

VALUTAZIONE DI MARKER GENETICI PER IDENTIFICAZIONE DEI PESCI

Evaluation of DNA markers for fish identification

Riina Maria Vittoria¹, Gilli Maurizio², Costa Rino², Colussi Silvia¹, Bertuzzi Simone¹, Trisorio Silvia¹, Gili Stefano², Perazzini Alice Zaira¹, Pezzolato Marzia¹, Richelmi Guia¹, Bozzetta Elena¹, Acutis Pier Luigi^{1*}

*Corresponding author. Tel: (+39) 011 2686324; Fax: (+39) 011 2686322. E-mail: pierluigi.acutis@izsto.it

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, Italia.

²ASL TO 1, Torino, Italia.

ABSTRACT

Species substitution is a common commercial fraud, mainly applied to fish species. It is thus important to have analytical methods for species identification. DNA analysis can be a suitable technique: some mitochondrial genes are actually recognized as valuable markers for species discrimination. Aim of this work was thus to evaluate the capability of *cytb* and *COI* genes to discriminate the species of fish (n=89) which are commonly substituted. In the last four years of activity on field, the laboratory analysed, using the FINS method (Forensically Informative Nucleotide Sequencing), 146 samples, belonging to several fish species, sent by veterinary officers in the frame of their activities of control: in this work, results about number and kind of fraud are reported. Additionally, samples directly purchased by the lab were examined. The obtained results showed that the genetic markers have a high discriminatory power and that the method is highly suitable. The frequent detection of species substitution in the samples collected on field showed the importance of controlling this kind of frauds in the fish market.

Keywords: Forensics, Genetics, Species identification, Fish, Cytochrome.

INTRODUZIONE

Nell'ambito degli alimenti di origine animale le frodi possono essere di tipo sanitario o commerciale: in questo ultimo caso una possibile frode è costituita dalla sostituzione di specie, ossia dalla vendita di carni o prodotti di origine animale derivati da specie diverse da quelle dichiarate. Questo tipo di frode viene soprattutto messa in atto nella vendita di pesci, molluschi e crostacei. Il danno per il consumatore si può tradurre nell'acquisto di una specie di valore commerciale inferiore, nel consumo di una specie di valore nutrizionale inferiore a quella dichiarata, fino al rischio per la salute, a causa della possibilità di incorrere in contaminanti chimici, tossinfezioni o intossicazioni. In questo contesto diventa importante avere a disposizione metodi di laboratorio per l'identificazione di specie che siano di valido supporto alle autorità competenti, nel caso in cui il riconoscimento morfologico sia dubbio o non applicabile, fornendo risultati accurati e accompagnati da garanzie tali da permettere l'uso anche in sede legale. I metodi di identificazione biochimici, come l'isoelettrofocaliz-

zazione, non riescono sempre a fornire risposte certe, soprattutto in caso di prodotti sottoposti a trattamento termico. Il DNA è invece una molecola più stabile delle proteine e permette una classificazione più precisa, basata sul fatto che specie diverse presentano una sequenza nucleotidica diversa per alcuni geni. In particolare i geni dei citocromi presenti nel DNA mitocondriale sono riconosciuti come marker molto utili per la distinzione di specie, anche filogeneticamente molto vicine non discriminabili, con metodi biochimici. Il DNA mitocondriale si presenta in abbondante numero di copie e, la sequenza dei geni dei citocromi, che sia informativa ai fini dell'identificazione di specie, può essere relativamente corta, (da circa 100bp a circa 600bp, a seconda dei casi), tanto da rendere possibile lo studio di campioni in cattivo stato di conservazione o con DNA frammentato a causa della lavorazione (trattamento termico). Inoltre, pur presentando sequenze diverse nelle diverse specie, questi marcatori genetici possiedono zone altamente conservate nei diversi *taxa* animali, consentendo l'uso di primer universali e la conseguente possibilità di identificare anche specie

nuove o poco conosciute. Le sequenze dei geni del citocromo b (*cytb*) e della citocromo ossidasi sub unità 1 (*COI*) sono state determinate ormai per molte specie ed è quindi presente un ampio database da utilizzare come riferimento. Tuttavia, il numero di sequenze per ogni specie presente nel database non sempre è tale da permettere una valutazione della variabilità intra e interspecifica e del conseguente potere discriminatorio dei marker. Inoltre, il *cytb* e il *COI*, usati originariamente per studi di filogenesi, richiedono una validazione mirata se applicati al controllo delle frodi alimentari, che tenga conto anche delle problematiche legate alla tipologia delle matrici da analizzare (Branicki *et al.*, 2003; Dawney *et al.*, 2007).

