

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**

**Dottorato di ricerca in
Scienze e Tecnologie delle Produzioni Agroalimentari
XX ciclo – 2004/2007**

Dipartimento di Scienze del Suolo, delle Piante,
dell’Ambiente, e delle Produzioni Animali

TESI DI DOTTORATO

*Analisi della variabilità del gene Sarcoplasmic
Endoplasmic Reticulum (SERCA1) Ca^{++} ATPase
codificante una ATPasi calcio dipendente del reticolo
sarcoplasmatico,
in *Xiphias gladius* e in *Makaira nigricans**

Dott.ssa Letizia Colimoro

Relatore:
Prof. Luigi Ramunno

Coordinatore:
Prof. Salvatore Spagnamusso

INDICE

| | |
|---|----|
| 1.Introduzione..... | 3 |
| 1.1 Proteine..... | 5 |
| 1.1.2. Lipidi..... | 7 |
| 1.1.3. Glucidi..... | 10 |
| 1.1.4. Sali minerali..... | 11 |
| 1.1.5 Composti azotati non proteici..... | 11 |
| 1.1.6. Vitamine..... | 12 |
| 1.2. Frode alimentare..... | 13 |
| 1.2.1. Frode commerciale di sostituzione: <i>Makaira nigricans</i> (blue marlin) per (<i>Xiphias gladius</i>) pesce spada..... | 17 |
| 1.2.2. Caratteristiche morfologiche di <i>Xiphias gladius</i> | 21 |
| 1.2.3. Caratteristiche morfologiche di <i>Makaira nigricans</i> | 22 |
| 1.3. Etichettatura dei prodotti ittici..... | 23 |
| 1.4. Rintracciabilità di filiera..... | 32 |
| 1.4.1. Analisi delle proteine..... | 33 |
| 1.4.2. Analisi morfologica..... | 33 |
| 1.4.3. Analisi del DNA..... | 33 |
| 1.5. Metodiche analitiche a confronto..... | 34 |
| 1.5.1 Isoelettrofocalizzazione (IEF) verticale..... | 34 |
| 1.5.2. Tecniche di Genetica Molecolare..... | 36 |
| 1.6. Trasportatore di membrana..... | 40 |
| 1.7. Contrazione muscolare..... | 42 |
| 1.8. Struttura della pompa del calcio..... | 47 |
| 1.9. Gene Serca1..... | 50 |
| 2. Obiettivo..... | 54 |

| | |
|--|----|
| 3. Materiali e metodi..... | 55 |
| 3.1. Preparazione dei campioni di DNA..... | 55 |
| 3.2. Disegno dei primer..... | 56 |
| 3.3. Amplificazione del DNA mediante PCR | 58 |
| 3.4. Purificazione e concentrazione dei prodotti di PCR..... | 59 |
| 3.5. Sequenziamento dei frammenti amplificati..... | 60 |
| 4. Risultati e Discussioni..... | 61 |
| 4.1 Analisi dei prodotti di amplificazione tra <i>Xiphias gladius</i> e <i>Makaira nigricans</i> | 62 |
| 4.2. Preliminare analisi strutturale del gene SERCA1 in <i>Xiphias gladius</i> | 65 |
| 4.2.1. Analisi delle regioni esoniche..... | 66 |
| 4.2.2. Analisi delle regioni introniche..... | 71 |
| 4.3. Preliminare analisi strutturale del gene SERCA1 in <i>Makaira nigricans</i> | 73 |
| 4.3.1. Analisi delle regioni esoniche..... | 73 |
| 4.3.2. Analisi delle regioni introniche..... | 75 |
| 4.4. Messa a punto di metodiche per la rintracciabilità di <i>Xiphias gladius</i> in prodotti alimentari..... | 76 |
| 5. Conclusioni..... | 79 |
| 6. Bibliografia..... | 82 |

1.INTRODUZIONE

Con la denominazione di “prodotto ittico” si intende tutto ciò che viene fornito dall’industria della pesca. Sono compresi animali marini o di acqua dolce quali: pesci, molluschi, crostacei, tunicati, echinodermi e mammiferi (*INRAN - Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione*).

La popolarità dei prodotti ittici tra i consumatori è aumentata in questi ultimi anni. In Italia, in particolare, si stima che negli ultimi dieci anni il consumo pro capite sia quasi raddoppiato. Secondo alcuni dati forniti dall’ISMEA, il 20% delle famiglie italiane consuma ogni anno 51,5 kg di pesce, mentre il 20% della popolazione lo acquista una volta al mese (ISMEA, 2006).

Tra le cause di tale incremento è importante citare l’aumento delle importazioni dai Paesi terzi, l’aumento delle produzioni nazionali e, soprattutto, l’estendersi della pratica dell’acquacoltura, con l’effetto positivo sui prezzi al consumo. Bisogna inoltre sottolineare che l’aumento dei consumi è stato favorito, anche e soprattutto, da un miglioramento della qualità e della freschezza dei prodotti a livello di commercializzazione, oltre che dalla convinzione che le carni dei prodotti ittici siano più magre e digeribili rispetto alle carni di consumo tradizionale. Infatti tali alimenti sono proposti in tutte le diete.

L'importanza di una corretta alimentazione per una buona conservazione dello stato di salute è stata comprovata da tempo da numerosi studi epidemiologici.

L'attuale dieta occidentale è caratterizzata da un aumento del consumo in grassi e in particolare di acidi grassi saturi, acidi grassi trans, acidi grassi essenziali n-6 e da una diminuzione di acidi grassi n-3, con gravi rischi di insorgenza di malattie cardiovascolari, ipercolesterolemie, dislipidemie (*Lall e Parazo, 1995*).

Le direttive delle Società scientifiche internazionali, dell'American Cancer Society in particolare, suggeriscono un corretto comportamento alimentare che svolga un'azione preventiva che si basa su:

- diminuzione delle calorie totali;
- diminuzione del consumo di grassi saturi e del colesterolo;
- aumento dell'assunzione degli acidi grassi essenziali n-3;
- aumento del consumo di vegetali e frutta che contengono sostanze antiossidanti e fibra;
- limitato consumo di alcool;
- sostituzione di carni rosse con pesce.

I prodotti ittici sono estremamente importanti nell'alimentazione dell'uomo in quanto possono costituire una valida alternativa al consumo della carne di altre specie animali, quali bovino e pollo, o di altri cibi come uova e formaggi, possedendo un elevato valore nutrizionale determinato dalla composizione chimica e dalla digeribilità dei nutrienti costitutivi (*Tibaldiet al, 2001*).

La composizione chimica del pesce non si discosta molto da quella degli animali terrestri. Il maggiore componente è l'acqua che oscilla tra i 60 e gli 80 g ogni 100 g, mentre il contenuto in proteine varia a seconda delle specie da 15 a 23 g per 100 g; tali proteine sono di elevata qualità, paragonabile a quella di altre carni.

I prodotti ittici sono caratterizzati da una composizione in grassi ricca di composti insaturi, capaci di migliorare la fluidità del sangue e di contribuire, insieme ad una dieta equilibrata, a prevenire le malattie cardiovascolari. (Albert et al, 1998).

Il contenuto in grassi si può diversificare notevolmente tra le diverse specie con quantità oscillanti da 0.8 g per 100 g (ad es. nel nasello) fino ad un contenuto di 20 g per 100g (ad es. nello sgombro) (Tibaldi et al, 2001).

Non esiste differenza significativa tra gli acidi grassi di crostacei, molluschi e pesci di mare o di acque dolci.

Tuttavia, la loro composizione è spesso caratteristica della specie (tabella 1) e, inoltre, può essere influenzata anche dalla dieta, dal periodo di cattura e dalle condizioni dell'ecosistema. Pesci pescati in ambiente naturale contengono una frazione insatura nettamente superiore a quella di pesci allevati. Le cause di queste differenze sono molteplici. Il regime alimentare spesso forzato, l'ambiente confinato, la temperatura dell'acqua e i cicli stagionali possono influenzare e incrementare il grado di insaturazione e la lunghezza degli acidi grassi. In mare proprio la temperatura dell'acqua, influenzando il tipo di acidi grassi dei crostacei

planctonici, caratterizza il grado di in saturazione dei grassi di tutti gli animali della catena alimentare (Tibaldi *et al*, 2001).

Tabella 1.

| Specie | Acqua g | Proteine g | Lipidi g | Minerali g | Kj | Vit.A µg | Vit.D µg | Vit.B1 µg |
|----------------|------------|---------------|-------------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|
| Aringa | 65.3 | 18.2 | 14.90 | 1.27 | 972 | 38 | 31 | 40 |
| Sgombro | 68 | 18.7 | 11.90 | 1.40 | 817 | 100 | 1 | 130 |
| Sardina | 73.8 | 19.4 | 5.18 | 1.62 | 563 | 20 | 7.65 | 20 |
| Platessa | 80.7 | 17.1 | 0.80 | 1.40 | 347 | - | - | 210 |
| Pesce Spada | 74.5 | 19.4 | 4.40 | 1.40 | 532 | 20 | - | 50 |
| Merluzzo | 80,8 | 17,2 | 0,85 | 1,07 | 350 | - | - | 100 |
| Sogliola | 80 | 17,5 | 1,37 | 1,06 | 377 | tracce | - | 60 |
| Tonno | 61,5 | 21,5 | 15,5 | 1,10 | 1012 | 450 | 5,38 | 160 |

Tabella 1: Composizione nutrizionale per 100 g di parte edibile (tabella Ist.Naz.Nutr. 1989)

1.1 PROTEINE

Le proteine nel muscolo sono rappresentate dalla miosina, actina, frazione albuminica del miogeno, alcune globuline ed una serie di enzimi legati all'attività metabolica del tessuto. Il valore nutritivo delle proteine muscolari è legato alla composizione amminoacidica, soprattutto in riferimento agli amminoacidi essenziali. La carne di pesce presenta un quadro simile alla carne di altre specie animali, tuttavia è riscontrabile un maggior contenuto in lisina, istidina ed arginina e solo raramente carenze di metionina e triptofano (*Tibaldi et al, 2001*). Le proteine nelle diverse specie di pesci, non subiscono apprezzabili variazioni in relazione alle condizioni ambientali o agli stati fisiologici, ma si possono osservare modeste variazioni durante il periodo riproduttivo (*Bernardi, 2003*).

Oltre alla relativa solubilità delle proteine vi sono altri fattori che rendono facilmente digeribile la carne di pesce, come l'elevata percentuale di aminoacidi liberi e il basso contenuto di tessuto connettivo interfibrillare.

Nei pesci, le proteine muscolari si suddividono (come negli animali a sangue caldo) in (*Orecchio e Joseffini, 2000*) :

- **proteine miofibrillari:** miosina (il 60% di tutte le proteine muscolari), actina (il 22% del totale), tropomiosina e troponina. Sono queste le molecole che, stando alla base dei fenomeni di contrazione muscolare, determinano la comparsa del rigor - mortis (rigidità postmortale) nei pesci, uno dei principali caratteri di freschezza che si valutano nel pescato fresco.

- **Proteine sarcoplasmatiche:** presenti nel citoplasma delle fibrocellule muscolari. Sono costituite da una serie di enzimi e dalla mioglobina, il pigmento rosso analogo all'emoglobina del sangue che determina il colore più o meno rosso o rosato delle masse muscolari.
- **Proteine del tessuto connettivo:** collagene, elastina. Sono molecole di una certa rigidità e consistenza; difficilmente vengono attaccate dagli enzimi muscolari della frollatura. La percentuale di tessuto connettivo (rigido) che si riscontra nelle masse muscolari dei pesci è decisamente più bassa di quella che si registra, invece, nei muscoli dei mammiferi per cui risultano costituzionalmente più tenere, indipendentemente dai fenomeni di frollatura che infatti nei pesci non hanno certo quell'importanza che hanno per i mammiferi. Inoltre, le carni dei pesci risultano comunque più tenere delle altre perché le proteine in esse presenti hanno una struttura molecolare meno "addensata" rispetto a quella dei mammiferi.

Da ciò consegue che:

- Le carni dei pesci sono già costituzionalmente più tenere di quelle dei mammiferi e degli stessi volatili da reddito (**fattore favorevole**).
- Per contro, le stesse carni sono più facilmente esposte alla penetrazione di batteri dagli strati più esterni a quelli più interni (**fattore sfavorevole**).

Le carni dei pesci sono, in genere, di colore rosa pallido. Soltanto in alcune specie ittiche (come il tonno) le masse muscolari hanno un colore

decisamente più rosso scuro. Nei pesci con carni chiare esistono, tuttavia, gruppi di muscoli con colorito decisamente più scuro:

- **i muscoli sottocutanei** (sede di accumulo di grasso nei pesci allevati e grassi),
- **i muscoli cardinali** (quelli che decorrono dal torace fino alla coda lungo le linee mediane del corpo. Sono muscoli deputati al movimento delle pinne impari).

1.1.2 Lipidi

I grassi del pesce sono costituiti da esteri trigliceridi di acidi grassi, acidi grassi liberi, fosfolipidi, steroli legati alle vitamine liposolubili A e D (*Bernardi, 2003*).

