |
| HAP7 | T | A | G | T | T | C | A | A | C | G | G | G | A | C | G |
| HAP8 | T | A | G | G | T | C | A | C | C | G | G | G | A | C | G |
| HAP9 | T | A | G | G | A | C | A | A | C | G | G | G | A | C | G |
| HAP10 | T | A | G | G | T | T | A | A | C | G | G | G | A | C | G |
| HAP11 | T | A | G | G | T | T | T | A | C | G | G | G | A | C | G |
| HAP12 | T | G | G | G | T | C | A | A | C | G | G | G | A | C | G |
| HAP13 | T | G | G | G | T | T | A | A | C | G | A | G | A | C | G |
| HAP14 | T | G | G | G | T | T | A | A | C | G | G | G | A | C | G |
| HAP15 | T | A | G | G | T | T | A | A | T | A | G | G | A | C | G |
| HAP16 | T | A | G | G | T | T | A | A | C | G | G | A | A | C | G |

Tab. 4 – Siti variabili delle sequenze della Citocromo Ossidasi I (COI) da cui sono stati individuati 16 aplotipi unici.

Dall'analisi dei siti polimorfici è stato possibile definire 16 aplotipi unici di pesce spada, di cui solamente uno (H10) risulta essere condiviso dagli esemplari dell'Oceano Atlantico e dell'Indiano. Negli stock dell'Atlantico e del Mediterraneo sono stati trovati i più alti valori di diversità aplotipica (rispettivamente 0.80 e 0.84), mentre i più bassi sono stati osservati negli esemplari dell'Oceano Indiano (Tab. 5).

| | N | 5'dloop | | COI |
|-------------------|----|---------------|---------------|---------------|
| | | h | π | |
| Atlantic ocean | 20 | 0.990 (0.018) | 0.036 (0.019) | 0.800 (0.047) |
| Mediterranean Sea | 30 | 0.924 (0.033) | 0.054 (0.027) | 0.839 (0.053) |
| Indian ocean | 15 | 0.762 (0.066) | 0.017 (0.009) | 0.419 (0.113) |
| Average | | 0.972 (0.008) | 0.040 (0.003) | 0.887 (0.023) |

N: numero di esemplari di *X. gladius* esaminati; Deviazione standard in parentesi.

Tab. 5- Indici di diversità genetica: *h*: diversità aplotipica; π : diversità nucleotidica.

Caratteristiche molecolari del 5'-dloop mitocondriale.

E' stato amplificato e sequenziato un segmento di 413 bp del dominio sinistro della regione di controllo mitocondriale (5'-dloop). Dall'allineamento delle sequenze ottenute, depositate in Genbank, sono stati identificati 97 siti polimorfici, 74 dei quali parsimoniosamente informativi (Tab. 6) che hanno definito 36 distinti aplotipi. Di questi ultimi 14 sono del Mar Mediterraneo, 17 dell'Oceano Atlantico, 3 dell'Oceano Indiano e solamente due condivisi (1, tra Oceano Atlantico e Mar Mediterraneo e 1 tra Atlantico e Indiano) (Pappalardo et al. 2011).

| Haplotype | 7 | 8 | 29 | 50 | 56 | 61 | 64 | 69 | 73 | 85 | 92 | 94 | Nucleotide position | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| | | | | | | | | | | | | | 95 | 96 | 100 | 102 | 104 | 108 | 111 | 113 | 119 | 120 | 123 | 124 | 128 | 129 | 130 | 131 | |
| HAP1 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | T | A | G | T | T | A | C | A | A | A | A | C | G | T | A | A | |
| HAP2 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | T | A | G | T | T | A | C | A | A | A | A | C | G | T | A | A | |
| HAP3 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | T | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | C | G | T | A | A | |
| HAP4 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | A | T | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | G | T | G | T | A | A |
| HAP5 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | C | G | C | A | A | C | T | A | C | A | A | A | A | T | G | T | A | A | |
| HAP6 | A | T | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | T | G | T | A | A |
| HAP7 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP8 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP9 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP10 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP11 | A | C | C | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP12 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | G | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP13 | A | C | A | G | T | C | C | A | C | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | G |
| HAP14 | A | C | A | G | T | C | C | A | C | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | G |
| HAP15 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP16 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP17 | T | C | A | A | C | A | C | A | C | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP18 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP19 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP20 | A | T | A | A | A | A | C | G | A | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP21 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP22 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP23 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | G | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP24 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | G | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | G | A |
| HAP25 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | G | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | G | A |
| HAP26 | A | T | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | T | G | T | A | A |
| HAP27 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | C | A | A | T | T | A | C | A | G | G | A | A | T | G | T | A | A |
| HAP28 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | T | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | T | G | T | A | A |
| HAP29 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | T | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | T | G | T | A | A |
| HAP30 | A | C | A | A | A | A | C | A | A | A | T | G | A | A | A | T | T | A | C | A | A | A | A | A | C | G | T | A | A |
| HAP31 | A | G | A | A | A | A | T | A | A | A | T | G | T | A | A | T | T | A | C | A | T | A | A | A | C | G | C | A | A |
| HAP32 | A | C | A | A | A | A | T | A | A | A | T | G | T | A | A | T | T | A | C | A | T | A | A | A | C | C | T | A | A |
| HAP33 | A | C | A | A | A | A | T | A | A | A | T | G | T | A | A | T | T | A | C | A | T | A | A | A | C | C | T | A | A |
| HAP34 | A | C | A | A | A | A | T | A | A | A | T | G | T | A | A | T | T | A | C | A | T | A | A | A | C | C | T | A | A |
| HAP35 | A | C | A | A | A | A | T | A | A | A | T | G | T | A | A | T | T | A | C | A | T | A | A | A | C | C | T | A | A |
| HAP36 | A | C | A | A | A | A | T | A | A | A | T | A | T | A | A | A | G | T | A | T | T | G | A | C | C | T | A | C | |

popolazioni e in particolare il valore più alto è di 0.99 nello stock dell'Oceano Atlantico, mentre i valori più bassi sono rispettivamente nel Mediterraneo e nell'Indiano (0.92 e 0.76) (Tab. 5). Le sequenze del 5'-dloop di *X. gladius* sono caratterizzate dalla presenza all'estremità 5' di una, due o tre repeat (moduli ripetuti) 5'-TACA-3'. Tali ripetizioni sono state già riscontrate in studi precedenti (Alvarado Bremer et al. 1995; Kotoulas et al. 1995). Dai nostri risultati appare evidente che solo negli esemplari del Mar Mediterraneo è possibile riscontrare una singola ripetizione 5'-TACA-3'; due ripetizioni sono evidenti sia nei campioni del Mediterraneo che dei bacini oceanici e infine solo un campione del Mediterraneo e alcuni dell'Atlantico presentano tre ripetizioni 5'-TACA-3'. La percentuale di esemplari che presentano 2 ripetizioni 5'-TACA-3' risulta maggiore di quella con 3 repeats (Fig. 12).

Analisi dei gruppi

Il fenogramma Neighbour-Joining in Fig. 13 mostra chiaramente le relazioni che intercorrono tra tutti gli aplotipi della COI. In particolare, si possono osservare due gruppi principali, uno dei quali contenente solo aplotipi del Mediterraneo. Nel secondo cluster sono presenti invece aplotipi dei vari stock. Un secondo nodo separa 4 aplotipi del Mediterraneo (H4, H7, H8, H9) da quelli dell'Atlantico (H12, H13, H14) e ancora all'interno di questo secondo cluster troviamo aplotipi atlantici insieme a quelli dell'Oceano Indiano. La Fig. 14 mostra invece le relazioni tra gli aplotipi ottenuti dall'analisi del 5'-dloop negli esemplari di *X. gladius* esaminati. Anche in questo caso si osserva un cluster statisticamente ben supportato (99% di bootstrap) contenente esclusivamente aplotipi del Mediterraneo, mentre altri aplotipi mediterranei sono arrangiati dall'altra parte dell'albero insieme ad aplotipi dell'Oceano Atlantico. E' quindi probabile che questi due cladi corrispondano a quelli precedentemente individuati da Alvarado Bremer et al. (1995, 1996), rilevati sia con il metodo della massima parsimonia che con il Neighbour-Joining. Inoltre, gli esemplari di *X. gladius* del clade II sono caratterizzati dalla presenza di una singola repeat 5'-TACA-3' all'inizio del 5'-dloop, mentre quelli del clade I hanno due o tre di tali repeat in questa posizione (Alvarado Bremer et al. 1995). In accordo con un

precedente studio (Ward et al. 2001) il clade I risulta ulteriormente suddiviso in un gruppo di aplotipi che presenta due ripetizioni TACA e in un altro con tre repeat TACA.

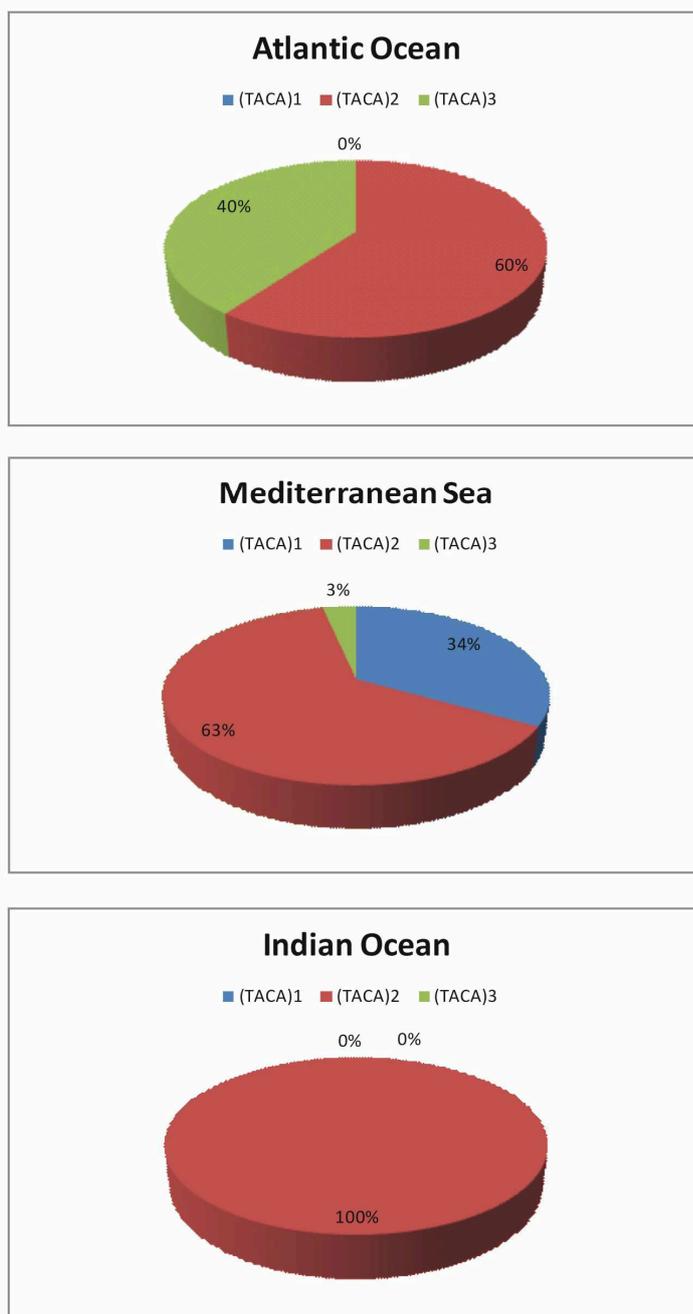


Fig. 12 - Distribuzione di frequenza delle repeat 5'-TACA-3' riscontrate in questo studio.

