

SVILUPPO DI UN METODO DI PCR-RFLP PER L'IDENTIFICAZIONE DI SEI SPECIE APPARTENENTI AL GENERE *LOPHIUS*

DEVELOPMENT OF A PCR-RFLP METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF SIX SPECIES BELONGING TO THE GENUS *LOPHIUS*

Armani A.¹, Castigliero L.¹, Guidi A.¹, Gandini G.², Manzoni P.³, Susini F.⁴, Gianfaldoni D.¹

⁽¹⁾ Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Università di Pisa

⁽²⁾ Ministero della Salute, PIF Bologna

⁽³⁾ Dipartimento di Prevenzione Veterinaria, ASL Lecco

⁽⁴⁾ Istituto Zooprofilattico Lazio e Toscana, laboratorio di Ittiopatologia

SUMMARY

Nowadays, six of the seven species belonging to the *Genus Lophius* have an important commercial value in the national and international markets. Usually they are sold beheaded and for this reason they are called tails. This kind of preparation is a limit for the specie-identification by means of the morphological characteristics. The mitochondrial cytochrome b (*Cyt b*) gene is considered a useful genetic marker to identify fish species. In this work, after obtaining the *Cyt b* complete sequence of the *Lophius* species that were missed in the databases, we set up a method based on PCR-RFLP able to identify the six species of *Lophius* with a commercial denomination in the Italian market.

Key words

Fish species identification, *Lophius*, PCR-RFLP.

INTRODUZIONE

Il Genere *Lophius* comprende sette specie, delle quali sei, *L. piscatorius* (Linnaeus, 1758), *L. budegassa* (Spinola, 1807), *L. americanus* (Valenciennes, 1837), *L. vomerinus* (Valenciennes, 1837), *L. litulon* (Jordan, 1902) e *L. gastrophysus* (Miranda Ribeiro, 1915) vengono commercializzate fresche e congelate nei mercati internazionali, sia intere che sottoforma di prodotti preparati denominati code (1). La loro importanza economica è progressivamente aumentata nel corso degli anni; infatti, se inizialmente costituivano una specie secondaria catturata durante la pesca di altre specie, successivamente numerosi Paesi hanno sviluppato sistemi di cattura specifici per i *Lophius* (2,3). *L. piscatorius* e *L. budegassa* sono pescate da più di un centinaio di anni in Europa (Norvegia, Spagna, Francia e Inghilterra) (4) con un quantitativo, riferibile agli ultimi 20 anni,

compreso fra le 50.000 e le 70.000 tonnellate (1). *L. americanus* rappresenta invece la quarta specie più importante in ordine di grandezza nel comparto ittico degli Stati Uniti e la prima nell'ambito delle specie demersali (5). *L. gastrophysus*, di recente introduzione sui mercati del Brasile, è diventata subito una delle specie più apprezzate e pregiate (6,7). *L. vomerinus* costituisce una risorsa molto importante per il comparto ittico del Sud Africa dove, già nel 1997 ha rappresentato più del 70% del totale delle catture effettuate (1). Il *L. litulon*, infine, pescato in Giappone, Cina e Corea, nonostante manchino informazioni a livello bibliografico, è divenuto oggi molto popolare nei siti commerciali cinesi.

Nel 2005 il quantitativo mondiale di pescato relativo a queste specie è stato di circa 116.000 tonnellate e l'importazione di rana pescatrice da parte dei Paesi europei nel 2005 è aumentata del 3818% rispetto al 1985.

Nonostante siano tutte molto pregiate, esistono delle differenze fra le specie che si riflettono sul loro valore commerciale (3) e, per questo motivo, sono state previste differenti denominazioni commerciali in lingua italiana. Il Decreto MIPAAF del 31 Gennaio 2008 e successive integrazioni prevedono la denominazione di rospo o rana pescatrice per le specie *L. piscatorius* e *L. budegassa* quella di rana pescatrice americana per il *L. americanus*, quella di rana pescatrice orientale per il *L. litulon* e di rana pescatrice atlantica per il *L. gastrophysus* (8,9).