Nei pesci possiamo distinguere due tipi di grassi:

- **di deposito**, che sono costituiti essenzialmente da trigliceridi
- **strutturali**, costituiti in genere da lipidi complessi (glicerofosfati) e dal colesterolo, che a rigore non è un vero e proprio lipide.

I grassi di deposito sono localizzati soprattutto nella regione della testa, nel sottocute, nella muscolatura ventrale (si pensi alla ventresca del tonno) e si accumulano nel peritoneo che avvolge i visceri addominali e nelle gonadi.

In generale, le carni più grasse in un pesce sono quelle delle porzioni più anteriori del ventre (*Orecchio e Joseffini, 2000*).

Nei prodotti della pesca il contenuto di grassi della parte edibile dell'animale può oscillare da circa lo 0,1% fino al 24-25% a seconda di vari fattori: la categoria di appartenenza (se pesce, mollusco o crostaceo), l'età del soggetto, il periodo dell'anno in cui si trova, le disponibilità alimentari delle acque in cui esso vive, le condizioni fisiologiche al momento della cattura (ad es., durante il periodo di riproduzione).

Si può accennare ad un'altra differenza significativa: com'è noto, i pesci si distinguono in pesci (*Orecchio e Joseffini, 2000*):

- **magri** (con meno del 3% di grassi nell'organismo): merluzzo;
- **semigrassi** (dal 3% all'8% di grassi): triglia, cefalo, dentice, trota;
- **grassi** (con contenuti di grassi > 8%): anguilla, sgombro.

Di regola, nei pesci magri, i lipidi dell'organismo tendono a concentrarsi nel fegato (si pensi all'olio di fegato di merluzzo), mentre in quelli semigrassi e grassi, oltre che nel fegato si rilevano veri e propri accumuli di tessuto adiposo diffusi (*Shevan e Smith, 1957*).

I lipidi dei pesci, inoltre, meritano alcune osservazioni integrative, per il significato che in questi ultimi anni hanno assunto sul piano nutrizionale.

Com'è risaputo, i nutrizionisti hanno scoperto che i grassi dei pesci sono in grado di contrastare, differentemente da quelli dei mammiferi, l'accumulo di colesterolo nel nostro sistema vascolare e di rallentare la formazione di "placche ateromatose" all'interno dei vasi sanguigni che possono alterare progressivamente

il regolare flusso emodinamico e formare, quindi, un presupposto per patologie cardiovascolari di intensità variabile. Si può andare dalla classica arteriosclerosi dei tronchi sovraortici degli anziani, con perdita parziale delle capacità intellettive, a forme mortali di insufficienza cardiaca o cerebrale .

I grassi presenti nei pesci, appaiono più utili per il nostro metabolismo che non quelli dei mammiferi perché i primi sono ricchi dei cosiddetti acidi grassi monoinsaturi e poliinsaturi, mentre i secondi sono formati essenzialmente da acidi grassi saturi, ritenuti più dannosi per il nostro sistema cardiocircolatorio .

In particolare, va notato che quelli a maggior contenuto di acidi grassi poliinsaturi (PUFA) sono i pesci di mare mentre i pesci di acqua dolce hanno una composizione lipidica che è intermedia fra quella dei primi e quella dei mammiferi terrestri da reddito.

Gli acidi grassi essenziali sono molecole di lipidi a 18 (o più) atomi di carbonio; i più studiati, al momento, sono gli acidi grassi che con terminologia ufficiale internazionale vengono definiti n - 3 o n - 6 e che nella terminologia italiana prendono anche nome di acidi grassi ω - 3 e ω -6. L'EPA (acido eicosapentaenoico) e il DHA (acido docosaesaenoico) sono particolari acidi grassi omega-3 che seppure in quantità modesta, si formano normalmente nell'organismo a partire dall'acido linolenico (*Lands, 2001*).

Gli acidi grassi essenziali svolgono due serie di funzioni:

 **Strutturale.**

In questo caso essi influenzano:

- ? la permeabilità delle membrane cellulari
- ? la fluidità delle stesse membrane
- ? la funzionalità delle membrane cellulari

 **Funzionale.**

In questo secondo caso, gli acidi grassi:

- ? deprimono i fenomeni di aggregazione delle piastrine, evitando la formazione di trombi,
- ? agiscono favorevolmente sulla pressione arteriosa,
- ? influenzano positivamente la funzionalità cardiaca.

1.1.3 Glucidi

Il contenuto in glucidi è inferiore a quello mediamente riscontrabile nel muscolo di mammiferi terrestri e sono contenuti nelle masse muscolari sottoforma di glicogeno. (*Orecchio e Joseffini, 2000*). Anche in questo caso la concentrazione varia a seconda del tessuto considerato, della specie, dell'età e delle condizioni nutritive dell'animale. La maggior parte dei pesci contiene solo tracce di carboidrati. Infatti subito dopo la morte non viene mai osservato in questi animali

un netto calo del pH, come avviene negli animali terrestri, dove la glicolisi anaerobica degrada il glicogeno presente e produce acido lattico, che abbassa il pH del muscolo.

1.1.4 Sali minerali

Le sostanze minerali sono presenti in buona quantità nei diversi tipi di pesce.. Importante in tutti i prodotti della pesca è il contenuto di iodio e di selenio(FAO, 2002): in genere 150 grammi di pesce forniscono questi due minerali in quantità sufficienti a soddisfare il fabbisogno giornaliero di un adulto (Larn, 1996). I crostacei e i molluschi sono molto ricchi di sodio e hanno un rapporto calcio/fosforo molto equilibrato.

1.1.5 Composti azotati non proteici

Derivano dai processi catabolici delle proteine ed hanno scarso valore nutrizionale ma contribuiscono a determinare sapore ed odore al prodotto ittico.

La frazione azotata non proteica è rappresentata da molecole di aminoacidi liberi (arginina, lisina, istidina), da creatina e creatinina, da dipeptidi (carnosina, anserina), da oligopeptidi, da urea, da ammoniaca, da ossido di trimetilammina (TMAO) (*Orecchio e Joseffini, 2000*). Come per i grassi la composizione della frazione non proteica varia da specie a specie e talvolta la loro composizione può caratterizzare la specie d'origine. (*Shevan e Smith, 1957*). I pesci a carni rosse, sia

di mare (sgomberidi) che di acque dolci, contengono alte concentrazioni di istidina, che influenza il loro sapore, ma le rende pericolose in caso di deterioramento microbico. Infatti, in queste carni è possibile riscontrare alti valori di istamina e di altre amine biogene, qualora gli animali non siano stati rapidamente sviscerati, congelati o refrigerati. Condizioni di abuso termico generano incrementi di microrganismi in grado di decarbossilare gli aminoacidi liberi.

L'ossido di trimetilamina, la cui funzione è ancora sconosciuta, è responsabile dell'odore tipico dei prodotti ittici di mare e viene degradato rapidamente in trimetilamina e dimetilamina per via enzimatica (Orecchio e Joseffini, 2000).

1.1.6 Vitamine

I prodotti ittici contengono discrete quantità di vitamina A e D nei grassi e nel fegato e vitamine del gruppo B (B_2 e B_6) e PP nei muscoli (Santosh P. Lall, 1995). La vitamina C sembra essere contenuta in alcune specie di ostriche (Lall e Parazo, 1995). Il contenuto di vitamine del pesce varia a seconda della specie considerata e nell'ambito della stessa specie a seconda del sesso, della stagione e dell'area geografica, della quantità e qualità della dieta. Molti pesci magri come il merluzzo, accumulano grandi quantità di vitamine liposolubili nel fegato ma non nella carne e se la composizione lipidica del pesce cambia in rapporto alla disponibilità di cibo, esiste comunque una correlazione inversa tra la potenza della vitamina A e la quantità di lipidi nel fegato. Sia la vitamina A che la D continuano ad essere accumulate nel fegato con il passare dell'età biologica. Durante la

maturazione sessuale si verifica la mobilitazione delle vitamine dai muscoli e da altri tessuti, soprattutto se la dieta è stata carente per determinate vitamine. I pesci selvatici mostrano differenze nella composizione delle vitamine idrosolubili durante la migrazione, la maturazione e quando il cibo è scarso, comunque queste differenze non sono così estreme come quelle delle vitamine liposolubili

1.2. Frode alimentare

Le preferenze dei consumatori sono note da sempre, ma possono variare sostanzialmente a seconda dell'origine geografica, motivazioni etnico religiose, ed economiche.

Si possono quindi creare preferenze per alimenti di una data regione, marca o tipo. Ciò nonostante la tendenza generale del consumatore rimane fissata su alimenti sicuri e genuini.

Le infrazioni che si riscontrano in campo agroalimentare attraverso i controlli ispettivi ed analitici sono in larga misura riconducibili ad inosservanze di alcuni obblighi imposti dalla normativa vigente in materia, complessa ed in continua evoluzione (*Malandra e Renon, 1998*).

Negli ultimi anni l'aumentato consumo di prodotti ittici in Italia rappresenta per i servizi veterinari uno sforzo notevole sia sul piano quantitativo che su quello professionale. Nel caso in cui esiste una realtà produttiva di pesca, il Servizio Veterinario deve assicurare l'ispezione dei prodotti pescati, anteriormente alla loro

prima commercializzazione, nei Mercati Ittici all'ingrosso e nelle aste pubbliche. Invece, l'attività di vigilanzache si esplica sui prodotti della pesca durante tutte le fasi della distribuzione commerciale e della somministrazione, ha carattere saltuario ed è imprevedibile, col fine di verificare la conformità dei prodotti, nonché il rispetto di tutte le norme previste(*Malandra e Renon, 1998*).

Alla figura del veterinario compete verificare la congruità e lo stato di commercializzazione dei prodotti ittici, conservati e preparati, freschi, refrigerati, congelati, inscatolati, per tutelare il delicato settore delle frodi, nonché riconoscere le specie poste in commercio, per salvaguardare il consumatore e collaborare, con Enti o figure professionali all'identificazione di specie ittiche, catturate in epoca di divieto, o con dimensioni non consentite, per non impoverire le risorse biologiche delle acque marine ed interne.

Le frodi alimentari vengono classificate secondo gli effetti esercitati sulla composizione e/o sugli aspetti esteriori dell'alimento in:

1. **Adulterazione:** variazione volontaria della naturale composizione dell'alimento senza peraltro effettuare aggiunta di altre sostanze (latte scremato e/o parzialmente scremato venduto come latte intero). Questa frode ha riflessi negativi sia commerciali che nutrizionali.
2. **Alterazione:** fenomeno solitamente accidentale che modifica la composizione chimica ed organolettica di un alimento (irrancidimento degli oli, filetti di pesce congelati alterati).

3. **Sofisticazione:** modifica volontaria della composizione naturale o legale di un alimento mediante l'aggiunta di una sostanza estranea (aggiunta di olio di semi agli oli di oliva, rinfresco dei molluschi bivalvi, non consentito, per simulare la freschezza del prodotto; aggiunta di sali dell'anidride solforosa in crostacei freschi ma soprattutto congelati, per mascherare l'aspetto e l'odore).
4. **Contraffazione:** sostituzione di un alimento con un altro di minor pregio ma che presenta caratteristiche macroscopiche molto affini (vendita di salmone di allevamento per salmone selvaggio).

Numerose risultano le irregolarità dannose per la salute. Un problema rilevante che si è manifestato negli ultimi anni è stata la presenza di antibiotici, in particolare cloramfenicolo e nitrofurani, in prodotti di provenienza asiatica, soprattutto gamberetti spesso in vendita nei reparti del congelato/surgelato delle pescherie della GDO (grande distribuzione organizzata). In Oriente si è sviluppata un'acquacoltura intensiva che, per soddisfare la congrua richiesta del mondo occidentale, ha causato lo sconvolgimento di alcuni ecosistemi costieri creando le condizioni per una più facile diffusione di malattie, che interessano solo il prodotto ittico, tra gli individui ammassati in spazi ristretti.

Altro problema è rappresentato dall'utilizzo di monossido di carbonio. In Indonesia, ad esempio, è lecito utilizzare tale gas per evitare l'imbrunimento dei pigmenti sanguigni dei muscoli nel tonno appena pescato, attribuendo così al prodotto un colore rosso vivo. Il monossido di carbonio, può rappresentare un rischio per il consumatore perché il colore può mascherare una eventuale perdita

di qualità. (*Mengoli, 2006*) Inoltre, sembra che il prodotto trattato non sviluppi odori apprezzabili tali da richiamare l'attenzione del consumatore e che sia causa di intossicazione istaminica, non mortale ma molto fastidiosa.

La notevole varietà dei prodotti della pesca costituisce uno dei presupposti principali delle frequenti frodi di sostituzione.

Secondo l'Autorità per la sicurezza alimentare inglese (FSA), il 15% dei venditori al dettaglio di pesce propone ai consumatori etichette ingannevoli e incomplete.

La situazione è altrettanto critica nei supermercati dove il 10-15% delle spigole e dei salmoni allevati viene presentato come “pescato in mare”.

La scorretta dichiarazione di specie può dare origine a problematiche molto importanti per quel che riguarda la salute dell'uomo e provocare conseguenze che possono risultare drammatiche.