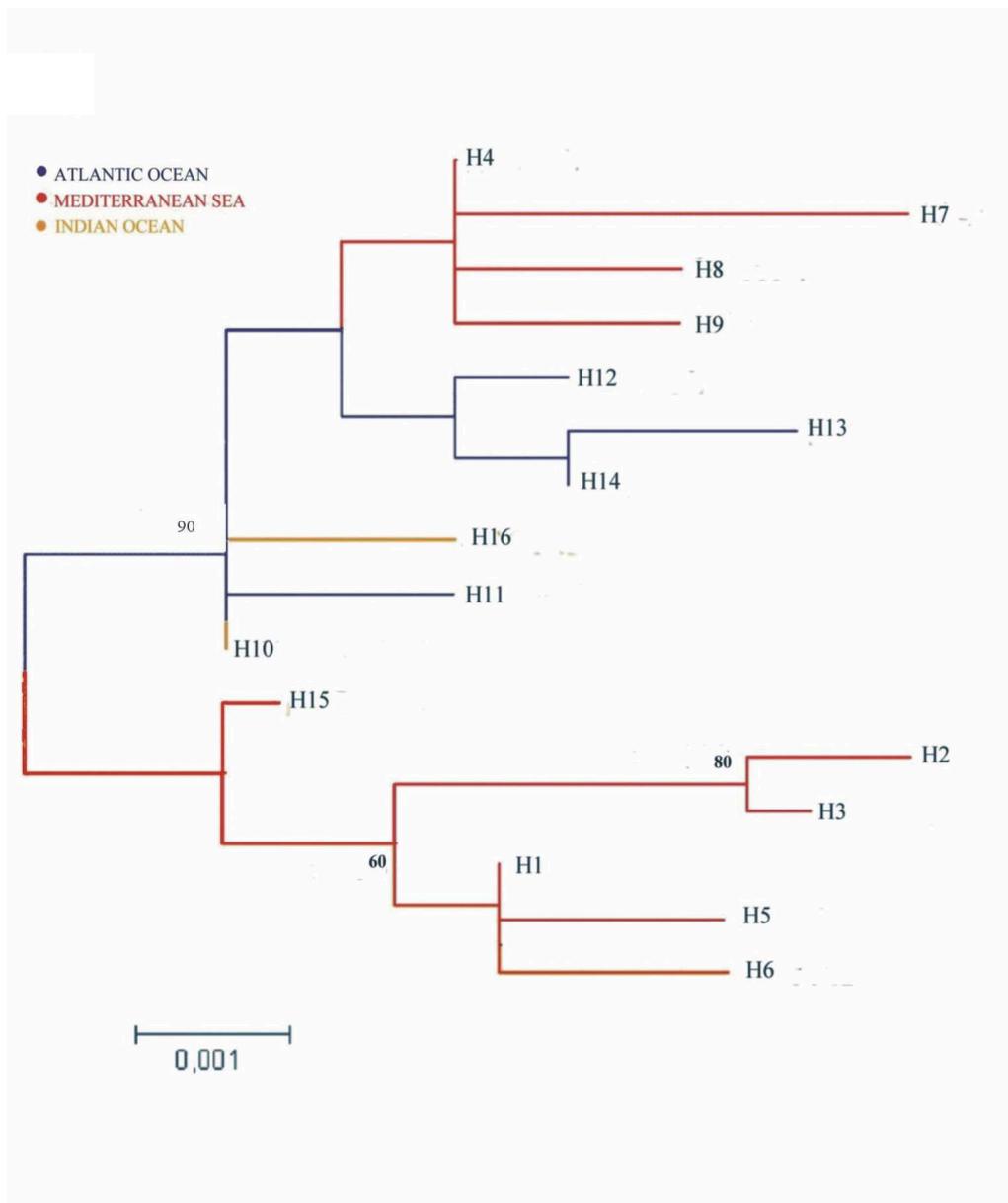


Fig. 13 – Fenogramma Neighbour-Joining ottenuto dai 16 aplotipi della COI di *X. gladius* provenienti da Mar Mediterraneo, Oceano Atlantico e Oceano Indiano, utilizzando il modello Kimura-2-parametri.

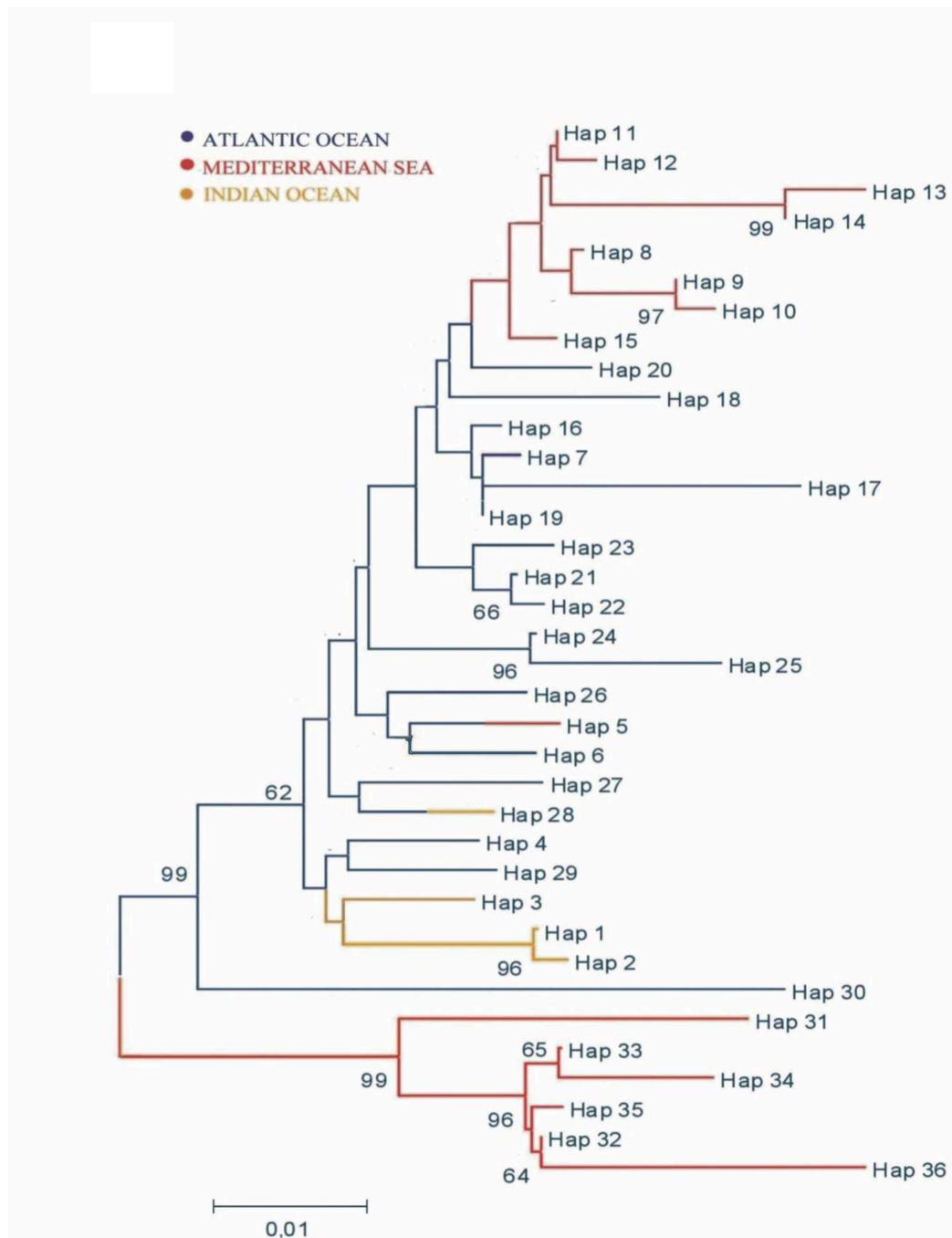
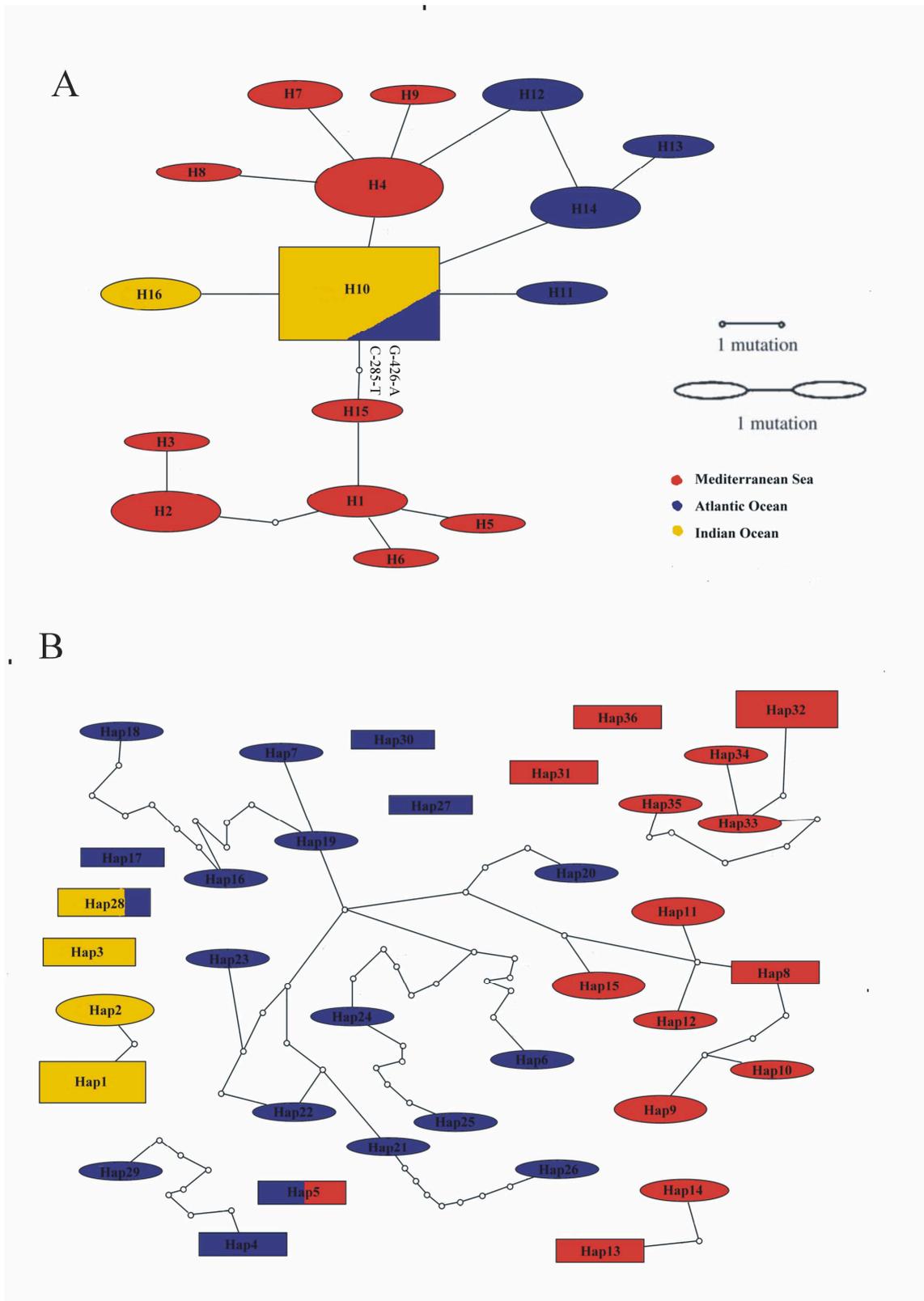


Fig. 14 – Fenogramma Neighbour-Joining ottenuto dai 16 aplotipi del 5'-dloop di *X. gladius* provenienti da Mar Mediterraneo, Oceano Atlantico e Oceano Indiano, utilizzando il modello Kimura-2-parametri.