Obiettivo del presente lavoro è stato valutare la capacità dei geni *cytb* e *COI* di discriminare le specie ittiche più probabili oggetto di frode, determinando prestazioni e limiti di applicazione del metodo analitico. Sono inoltre riportati i risultati degli ultimi quattro anni di attività, relativamente a numero e tipologia di frodi riscontrate.

MATERIALI E METODI

Validazione del metodo

Sono stati raccolti 206 campioni appartenenti a 89 diverse specie (56 specie di pesci di mare, 6 di molluschi eduli lamellibranchi, 13 di cefalopodi, 7 di crostacei, 7 di pesci d'acqua dolce). Per le specie più diffuse sono stati campionati più esemplari di provenienza geografica diversa (da 2 a 13 campioni), mentre per le rimanenti specie, meno comuni e note, si è campionato un solo esemplare, al fine di inserirne la sequenza genica nel database del laboratorio. I campioni erano in maggior parte allo stato fresco (n=12), mentre 62 erano congelati o decongelati, 3 sott'olio, 6 affumicati, 3 sotto sale e 21 sottoposti ad altri tipi di lavorazioni.

È stato adottato il metodo FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing), costituito da quattro passaggi: estrazione di DNA; amplificazione mediante reazione di PCR del marcatore genetico (Verma *et al.*, 2003; Dawney *et al.*, 2007); sequenziamento della porzione nucleotidica amplificata; analisi filogenetica, confrontando la sequenza ottenuta con quelle depositate nel database pubblico e valutando la significatività statistica dell'albero filogenetico mediante bootstrap test (Terol *et al.*, 2002).

Applicazione del metodo sul territorio

Negli ultimi 4 anni sono stati analizzati con il metodo sopra descritto campioni inviati al laboratorio dai veterinari ufficiali delle regioni Piemonte e Liguria, in quanto sospetti oggetto di frode (n=146, di cui 66 freschi, 61 congelati, 9 decongelati, 2 sott'olio, 5 cotti, uno essiccato, uno sotto sale e uno affumicato). Il laboratorio nel biennio 2011/2012 ha inoltre esaminato 22 campioni di pesci acqui-

stati presso un grande mercato cittadino e 13 campioni di pesci destinati alla somministrazione come sushi e sashimi.

RISULTATI

Validazione del metodo

Tutti i 206 campioni sono stati correttamente identificati e sia il *cytb* sia il *COI* hanno mostrato un buon potere discriminatorio, con una specificità del 100% per almeno uno dei due marcatori e con valori di similarità con le sequenze di riferimento $\geq 98\%$. La variabilità intraspecifica è risultata sempre inferiore al 3% e le analisi filogenetiche hanno sempre mostrato una netta separazione tra specie diverse e corretti raggruppamenti tra individui della stessa specie, con valori di bootstrap altamente significativi. La sequenza di *cytb* di *Acanthistius brasiliensis* e quelle di *COI* di *Octopus maya*, *Pagellus erythrinus*, *Pagellus bellottii* e *Pagrus caeruleosticus* non risultavano presenti nei database pubblici e sono quindi state depositate in GenBank.

Relativamente alle matrici studiate, non si sono rilevate differenze tra fresco, congelato, cotto, affumicato e sotto sale. Per l'analisi del tonno sott'olio, come atteso, è stato necessario un protocollo *ad hoc* che prevede una pre-estrazione, partendo da una quantità maggiore di materiale, e una PCR con primer specifici in grado di amplificare frammenti di DNA molto corti (Michellini *et al.*, 2007).