Si pensi ad esempio alla sostituzione di bivalvi sgusciati precotti nostrani con bivalvi esotici, non sempre raccolti in aree controllate per la presenza di diossina; oppure alla sostituzione di filetti di pesce persico nostrano, o di cernia, con il persico del Nilo, più volte sottoposto a divieti commerciali per problemi igienico sanitari in quanto proveniente da zone caratterizzate da acque inquinate. (*Arcangel, 2005*).

La frode classica nel commercio è quella di sostituire una specie pregiata con un'altra meno costosa, questa sostituzione è detta semplice e avviene quando il

commerciante, fidando sull'ignoranza del cliente, spaccia in quanto simile o somigliante alla specie richiesta, una specie di minor valore.

1.2.1 Frode commerciale di sostituzione: *Makaira nigricans* (blue marlin) per *Xiphias gladius* (pesce spada)

La commercializzazione di prodotti ittici trasformati soprattutto per le specie ittiche di grossa mole, che per le loro dimensioni sarebbero scomode e antieconomiche da trattare allo stato naturale, risolve non pochi problemi ai commercianti e alle industrie dei prodotti della pesca introducendo però il problema del riconoscimento di specie (Bernardi et al, 2004).

Inoltre, numerose specie di basso pregio commerciale sono molto simili morfologicamente a specie di valore commerciale significativamente più alto. Questo spiega il costante aumento di prodotti commercializzati con etichettatura errata, involontaria o deliberata, e quindi di frodi commerciali

La frode di sostituzione tra *Xiphias gladius* (pesce spada) e *Makaira nigricans* (blue marlin), negli ultimi anni è diventata molto frequente per sopperire alla crescente domanda di pesce spada rispetto alla quantità disponibile (Renon et al, 2005).

Il valore commerciale di *Makaira nigricans* è inferiore a quello di *Xiphias gladius*, non per la qualità delle carni, ma perché specie sconosciuta sui nostri banchi di pesca e quindi per niente richiesta dal consumatore. In tabella 2 sono

riportati i prezzi di tranci di *Xiphias gladius* e di *Makaira nigricans* , freschi, congelati ed affumicati.

Tabella 2

| Specie | Prezzo (€/kg) | | | |
|--------------------------|---------------|-----------|------------|---------|
| | fresco | congelato | affumicato | Mercato |
| <i>Xiphias gladius</i> | 20-24 | 8-10 | 10.5-13 | Milano |
| <i>Makaira nigricans</i> | 10-11 | 4-5 | 5.2-6.5 | Milano |

Tabella 2: prezzo/kg di *Xiphias gladius* e *Makaira nigricans* presso il mercato ittico di Milano

Il consumo di *Xiphias gladius* rapportato a quello complessivo nazionale di pesce fresco è pari al 4,9 %, con livelli ancora superiori in Lombardia dove è il più venduto dopo le alici. La ristorazione commerciale italiana, solo tra l'ottobre 2005 e gennaio 2006 , ha acquistato più di 1000 tonnellate di *Xiphias gladius* per far fronte alla richiesta di tale prodotto (ISMEA, 2006).

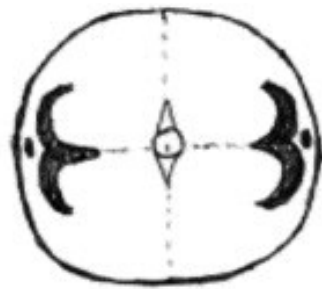
Presso i mercati ittici sono disponibili pesci spada pescati nel mar Ligure e nei mari antistanti la Sicilia, con piccoli quantitativi provenienti dalla Sardegna ma la maggior parte di prodotto offerto viene importato da Spagna e Portogallo presentando spesso etichettatura errata.

La frode di sostituzione è facilitata dal fatto che la distinzione tra le due specie diventa impossibile quando il prodotto è trasformato. Come è possibile osservare in figura 1 la differenziazione di queste due specie in tranci freschi è possibile

attraverso l'osservazione del muscolo di Vogt; detto muscolo in *Xiphias gladius* è disposto in posizione intermedia tra pelle e corpo vertebrale nel tessuto muscolare roseo, sotto forma di due semicerchi adiacenti di colore rosso scuro (*Renon et al*, 2005).

In *Makaira nigricans* il muscolo di Vogt di colore rosso scuro è invece posto in posizione periferica rispetto allo speco vertebrale, cioè adiacente alla cute, che spicca nel tessuto muscolare di colore biancastro.

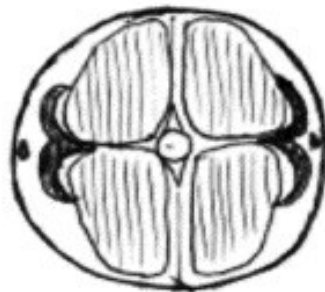
Figura 1.



A = Sword fish



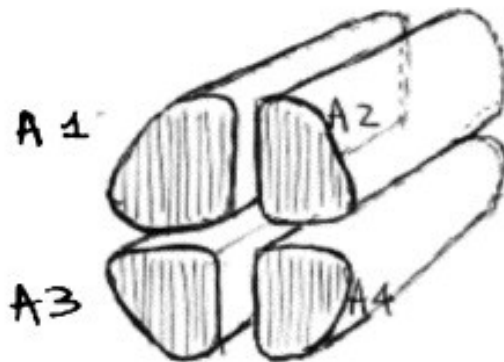
B = Blue marlin



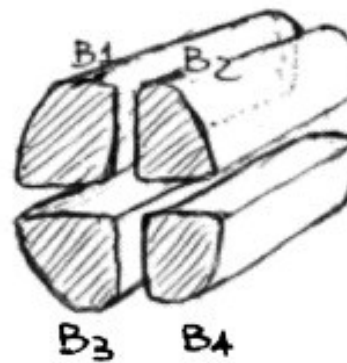
A = Sword fish



B = Blue marlin



A₁-A₂: 2 Fillet dorsal
A₃-A₄: 2 Fillet ventral
for smoked



B₁-B₂: 2 fillet dorsal
B₃-B₄: 2 fillet ventr.
for smoked

Morfologia anatomica di tranci di due specie: *Xiphias gladius*, *Makaira nigricans*

1.2.2 Caratteristiche morfologiche di *Xiphias gladius*

| | |
|------------------|------------------------|
| Nome scientifico | <i>Xiphias gladius</i> |
| Famiglia | <i>Xifidi</i> |
| Ordine | <i>Perciformi</i> |
| Classe | <i>Actinopterigi</i> |



Xiphias gladius è un pesce pelagico di notevoli dimensioni, può infatti raggiungere i 4 m e mezzo di lunghezza e i 500 kg di peso. Presenta corpo cilindrico e allungato con mascella superiore prolungata in un caratteristico lungo rostro osseo appiattito, a sezione ovaliforme, che misura circa 1/3 della lunghezza totale (Safina, 1996).

La mascella inferiore termina a punta. Solo negli adulti sono presenti due pinne dorsali, di cui la prima è breve ed alta mentre la seconda è piccola; inoltre ci sono due pinne anali e la pinna caudale presenta le estremità molto evidenti e slanciate.

Xiphias gladius presenta il dorso grigio scuro, blu scuro o rosso brunastro, i fianchi più chiari con riflessi bronzeei ed il ventre grigiobiancastro.

Tale specie è presente nelle acque temperate e tropicali di tutti gli oceani ed è diffuso anche nel Mediterraneo. (Nakamura, 1985; Wilson et al., 1991)

1.2.3 Caratteristiche morfologiche di *Makaira nigricans*

| | |
|------------------|--------------------------|
| Nome scientifico | <i>Makaira nigricans</i> |
| Famiglia | <i>Istioforidi</i> |
| Ordine | <i>Perciformi</i> |
| Classe | <i>Osteiti</i> |



Makaira nigricans, a differenza di *Xiphias gladius*, è caratterizzato da un rostro più corto a sezione circolare e da due carene per lato alla base della pinna caudale.

Presenta una colorazione blu-nerastra sul dorso che schiarisce sui fianchi, mentre sul ventre è argentea. È anch'esso un pesce pelagico presente nelle acque temperate e tropicali di tutto l'Atlantico (Nakamura, 1985).

È una specie che non riscuote grande interesse sui nostri mercati, ove compare piuttosto raramente; viene commercializzata fresca, congelata ed affumicata.

1.3. Etichettatura dei prodotti ittici

Il 1 gennaio 2002 sono entrate in vigore le norme comunitarie sull'etichettatura del pesce: in tutti i paesi dell'Unione Europea, i prodotti ittici vivi, freschi o refrigerati, congelati, secchi, salati o in salamoia destinati al consumatore finale possono essere commercializzati solo se recano un'indicazione o un'etichetta che contenga la denominazione commerciale della specie, il metodo di produzione e la zona di cattura o di allevamento. Il sistema di etichettatura, introdotto dal Reg. (CE) n. 104/2000 nell'ambito della riforma dell'OCM della pesca e dell'acquacoltura e disciplinato dal Reg. (CE) n. 2065/2001, è stato applicato in Italia secondo le modalità contenute nel Decreto del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali del 27 marzo 2002 e nelle Circolari n.21229 del 21 dicembre 2001 e n.21329 del 27 maggio 2002.(tabella 3).

L'etichetta è *“...l'insieme delle menzioni, delle indicazioni, dei marchi di fabbrica o di commercio, delle immagini o dei simboli che si riferiscono al prodotto alimentare e che figurano direttamente sull'imballaggio o su un'etichetta appostavi o sul dispositivo di chiusura o su cartelli o su anelli o fascette legate al prodotto medesimo...”*(Art. 1 D. Lg. 109/92). Al di là della definizione occorre osservare che le etichette non solo vengono apposte per fornire le dovute informazioni circa il contenuto della confezione posta in commercio, ma hanno una funzione di richiamo, ossia devono attirare l'attenzione del consumatore mediante illustrazioni.

La necessità di informare il consumatore e al tempo stesso l'esigenza di salvaguardare le produzioni ittiche comunitarie sono le principali motivazioni che hanno indotto l'Unione Europea ad adottare tale sistema normativo sull'etichettatura finalizzato, quindi sia ad accrescere la trasparenza del mercato e la riconoscibilità del prodotto e, di conseguenza, ad aumentare la fiducia del consumatore, sia a salvaguardare i produttori, attraverso la valorizzazione delle proprie produzioni, provenienti sia dall'attività di pesca che d'acquacoltura.

La normativa, in merito alle informazioni obbligatorie da fornire con l'etichettatura, distingue tra la fase di vendita al dettaglio e le fasi precedenti. In particolare, nella vendita al dettaglio, per i prodotti riportati in tabella 3 devono essere fornite le seguenti informazioni:

1. denominazione commerciale della specie (secondo l'elenco predisposto dallo Stato membro)
2. metodo di produzione; le diciture che possono essere utilizzate sono: pescato, pescato in acque dolci, allevato
3. zona di cattura o di allevamento. Tale indicazione implica per i prodotti pescati in mare, l'indicazione di una delle zone riportate in tabella 3 (zone di pesca definite dalla FAO); per i prodotti pescati in acque dolci, l'indicazione dello Stato membro o del Paese terzo di origine del prodotto e, infine, per i prodotti allevati, l'indicazione dello Stato membro o del Paese terzo di allevamento in cui si è svolta la fase finale di sviluppo del prodotto, ovvero la fase che intercorre tra lo stadio giovanile e la taglia commerciale.

Tabella 3

Elenco dei prodotti ittici ai quali si applica l'etichettatura di cui al Reg.(CE) n. 104/2000

| Codice NC | Designazione delle merci |
|-----------|---|
| 0301 | Pesci vivi |
| 0302 | Pesci freschi o refrigerati, esclusi i filetti di pesce ed altra carne di pesce della voce 0304 |
| 0303 | Pesci congelati, esclusi i filetti e altre carni di pesce della voce 0304 |
| 0304 | Filetti di pesce freschi, refrigerati o congelati ed altra carne di pesce anche tritata |
| 0305 | Pesci secchi, salati o in salamoia; pesci affumicati, farine polveri atti all'alimentazione umana |
| 0306 | Crostacei anche sgusciati vivi, freschi, refrigerati, congelati, secchi, salati o in salamoia; crostacei non sgusciati, cotti in acqua o al vapore, anche refrigerati, congelati, secchi, salati o in salamoia |
| 0307 | Molluschi, anche se separati dalla loro conchiglia, vivi freschi, refrigerati, congelati, secchi, salati o in salamoia; invertebrati acquatici diversi dai crostacei e dai molluschi, vivi, freschi, refrigerati, congelati, secchi, salati o in salamoia; farine, polveri e agglomerati in forma di pellets di invertebrati acquatici diversi dai crostacei, atti all'alimentazione umana. |

Fonte: Reg.(CE) n° 104/2000 del Consiglio del 17 dicembre 1999

Tabella 4 Elenco delle zone di cattura

| Zone di cattura | Zone FAO |
|------------------------------|---------------------------|
| Atlantico nord-occidentale | n.21 |
| Atlantico nord-orientale (1) | n.27 |
| Mar Baltico | n.27.IIIId |
| Atlantico centro-occidentale | n.31 |
| Atlantico centro-orientale | n.34 |
| Atlantico sud-occidentale | n.41 |
| Atlantico sud-orientale | n.47 |
| Mar Mediterraneo | n.37.1, 37.2, 37.3 |
| Mar Nero | n.37.4 |
| Oceano Indiano | n.51 e 57 |
| Oceano Pacifico | n.61, 67, 71, 77, 81 e 87 |
| Antartico | n.48, 58 e 88 |

(1) Mar Baltico escluso

Per i prodotti pescati in mare, è consentito omettere il metodo di produzione nella vendita al dettaglio, se risulta chiaramente dalla denominazione commerciale e dalla zona di cattura che si tratta di una specie pescata in mare (per esempio, alici, sardine, ecc.) (figura 2). Per i prodotti di acquacoltura, come riportato in

figura 3, vi è invece la facoltà per il dettagliante di aggiungere alla dizione “allevato”, la dizione “prodotto di acquacoltura”.