I risultati suddetti sono stati ulteriormente confermati dalla parsimony network analisi che ha prodotto un unico gruppo di aplotipi delle sequenze COI (Fig. 15A) e diversi gruppi di aplotipi per le sequenze del 5'-dloop (Fig. 15B). In particolare, la Fig. 15A mostra che l'H10 è l'aplotipo più comune, condiviso tra Atlantico, e Indiano. Gli aplotipi Mediterranei H1, H2, H3, H5, H6, H15 sono separati da H10 solamente da due step mutazionali (G-426- A e C-285-T) che rappresentano i loro nucleotidi diagnostici (ND) (Wong et al. 2009). Un altro gruppo di aplotipi Mediterranei (H4, H7, H8, H9) è connesso all'aplotipo atlantico H12 e ad H10. In Fig. 15B il parsimony network presenta un più alto numero di gruppi aplotipici, ciò a causa del più elevato grado di polimorfismo delle sequenze del 5'-dloop. Gli aplotipi Mediterranei Hap13-14, Hap32-35, Hap36, Hap31 sono organizzati in quattro gruppi separati. Altri aplotipi mediterranei, Hap8-12, Hap15 sono connessi ad aplotipi atlantici ma attraverso numerosi step mutazionali. Appare interessante il fatto che gli aplotipi dell'Oceano Indiano risultano separati dagli altri, con la sola eccezione di Hap28 che è condiviso da esemplari dell'Oceano Indiano e Atlantico (Pappalardo et al. 2011).



Screening di esemplari “incogniti”: un caso report di sostituzione fraudolenta

In una fase successiva sono stati amplificati e sequenziati entrambi i marcatori (COI e 5'-dloop) di campioni di DNA estratti da tranci di pesce spada acquistati nei vari mercati locali, per effettuare uno screening di controllo. Tutti questi campioni erano venduti come “pesce spada del Mediterraneo”. Le nuove sequenze ottenute sono state aggiunte nell’analisi alle sequenze di riferimento e sono stati costruiti nuovi fonogrammi NJ (Fig. 16 e Fig. 17) allo scopo di assegnare ad ogni campione incognito un’origine geografica. Sorprendentemente, l’esemplare denominato X13 si è collocato al di fuori dell’ingroup, andando a costituire un outgroup. L’identificazione di tale sequenza attraverso una ricerca in Genbank con BLAST, ha rivelato che tale sequenza apparteneva ad un esemplare di squalo, *Prionace glauca*, comunemente noto come verdesca. Inoltre, si è osservato che 3 dei 14 campioni incogniti esaminati clusterizzavano con esemplari dell’Oceano Atlantico per entrambi i marker, e solo 11 campioni risultavano essere esemplari del Mar Mediterraneo, come dichiarato al momento dell’acquisto. In particolare in Tab. 7 possiamo osservare che c’è una piena corrispondenza tra i due marker (COI e 5'-dloop), e tutti gli individui del Mediterraneo, con l’eccezione di X12, possono essere assegnati ad uno stesso clade filogenetico (clade I o clade II come designati in Alvarado Bremer et al. 1995, 1996)(Pappalardo et al. 2011).

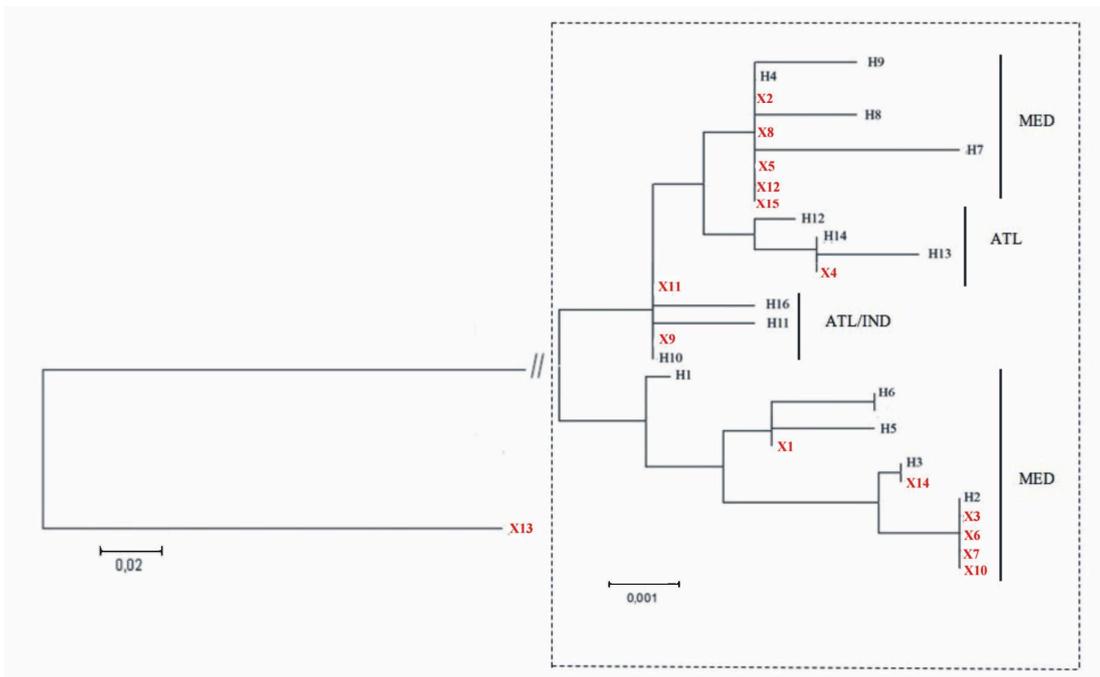


Fig. 16 - Fenogramma NJ (K2P) delle sequenze della COI di esemplari “incogniti”

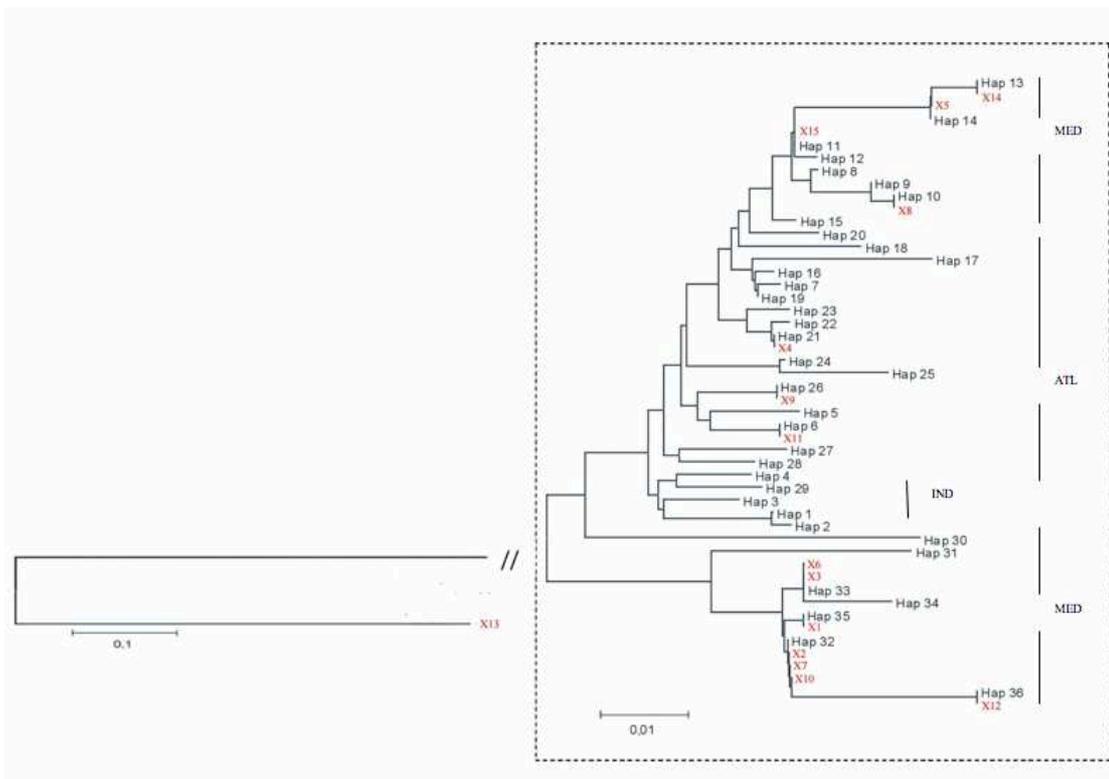


Fig. 17 - Fenogramma NJ (K2P) delle sequenze del 5'-dloop di esemplari “incogniti”

| N | REGION OF CAPTURE | |
|------------|------------------------|------------------------|
| | COI | DLOOP |
| x1 | ME (II) | ME (II) |
| x2 | ME (I) | ME (I) |
| x3 | ME (II) | ME (II) |
| x4 | ATL | ATL |
| x5 | ME (I) | ME (I) |
| x6 | ME (II) | ME (II) |
| x7 | ME (II) | ME (II) |
| x8 | ME (I) | ME (I) |
| x9 | ATL | ATL |
| x10 | ME (II) | ME (II) |
| x11 | ATL | ATL |
| x12 | ME (I) | ME (II) |
| x13 | <i>Prionace glauca</i> | <i>Prionace glauca</i> |
| x14 | ME (I) | ME (I) |
| x15 | ME (I) | ME (I) |

Il numero in parentesi si riferisce ai due differenti cladi filogenetici individuato in questo studio e supportati in Alvarado Bremer et al. 1995, 1996. In grassetto i campioni la cui assegnazione risulta ambigua.

Tab. 7 – Assegnazione dei “campioni incogniti” alle regioni geografiche di cattura.

4.2. Screening di controllo su esemplari di pesci piatti

Un frammento di 658 bp del gene della Citocromo Ossidasi I (COI) è stato amplificato e sequenziato in 15 esemplari di Pleuronectiformi (pesci piatti) reperiti in vari mercati locali. Dopo aver utilizzato il software IDS per trovare una corrispondenza identificativa tra le sequenze ottenute e le varie specie di pesci piatti, dalle sequenze analizzate e rieditate con Bioedit, è stato costruito un fenogramma NJ (Fig. 18) per esaminare le relazioni evolutive tra i campioni pervenuti.