La loro commercializzazione sotto forma di preparati costituisce un ostacolo all'identificazione di specie attraverso l'utilizzo delle caratteristiche morfologiche, che, all'interno di questo genere, risulta difficile anche in presenza degli esemplari interi, favorendo la sostituzione (involontaria o volontaria) di prodotti più pregiati con specie dal valore economico inferiore (3).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di sviluppare una metodica bio-molecolare (PCR-RFLP) capace di identificare in maniera univoca le sei specie di *Lophius* per le quali è prevista una denominazione commerciale in lingua italiana. L'amplificazione e la successiva digestione di una porzione della sequenza relativa al citocromo b mitocondriale ha permesso di ottenere dei profili di restrizione caratteristici per ogni specie considerata.

MATERIALI E METODI

Nel presente lavoro sono stati analizzati un totale di 49 esemplari interi ognuno dei quali è stato identificato su base morfologica in base alle referenze bibliografiche. Il numero degli esemplari di ogni specie, la denominazione scientifica, quella commerciale (D.M. 31 gennaio 2008) e l'area di cattura (REG. CE 2065/2001) sono riportati nella tabella sottostante:

L'estrazione del DNA totale è stata effettuata aggiungendo due lavaggi con cloroformio/alcool isoamilico (24:1) al protocollo sviluppato da Nishiguchi *et al.* 2002 per l'estrazione di DNA da tessuti di pesce (10). Il DNA ottenuto è stato poi valutato qualitativamente e quantitativamente tramite spettrofotometro NanoDrop® ND-1000.

Le sequenze relative al citocromo b mitocondriale delle specie *L. piscatorius*, *L. budegassa*, *L. americanus* e *L. litulon* depositate sul database GeneBank, quella del *L. vomerinus* da noi ottenuta in un precedente lavoro (11) e quella del *L. gastrophysus* ottenuta nel seguente lavoro utilizzando due coppie di primers universali (GluFish-F/CytBI-4R) e (THR-Fish-R/CytBI-7F) (12), sono state allineate utilizzando il programma ClustalW (Software BioEdit version 5.0.6) al fine di mettere in evidenza le zone maggiormente conservate sul gene mitocondriale. Sono stati quindi disegnati due primer (FOR-LOP1: 5'-AGCCTCCTTCTTCTTTATTTGC-3'; REV-LOP6: 5'-GTATCACTCTGGCTTGATGTG-3') capaci di amplificare tramite PCR una porzione di 562 bp in tutte le specie d'interesse (condizioni di amplificazione: 94°C 3 min; 40 cicli a 94°C, 30 s; 54,5 °C, 30s, 72°C 25 sec; 1 ciclo a 72°C, 10 min).

I prodotti di amplificazione sono stati purificati e sequenziati (BMR genomics). Le sequenze ottenute sono state nuovamente allineate utilizzando il programma ClustalW e confrontate con le sequenze depositate in GenBank utilizzando il programma BLASTn (Software BioEdit version 5.0.6). Per la progettazione della RFLP, le sequenze d'interesse sono state analizzate tramite il programma REB-site, che permette di confrontare un numero indefinito di profili di restrizione generati da diversi enzimi (13). L'enzima BfaI è stato scelto in base alla sua capacità di generare dei profili di restrizione caratteristici per ogni specie e con bande facilmente distinguibili su gel di agarosio. Il numero di tagli e la lunghezza delle bande generate sono riportati

Numero esemplari	Nome scientifico	Denominazione commerciale	Zona di cattura
5	<i>Lophius piscatorius</i> (Linnaeus, 1775)	Rospo o rana pescatrice	Area FAO 27
5	<i>Lophius budegassa</i> (Spinola, 1807)	Rospo o rana pescatrice	Area FAO 27
9	<i>Lophius vomerinus</i> (Valenciennes, 1837),	Rana pescatrice sudafricana	Area FAO 47
10	<i>Lophius americanus</i> (Valenciennes, 1837)	Rana pescatrice americana	Area FAO 21
10	<i>Lophius litulon</i> (Jordan, 1902)	Rana pescatrice orientale	Area FAO 61
10	<i>Lophius gastrophysus</i> (Miranda Ribeiro, 1915)	Rana pescatrice atlantica	Area FAO 41

nella seguente tabella:

Specie	Numero tagli	Lunghezza bande
<i>Lophius piscatorius</i> (Linneaus, 1975)	3	107-204-156-95
<i>Lophius budegassa</i> (Spinola, 1807)	2	368-159-35
<i>Lophius vomerinus</i> (Valenciennes, 1837),	5	221-90-57-99-60-35
<i>Lophius americanus</i> (Valenciennes, 1837)	1	368-194
<i>Lophius litulon</i> (Jordan, 1902)	3	108-204-57-193
<i>Lophius gastrophysus</i> (Miranda Ribeiro, 1915)	5	107-114-147-123-36-35

Per ogni specie considerata sono state sottoposte al taglio con l'enzima prescelto tutte le sequenze depositate in database e quelle ottenute dal sequenziamento dei nostri campioni al fine di valutare la presenza di possibili aplotipi a livello dei siti di restrizione. Tutti i prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante corsa su gel di agarosio al 2% per valutare la specificità della reazione prima di essere sottoposti a digestione. La reazione è stata condotta in un volume di 30µl. Sono stati utilizzati 10µl di amplificato, 3µl di FastDigest™ Buffer 10X, 1µl di enzima BfaI FastDigest™ (Fermantas) e 16µl di acqua sterile. La digestione è stata condotta a 37°C per 45 minuti seguita da inattivazione a 65°C per 5 minuti. I campioni sono stati successivamente riscaldati a 65°C per 10 minuti in loading buffer 6X (60% glicerolo, 1% SDS, 100mM EDTA) e centrifugati prima di essere caricati sul gel. La corsa è stata effettuata su gel di agarosio ad alta risoluzione al 4% a 45V per 1 ora e 30 minuti. Per permettere la corretta identificazione delle bande ad ogni corsa è stato caricato una scala di riferimento, Ladder 50-1000bp (Euroclone).

RISULTATI

I primer disegnati hanno permesso di amplificare un frammento di 562bp in tutti i campioni analizzati. L'allineamento delle sequenze ottenute per le specie *L. piscatorius*, *L. budegassa* ed *L. americanus* con quelle depositate in database relative alla sequenza del citocromo b mitocondriale hanno messo in evidenza un'omologia del 100% confermando l'appartenenza di tali esemplari alla specie identificata su base morfologica. Le sequenze ottenute dai campioni della specie *L. litulon* hanno presentato omologia completa, se si escludono due basi

in due esemplari diversi. Inoltre, l'allineamento delle sequenze ottenute ha messo in evidenza un'omologia del 79% con le uniche due sequenze presenti in GeneBank relative alla specie considerata ed un'omologia compresa fra l'83 e l'87% con quelle della altre specie del Genere *Lophius*.

Infine, è stata ottenuta la sequenza completa del citocromo b mitocondriale della specie *Lophius gastrophysus*, ad oggi non ancora presente in database. Tutti i campioni appartenenti alla stessa specie hanno fornito il medesimo profilo di restrizione quando sottoposti a digestione con l'enzima BfaI confermando l'assenza di aplotipi a livello del sito di taglio. La tecnica utilizzata ha permesso di ottenere dei profili caratteristici e facilmente riconoscibili per ognuna delle 6 specie consentendo di identificare tutti i campioni analizzati in maniera univoca (fig. 1).

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Nell'ambito del comparto ittico, più di un terzo dei prodotti vengono commercializzati sotto forma di preparati. L'identificazione di specie costituisce un problema rilevante nell'ambito dell'accertamento ispettivo-annonario durante i controlli ufficiali, rappresentando, tuttavia, un elemento fondamentale anche in relazione alla normativa di tracciabilità (Reg. CE 2065/2001). Per questo motivo, nel corso degli anni sono state sviluppate metodiche basate sull'analisi di molecole target quali proteine e acidi nucleici capaci di permettere una sicura identificazione anche quei prodotti nei quali non sono più presenti caratteri morfologici distintivi. Il DNA mitocondriale, in relazione alle sue caratteristiche, è ormai riconosciuto come marker genetico utile ai fini del riconoscimento di specie (14). Nel presente la-