Figura 2.

| ETICHETTA PESCE CATTURATO IN MARE E VENDUTO IN VASCHETTA AL SUPERMERCATO | |
|---|--|
| 1) Denominazione della specie | Merluzzo |
| 2) Metodo di produzione | Catturato in mare |
| 3) Zona di cattura | Mediterraneo (Canale di Sicilia facoltativa) |
| 4) Data di scadenza | Da consumarsi entro il: giorno - mese |
| 5) Metodo di conservazione | In frigorifero a 0/+2°C |

Figura 3.

| ETICHETTA DEL PESCE DI ALLEVAMENTO CONFEZIONATO IN VASCHETTA | |
|---|---|
| 1) Denominazione della specie | Orata |
| 2) Metodo di produzione | Allevamento |
| 3) Paese di allevamento | Italia (Chiosgia VE – precisazione facoltativa) |
| 4) Metodo di conservazione | In frigorifero a 0/+2°C |
| 5) Data di scadenza | Da consumarsi entro il: giorno - mese |
| 6) Ragione sociale | Nome produttore o importatore |
| 7) Altre diciture facoltative per il pesce di filiera controllata | Descrizione della qualità dei mangimi. Contenuto di grasso. Richiamo alla rintracciabilità della filiera. Nome dell'ente certificatore |

È inoltre consentito indicare:

? una zona di cattura o di allevamento più dettagliata.

? La denominazione scientifica della specie

Nelle fasi precedenti alla vendita al dettaglio, ad ogni stadio di commercializzazione devono figurare non solo la denominazione commerciale, il metodo e la zona di produzione ma anche la denominazione scientifica della specie.

Le informazioni obbligatorie devono figurare sull'etichettatura o sui documenti commerciali di accompagnamento, compresa la fattura, per garantire la tracciabilità dei prodotti ittici.

Nonostante la nuova normativa sia stata appositamente finalizzata ad accrescere la trasparenza del comparto ittico numerose sono le infrazioni commesse a danno del consumatore.

Solo nel 2005 sono stati effettuati 30.000 controlli dalle unità navali e oltre 130.000 ispezioni ai punti di sbarco ed alle attività commerciali portando al sequestro di circa 250.000 chili di prodotti ittici. Tra questi sono stati scoperti molti casi di pesce cinese venduto come italiano: dai bianchetti della costiera romagnola alle cozze e vongole con etichette irregolari.

Durante il bimestre marzo-aprile 2006 su 162 punti di vendita al dettaglio, dislocati in 56 mercati di 10 regioni italiane scelte come campione, sono state analizzate almeno 10 specialità vendute e relative etichette, per un totale di 1000

cartellini contenenti le informazioni per il consumatore. I risultati emersi dall'indagine svolta dal *Movimento Difesa del cittadino* hanno dimostrato che i banchi di vendita del pesce risultano in gran parte fuori legge come riportato in tabella 5

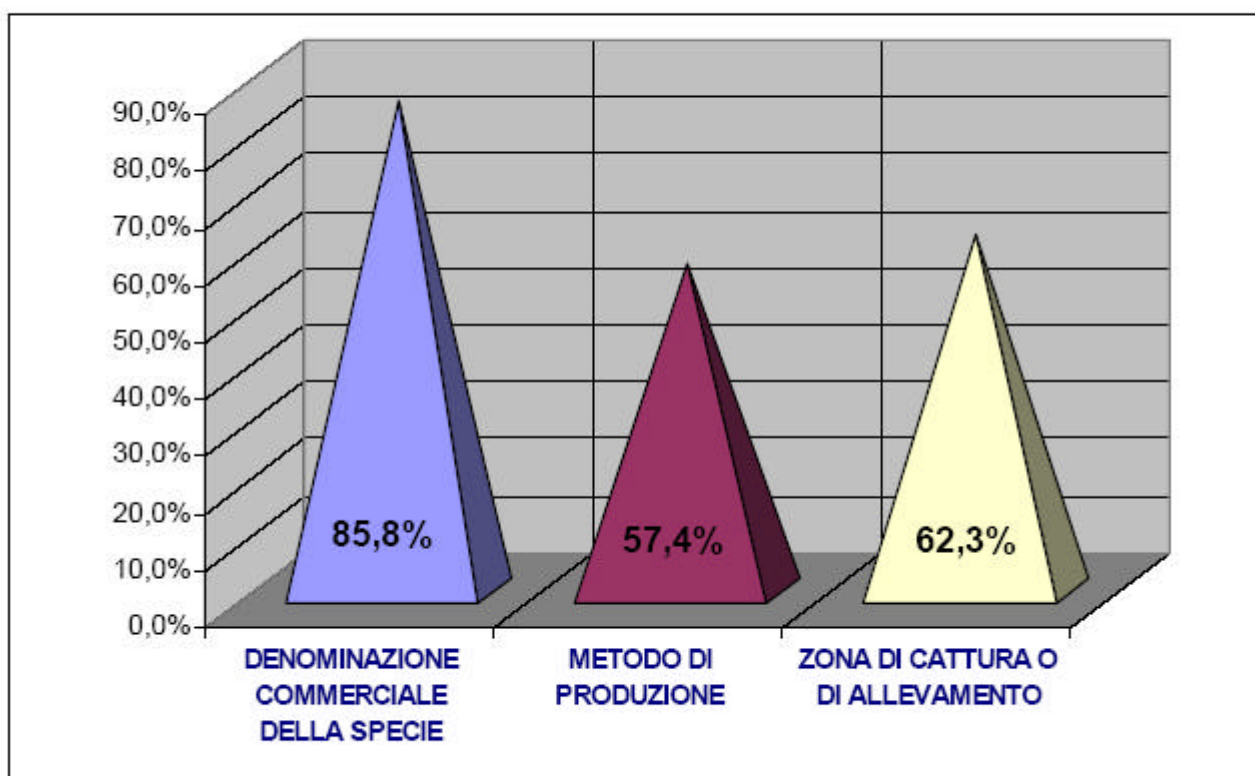
Tabella 5 Dati ed elaborazione: Movimento Difesa del Cittadino

| REGIONE | N° BANCHI ESAMINATO | DENOMINAZIONE COMM.DELLA SPECIE | | METODO DI PRODUZIONE | | ZONA DI CATTURA O DI ALLEVAMENTO | |
|------------|------------------------|---------------------------------------|------|-------------------------|------|--|------|
| | | N | % | N | % | N | % |
| Basilicata | 15 | 15 | 100 | 14 | 93,3 | 15 | 100 |
| Campania | 14 | 9 | 64,3 | 3 | 21,4 | 5 | 35,7 |
| Lazio | 47 | 34 | 72,3 | 16 | 34 | 18 | 38,3 |
| Liguria | 6 | 6 | 100 | 6 | 100 | 6 | 100 |
| Lombardia | 17 | 17 | 100 | 10 | 58,8 | 12 | 70,6 |
| Marche | 27 | 26 | 96,3 | 14 | 51,8 | 17 | 62,3 |
| Sicilia | 9 | 5 | 55,6 | 5 | 55,6 | 4 | 44,4 |
| Toscana | 10 | 10 | 100 | 9 | 90 | 8 | 80 |
| Umbria | 5 | 5 | 100 | 5 | 100 | 5 | 100 |
| Veneto | 12 | 12 | 100 | 11 | 91,7 | 11 | 91,7 |
| Totale | 162 | 139 | 85,8 | 93 | 57,4 | 101 | 62,3 |

In generale, l'informazione più diffusa risulta essere quella relativa alla Denominazione commerciale della specie (85,8%), segue quella sulla Zona di cattura o di allevamento (62,3%) e soltanto nel 57,4% viene indicato il Metodo di produzione. (grafico 1).

Grafico 1.

I contenuti delle etichette

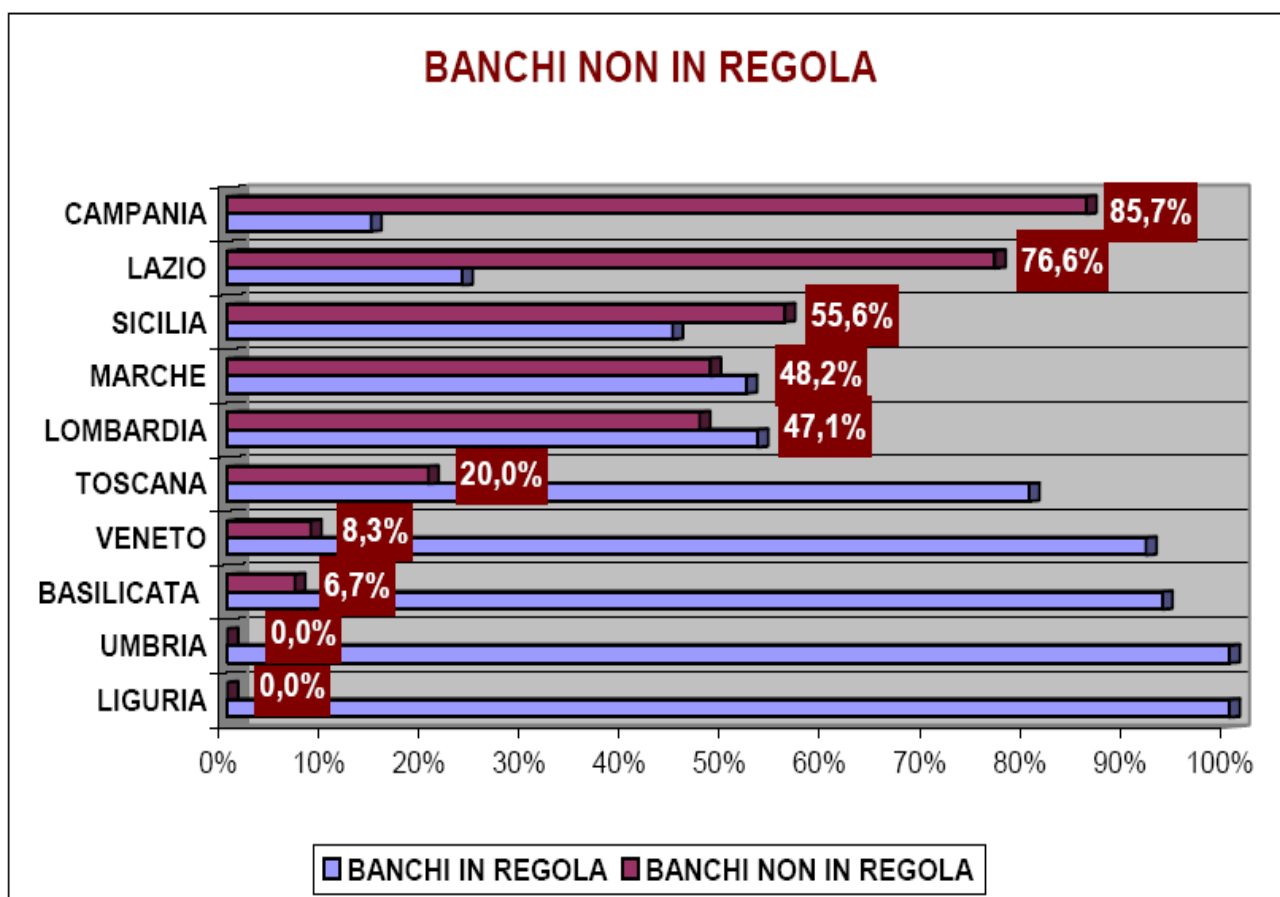


Dati ed elaborazione: Movimento Difesa del Cittadino

Soltanto la Liguria e l'Umbria, di tutte le regioni esaminate, presentano i banchi di pesca in regola presentando, in etichetta, tutte le informazioni richieste a garanzia del consumatore.(grafico 2).

Grafico 2.

La situazione nelle regioni



Dati ed elaborazione: Movimento Difesa del Cittadino

1.4 Rintracciabilità di Filiera

Il 1/01/2005 è entrato in vigore il Regolamento sulla tracciabilità (Reg.(CE) n.178/2002), che rende inoltre obbligatoria la rintracciabilità. L' art.1 di tale Regolamento, conosciuto anche come Food Law, stabilisce che *“...tutti gli operatori del settore alimentare in tutte le fasi del processo devono essere capaci di individuare sia i soggetti che hanno fornito loro un alimento, un mangime, un animale destinato alla produzione alimentare, sia le imprese che hanno fornito loro i prodotti...”*. Si stabilisce inoltre che *per tracciabilità si intende la possibilità di ricostruire e seguire un processo di un alimento, mangime, animale destinato alla produzione alimentare o sostanza che entra a far parte di un alimento o mangime attraverso tutte le fasi di produzione.*

“Per rintracciabilità si intende la possibilità di ricostruire e seguire un processo di un alimento, mangime, animale destinato alla produzione alimentare o sostanza che entra a far parte di un alimento o mangime attraverso tutte le fasi di produzione, trasformazione e distribuzione” (reg. CE n° 178/2000”). Risulta evidente, pertanto, che la veridicità delle informazioni fornite dal sistema di identificazione ed etichettatura possa essere verificata attraverso il controllo della documentazione cartacea e/o elettronica. Al fine di verificare la veridicità delle informazioni riportate in etichetta è quindi indispensabile affiancare ai sistemi di tracciabilità tradizionali opportune procedure analitiche come l'analisi delle proteine, l'analisi dei tessuti e tecniche di genetica molecolare.