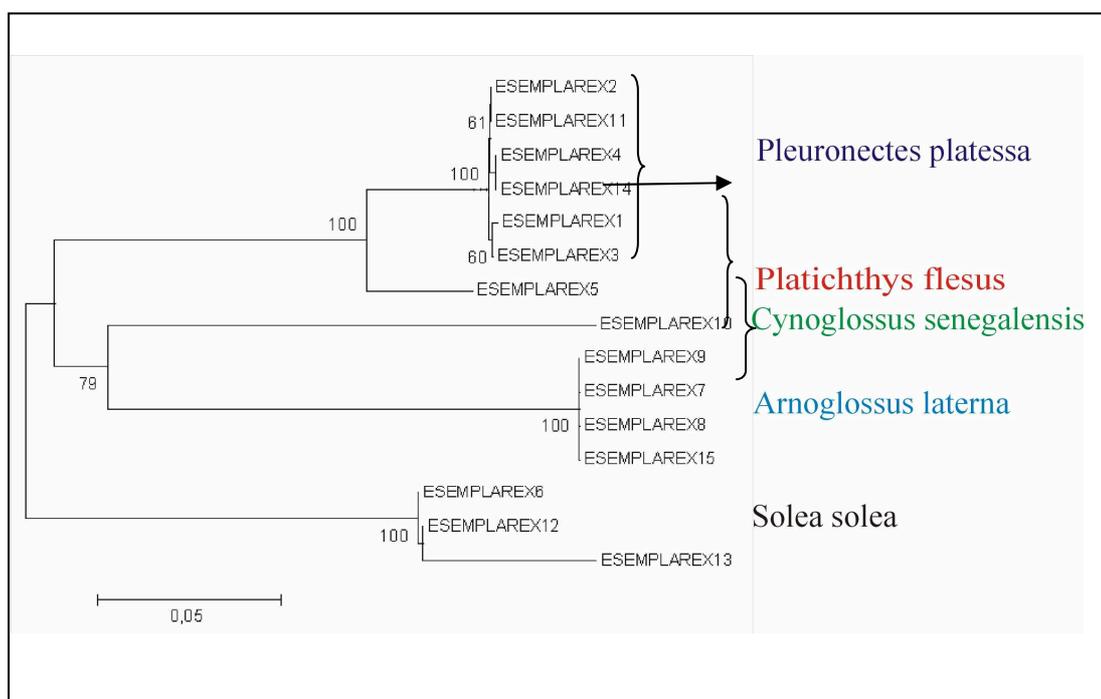


Fig 18 – Fenogramma Neighbour-joining (K2P) ricavato dalle sequenze della COI di varie specie di “pesci piatti”.

Dall’analisi si evince la chiara separazione di 3 cluster principali: il primo rappresentato dai 3 esemplari di sogliola; il secondo che comprende le “pante” etichettate come *Arnoglossus laterna* e una delle quali, l’esemplare X10 risulta essere una specie diversa, *Cynoglossus senegalensis*; infine il terzo cluster comprendente 7 esemplari acquistati come platessa, ma una delle quali (esemplare

X5) è risultata essere una specie affine (la distanza genetica tra questa e la platessa è di 0.064), ma di minor valore commerciale, *Platichthys flesus* (Tab. 8).

| | P. | | C. | | |
|---------------------------------|-----------------|------------------|-------------------|---------------------|-----------------|
| | <i>platessa</i> | <i>P. flesus</i> | <i>A. laterna</i> | <i>senegalensis</i> | <i>S. solea</i> |
| <i>Pleuronectes platessa</i> | 0 | | | | |
| <i>Platichthys flesus</i> | 0,064 | 0 | | | |
| <i>Arnoglossus laterna</i> | 0,262 | 0,26 | 0 | | |
| <i>Cynoglossus senegalensis</i> | 0,268 | 0,255 | 0,262 | 0 | |
| <i>Solea solea</i> | 0,249 | 0,245 | 0,273 | 0,277 | 0 |



Pleuronectes platessa



Platichthys flesus flesus

€ 19 /KG

€ 10 /KG




Tab. 8 – Matrice della distanze genetiche tra le specie di pesci piatti calcolate con il software MEGA.

Dallo screening effettuato su 15 esemplari di pesci piatti campionati nei vari mercati locali è stato possibile individuare ben 2 casi di sostituzione di specie (Tab. 9).

| PRODOTTI INCOGNITI | SPECIE ETICHETTATE | SPECIE IDENTIFICATE | NUMERO CAMPIONI | NUMERO DIFFERENZE NUCLEOTIDICHE |
|--------------------|------------------------------|---|-----------------|---------------------------------|
| FILETTI | <i>Pleuronectes platessa</i> | Ident. incorretta <i>Platichthys flesus</i> | 1 | 40 |
| ESEMPLARI INTERI | <i>Pleuronectes platessa</i> | Ident. corretta <i>Pleuronectes platessa</i> | 6 | |
| | <i>Solea vulgaris</i> | Ident. corretta <i>Solea vulgaris</i> | 3 | |
| | <i>Arnoglossus laterna</i> | Ident. corretta <i>Arnoglossus laterna</i> | 4 | |
| | <i>Arnoglossus laterna</i> | Ident. incorretta <i>Cynoglossus senegalensis</i> | 1 | 128 |

Tab. 9 – Tabella riassuntiva dello screening di controllo effettuato sui pesci piatti acquistati in vari mercati locali.

4.3. Identificazione molecolare di stadi larvali di specie della famiglia **Myctophidae**

L'analisi delle sequenze di un frammento di 550 bp della COI è stata condotta su un certo numero di larve di 4 specie mesopelagiche (*Myctophum punctatum*, *Ceratoscopelus maderensis*, *Hygophum benoiti* e *Electrona rissoi*) precedentemente identificate su base morfologica (Fig. 19).

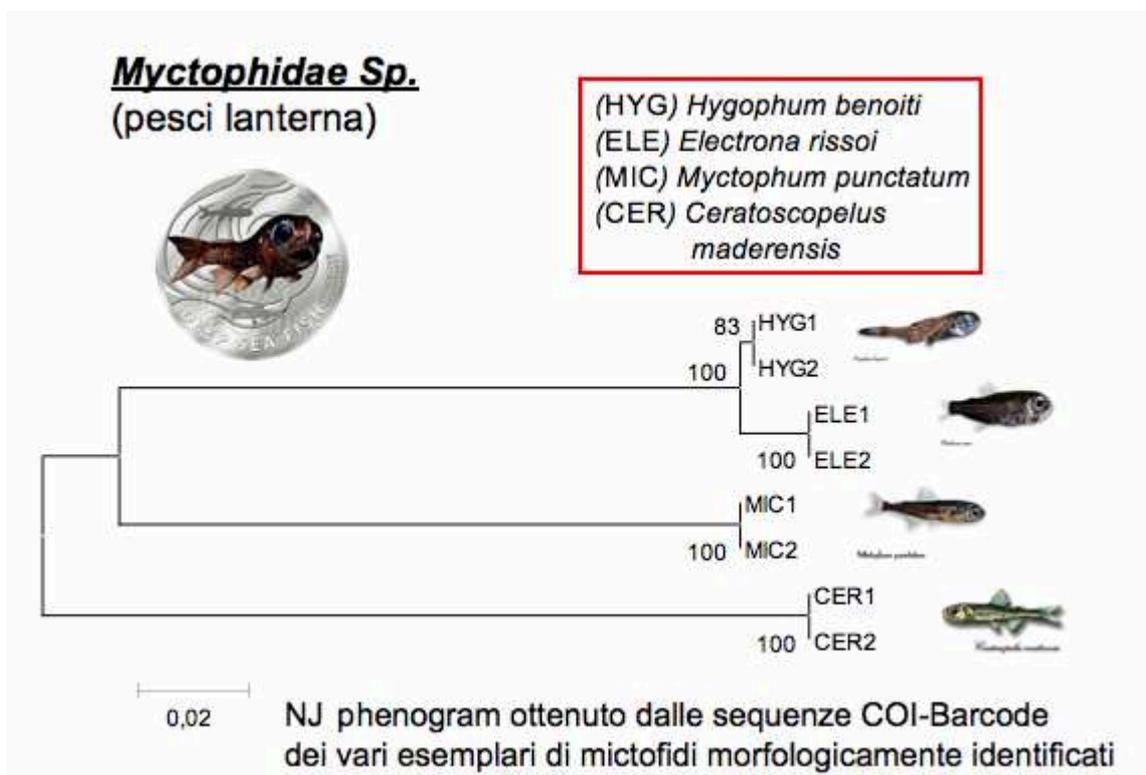


Fig. 19 - Fenogramma NJ costruito dalle sequenze di riferimento della COI per le 4 specie mesopelagiche.

Le sequenze ottenute sono state poi utilizzate come riferimento per effettuare uno screening su campioni di larve la cui identificazione morfologica poneva delle ambiguità e per costruire un nuovo fonogramma NJ con i campioni incogniti (Fig. 20).

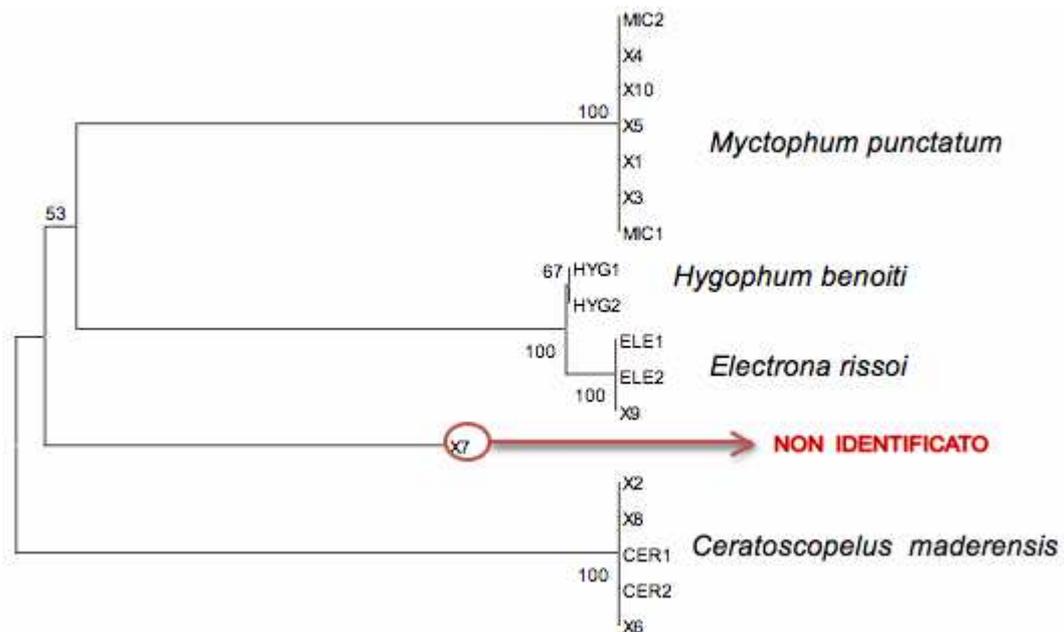


Fig. 20 - Albero NJ ottenuto inserendo nell'analisi le sequenze ottenute a partire da larve la cui identificazione morfologica presentava ambiguità.