Applicazione del metodo sul territorio

I campioni analizzati negli ultimi quattro anni di attività, inviati dai veterinari ufficiali, e il numero di non conformità rilevate sono illustrati nella Figura 1. Il numero di frodi sul totale dei campioni analizzati è passato dal 10% del 2009, al 16,7% nel 2010, al 40,3% nel 2011 fino al 21,7% nei primi sei mesi del 2012. Nella Tabella 1 sono riportati gli stessi campioni suddivisi per specie di appartenenza.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Entrambi i marcatori genetici studiati si sono rivelati adatti per l'identificazione di specie ai fini del rilevamento di frodi alimentari. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il metodo è affidabile e accurato e quindi oggi il laboratorio sta fornendo di routine il servizio di identificazione di specie ai veterinari pubblici della regione per indagini ufficiali, emettendo rapporti di prova corredati di marchio ACCREDIA, essenziale per un eventuale utilizzo in sede legale.

Lo studio, come ricaduta collaterale, ha permesso di ampliare i database pubblici, in quanto sono state depositate sequenze di specie in essi non ancora presenti.

L'elevato potere discriminatorio del metodo, in

grado di fornire nella quasi totalità dei casi sottoposti al laboratorio un risultato certo e oggettivo, ha incoraggiato un progressivo incremento di campioni inviati dai veterinari ufficiali nel corso degli anni, fatto che attesta anche l'entità dell'esigenza presente sul territorio relativamente a questo tipo di controlli. La percentuale non trascurabile di non conformità riscontrate, sia nei campioni sospetti inviati dai veterinari delle ASL, sia nei campioni prelevati casualmente ai punti vendita, mostra l'importanza di controllare le frodi di sostituzione di specie nel settore ittico.

BIBLIOGRAFIA

1. Branicki W., Kupiec T., Pawlowski R. 2003. Validation of *Cytochrome b* Sequence Analysis as a Method of Species Identification. *J. Forensic Sci.* 48:83-87.
2. Dawnay N., Ogden R., McEwing R., Carvalho G.R., Thorpe R.S. 2007. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Sci. Int.* 173:1-6.
3. Michelini E., Cevenini L., Mezzanotte L., Simononi P., Baraldini M., De Laude L., Roda A. 2007. One-step triplex-polymerase chain reaction assay for the authentication of yellowfin (*Thunnus albacores*), bigeye (*Thunnus obesus*), and skipjack (*Katsuwonus pelamis*) tuna DNA from fresh, frozen, and canned tuna samples. *J. Agr. Food Chem.* 55:7638-7647.
4. Regolamento (CE) n. 640/2010 del 7 luglio 2010 che istituisce un programma di documentazione delle catture di tonno rosso (*Thunnus thynnus*) e modifica il regolamento (CE) n. 1984/2003 del Consiglio. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, L 194 del 24.07.2010.
5. Terol J., Mascarell R., Fernandez-Pedrosa V., Pérez-Alonso M. 2002. Statistical Validation of the Identification of Tuna Species: Bootstrap Analysis of Mitochondrial DNA Sequences. *J. Agr. Food Chem.* 50:963-969.
6. Verma S.K., Singh L. 2003. Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application. *Mol. Ecol. Notes* 3:28-31.