1.4.1 Analisi delle proteine

Tra le procedure comunemente impiegate per la rintracciabilità dei prodotti alimentari, le analisi sulle proteine prevedono l'impiego di metodiche che si basano sulla differenza dei pattern elettroforetici generati da proteine di diverse specie (*Bonnefoi et al, 1986*). La focalizzazione isoelettrica, l'elettroforesi bidimensionale e l'SDS sono metodiche utilizzate per la visualizzazione di tali patterns (*Lundstrom, 1980*). In alternativa vengono impiegati saggi immunologici, tra cui i saggi ELISA. Con quest'ultima tecnica l'identificazione delle specie viene ottenuta producendo anticorpi specie-specifici, cioè che riconoscono come target proteine appartenenti ad un'unica specie (*Stelo, 1993; Asensio, 2003*). Le proteine sono molecole organiche che subiscono processi degradativi durante la cottura per cui i suddetti saggi trovano applicazione solo sui prodotti freschi.

1.4.2 Analisi morfologica

L'analisi morfologica dei tessuti adotta, invece, tecniche di microscopia elettronica (*Momcilovic, et al 2000*). Tale analisi, può essere utilizzata solo sui prodotti carnei i cui tessuti non hanno subito modifiche in seguito a cottura o trattamenti meccanici, quali macinazione.

1.4.3 Analisi del DNA

L'avvento delle moderne biotecnologie e i notevoli progressi effettuati nel campo della genetica rendono le tecniche di biologia molecolare le procedure più

impiegate per la rintracciabilità dei prodotti. Il principale vantaggio è rappresentato dal fatto che tali tecniche sono particolarmente sicure come conseguenza della stabilità delle molecole di acidi nucleici, rispetto alle proteine e ai tessuti, superando quindi i limiti delle precedenti analisi. Il DNA risulta, infatti, alquanto stabile alle elevate temperature, pressioni e trattamenti chimici, comunemente utilizzati nelle preparazioni alimentari. Il DNA rappresenta una utile fonte di informazione sulla quale sviluppare saggi diagnostici per mettere a punto sistemi di tracciabilità genetica, e rintracciabilità dei prodotti alimentari (Papa, et al 2004).

1.5 Metodiche analitiche a confronto

1.5.1 Isoelettrofocalizzazione (IEF) verticale

Con questa tecnica le proteine vengono separate in un campo elettrico lungo il quale viene stabilito un gradiente di pH. Infatti, la loro separazione avviene sulla base del loro punto isoelettrico, che è il pH distintivo per ogni tipo di proteina, in cui la proteina stessa non ha carica netta. La regione anodica (+) corrisponde alla regione più acida e quella catodica (-) a quella più basica. Gli estremi di pH vengono scelti sulla base dei punti isoelettrici dei componenti da separare. Il principio su cui si basa tale metodo è la migrazione delle proteine in gel di poliacrilammide in funzione della carica della molecola, della sua massa e della sua forma. Il gel di acrilammide è costituito da un reticolo di maglie la cui dimensione permette una

selettività secondo il peso molecolare della proteina: tanto più le molecole sono grandi, tanto più vengono rallentate nella loro migrazione. La separazione elettroforetica è il risultato di due fenomeni:

- la migrazione delle molecole sotto l'azione di un campo elettrico a seconda della loro carica a un pH stabilito;
- la filtrazione di tali molecole attraverso le maglie del gel.

La separazione su gel di poliacrilammide delle diverse proteine avviene quindi in funzione del loro peso molecolare. Il gradiente stabile di pH tra gli elettrodi viene realizzato con una miscela di anfolti a basso peso molecolare aventi punti isoelettrici che coprono l'intervallo di pH desiderato. Presenti in vendita, possono coprire un ampio intervallo di pH (da 3 a 10) o un intervallo di pH ristretto (da 4 a 5). La separazione può essere condotta o su colonna verticale o su lastra orizzontale di gel, utilizzando apposite apparecchiature disponibili in commercio (LBK, BioRad e Amersham Pharmacia Biotech). L'isoelettrofocalizzazione, quindi, ha come caratteristica quella di permettere il riconoscimento di specie tramite l'analisi di pochi mg di muscolo (*Tepedino et al., 2000*). Tuttavia questa tecnica si limita ad una identificazione su prodotti freschi e tal quali. Le conserve o miscele come le insalate di mare, infatti, non possono essere sottoposte all'IEF in quanto le prime hanno subito un'alterazione termica, compromettendo la struttura delle proteine stesse; le seconde invece, consistendo in miscele di più prodotti, non si possono discriminare i singoli ingredienti rendendo, perciò, tale tecnica inutile.

1.5.2 Tecniche di Genetica Molecolare

Una delle tecniche di biologia molecolare maggiormente utilizzate per identificare le specie presenti in alimenti carnei è la PCR.

La Reazione a Catena della Polimerasi (PCR), introdotta a metà degli anni '80 da Kary Mullis, è una tecnica straordinariamente potente per analizzare il DNA (M.G. Marini, 1996). La PCR è una reazione di amplificazione in vitro di uno specifico segmento di DNA, catalizzata da una DNA polimerasi, la Taqpolimerasi, enzima ottenuto da un microrganismo termofilo (*Therm(ophyl)us aquaticus*). In una reazione standard di PCR sono coinvolti lo “stampo” di DNA a doppia elica, che deve essere amplificato, e primers oligonucleotidici a singolo filamento, che fiancheggiano il segmento di interesse, e rappresentano le sequenze delimitanti la regione che si desidera amplificare. Sono presenti inoltre deossiribonucleotidi, un tampone e dei sali (M.G. Marini, 1996). La reazione prevede la denaturazione del DNA, seguita da una riassociazione dei filamenti singoli in presenza di un eccesso di “primers”. Dato l'eccesso molare degli oligonucleotidi, i filamenti di DNA si riassociano, in idonee condizioni di temperatura, quasi esclusivamente con i due oligonucleotidi, piuttosto che tra di loro. Gli oligonucleotidi devono essere tali che i loro estremi 5' restino esterni, cioè che i loro estremi 3' fungano da innesco a partire dal quale la DNA-polimerasi può sintetizzare un filamento di DNA complementare su ognuno dei due filamenti originali. L'enzima è caratterizzato da un'elevata termostabilità, proprietà che gli permette di esplicare la sua azione nonostante le alte

temperature (90-95°C) che si raggiungono al momento della denaturazione della doppia elica e che, normalmente, denaturano gli enzimi stessi. La resistenza dell'enzima alla degradazione termica evita l'aggiunta di nuova polimerasi dopo ogni ciclo di denaturazione, consentendo di automatizzare il processo di amplificazione in cicli ripetitivi. Gli step che si susseguono sono:

- ✚ denaturazione ad elevate temperature;
- ✚ riconoscimento e ibridazione dei primers con le rispettive sequenze complementari;
- ✚ polimerizzazione ad opera della *Taq*-polimerasi.

La temperatura di annealing, ovvero di ibridazione, è di importanza fondamentale per aumentare la stringenza della reazione. Maggiore è tale temperatura, più elevata sarà la specificità del riconoscimento tra primer e sequenza riducendo al minimo gli appaiamenti aspecifici degli oligonucleotidi e la formazione casuale di strutture secondarie.

I cicli di denaturazione, ibridazione e polimerizzazione possono essere reiterati in una macchina programmata per compiere queste operazioni, detta termocicizzatore, che consiste in una celletta termostata che viene ritmicamente riscaldata per denaturare il DNA e raffreddata per permettere l'appaiamento di questo con i primer e la copia del filamento. In una classica reazione di PCR, la relazione tra la quantità della sequenza bersaglio iniziale (Q) e la quantità del prodotto amplificato ottenuto (Y) in condizioni ideali, dovrebbe essere espressa dalla equazione:

$$Y=Q(1+X)^n$$

Dove X rappresenta l'efficienza della reazione in ciascun ciclo n il numero di cicli di PCR. In pratica, però, la quantità del prodotto di amplificazione non dipende soltanto dal numero di molecole bersaglio presenti inizialmente nella reazione, ma è in relazione a tutta una serie di variabili difficilmente controllabili dall'operatore, come la presenza di prodotti di amplificazione non specifici (aspecifici) e la cinetica della stessa reazione. Una reazione di reazione di PCR può essere schematizzata in tre fasi:

1. Fase esponenziale
2. Fase lineare
3. Fase di plateau

La prima fase si caratterizza per un'esatta corrispondenza tra i prodotti duplicati e l'accumulo degli stessi, e assicura una resa molto specifica e precisa.

Durante la seconda fase si verifica una diminuzione della velocità di accumulo del prodotto dovuta alla degradazione degli ampliconi a causa dell'attività esonucleasica della Taq-polimerasi, nonché all'inattivazione termica o ad una concentrazione limitante dell'enzima stesso. La fase di plateau è il punto finale della reazione di PCR e rappresenta l'ammontare di prodotto finale (M.G. Marin,1996). Uno dei primi e più semplici metodi utilizzati per la visualizzazione dei frammenti di DNA amplificati consiste nella corsa elettroforetica in un campo elettrico a intensità e direzione costante, su gel di agarosio (polimero lineare). La velocità di migrazione degli ampliconi sul gel è inversamente proporzionale al

peso molecolare degli stessi, quindi possono essere separati frammenti di differenti grandezze. La visualizzazione del DNA avviene agli UV per mezzo della colorazione con etidio bromuro. L'etidio bromuro è un colorante fluorescente contenente un gruppo planare che si intercala tra le basi del DNA dando origine a un legame che aumenta la quantità di fluorescenza rispetto a quella emessa dal colorante libero. La PCR trova diverse applicazioni nell'identificazione di specie presenti in prodotti alimentari, perchè si possono disegnare primers che amplificano selettivamente regioni di DNA proprie di una specie (J. F. Montiel Sosa *et al*, 2000) o primers che amplificano frammenti di diverso peso molecolare a seconda delle specie (T. Matsunaga, *et al* 1997).

1.6. Trasportatore di membrana

Un trasportatore di membrana è un polipeptide transmembrana in grado di mediare il trasporto di ioni o molecole polari di medie dimensioni (amminoacidi, zuccheri, nucleotidi) all'interno della cellula (Alberts, 2004).

La presenza di trasportatori di membrana è indispensabile: solamente alcuni composti sono in grado di diffondere liberamente attraverso la membrana plasmatica; tutti gli altri hanno bisogno di metodi alternativi per entrare nel citoplasma. Sebbene esista un gran numero di diversi trasportatori, questi possiedono alcune caratteristiche in comune:

- ? Il trasporto è selettivo per il substrato che deve essere trasportato, e basato su interazioni steriche tra il trasportatore e la molecola trasportata;
- ? la traslocazione attraverso la membrana è legata ad un cambiamento conformazionale della proteina trasportatrice, e più specificamente all'apertura/chiusura di un "canale" all'interno del polipeptide;
- ? Il trasporto può richiedere o meno dispendio energetico dando vita rispettivamente ad un trasporto attivo o passivo;
- ? tutte le molecole trasportatrici conosciute sono proteine transmembrana, che attraversano integralmente la membrana plasmatica.

L'ingresso nel citoplasma può avvenire in tre modi diversi; la natura del trasporto dipende dalle caratteristiche steriche e chimiche della molecola in questione.

I trasportatori di membrana si occupano dell'internalizzazione di ioni, protoni e molecole polari di medie dimensioni, come zuccheri, nucleotidi e amminoacidi. Inoltre, essi si suddividono in quattro classi principali che differiscono per il meccanismo di azione, la localizzazione nella cellula e il tipo di molecola trasportata: (*Alberts, 2006*)

- ? ATPasi di trasporto
- ? Canali ionici
- ? Permeasi
- ? Cotrasportatori

Le ATPasi di trasporto, dette anche pompe ioniche, sfruttano l'idrolisi di ATP per trasportare ioni o protoni contro il gradiente di concentrazione (*Costanzo, 1998*). In natura esistono 6 tipi di trasportatori primari:

- ? ATPasi di tipo P,
- ? ATPasi di tipo F e V
- ? ATPasi di tipo Ars
- ? Pompe decarbossilasi
- ? Trasportatori ABC (ATP – binding cassette).

Le ATPasi di tipo P sono anche chiamate pompe cationiche in quanto la loro funzione principale è quella di pompare cationi contro un gradiente di concentrazione, sono presenti sia sulla membrana plasmatica che sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico. Ciascuna ATPase di tipo P è specifica per una o poche specie di cationi strettamente affini. Esempi di ATPasi sono la pompa sodio potassio, la pompa protonica e la pompa del calcio.