Su 12 campioni analizzati, solamente uno (X7) è rimasto non identificato come specie: nonostante il frammento della COI sia stato sequenziato, non è risultata presente né tra le nostre sequenze di riferimento, né in banca dati, una sequenza cui riferirsi per convalidarne l'identificazione. Altri due campioni (X11 e X12) non hanno dato un risultato positivo all'amplificazione, probabilmente a causa del fatto che il DNA genomico di partenza era degradato (Tab.10).

Congruenza tra classificazione morfologica e molecolare

| CAMPIONI INCOGNITI (LARVE) | IDENTIFICAZIONE MORFOLOGICA | IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| X1 | <i>Myctophum punctatum</i> | <i>Myctophum punctatum</i> |
| X2 | <i>Ceratoscopelus maderensis</i> | <i>Ceratoscopelus maderensis</i> |
| X3 | <i>Myctophum punctatum</i> | <i>Myctophum punctatum</i> |
| X4 | <i>Myctophum punctatum</i> | <i>Myctophum punctatum</i> |
| X5 | <i>Myctophum punctatum</i> | <i>Myctophum punctatum</i> |
| X6 | <i>Ceratoscopelus maderensis</i> | <i>Ceratoscopelus maderensis</i> |
| X7 | Non identificato | Non identificato |
| X8 | <i>Ceratoscopelus maderensis</i> | <i>Ceratoscopelus maderensis</i> |
| X9 | <i>Hygophum benoiti</i> | <i>Electrona rissoi</i> |
| X10 | <i>Myctophum punctatum</i> | <i>Myctophum punctatum</i> |
| X11 | <i>Electrona rissoi</i> | NO amplificazione |
| X12 | <i>Ceratoscopelus maderensis</i> | NO amplificazione |

4.4. Analisi della struttura genetica di popolazioni di *Engraulis encrasicolus*.

Sono state campionate 55 larve di *Engraulis encrasicolus* da cui è stato estratto il DNA genomico. Sono stati amplificati e sequenziati un tratto di circa 650 bp del gene della Citocromo Ossidasi I (COI) e il tratto ipervariabile della regione di controllo mitocondriale (5'dloop) al fine di testare la strutturazione genetica in questa specie nel Canale di Sicilia. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza una mancanza di strutturazione genetica, tuttavia è stato possibile, dall'albero costruito (Fig. 21) risalire alla presenza di almeno 4 diverse aree di riproduzione nel Canale di Sicilia: piattaforma siciliana (area a nord), Malta, Libia e piattaforma siciliana (area a sud). La variazione genetica all'interno di ciascuna popolazione è stata stimata attraverso gli indici di diversità aplotipica (h) e nucleotidica (π) (Tab. 11). I valori più bassi di diversità aplotipica e nucleotidica (rispettivamente 0.581 e 0.005) si riferiscono rispettivamente allo stock della Libia e a quello di Malta.

| | | 5'dloop | |
|---------|-----|-----------------|------------------|
| | N | h | π |
| LIBIA | 21 | 0,581 +/- 0,102 | 0,020 +/- 0,011 |
| SICILIA | 24 | 0,656 +/- 0,104 | 0,023 +/- 0,012 |
| MALTA | 10 | 0,822 +/- 0,097 | 0,005 +/- 0,0034 |

Tab. 11 – Indici di diversità aplotipica (h) e nucleotidica (π) calcolati utilizzando il software DNAsp sui tre stock di *E. encrasicolus* esaminati in questo studio.

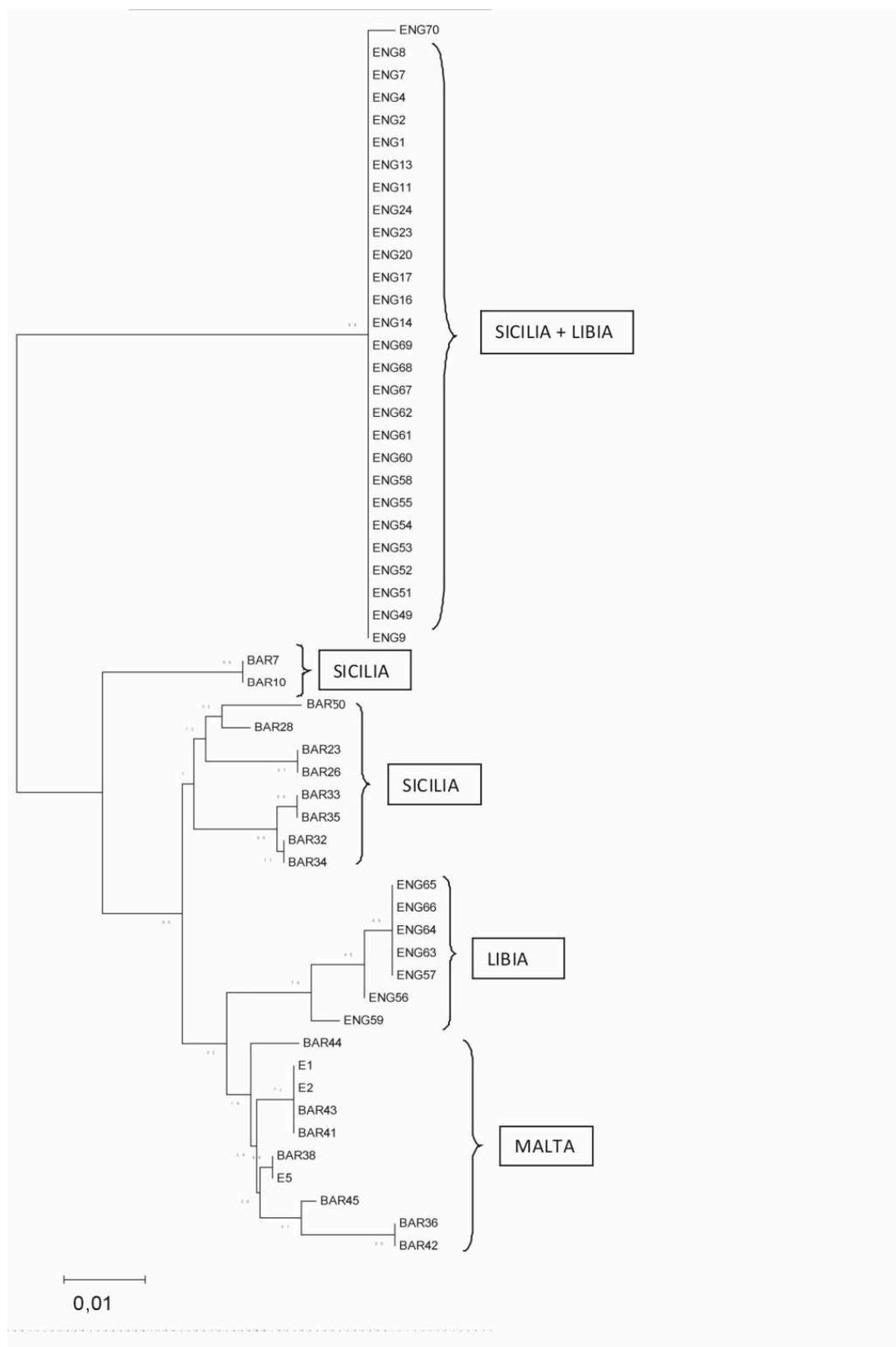


Fig. 21 – Albero filogenetico costruito con il metodo della Massima Probabilità (ML).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Fino ad oggi sono stati utilizzati differenti approcci per rendere possibile l'identificazione di specie, dall'osservazione dei caratteri morfologici alle tecniche molecolari basate sull'analisi delle proteine, ma nessuno di questi è stato mai standardizzato. Infatti, durante il processo di trasformazione in prodotti ittici commercializzati, le caratteristiche esterne utilizzate dalla tradizionale analisi morfologica, vengono rimosse e le proteine, analizzate con l'IEF (isoelectric focusing) o cromatografia liquida, vengono denaturate dai trattamenti di calore effettuati (Mackie *et al.*, 1999). Una diversa fonte di informazione è il DNA, che pur subendo trattamenti termici, rappresenta ancora una molecola stabile a differenza delle proteine. Quindi lo sviluppo di approcci analitici a basso costo per l'identificazione basata sull'analisi del DNA è diventata una questione di notevole importanza. Superati i metodi molecolari, quali PCR-RFLP o PCR-SSCP, la sequenza di un gene target può essere utilizzata per identificare un organismo anche in prodotti alimentari altamente processati (Unsel *et al.*, 1995). Difatti mentre le suddette tecniche richiedevano una conoscenza preliminare su ciò che poteva essere contenuto nel prodotto, il DNA barcoding non necessita di questa informazione. Ad oggi questo approccio, basato sull'amplificazione, il sequenziamento e l'interrogazione di banche dati di sequenza, non è del tutto innovativo poiché quasi venti anni fa era stata sviluppata una procedura simile chiamata FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing) (Bartlett and Davidson, 1992). Ma solo con l'introduzione del DNA barcoding essa è divenuta una risorsa internazionale come saggio per l'identificazione molecolare. A differenza del FINS che utilizzava differenti marker per analizzare diversi gruppi tassonomici, il DNA barcoding offre la possibilità di standardizzare le metodica utilizzando una regione universale, così da creare una library unica basata sulle sequenze della COI per tutti i metazoi. Le applicazioni di tale metodo analitico potrebbe essere un rapido e sensibile monitoraggio di specie di interesse commerciale presenti negli alimenti allo scopo di combattere le frodi intenzionali e non di sostituzione di specie ittiche (Logan *et al.*, 2008).

Il DNA barcoding si è infatti rivelato adatto all'identificazione di specie a partire da campioni biologici, inclusi i cibi trasformati. Numerosi studi hanno dimostrato la sua efficacia in vari gruppi (Hebert et al. 2003a, b.; Teletchea 2005, 2009; Hebert et al. 2004a, b; Hogg et al. 2004; Smith et al. 2005; Hajibabaei et al. 2006), inclusi i pesci (Ward et al. 2005; Hubert et al. 2008). Ward et al. (2005) ha fornito una chiara evidenza dell'efficienza discriminativa del DNA barcoding nell'identificazione di pesci marini in uno studio che ha esaminato oltre 200 specie Australiane. In generale, Il DNA barcoding si è mostrato essere valido anche nell'identificazione di campioni incogniti (di origine sconosciuta) e nel controllo dell'etichettatura dei prodotti commercializzati. D'altra parte, per la caratterizzazione di stock ittici, sono stati finora utilizzati marker con un alto tasso di variabilità intraspecifica, come ad esempio il dominio ipervariabile della regione di controllo mitocondriale (5'-dloop). Quest'ultimo è generalmente molto più sensibile e appropriato rispetto ad altri geni che codificano per proteine, come marker per lo studio della struttura filogeografica di svariati organismi. In questo studio la variabilità di sequenza di un segmento di circa 650 bp del gene della COI (DNA barcode) è stato utilizzato sia in campo applicativo, fornendo un utile supporto alla tracciabilità molecolare dei prodotti ittici in particolare nel caso delle specie appartenenti all'ordine Pleuronectiformes (pesci piatti); sia nella ricerca di base oltre che per scopi tassonomici, come nel caso dell'identificazione di specie mesopelagiche della famiglia Myctophidae, anche per lo studio e la caratterizzazione molecolare di stock ittici, ovvero nella specie *Xiphias gladius* (pesce spada). Infine, dopo un preliminare test negativo sull'utilizzo del gene della COI per indagare la struttura genetica di stock di *Engraulis encrasicolus* (acciuga) (la COI non è stata utilizzata in quanto il grado di variabilità riscontrato era troppo basso per essere utilizzata come marcatore di stock), si è condotta un'analisi sulle sequenze del dominio ipervariabile della regione di controllo mitocondriale (5'-dloop) per distinguere e caratterizzare stock di acciuga del Canale di Sicilia, di Malta e Libia.