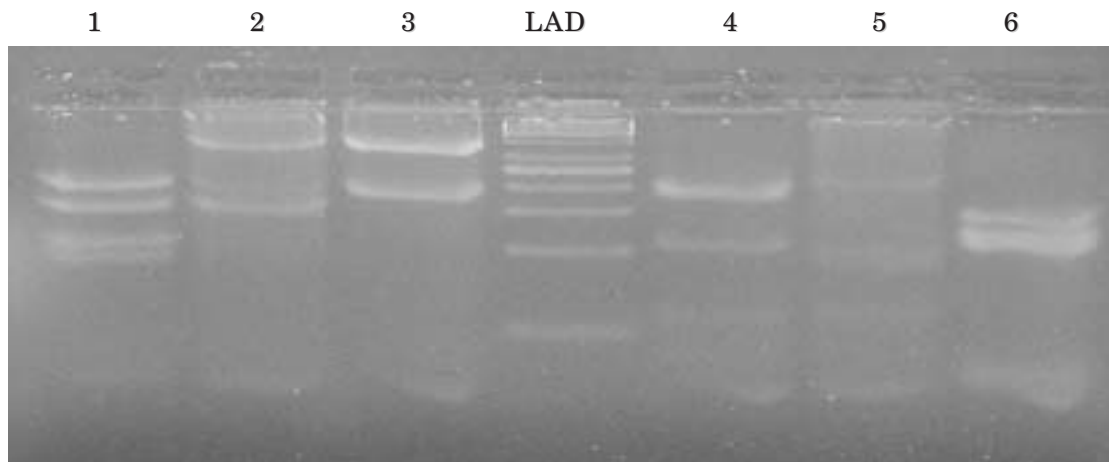


Figura 1

voro, il confronto delle sequenze ottenute utilizzando i primer da noi progettati ha permesso di confermare l'appartenenza alla specie identificata su base morfologica per gli esemplari di *L. piscatorius*, *L. budegassa* e *L. americanus*. Nel caso del *L. litulon*, la bassa omologia riscontrata con le uniche due sequenze depositate (15) e l'elevata omologia con le altre specie del genere *Lophius* non è facilmente giustificabile. L'eventuale esistenza di aplotipi o specie diverse con le medesime caratteristiche morfologiche, derivanti dalla medesima zona di pesca FAO, anche se non escludibile a priori, sembrerebbe, però, un'ipotesi poco probabile, poiché implicherebbe una distanza filogenetica maggiore fra varietà o specie eventualmente coabitanti, piuttosto che fra specie provenienti da zone marine molto distanti fra loro. A supporto di questa osservazione, si rimanda alle sequenze depositate su Genbank da Espineira et al., (3), i quali, analizzando un altro gene mitocondriale (*COI*), hanno riscontrato omologie elevate (fino al 90%) fra la specie *L. litulon* e le altre del genere *Lophius*. Inoltre, l'analisi filogenetica delle specie in questione, effettuata con le sequenze di tutte le specie da noi ricavate e con le sequenze di altre famiglie di lofidi depositate su GenBank, produce un macro-raggruppamento che include le specie del genere *Lophius*, compresa la specie *L. litulon*, in base alla sequenza da noi ricavata. L'albero filogenetico così generato risulta molto simile a quello elaborato da Espineira et al. (3). Al contrario, la specie *L. litulon*, relativa alla sequenza depositata sul database, viene collocata al di fuori del gruppo *Lophius*. Da ultimo, l'amplificazione ed il sequenziamento del gene *COI* nei nostri campioni ha fornito sequenze identiche a quelle di Espineira et al. (3). In ogni caso, l'ap-

plicazione della tecnica RFLP alle sequenze depositate da Miya et al. (15) genererebbe un pattern diverso e riconoscibile.