Quest'ultima svolge un ruolo fondamentale per rilassare il muscolo dopo la contrazione muscolare.

1.7 Contrazione muscolare

I muscoli scheletrici sono formati da numerose fibre muscolari che rappresentano la base costruttiva del sistema muscolare. Ogni fibra muscolare è una singola cellula plurinucleare di forma cilindrica formata da centinaia di lunghi fascetti contrattili, detti miofibrille. Ciascuna miofibrilla è costituita da una sequenza di sarcomeri anch'essi strutture contrattili formate da proteine muscolari come l'actina e la miosina. L'actina è posta sulle 2 facce dei cosiddetti dischi Z che delimitano un sarcomero conferendo alle sue estremità una colorazione chiara (*Baldissera, 2006*).

Al centro del sarcomero è posta invece la miosina che fa apparire scura la parte centrale. I due tipi di filamenti sono intercalati in modo ordinato, così che ogni filamento di miosina si trova circondato da sei di actina; al momento della

contrazione i sarcomeri ricevono l'impulso dal cervello tramite i nervi motori che formano sulla superficie del muscolo le placche motrici. (figura 4 e 5)

Queste trasmettono l'impulso elettrico, che si propaga attraverso delle inflessioni delle membrane delle cellule muscolari, i tubuli trasversali (Arienti, 2006).

Nei tubuli sono presenti assemblati in gruppi di 4, i canali DHPR (recettore per le diidropiridine) che, al passaggio del potenziale, cambiano la loro organizzazione molecolare passando in uno stato funzionale definibile come "aperto". A questo punto il cambio di conformazione dei 4 DHPR induce un cambio funzionalmente simile di un canale RYR1 che si trova con le sue 4 unità costitutive in stretto contatto con i 4 DHPR attivati dal voltaggio. Si crea in questo modo la condizione per cui il Ca, immagazzinato nelle cisterne terminali legato ad una proteina che lo fissa (calciosequestrina), è libero di muoversi e di fuoriuscire dalle cisterne per aumentare la sua concentrazione nel mioplasma (da 10^{-7} a 10^{-5} M) (Arienti, 2006).

Il destino del Ca^{2+} mioplasmatico è quello di legarsi essenzialmente ad una proteina contrattile di basso peso molecolare, la Troponina che si trova nel filamento sottile raggruppata ogni 400 Å in tre subunità (T, I e C) di cui una, la C, dotata di grande affinità per lo ione. La funzione della Tn quando il muscolo è a riposo è quella di impedire, attraverso la subunità I (inibitrice) l'interazione tra l'actina del filamento sottile e la miofibrina del filamento spesso. Quando il Ca^{2+} supera la concentrazione di 10^{-7} M, si lega alla TnC cosa che fa cambiare la

conformazione molecolare dell'intero complesso delle troponine sicchè l'actina è in grado di formare un "ponte trasversale" con la testa della miosina e quindi iniziare la fase della concentrazione.

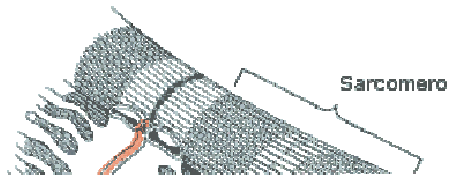
Quando il muscolo è rilasciato miosina e actina non interagiscono se la testa della miosina lega ATP. Questo stato ha però una vita molto breve perché in presenza di Mg^{2+} , si innesca l'attività ATP-asi della testa della molecola che idrolizza ATP in ADP + Pi (fosforo inorganico). All'arrivo del Ca^{2+} si forma un legame energizzato tra actina e testa della miosina in cui sono presenti ADP e Pi. La perdita successiva del Pi porta ad una rotazione della testa che, essendo legata al filamento sottile tramite l'actina, tira verso il centro del sarcomero il filamento stesso. A questo punto un'altra molecola di ATP si lega alla miosina e ciò determina il distacco della stessa dall'actina: in pratica inizia un nuovo ciclo di formazione-rottura dei ponti (*Arienti, 2006*).

Una volta terminato l'effetto indotto dal potenziale con il ritorno dei canali per il Ca^{2+} allo stato di chiusura lo ione in eccesso presente nel sarcoplasma viene attivamente ritrasportato nel RS attraverso un sistema di pompe metaboliche.

La pompa del calcio permette ai muscoli di rilassarsi dopo questa ondata frenetica di contrazione indotta dal calcio, essa è localizzata nella membrana del reticolo sarcoplasmatico (*Goodsell, 2004*). Sfruttando l'energia dell'ATP, spinge di nuovo gli ioni calcio nel reticolo sarcoplasmatico riducendo il livello di calcio attorno ai filamenti di actina e miosina permettendo così al muscolo di rilassarsi.

In altre cellule, gli ioni calcio vengono usati per trasmettere segnali e pompe simili sono state trovate nella membrana cellulare di moltissime cellule. Operano senza sosta per ridurre la quantità di calcio a livelli molto bassi, preparando la cellula per l'azione. Quando, all'improvviso, la cellula viene inondata di calcio, il segnale può diffondersi in ogni punto (Arienti, 2006).

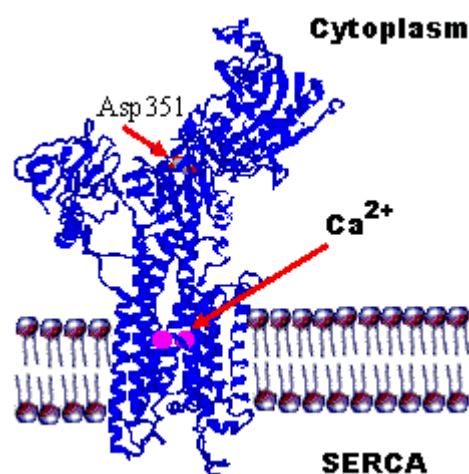
Figura 4.



1.8 Struttura della pompa del calcio

La pompa del calcio ha un grande dominio che sporge all'esterno ed una regione che risulta immersa nella membrana e che forma un tunnel che la attraversa. (Herbette et al., 1977). La regione idrofobica è costituita da dieci segmenti transmembrana (M1-M10) organizzati in una struttura ad elica (MacLennan et al., 1985) e da due siti di legame per il calcio localizzati vicino al doppio strato lipidico della membrana. La sezione citoplasmatica e quella transmembrana sono unite da un peduncolo (Inesi & Asai, 1968) costituito da 5 segmenti (S1-S5) collegati ad altri 5 segmenti transmembrana. I residui terminali di carbonio e di azoto sono entrambi immersi nel citosol (Matthews et al., 1989) mentre i residui di ossigeno sono localizzati nei segmenti M4 e M5, i segmenti M6 e M8 formano 2 siti che presentano un'alta affinità per il calcio (Toyoshima et al., 2000), tra i segmenti s4 e s5 è posto l'aspartato 351 al quale è trasferito il fosfato derivato dall'idrolisi dell'ATP (Lee & East, 2001) (figura 6).

Figura 6



Per ogni ATP rotto, la pompa trasferisce 2 ioni calcio attraverso la membrana, e due o tre ioni idrogeno indietro nella direzione opposta. Durante il ciclo di pompaggio si flette e subisce una serie di trasformazioni (Goodsell, 2004).

La struttura riportata in figura 7, è lo stadio vuoto che presumibilmente ha ioni idrogeno legati nel sito di trasferimento, La sua forma si modifica fino a diventare la struttura riportata in figura 8, permettendo agli ioni calcio di entrare da sopra per sostituire gli ioni idrogeno che escono nel citoplasma verso l'alto. Le ultime due fasi usano una molecola di ATP per modificare la propria forma così il calcio viene rilasciato verso il basso. In questo processo, uno ione fosfato è trasferito dall'ATP ad un particolare amminoacido aspartato nella pompa, il numero 351, mostrato in rosso. Sia l'aspartato che il presunto sito di legame dell'ATP (che deve essere vicino all'aspartato) si trovano a qualche distanza dal tunnel attraverso il quale passa il calcio. Il cambiamento è controllato dai grandi movimenti dei domini che legano l'ATP che premono o tirano la proteina, aprendo o chiudendo il tunnel al momento opportuno.

Il sito di legame del calcio si trova all'interno di un tunnel formato da quattro alfa eliche che passano diritte attraverso la membrana. I due ioni calcio, mostrati come grosse sfere verdi in figura 9, sono trattenuti da un insieme di amminoacidi, mostrati con sfere e bastoncini, che coordinano il calcio da ogni lato. La proteina è molto meno stabile quando questi ioni calcio vengono rimossi (Goodsell, 2004)

Figura 7

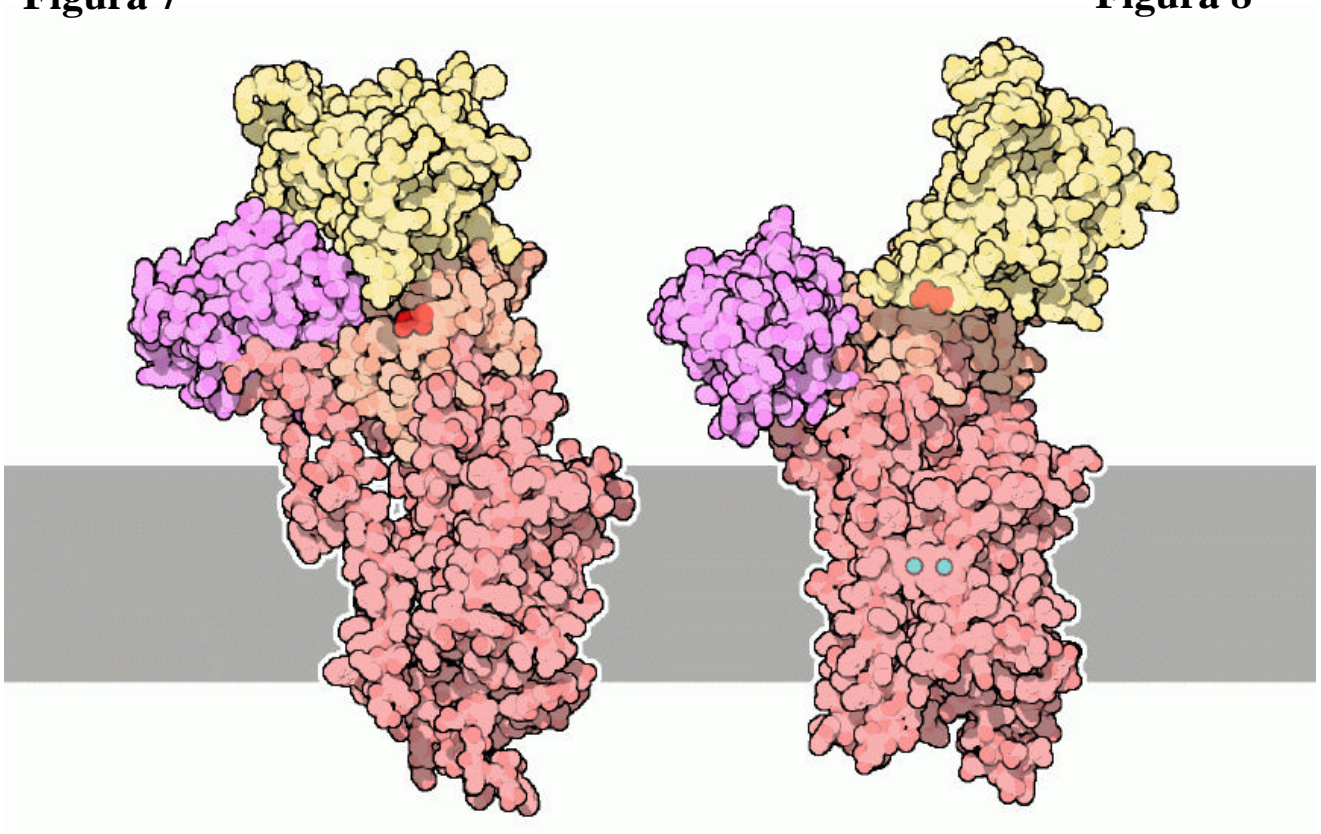
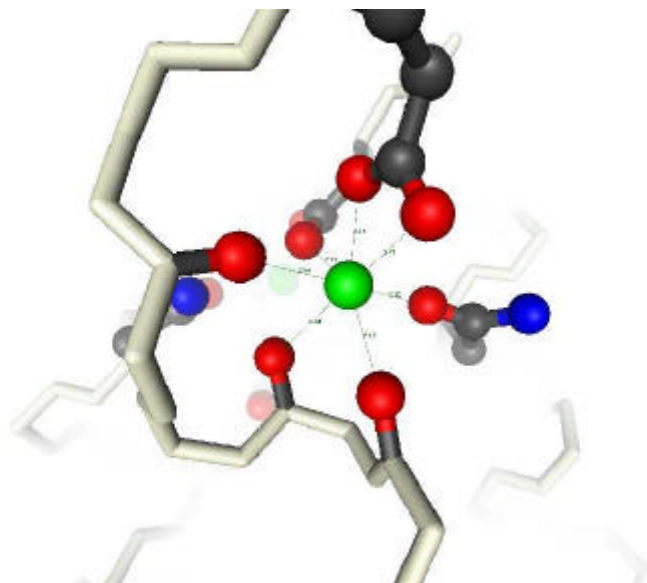


Figura 9



1.9 Gene Serca1

Esistono tre geni che codificano per tre distinte proteine SERCA1, SERCA2, SERCA 3.