5.1. Contributo del DNA barcoding alla tracciabilità molecolare nel settore ittico.

Dallo screening effettuato su 15 campioni di pesci piatti (Pleuronectiformes) e su 15 campioni di pesce spada (*Xiphias gladius*), in filetti, tranci e/o in prodotti impanati, acquistati in vari supermercati e mercati locali, è stato possibile attraverso il sequenziamento e l'analisi di un frammento del gene della COI individuare alcune frodi commerciali di sostituzione di specie. In particolare una delle frodi più clamorose riscontrate è stata la sostituzione di un filetto di platessa con una specie simile ma di minor valore commerciale, la passera (*Platichthys flesus*). Stesso tipo di frode è stata individuata tra i campioni di tranci impanati di pesce spada: uno di questo, dall'analisi molecolare è risultato appartenere ad una specie diversa, *Prionace glauca* per l'appunto, uno squalo. Altro risultato di notevole rilevanza commerciale è stata la possibilità di discriminare lo stock di pesce spada del Mediterraneo da quelli oceanici, e in qualche caso campioni acquistati come pesce spada del Mediterraneo sono risultati provenire invece dall'Atlantico, con una maggiore probabilità quindi che il pesce fosse decongelato e non fresco.

6.2. Identificazione di stock di *X. gladius* su ampia scala geografica attraverso COI- DNA barcode

La stima media della diversità aplotipica rilevata dall'analisi delle sequenze della COI mitocondriale in esemplari di *Xiphias gladius* è risultata piuttosto alta ($h=0.89$), ma non quanto quella calcolata per le sequenze del 5'dloop negli stessi esemplari ($h=0.97$). Entrambi i marker hanno mostrato un pattern di relazioni intraspecifiche simile ad eccezione dei bassi valori di diversità aplotipica riscontrata per le sequenze della COI, che di conseguenza risulta essere meno soggetta a rischio di saturazione mutazionale. Proprio per questa caratteristica è stato ritenuto opportuno utilizzare questo marcatore per discriminare gli stock di pesce spada. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ricavati dal sequenziamento del 5'-dloop degli stessi esemplari e da ciò è emersa una piena corrispondenza tra essi. In conclusione il frammento di 682 bp della COI è risultato un efficiente marker non solo per l'identificazione a livello di specie ma è stato anche utile, relativamente alla specie *X.*

gladius, per discriminare lo stock del Mar Mediterraneo da quelli dei bacini oceanici (Pappalardo et al. 2010). In particolare da fonogrammi NJ ottenuti con entrambi i marker sono stati individuati due cladi principali che probabilmente corrispondono a quelli riportati in studi precedenti (Alvarado Bremer et al. 1995,1996, 2006) : il clade I che comprende 30 individui appartenenti a tutti e tre i bacini oceanici e il clade II include invece sei aplotipi esclusivamente del Mar Mediterraneo. Questi risultati, comparati con quelli già presenti in letteratura (Greig et al. 1999; Pujolar et al. 2002; Magoulas et al. 1993; Alvarado Bremer et al. 2005), potrebbero suggerire una possibile spiegazione alla evidente strutturazione degli esemplari di *X. gladius* del Mediterraneo. E' ipotizzabile che il lineage esclusivamente Mediterraneo possa essere considerato una candidata specie criptica (nel senso di Padial et al. 2010) distinta dalla specie più ampiamente distribuita che risulta avere esemplari anche negli altri bacini oceanici. Questa organizzazione potrebbe giustificare l'individuazione di uno stock localizzato con l'approccio del DNA barcoding. E' evidente la necessità di effettuare un campionamento più ampio per confermare o meno tale ipotesi (Pappalardo et al. 2011).

5.3. Identificazione di specie mesopelagiche a partire da stadi larvali.

Oltre all'efficacia nell'identificazione e nella scoperta di nuove specie. Il DNA Barcoding riveste un ruolo fondamentale anche nell'identificazione di specie a partire da vari stadi larvali. Infatti gli stadi più giovanili di molte specie di pesci sono ancora sconosciuti e le larve di specie differenti sono spesso molto simili morfologicamente (Leis and Carson- Ewart 2000; Richards 2006; Baldwin *et al.* 2009). Inoltre, le larve sono così delicate che spesso subiscono danni durante i campionamenti e la fase di fissazione regolarmente determina la perdita del pattern di pigmentazione importante per l'identificazione (Smith 1995). Un ovvia soluzione di questi problemi implica l'identificazione degli stadi larvali attraverso un confronto delle sequenze da essi ottenute con delle sequenze di riferimento ottenute attraverso il DNA barcoding degli adulti. In questo studio è stata testata la capacità del DNA barcoding di distinguere specie appartenenti alla famiglia Myctophide ancora poco

conosciute e caratterizzate dal punto di vista molecolare, a partire da campioni di larve che spesso presentano ambiguità nell'identificazione morfologica. Infatti analizzando la concordanza tra il criterio morfologico e molecolare (DNA barcoding) per l'identificazione di esemplari di quattro specie mesopelagiche. Solamente in un caso il risultato è stato negativo, nel senso che non si è arrivati all'identificazione della larva pur essendo riusciti ad amplificarne e sequenziarne il gene della COI (barcode). Infatti, confrontando la sequenza ottenuta sia con le banche dati online che con le nostre sequenze di riferimento per le quattro specie in esame, essa non si allineava opportunamente con nessuna sequenza. Si potrebbe così trattare di una specie diversa dalle quattro da noi analizzate, che probabilmente non è stata ancora caratterizzata dal punto di vista molecolare. Per altri due campioni invece non è stato possibile ottenere i prodotti di amplificazione, ciò forse a causa del fatto che il DNA estratto risultava essere degradato e quindi non più adatto per l'amplificazione del frammento di circa 650 bp della COI. E' quindi evidente che il DNA Barcoding convenzionale presenta un problema: la degradazione del DNA in materiale biologico processato (prodotti alimentari trasformati) o danneggiato o in quantità troppo esigua (larve) spesso impedisce il recupero di frammenti di PCR più lunghi di 200 bp, non consentendo così di ottenere una sequenza barcode convenzionale (Hajibabaei et al. 2006). Alcuni autori hanno proposto l'utilizzo di una sequenza "mini-barcode" per risolvere questo problema. Il mini-barcode system allarga notevolmente le applicazioni del DNA Barcoding e diversi autori come ad es. Meusnier et al. (2008) hanno dimostrato che brevi sequenze del DNA barcode (frammenti < 150 bp) rappresentano efficienti tags di sequenza per l'identificazione univoca delle specie. Obiettivo futuro potrebbe essere l'applicazione del minibarcode a questo campione incognito.

5.4. Analisi della variabilità del 5'dloop per lo studio della struttura genetica di popolazione nella specie *Engraulis encrasicolus*.

Lo studio preliminare sulla strutturazione genetica nel Canale di Sicilia della specie *Engraulis encrasicolus*, attraverso l'analisi delle sequenze del 5'-dloop ha permesso di identificare nell'area, 4 diverse zone di spawning ben separate: piattaforma siciliana (area a nord), Malta, Libia e piattaforma siciliana (area a sud). Tale situazione probabilmente risente dell'influenza delle correnti che governano il regime circolatorio nel Canale di Sicilia, dove la circolazione può essere schematizzata con un modello a due strati che prevede il fluire verso Est della MAW nello strato più superficiale ed il fluire verso Ovest della LIW nello strato più profondo, in controcorrente rispetto alla MAW (Béranger *et al.*, 2005). Il modello di circolazione prevede inoltre che, in corrispondenza della parte più occidentale del Canale di Sicilia, la MAW si biforchi dando origine all'“Atlantic Ionian Stream” (AIS) (Robinson *et al.*, 1999), una corrente che trasporta acqua Atlantica, più calda e meno salata, verso il mar Ionio e alla “Atlantic Tunisian Current” (ATC) che fluisce verso la costa tunisina (Lermusiaux e Robinson, 2001; Béranger *et al.*, 2005). Un tipico pattern di circolazione prevede che l'AIS entri nel Canale di Sicilia da ovest, e che lungo la sua traiettoria, si distacchino due rami di corrente dando origine a due vortici ciclonici (Fig. 22): il primo sul Banco Avventura (Adventure Bank Vortex, ABV) ed il secondo intorno alla piattaforma maltese poco a sud di Capo Passero (Ionian Shelf Break Vortex, IBV), mentre il ramo principale della corrente descrive un pronunciato meandro anticiclonico tra questi due vortici. Un terzo vortice ciclonico, sempre derivante dal ramo di corrente principale dell'AIS, si forma talvolta lungo la costa orientale della Sicilia, tra Capo Passero a sud e lo Stretto di Messina a nord. Tutte queste correnti influenzano la distribuzione e i movimenti delle larve di *E. encrasicolus* determinando il pattern di strutturazione genetica riscontrato in questo studio. Un ulteriore e più ampio campionamento è tuttavia necessario per delineare meglio la struttura genetica di questa specie nell'area Mediterranea.