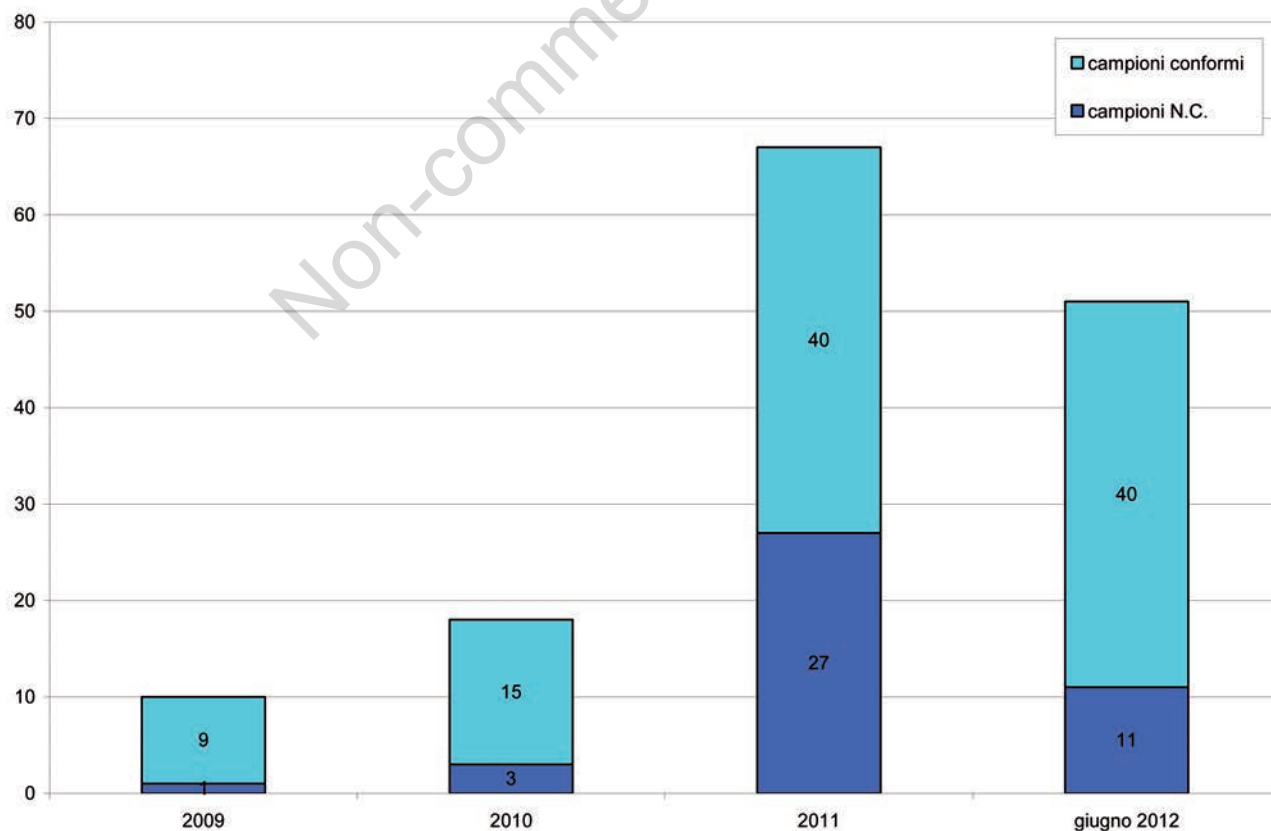


Figura 1. Campioni inviati dai veterinari ufficiali (periodo: 2009 - giugno 2012) analizzati dal laboratorio di genetica dell'IZS Torino e numero di non conformità rilevate.

Tabella 1. Campioni inviati dai veterinari ufficiali (periodo: 2009 - giugno 2012) analizzati dal laboratorio di genetica dell'IZS Torino suddivisi per specie di appartenenza. Per ogni specie si riporta numero totale di campioni, tipologia di matrice e non conformità in termini di specie non corrispondente a quella dichiarata.