Nell'uomo questi geni sono localizzati rispettivamente sul cromosoma 16 (figura 10), 12 e 17 (*Dode et al., 1996; MacLennan et al., 1987*). Splicing alternativi determinano 7 isoforme del gene rappresentate da SERCA1a, SERCA1b, SERCA2a, SERCA2b e SERCA3a, b e c. (*Andersen & Vilsen, 1998*).

SERCA1a è espresso esclusivamente nelle fibre muscolari scheletriche (fast) dell'adulto, SERCA1b è espresso nelle stesse fibre ma solo nel feto (*Brandl et al., 1987*). SERCA2a è espresso sia nel muscolo cardiaco che nelle fibre muscolari scheletriche (slow) (*Brandl et al., 1987*), e SERCA2b è una proteina housekeeping (*Carafoli & Brini, 2000*). L'espressione del gene SERCA3 è ristretta ad alcuni tessuti (*Andersen & Vilsen, 1998*).

Nell'uomo il gene SERCA1a risulta costituito da 23 esoni e 22 introni. La regione esonica è stata sequenziata per un totale di 3482 bp e, nello specifico, come riportato in tabella 7.A, la grandezza degli esoni si estende da un minimo di 18 bp (2° esone) ad un massimo di 336 bp (15° esone). Il 1° esone è costituito da 293 bp di cui 175 bp della regione 5'UT (UnTranslated) e 118 bp della regione codificante (*Zhang, 1995*)

Splicing alternativi generano due varianti di trascritti che codificano per due isoforme differenti. Quando l'outslicing interessa l'esone 22, l'mRNA codifica

per la isoforma neonatale SERCA1b, mentre il trascritto correttamente assemblato codifica per la isoforma adulta SERCA1a (Zhang, 2004).

I 22 introni occupano uno spazio di circa 22600 bp ed in particolare l'introne più grande si estende per 6000 bp (9° esone) mentre quello più piccolo per 112 bp (18° esone). Inoltre, in *Homo sapiens*, il gene risulta caratterizzato da un maggiore contenuto in G/C, pari al 58%, rispetto a quello in A/T pari al 41.8% e codifica per una proteina di 8706 aminoacidi di cui si riporta la sequenza (Brandl, 2007)

MEAAHAKTTEECLAYFGVSETTGLTPDQVKRNLEKYGLNELPAE
EGKTLWELVIEQFEDLLVRILLLAACISFVLAWFEEGETITAFVEPFVILLILIANA
IVGVWQERNAENAIEALKEYEPEMGKVYRADRSVQRIKARDIVPGDIVEVAVGDKVP
ADIRILAIKSTTLRVDQSILTGESVSVIKHTEPVPDPRAVNQDKKNMLFSGTNIAAGK
ALGIVATTGVGTEIGKIRDQMAATEQDKTPLQQKLDEFGEQLSKVISLICVAVWLINI
GHFNDPVHGGSWFRGAIYYFKIAVALAVAAIPEGLPAVITTCALGTRRMAKKNNAIVR
SLPSVETLGCTSVICSDKTGTLTTNQMSVCKMFIIDKVDGDI CLLNEFSITGSTYAPE
GEVLKNDKPVRPGQYDGLVELATICALCNDSSLDNFNEAKGVYEKVGEEATETALTTLVE
KMNVFNTDVRSLSKVERANACNSVIRQLMKKEFTLEFSRDRKSMSVYCSPAKSSRAAV
GNKMFVKGAPEGVIDRCNYVRVGTTRVPLTGPVKEKIMAVIKEWGTGRDTLRCLALAT
RDTPPKREEMVLDD SARFLEYETDLTFVGVVGM LPPRKEVTGSIQLCRDAGIRVIMI
TGDNKGTAAIAICRRIGIFGENEEVADRAYTGREFDDLPLAEQREACRRACCFARVEPS
HKSKIVEYLQSYDEITAMTGDGVNDAPALKKAEIGIAMGSGTAVAKTASEMVLADDNF
STIVAAVEEGRAIYNNMKQFIRYLISSNVGEVVCIFLTAALGLPEALIPVQLLWVNLV
TDGLPATALGFNPPDLDIMDRPPRSPKEPLISGWLFFRYMAIGGYVGAATVGAAAWWF
LYAEDGPHVNYSQLTHFMQCTEDNTHFEGIDCEVFEAPEPMTMALSVLVTIEMCNALN
SLSENQSLLRMPWPVNIWLLGSICLSMSLHFLILYVDPLPMIFKLRALDLTQWLMVLK
ISLPVIGLDEILKFVARNYLEDPEDERRK "

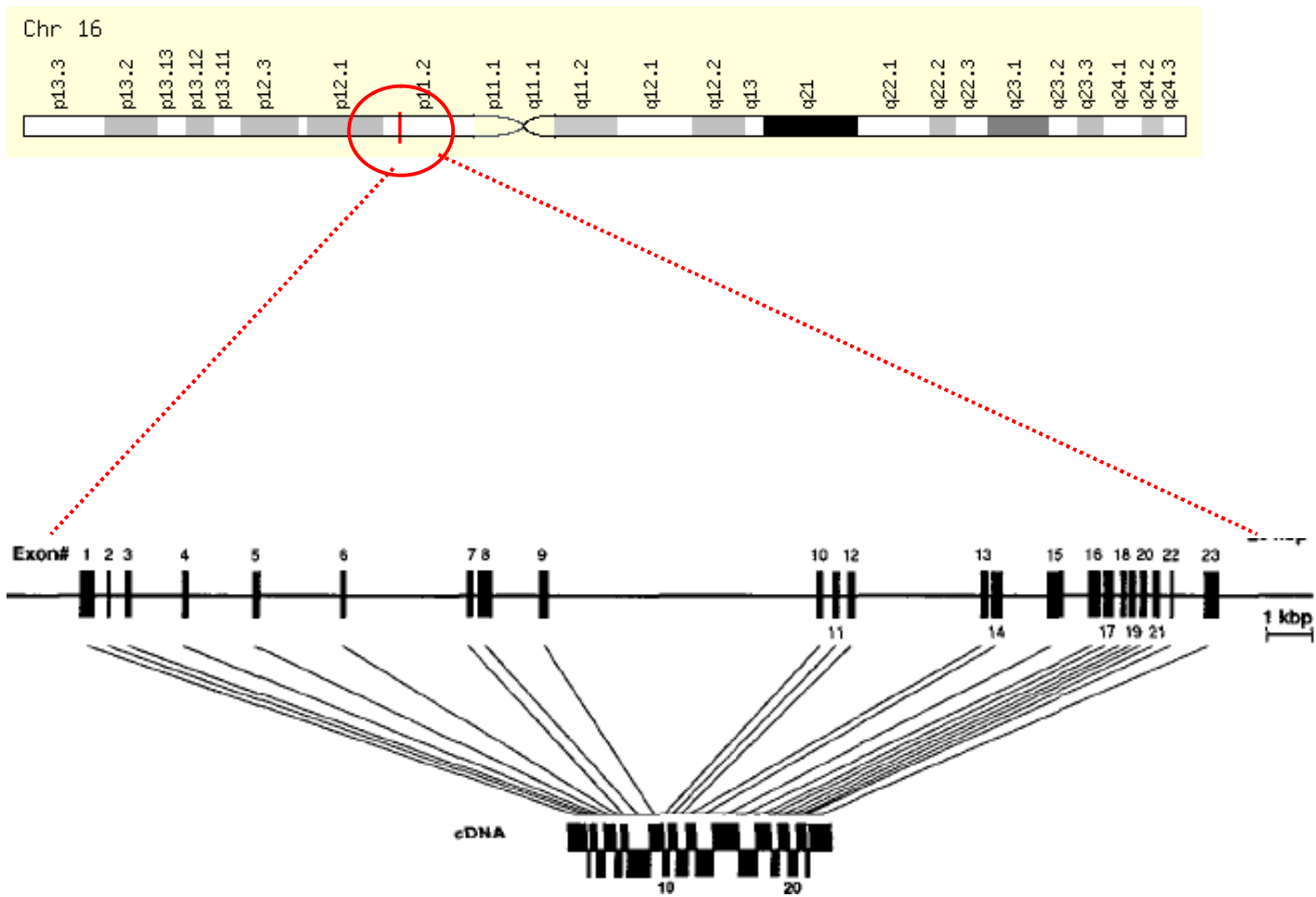
TABLE 1

Intron-Exon Organization of the Human ATP2A1 Gene

| 3' Acceptor sequence | | Exon No. | cDNA nucleotide No. ^a | Exon size (bp) | 5' Donor sequence | | Intron number and size (kb) |
|----------------------|---------------------|----------|----------------------------------|---------------------|-------------------|--------|-----------------------------|
| Intron | Exon | | | | Exon | Intron | |
| | n/a | 1 | 1-118 | (~293) ^b | TCAATG/gtaagtgtcc | | 1 (0.307) |
| | | | | | euAsnG | | |
| tcttgggtag/AGCTCC | luLeuP | 2 | 119-136 | (18) | AGGAAG/gtaagttact | | 2 (0.380) |
| | | | | | luGluG | | |
| cctccccacag/GGAAGA | lyLysT | 3 | 137-219 | (83) | TCCTTC/gtaagtgtgg | | 3 (1.19) |
| | | | | | SerPhe | | |
| tgctccccag/GTGCCTG | ValLeu | 4 | 220-324 | (105) | TGGCAG/gttagcgttg | | 4 (1.45) |
| | | | | | TrpGln | | |
| gtctctctcag/GAGCGG | GluArg | 5 | 325-463 | (139) | TGGCTG/gtgagtgaca | | 5 (1.8) |
| | | | | | alAlaV | | |
| ctctctcacag/TGGGGG | alGlyA | 6 | 464-544 | (81) | TCACAC/gtctgetggc | | 6 (2.72) |
| | | | | | euThrG | | |
| ttctccacag/GCGAGT | lyGluS | 7 | 545-630 | (86) | TTCTCG/gtgagcaatc | | 7 (0.147) |
| | | | | | PheSer | | |
| tccttcccag/GGCACC | GlyThr | 8 | 631-928 | (298) | CCGAAG/gtatgaaagc | | 8 (1.07) |
| | | | | | roGluG | | |
| ctccccacag/GTCTTC | lyLeuP | 9 | 929-1095 | (167) | TGCAAG/gtcaggagca | | 9 (6.0) |
| | | | | | CysLys | | |
| tcccctgcag/ATGTTT | MetPhe | 10 | 1096-1184 | (89) | AGAGGT/gtaagtcacc | | 10 (0.261) |
| | | | | | yGluVa | | |
| ctgtgtgccag/CTTGAA | lLeuLy | 11 | 1185-1287 | (103) | AACGAG/gtaacctctc | | 11 (0.213) |
| | | | | | AsnGlu | | |
| cccctctcag/GCCAAA | AlaLys | 12 | 1288-1419 | (132) | AACTCG/gtgagcctgc | | 12 (2.8) |
| | | | | | AsnSer | | |
| tcctctccag/GTGATC | ValIle | 13 | 1410-1545 | (126) | GTCAAG/gtcagaaatc | | 13 (0.107) |
| | | | | | ValLys | | |
| ggtctctcag/GGTGCC | GlyAla | 14 | 1546-1764 | (219) | TATGAG/gtaagcgct | | 14 (1.02) |
| | | | | | TyrGlu | | |
| atctccccag/ACGGAC | ThrAsp | 15 | 1765-2100 | (336) | GCCATG/gtgagagggc | | 15 (0.59) |
| | | | | | AlaMet | | |
| cctcccctcag/ACAGGT | ThrGly | 16 | 2101-2321 | (221) | GGTCTG/gtgagcagct | | 16 (0.1) |
| | | | | | lValCy | | |
| cttccccacag/TATCTT | sIlePh | 17 | 2322-2524 | (203) | TCGGGG/gtgagctgga | | 17 (0.193) |
| | | | | | leGlyG | | |
| tccaccacag/GCTATG | lyTyrV | 18 | 2525-2610 | (86) | CAGCTG/gtagggggag | | 18 (0.112) |
| | | | | | GlnLeu | | |
| ttccctgcag/ACTCAC | ThrHis | 19 | 2611-2744 | (134) | GAACAG/gtgggggccc | | 19 (0.118) |
| | | | | | uAsnSe | | |
| ccctctgcag/CCTGTC | rLeuSe | 20 | 2745-2862 | (118) | CTGCCG/gtgaggtttc | | 20 (0.175) |
| | | | | | LeuPro | | |
| cctgccccag/ATGATC | MetIle | 21 | 2863-2980 | (118) | TAGAGG/gtaaggagtg | | 21 (0.26) |
| | | | | | euGluG | | |
| ctggccatag/GATAAC | ly**** | 22 | 2981-3022 | (42) | TCACAG/gtatcaccoc | | 22 (0.724) |
| | | | | | | | |
| cccttccag/ATCCAG | AspPro ^f | 23 | 3023- | (>285) | AAAGTC/tggccttgcc | | |

Struttura del gene SERCA 1

CROMOSOMA 16



2. OBIETTIVO




Studiare la variabilità del gene SERCA1 (Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca⁺⁺ ATPase) codificante una ATPasi calcio dipendente del reticolo sarcoplasmatico, in *Xiphias gladius* e in *Makaira nigricans* allo scopo di individuare marcatori specie specifici utili per la differenziazione di *Xiphias gladius* da *Makaira nigricans*.