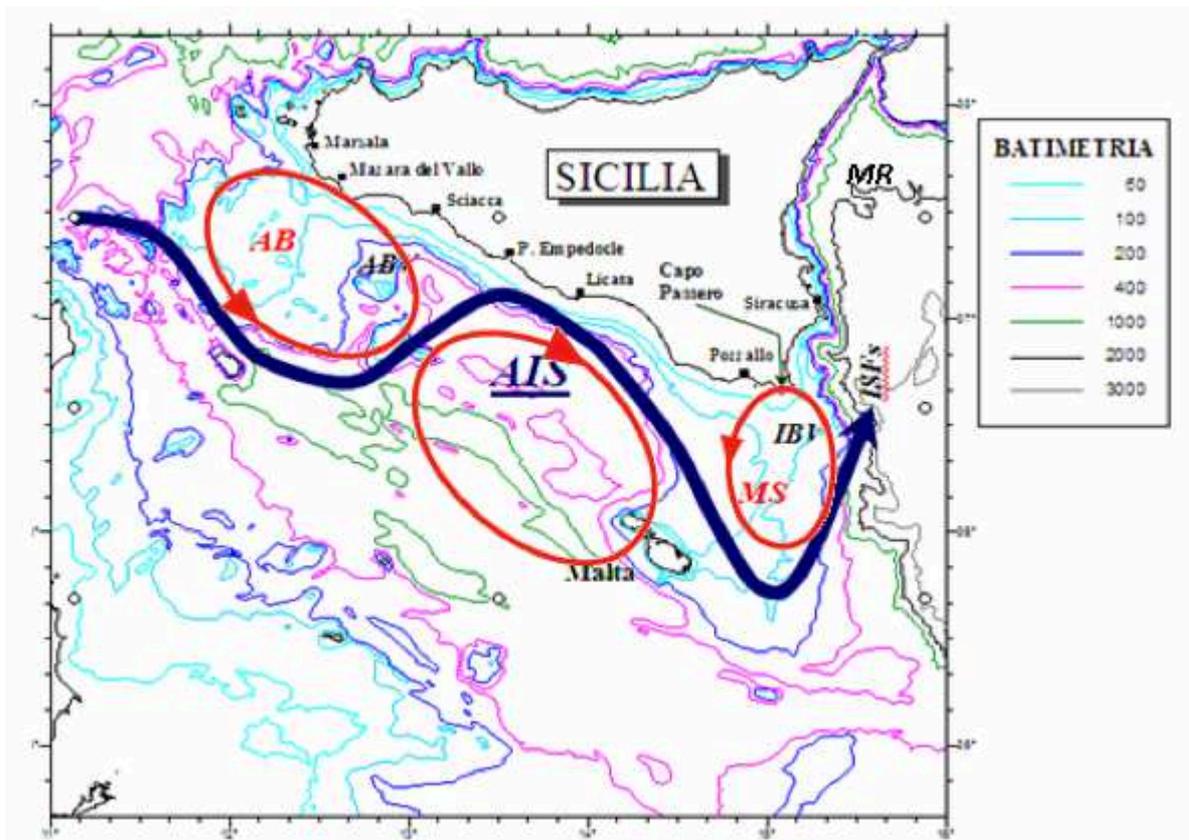


Fig. 22 - Schematizzazione delle caratteristiche della circolazione superficiale individuate da Robinson *et al.* (1998) nello Stretto di Sicilia. La freccia in blu traccia il percorso dell'AIS (Robinson *et al.*, 1999). AB: Adventure Bank; MS: maltese Shelf. In nero sono riportate le principali strutture oceanografiche superficiali: ABV: Adventure Bank Vortex; IBV: Ionian Shelf Break Vortex; MRV: Messina Rise Vortex; ISFs: Ionian Shelf Fronts

5.5. Conclusioni e prospettive future

L'identificazione e la classificazione delle specie viventi sono state tradizionalmente di dominio dei tassonomi, ma poiché i metodi classici, basati sulla morfologia, richiedono grandi capacità, lunghi tempi e spesso sono difficili da applicare in quelle situazioni con limitati tratti fenotipici, recentemente sono stati sviluppati nuovi approcci molecolari. Negli ultimi dieci anni, il DNA Barcode, ovvero l'identificazione delle specie attraverso il sequenziamento di una regione standardizzata del DNA, è stato proposto e applicato come moderno strumento molecolare in grado di supportare i tradizionali metodi tassonomici in un approccio integrato. Inoltre, il DNA barcoding, che può essere applicato a tutti gli stadi di vita, da quello giovanile alle forme adulte, e per la determinazione dell'identità tassonomica a partire da esemplari danneggiati o da frammenti (ad esempio, prodotti alimentari), è risultato importante per esempio nel campo della scienza forense, nella tracciabilità alimentare o nella protezione della biodiversità, in particolare per impedire la caccia illegale di animali in via di estinzione. Anche se questi vantaggi indiscutibili conferiscono un valore inestimabile a tale approccio, sono state sollevate numerose critiche, soprattutto dalla comunità tassonomica che mette in discussione i presupposti teorici su cui si basa il DNA barcode. Il grado di divergenza genetica viene utilizzato come criterio per definire una specie, per es. per stabilire se due popolazioni appartengono o meno alla stessa specie, ma può essere utilizzato solo tenendo conto del concetto di specie biologica proposto da Mayr, che è ancora uno dei temi più discussi in biologia. Pertanto diversi autori credono che il DNA barcode sia solo una chiave molecolare aggiuntiva che può identificare solo specie conosciute e non può in nessun modo sostituire la tassonomia tradizionale. Il presente studio inserito nell'ambito di questa tematica fornisce un'analisi delle possibili applicazioni del DNA barcoding sia nella ricerca di base, a scopo tassonomico, sia nell'ambito della tracciabilità molecolare nel settore ittico, laddove consente il riconoscimento delle varie specie di interesse alieno, spesso coinvolti in casi di falsificazione. Si tratta ovviamente di uno studio che potrebbe fornire le informazioni necessarie di base, da utilizzare in futuro per lo sviluppo di un dispositivo portatile che potrà consentire una facile e rapida

applicazione sul campo di metodiche molecolari atte al riconoscimento delle specie in esame. Questi sviluppi potrebbero avere importanti potenzialità economiche perchè permetterebbero l'applicazione di tale sistema analitico da parte dei consumatori, degli utilizzatori e di qualsiasi Organo di Controllo, per contrastare in maniera sollecita ed efficace lo svilupparsi di frodi commerciali che comportano problemi di carattere economico ma potenzialmente anche sanitario.

6. BIBLIOGRAFIA

Alvarado Bremer JR, Mejuto J, Baker AJ (1995) Mitochondrial DNA control region sequences indicate extensive mixing of swordfish (*Xiphias gladius*) populations in the Atlantic Ocean. *Can J Fish Aquat Sci*, 52: 1720–1732.

Alvarado Bremer JR, Mejuto J, Greig TW, Ely B (1996) Global population structure of the swordfish (*Xiphias gladius* L.) as revealed by analysis of the mitochondrial DNA control region. *J Mar Biol Ecol* 197: 295-310.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290(5806):457-465.

Aquadro CF & Greenberg BD (1983) Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, 103: 287-312.

Avise JC (1986) Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B*, 312: 325-342.

Baldwin CC, Mounts JH, Smith DG, Weigt LA (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*. *Zootaxa* 1–22.

Bartlett SE, Davidson WS (1992). FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Biotechniques* 12(3): 408-411.

Bensasson D, Zhang DX, Harti DL, and Hewitt GM (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol Evol* 16(6): 314-321.

Béranger K, Mortier L, Crépon M (2005) Seasonal variability of water transport through the Straits of Gibraltar, Sicily and Corsica, derived from a high-resolution model of the Mediterranean circulation. *Progress in Oceanography* 66, 341-364.

Berrini A, Tepedino V, Borromeo V, Secchi C (2006) Identification of freshwater fish commercially labelled “perch” by isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *Food Chemistry*, 96: 163–168.

Billington N & PDN Herbert (1991) Mitochondrial DNA Diversity in Fishes and its implications for Introductions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48: 80-94.

- Birky CW Jr (1995) Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 92: 11331-11338.
- Brown WM, George M Jr & Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(4), pp. 1967-1971.
- Brown WM (1983) Evolution of animal mitochondrial DNAs, pp. 62-88. In M. Nei and R. K. Koehn [ed.] *Evolution of genes and proteins*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Buhay JE (2009) “COI-like” sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustaceans Biology* 29: 96–110.
- Castresana J (2000) Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignment for Their use in Phylogenetic Analysis. *Mol Biol Evol* 17(4): 540–552.
- Chow S, Okamoto H, Uozumi Y, Takeuchi Y, Takeyama H (1997) Genetic stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Mar Biol* 127: 359-367.
- Chow S, Takeyama H (2000) Nuclear and mitochondrial DNA analyses reveal four genetically separated breeding units of the swordfish. *J Fish Biol* 56: 1087– 1098.
- Clement M, Posada D & Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9: 1657–1659.
- De Salle R, Egan MG, Siddall M (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philos T R Soc B* 360: 1905-1916.
- Dupont S, Wilson K, Obst M, Sköld H, Nakano H & Thorndyke MC (2007) Marine ecological genomics: when genomics meets marine ecology. *Marine ecology progress series* 332: 257-273.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Ficetola GF, Coissac E, Zundel S, Riaz T, Shehzad W, Bessièrè J, Taberlet P, Pompanon F. (2010) An *In silico* approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics*, 11: 434.
- Fitch WM (1967) Evidence suggesting a non-random character to nucleotide replacements in naturally occurring mutations. *Journal of Molecular Biology*, 26: 499-507.
- Folmer O, Black M, Hoeth W, Lutz R, and Vrijenhoek R (1994) DNA primers for

amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3 (5): 294-299.

Frézal L, Leblois R. (2008) Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infect Genet Evol* 8(5): 727-36.

Garcia A, Palomera I, Liorzou B, Giovanardi O & Pla C (1994) Northwestern Mediterranean Anchovy. Distribution, biology, fisheries and biomass estimation by different methods. Final Report of the EC FAR Project 1992±93, Contract No MA 3.730.

Greig TW, Alvarado Bremer JR, Ely B (1999) Preliminary results from genetic analyses of nuclear markers in swordfish, *Xiphias gladius*, reveals concordance with mitochondrial DNA analyses. *ICCAT Coll Vol Sci Papers* 49: 476–482.

Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN (2006) DNA barcode distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(4): 968-971.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270: 313-321.

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270:S96–S99.

Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM (2004a) Identification of birds through DNA barcodes. *Plos Biology*, 2: 1657–1663.

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004b) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14812–14817.

Hogg ID, Hebert PDN (2004) Biological identification of springtails (Collembola: Hexapoda) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can J Zool* 82: 749-754.

Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak NE, Taylor E, BurrIDGE M, Watkinson D, Dumont P, Curry A, Bentzen P, Zhang J, April J, Bernatchez L (2008) Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS ONE* 3 (6): e2490.

Jeffreys AJ & Flavell RA (1977) A physical map of the DNA flanking the rabbit β -globin gene. *Cell*, 12: 429-439.

- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC (1991) Evolution of the cytochrome *b* Gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32: 128-144.
- Kerr CRK (2010) A cryptic, intergeneric cytochrome *c* oxidase I pseudogene in tyrant flycatchers (family: Tyrannidae). *Genome*; 53: 1103-1109.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Knowlton N (1993) Sibling Species in the Sea. *Annu Rev Ecol Evol S* 24: 189-216.
- Korpelainen H (2004) The evolutionary processes of mitochondrial and chloroplast genomes differ from those of nuclear genomes. *Naturwissenschaften* 91: 505–518.
- Kocher TD, Conroy JA, McKaye KR, Stauffer JR, Lockwood SF (1995) Evolution of NADH dehydrogenase subunit 2 in East African cichlid fish. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4: 420-432.
- Kotoulas G, Magoulas A, Tsimenides N, Zouros E (1995) Marked mitochondrial DNA differences between Mediterranean and Atlantic populations of the swordfish, *Xiphias gladius*. *Mol Ecol* 4: 473-481.
- Lee, Woo-Jai, Conroy J, Howell WH, Kocher TD (1995) Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 54-66.
- Lefébure T, Douady CJ, Gibert J (2006) Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Mol Phylogenet Evol* 40 : 435–447.
- Leis JM & Carson-Ewart BM (2000) ‘The Larvae of Indo-Pacific Coastal Fishes: An Identification Guide to Marine Fish Larvae.’ (Brill: Leiden, The Netherlands.)
- Lermusiaux PFJ & Robinson AR (2001) Features of dominant mesoscale variability, circulation patterns and dynamics in the Strait of Sicily. *Deep Sea Research I*, 48: 1953-1997.
- Li WH, Wu CI, Luo CC (1984) Nonrandomness of point mutation as reflected innucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. *Journal of Molecular Evolution*, 21: 58-71.
- Lin W-F, Hwang D-F (2008) A multiplex PCR assay for species identification of raw and cooked bonito. *Food Control* 19 (9): 879-885.
- Linnaeus C (1756) *Systema Naturae*. Ninth edition. Theodor Haak, Leiden (Lugdunum Batavorum).