Specie dichiarata	n°	Tipologia	Non conformità
<i>Acanthistius brasiliensis</i>	3	congelato	n° 1 <i>Pangasius</i> spp.
<i>Anabas testudines</i>	1	congelato	
<i>Arnoglossus laterna</i>	1	congelato	n° 1 <i>Citharus linguatula</i>
<i>Boops boops</i>	1	congelato	
<i>Chelidonichthys</i> spp.	1	fresco	n° 1 <i>Pangasius</i> spp.
	1	decongelato	n° 1 <i>Pangasius</i> spp.
<i>Chelidonichthys obscurus</i>	1	congelato	
<i>Chelon labrosus</i>	1	congelato	
<i>Conger</i> spp.	1	congelato	
<i>Coryphaena hippurus</i>	1	congelato	n° 1 <i>Seriola quinqueradiata</i>
<i>Dentex dentex</i>	1	fresco	n° 1 <i>Dentex gibbosus</i>
<i>Gadus morhua</i>	1	sotto sale	
	6	fresco	
	1	congelato	n° 1 <i>Melanogrammus aeglefinus</i>
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	3	congelato	n° 1 <i>Psettodes erumei</i> n° 2 <i>Atheresthes stomias</i>
<i>Isurus oxyrhynchus</i>	1	fresco	
<i>Katsuwonus pelamis</i>	1	sott'olio	
	1	fresco	
<i>Lithognathus moryrus</i>	1	congelato	
<i>Liza aurata</i>	1	congelato	
	1	affumicato	
<i>Liza ramado</i>	2	congelato	
<i>Liza saliens</i>	1	congelato	
<i>Lophius piscatorius</i>	2	congelato	
<i>Macrobanchium</i> spp.	1	essiccato	
<i>Merluccius hubbsi</i>	1	congelato	n° 1 <i>Merluccius productus</i>
<i>Merluccius merluccius</i>	3	cotto	n° 1 <i>Theragra</i> spp. n° 1 <i>Theragra chalcogramma</i>
	1	congelato	
<i>Micromesistius poutassou</i>	1	congelato	
<i>Mola mola</i>	2	fresco	
<i>Mustelus mustelus</i>	2	fresco	n° 1 <i>Squalus acanthias</i> n° 1 <i>Scyliorhinus canicula</i>
<i>Octopus maya</i>	1	decongelato	
<i>Octopus vulgaris</i>	5	decongelato	n° 2 <i>Octopus maya</i> n° 1 <i>Octopus aegina</i>
	2	fresco	
<i>Oreochromis niloticus</i>	1	congelato	
<i>Pagellus bellottii</i>	1	congelato	n° 1 <i>Pagrus caeruleostictus</i>
<i>Pagrus pagrus</i>	5	congelato	n° 2 <i>Pagellus bellottii</i> n° 3 <i>Pagellus erythrinus</i>
<i>Pangasius</i> spp.	1	congelato	
	2	decongelato	
<i>Penaeus vannamei</i>	2	fresco	
<i>Perca fluviatilis</i>	3	fresco	n° 3 <i>Lates niloticus</i>

continua nella pagina seguente

segue dalla pagina precedente

Specie dichiarata	n°	Tipologia	Non conformità
<i>Phycis blennoides</i>	1	congelato	
<i>Pleuronectes platessa</i>	8	fresco	
	3	congelato	n° 3 <i>Gadus morhua</i>
<i>Psetta maxima</i>	1	congelato	
<i>Salmo salar</i>	1	congelato	
	6	fresco	
<i>Sarda sarda</i>	1	fresco	
<i>Sardina pilchardus</i>	1	fresco	
	1	congelato	n° 1 <i>Encrasicholina devisi</i>
<i>Scomber scombrus</i>	1	congelato	
<i>Solea vulgaris</i>	1	congelato	
<i>Sparus aurata</i>	1	cotto	
<i>Sphyraena sphyraena</i>	3	fresco	
<i>Spondyliosoma cantharus</i>	1	congelato	
<i>Tenualosa ilisha</i>	1	congelato	
<i>Thunnus alalunga</i>	2	fresco	
<i>Thunnus albacares</i>	15	fresco	n° 2 <i>Thunnus thynnus</i> n° 1 <i>Thunnus obesus</i> n° 1 <i>Xiphias gladius</i>
	5	congelato	
<i>Thunnus obesus</i>	2	congelato	
<i>Thunnus spp.</i>	1	sott'olio	
	6	fresco	n° 5 <i>Thunnus thynnus</i> * n° 1 <i>Katsuwonus pelamis</i>
<i>Thunnus thynnus</i>	1	congelato	n° 1 <i>Thunnus obesus</i>
<i>Torpedo marmorata</i>	1	congelato	
<i>Trygla lyra</i>	1	congelato	
<i>Xiphias gladius</i>	1	cotto	
	3	fresco	
	8	congelato	

*Sono state considerate non conformità secondo il Reg. (CE) N. 640/2010 che istituisce un programma di documentazione delle catture di tonno rosso *Thunnus thynnus*.

Nel gruppo di campioni acquistati al mercato cittadino e di quelli somministrati come sushi/sashimi sono state rilevate rispettivamente 4 e 1 non conformità.