Concludendo, l'analisi ed il confronto delle sequenze ottenute ci ha permesso di mettere in evidenza la presenza di polimorfismi caratteristici per ogni singola specie, utilizzando il solo enzima di restrizione *BfaI*, consentendoci di sviluppare una tecnica bio-molecolare (PCR-RFLP) per l'identificazione delle sei specie di *Lophius* che attualmente posseggono una denominazione commerciale ai sensi del D.M. 31 gennaio 2008 e successive modifiche.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Farina A.C., Azevedo M., Landa J. Duarte R, Sampedro P. Costas G., Torres M. A. and Canas L., (2008). *Lophius* in the world: a synthesis on the common features and life strategies. *International Council for the Exploration of the Sea*, 65 (7), 1272-1280.
- 2) Afonso-Dias I.P., Hislop J.R.G. (1996). The reproduction of anglerfish *Lophius piscatorius* Linnaeus from the north west coast of Scotland. *The Fishery Society of the British Isles*, 49 (Supplement A), 18-39.
- 3) Espineira M., Gonzales N., Vieites J. M. and Santaclara F. J., (2008). Authentication of Anglerfish species (*Lophius* spp.) by means of polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism and forensically informative nucleotide sequencing methodologies”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (22), 10594-10599.
- 4) Maartens L., Booth A.J, Hecht T. (1999). The growth of monkfish *Lophius vomerinus* in Namibian waters, with a comparison of otolith and illicia methods of ageing. *Fisheries Research*, 44, 139-148.
- 5) Chikarmane H.M., Kuzirian A.M., Kozlowski R., Kuzirian M. and Lee T., (2000). Population Genetic Structure of the Goosefish, *Lophius americanus*. *The Biological Bulletin*, 199, 227–228.
- 6) Ramella M.S., Kroth M.A., Tagliari C. and Arisi A. C. M., (2005). Optimization of random amplified polymorphic DNA protocol for molecular identification of *Lophius gastrophysus*. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 733-735.
- 7) Perez J.A.A., Pezzato P.R., Andrade H.A. (2005). Bio-mass assessment of the monkfish *Lophius gastrophysus* by a new deep-water fishery in southern Brazil. *Fisheries research*, 72, 149-162.
- 8) Decreto 31 gennaio 2008 del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, dal titolo “Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale – Modifiche ed integrazioni dell’elenco di cui al decreto 25 luglio 2005” GU n. 45 del 22 Febbraio 2008.
- 9) Integrazioni all’elenco del Decreto 31 gennaio 2008 del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, dal titolo delle “Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale – Modifiche ed integrazioni dell’elenco di cui al decreto 25 luglio 2005”. GU n. 181 del 5 Agosto 2008.
- 10) Nishiguchi M.K., Doukakis P., Egan M. Egan M., Kizirian D., Phillips A., Prendini L., Rosenbaum h. C., Torres E., Wyner Y., DeSalle R. and Giribet G., (2002). DNA Isolation Procedures, Methods and Tools in Biosciences and Medicine Techniques in molecular systematics and evolution, ed. by Rob DeSalle et al., Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. pp. 268-269.
- 11) Armani A., Pepe T., Castigliero L., Guidi A., Gandini G., Manzoni P. e Gianfaldoni D., (2008). Sequenziamento del citocromo b mitocondriale di *Lophius vomerinus* (Valenciennes, 1837). *Atti XVIII Convegno AIVI*, 56-60.
- 12) Sevilla Rafael G, Diez Amalia, Noren Michael *et al.* (2007). Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Notes*, 7, 730-734.
- 13) <http://tools.neb.com/REBSites/index.php>
- 14) Sanjuan A., Raposo-Guillan J. and Comesana A. S, (2002). Genetic Identification of *Lophius budegassa* and *L. piscatorius* by PCR-RFLP Analysis of a Mitochondrial tRNA^{Glu}/Cytochrome b Segment. *Food Chemistry and Toxicology*, 67 (7), 2644-2648.
- 15) Miya M., Takeshima H., Endo H., Ishiguro N.B., Inoue J.G., Mukai T., Satoh T.P., Yamaguchi M., Kawaguchi A., Mabuchi K., Shirai S.M. and Nishida M. (2003). Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics Evolution* 26 (1), 121-138.