- Lipscomb D, Platnick N, Wheeler Q (2003) The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA in taxonomy. *Trends Ecol Evol* 18: 65–67.
- Liu CJ & Musial JM (2001) The application of chloroplast DNA clones in identifying maternal donors for polyploid species of *Stylosanthes*. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 73-77.
- Logan CA, Alter SE, Haupt AJ, Tomalty K, Palumbi SR (2008) An impediment to consumer choice: overfished species are sold as Pacific red snapper. *Biol Conserv* 141 (6): 1591-1599.
- Magoulas A, Tsimenides N, Zouros E (1996) Mitochondrial DNA phylogeny and the reconstruction of the population history of a species: the case of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Mol Biol Evol* 13: 178–190.
- Magoulas A, Zouros E (1993) Restriction-site heteroplasmy in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) indicates incidental biparental inheritance of mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* 10, 319–325.
- Magoulas A, Castilho R, Caetano S, Marcato S, Patarnello T (2006) Mitochondrial DNA reveals a mosaic pattern of phylogeographical structure in Atlantic and Mediterranean populations of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Mol Phyl Evol*, 39: 734–746.
- Mackie IM, Pryde SE, Gonzalez-Sotelo C, Medina I, Perez-Martin R, Quinteiro J, Rey- Mendez M, Rehbein H (1999) Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends Food Sci Tech* 10 (1): 9-14.
- Meusnier G, Singer A, Landry JF, Hickey DA, Hebert PD, Hajibabaei M (2008) A universal mini-barcode for biodiversity analysis, *BMC Genom.* 9: 214.
- Meyer A (1994) Shortcomings of the cytochrome *b* gene as a molecular maker. *Trends Ecol. Evol.*, 9: 278-303.
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA Barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*; 3:e422.
- Momcilovic D & Rasooly A (2000) Detection and analysis of animal materials in food and feed. *Journal of Food Protection*, 63: 1602-1609.
- Montiel-Sosa JF, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Roncales P, Lopez-Perez MJ, Perez-Martos A (2000) Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *J Agr Food Chem* 48 (7): 2829-2832.

- Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 269-292.
- Naciri Y, Manen JF (2009) Potential DNA transfer from the chloroplast to the nucleus in *Eryngium alpinum*. *Molecular Ecology Resources*, 10: 728-731.
- Nei M & Miller JC (1990) A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics*, 125: 873-879
- Newmaster SG, Fazekas AJ, Ragupathy S (2006) DNA barcoding in land plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach. *Can J Bot* 84: 335-341.
- Padial J, Miralles A, De la Riva I, Vences M (2010) The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7: 16.
- Palomera I, Olivar MP, Salat J, Sabatés A, Coll M, García A & Morales-Nin B (2007). Small pelagic fish in the NW Mediterranean Sea: An ecological review. *Progress in Oceanography* 74: 377–396.
- Pappalardo AM, Guarino F, Reina S, Messina A, De Pinto V (2011) Geographically widespread swordfish barcode stock identification: a case study of its application. *PLoS ONE* 6(10): e25516. doi:10.1371
- Paquin P, Hedin M (2004) The power and perils of "molecular taxonomy": a case study of eyeless and endangered *Cicurina* (Araneae: Dictynidae) from Texas caves. *Mol Ecol* 13:3239-3255.
- Patti B, Bonanno A, Basilone G, Goncharov S, Mazzola S, Buscaino G, Cuttitta A, García Lafuente J, García A, Palombo V & Cosimi G (2004) Interannual fluctuations in acoustic biomass estimates and in landings of small pelagic fish populations in relation to hydrology in the Strait of Sicily. *Chem Ecol*, 20(5): 365-375.
- Pegg GG, Sinclair B, Briskey L, Aspden WJ (2006) MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia. *Sci Mar* 70(S2): 7–12.
- Pesole G, Gissi C, De Chirico A, Saccone C (1999) Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J Mol Evol* 48(4): 427–434.
- Pujolar JM, Roldan MI, Pla C (2002) A genetic assessment of the population structure of swordfish (*Xiphias gladius*) in the Mediterranean Sea. *J Exp Mar Biol Ecol* 276: 19-29.
- Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol Ecol Notes*, 7: 355–64.

- Rehbein H, Etienne M, Jerome M, Hattula T, Knudsen LB, Jessen F, Luten JB, Bouquet W, Mackie I, Ritchie AH, Martin R and Mendes R (1995) Influence of variation in methodology on the reliability of the isoelectric focusing method of fish species identification. *Food Chemistry*, 52: 193–197.
- Richards WJ (2006) ‘Early Stages of Atlantic Fishes: An Identification Guide for Western Central North Atlantic.’ (Taylor and Francis: Boca Raton, FL.)
- Richly E, Leister D (2004) NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. *Mol Biol Evol*, 21: 1081–4.
- Robinson AR, Sellschopp J, Warn-Varnas A, Leslie WG, Lozano CJ, Haley PJ, Anderson LA, Lermusiaux PFJ (1999) The Atlantic Ionian Stream. *Journal of Marine Systems* 20: 113-128.
- Rosel PE, Block BA (1996) Mitochondrial control region variability and global population structure in the swordfish, *Xiphias gladius*. *Mar Biol* 125: 11-22.
- Rozas J, Rozas R (1999) DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174–175.
- Rubinoff D (2006) Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conserv Biol* 20(4): 1026-1033.
- Saccone C, De Giorgi C, Gissi C, Pesole G, Reyes A (1999) Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238(1): 195-209.
- Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4: 406–425.
- Salgado J, Honorato B, Garcia-Foncillas J (2008) Review: Mitochondrial Defects in Breast Cancer. *Oncology* 2: 199–207.
- Saunders GW (2005) Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philos Trans R Soc B* 360 (1462): 1879-1888.
- Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R (2005) Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Phil Trans R Soc B* 360: 1805-1811.
- Shearer TL, Van Oppen MJH, Romano SL, Worheide G (2002) Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Mol Ecol* 11: 2475–2487.

Sbisa E, Tanzariello F, Reyes A, Pesole G, Saccone C (1997) Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* 205: 125–140.

Shields GF & Wilson AC (1987) Calibration of mitochondrial DNA evolution in geese. *Journal of Molecular Evolution*, 24: 212-217.

Simmons RB, Weller SJ (2001) Utility and evolution of cytochrome *b* in insects. *Mol Phylogenet Evol* 20 (2): 196-210.

Simon C, Frati F, Beckenback A, Crespi B, Lui H, Flook P (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87: 651-701.

Smith DG (1995) Preservation of color in larval fishes. *American Society Ichthyology and Herpetology Curation Newsletter* 11, 5–6.

Smith MA, Fisher BL, Hebert PDN (2005) DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Phil Trans Royal Soc B-Biol Sci* 360: 1825–1834.

Song H, Buhay JE, Whiting MF, et al. (2008) Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:13486–91.

Spanakis E, Tsimenides N, Zouros E (1989) Genetic differences between populations of sardine, *Sardina pilchardus*, and anchovy, *Engraulis encrasicolus*, in the Aegean and Ionian seas. *J Fish Biol* 35: 417–437.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.

Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP (2003) A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol* 18(2): 70–74.

Teletchea F, Maudet C, Hanni C (2005) Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnol* 23 (7): 359-366.

Teletchea F (2009) Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev Fish Biol Fish*. DOI 10.1007/s11160-009-9107-4.

Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132:619–633

Unsel M, Beyermann B, Brandt P, Hiesel R (1995) Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR Methods Appl* 4: 241-243.

van Velzen R, Bakker FT, Loon JJA (2007) DNA barcoding reveals hidden species diversity in *Cymothoe* (Nymphalidae). *Proc Neth Entomol Meet* 18: 95-103.

Vences M, Thomas M, Bonett RM, Vieites DR (2005) Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philos T R Soc B* 360: 1859-1868.

Ward RD, Reeb CA, Block BA (2001) Population structure of Australian swordfish, *Xiphias gladius*. Final Report to the Australian Fisheries Management Authority, Canberra.

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Phil Trans R Soc B* 360 (1462): 1847-1857.

Wiemers M, Fiedler K (2005) Does the DNA barcoding gap exist? – A case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Front Zool*, 4: 8.

Wilson AC, Cann RL, Carr SM, Geroge M, Gyllensten UB, Helm-Bychowski KM, Higuchi RG, Palumbi SR, Prager EM, Sage RD, Stoneking M (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26: 375-400.

Wong EHK, Shivji MS, Hanner RH (2009) Identifying shark with DNA barcode: assessing the utility of a nucleotide diagnostic approach. *Mol Ecol Res* 9 (Suppl. 1): 243–256.

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUZIONE | |
| 1.1. Biodiversità e crisi della tassonomia | 1 |
| 1.2. IL DNA Barcoding | 7 |
| 1.3. Il genoma mitocondriale | 17 |
| 1.4. La tracciabilità molecolare nel settore ittico | 22 |
| 2. OBIETTIVO DELLA TESI E CASI DI STUDIO | |
| 2.1. Il pesce spada (<i>Xiphias gladius</i> , Fam. Xiphiidae) | 29 |
| 2.2. I “pesci piatti” (Ord. Pleuronectiformes) | 30 |
| 2.3. Specie mesopelagiche (Fam. Myctophidae) | 33 |
| 2.4. L’acciuga, <i>Engraulis encrasicolus</i> (Fam. Engraulidae) | 34 |
| 3. MATERIALI E METODI | |
| 3.1. Campionamenti | 37 |
| 3.2. Estrazione, amplificazione e sequenziamento | 39 |
| 3.3. Analisi dei dati molecolari | 40 |
| 3.4. Ricerca di NUMTS | 42 |
| 3.5. Identificazione di campioni incogniti | 43 |
| 4. RISULTATI | |
| 4.1. Identificazione di stock di <i>X. gladius</i> su ampia scala geografica attraverso COI-DNA barcode. | 44 |
| 4.2. Screening di controllo su esemplari di Pleuronectiformi (pesci piatti). | 56 |
| 4.3. Identificazione molecolare di stadi larvali di specie della famiglia Myctophidae. | 59 |
| 4.4. Analisi della struttura genetica di popolazioni di <i>E. encrasicolus</i> . | 61 |
| 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI | |
| 5.1. Contributo del DNA barcoding alla tracciabilità molecolare nel | |

| | |
|--|-----------|
| settore ittico | 65 |
| 5.2. Identificazione di stock di <i>X. gladius</i> su ampia scala geografica Attraverso COI-DNA barcode | 65 |
| 5.3. Identificazione di specie mesopelagiche a partire da stadi larvali | 66 |
| 5.4. Analisi della variabilità del 5'-dloop per lo studio della struttura genetica di popolazione nella specie <i>E. encrasicolus</i> | 68 |
| 5.5. Conclusioni e prospettive future | 71 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 73 |