3. MATERIALI E METODI

3.1 Preparazione dei campioni di DNA

Le analisi sono state condotte sul DNA estratto dal tessuto fresco di 14 campioni individuali di *Xiphias gladius* ottenuto da individui interi e pertanto morfologicamente riconoscibili. Il 50% dei campioni analizzati è rappresentato da *Xiphias gladius* pescato nella zona FAO 27 (Atlantico Nord Orientale) ed il restante da *Xiphias gladius* proveniente dalla zona FAO 34 (Atlantico Centro Orientale). Inoltre, allo stesso modo, è stato estratto il DNA da 2 campioni di tessuto fresco ottenuti da individui interi di *Makaira nigricans*, pescati nella zona FAO 27, da 3 confezioni di patè e 2 di bottarga di *Xiphias gladius* messi in commercio da diverse aziende alimentari e di un campione di pesce surgelato sulla cui etichetta veniva contemporaneamente riportata denominazione “pesce spada” e “marlin”.

Il DNA è stato estratto con metodo tradizionale riportato da *Maniatis et al* 1984. Seguendo tale procedura, il campione è stato polverizzato dopo congelamento con azoto liquido, e poi sospeso in una soluzione di Buffer di estrazione, per un'ora a 37°. Il buffer di estrazione è una soluzione contenente:

-  10 mM Tris-Cl (pH 8.0)
-  M EDTA (pH 8.0)
-  20 µg/ml pancreatic RNAase

 0.5% SDS

Successivamente, è stato aggiunto l'enzima proteinase K e si è incubato over night.

La soluzione ottenuta è stata sottoposta ad un trattamento con fenolo per allontanare tutte le impurità organiche. Infine si è proceduto con un lavaggio con ammonio acetato 10M, e infine con etanolo per precipitare il DNA.

3.2 Disegno dei primer

I primer utilizzati per l'amplificazione del gene SERCA1 in *Xiphias gladius* e in *Makaira nigricans* sono stati disegnati avvalendosi del software DNASIS-Pro (Hitachi). Come stampo sono state utilizzate le sequenze relative al cDNA di *Makaira nigricans* (EMBL n° di accesso U6522) e a quello parziale di *Xiphias gladius* depositato in Banca Dati (EMBL n° di accesso U58328).

Successivamente, sono stati disegnati altri primer utilizzando come stampo le regioni sequenziate nel corso della ricerca (Tabella 7).

Tabella 7.

| Nome del primer | Sequenza | Tratto amplificato |
|----------------------|----------------------------|--------------------|
| 5'-Nigri1F (forward) | 5'- AACGCACACACAAAGTCC-3' | Ex 1-5 |
| 5'-Nigri5R (reverse) | 5'- TTCTCTGGCCTTGATCCT -3' | |
| 5'-Nigri6F (forward) | 5'-AAGTCCCCGCTGACATC-3' | Ex 6-8 |
| 5'-Nigri8R (reverse) | 5'-GCGACGGCGATCTTGA-3' | |
| 5'-Nigri8F (forward) | 5'- CAACATCGCTGCTGGCAA-3' | Ex 8-10 |
| 5-Nigri10R (reverse) | 5'- GCCCTCGGGTGTGTAC -3' | |
| 5-Nigri10F (forward) | 5'- CTCCAAGTACACACCC- 3' | Ex 10-12 |
| 5-Nigri12R (reverse) | 5'- CTGTGCAACGACTCCTC- 3' | |
| 5'SpadaF(forward) | 5'- CGTGGGTATGCTGGAT -3' | Ex 12-14 |
| 5'SwordR (riverse) | 5'- TGCACCTGTCAATCACAC-3' | |
| 5'Nigri14F(forward) | 5'- CTGGTGGTTCCTGTACGA -3' | Ex 14-17 |
| 5'Nigri17R(reverse) | 5'- AGCAGCAGGATCCTGA-3' | |
| 5-Nigri17F (forward) | 5'-CCTGGCTGACGACTACTT-3' | Ex 17-19 |
| 5-Nigri19R (reverse) | 5'-TGGTAGTAGGTGACAGCG-3' | |
| 5'-Nigri17R(reverse) | 5'-AAGCATGTTCTTCTTGTCCT3' | Ex 19-22 |
| 5'-Nigri22R(reverse) | 5'- CTCAATGTAGTTGCGGGC-3' | |

Tabella 7- Primer utilizzati per sequenziare il gene *SERCA1* in *Xiphias gladius* e in *Makaira nigricans*..

3.3. Amplificazione del DNA mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR è una metodica che consente l'amplificazione selettiva di sequenze di DNA attraverso una serie di duplicazioni successive mediate da una DNA polimerasi.

La specificità del frammento amplificato è data dalla coppia di oligonucleotidi (primer) che vengono utilizzati per innescare l'intero processo.

L'amplificazione si realizza attraverso la ripetizione ciclica di tre fasi: denaturazione, annealing ed estensione.

Una tipica reazione di PCR è stata effettuata in 50 μ l di mix che comprendono: 100 ng di DNA genomico, 10 pmol di ciascun primer, 1,25 U di Taq DNA polimerasi (Promega, Madison, WI), 50 mM di KCl, 10 mM di Tris HCl (pH 9,0), 0,1% di Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, dNTPs (ciascuno ad una concentrazione di 200 μ M). Il programma di amplificazione comprende i seguenti 32 cicli:

| Cicli | Denaturazione | Annealing | Estensione |
|-------|---------------|-------------------|----------------|
| 1 | 97 °C x 2' | 56 - 62 °C x 45'' | 72 °C x 2'30'' |
| 30 | 94 °C x 45'' | 56 - 62 °C x 45'' | 72 °C x 2'30'' |
| 1 | 94 °C x 45'' | 56 - 62 °C x 45'' | 72 °C x 10' |

3.4. Purificazione e concentrazione dei prodotti di PCR

Una successiva fase ha previsto la purificazione dei campioni di DNA dai residui di amplificazione, impiegando il kit NucleoSpin Extract fornito da Macherey-Nagel. Lo stesso kit è stato utilizzato anche per l'estrazione e la purificazione del DNA dal gel.

Il protocollo si basa sull'impiego di speciali buffer che in presenza di un'alta concentrazione di "chaotropic-salt", consente un adsorbimento selettivo e quantitativo degli acidi nucleici ad una membrana di silice, mentre le contaminazioni da sali e componenti macromolecolari sono rimossi da due lavaggi con buffer a base di etanolo. Infine, attraverso una semplice eluizione è stato possibile portare il DNA in soluzione.

Ottenuta la soluzione contenente DNA puro, si è passato alla quantificazione spettrofotometrica; inoltre il campione è stato controllato sul gel di agarosio (corsa di 30 minuti a 100 Volt), usando come tracciante bromuro di etidio, per accertare l'assenza di RNA e DNA contaminanti

3.5. Sequenziamento dei frammenti amplificati

Dai campioni ottenuti sono state ricavate aliquote contenenti in media 100 ng di DNA a cui sono state aggiunte 1,6 pmoli del primer corrispondente al frammento amplificato.

La soluzione è stata quindi inviata presso il Servizio di Sequenziamento del DNA – Istituto Nazionale di Apicoltura – di Bologna, che ha provveduto al sequenziamento del frammento d'interesse mediante il metodo enzimatico di Sanger (Sanger, 1988).

La sequenza ottenuta è stata quindi comparata con quelle riportate in letteratura e depositate alla GeneBank del National Center of Biotechnology Information (Altschul *et al.*, 1997).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

A tutt'oggi, in banca dati è possibile disporre della sequenza genomica del gene SERCA1 in *Zebra fish* (EMBL n° NW_001513009), del cDNA completo del gene SERCA1 di *Makaira nigricans*, che si estende per un tratto di 4091 bp (EMBL n°U65228), oltre che di diverse altre specie, ittiche e non.

Poche informazioni, invece, sono riportate per *Xiphias gladius*, del quale si dispone solo di una breve sequenza di trascritto pari a 390 nucleotidi (EMBL U58328).

Mediante il software DNAsis è stato possibile utilizzare le informazioni genomiche di *Zebra fish* per ottenere la suddivisione in esoni del cDNA del gene SERCA1 in *Makaira nigricans* e nelle poche sequenze disponibili di *Xiphias gladius*.

Grazie a tale approccio è stato stabilito che la struttura del gene SERCA1 in *Makaira nigricans* è simile per numero di esoni e loro grandezza a quella di *Danio rerio* e che la sequenza di *Xiphias gladius*, già depositata in banca dati, risulta corrispondere alle sequenze relative al 12°, 13° e 14° esone.

Tutte le informazioni acquisite sono state utilizzate sia per un corretto disegno dei primer su sequenze esoniche sia per l'amplificazione e successivo parziale sequenziamento del gene in *Xiphias gladius* e *Makaira nigricans*.

Utilizzando DNA genomico è stato amplificato il gene SERCA1 per un totale di circa 5,8 kb (figura 11) di due campioni di *Xiphias gladius* e di due di *Makaira nigricans*. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati su gel di agarosio.

Figura 11.

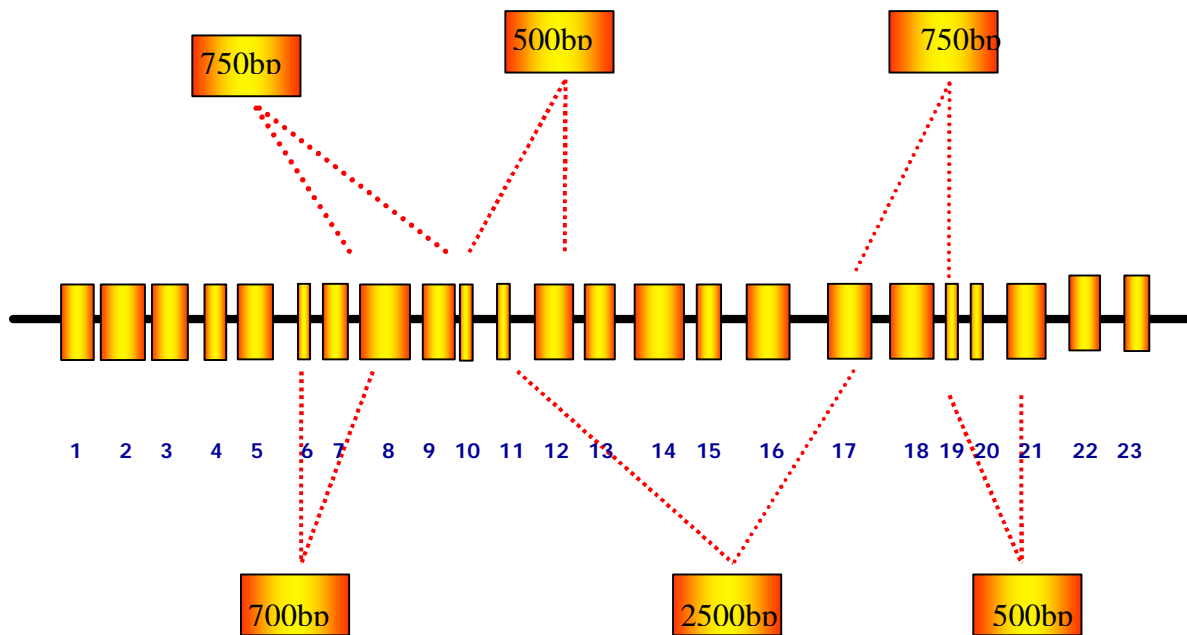


Figura 11: Frammenti amplificati del gene SERCA1 in *Xiphias gladius* e *Makaira nigricans*

Degli ampliconi relativi alle due specie prese in esame, si è proceduto al sequenziamento in entrambi i sensi (forward e reverse).

4.1. Analisi dei prodotti di amplificazione tra *Xiphias gladius* e *Makaira nigricans*.

L'analisi delle dimensioni degli ampliconi prodotti nelle due specie ha messo in evidenza diversi fenomeni di ricombinazione genica interspecie: inserzioni/delezioni.

In particolare il protocollo di amplificazione della regione compresa tra l'8° e il 10° esone, ha prodotto un amplicone di 500 bp e uno di 800 bp rispettivamente per *Xiphias gladius* e *Makaira nigricans* (foto 1), mentre tra il 17° e il 19° esone un amplicone di circa 800 bp per *Xiphias gladius* ed uno di circa 600 bp per *Makaira nigricans* (foto 2).

Infine, il fenomeno di ricombinazione genica più rilevante (350 bp) rispetto a quelli osservati nelle altre regioni amplificate si è realizzato tra l'11° ed il 17° esone. L'amplificazione del tratto compreso tra l'11° e il 17° esone per mezzo di PCR produce, infatti, frammenti di dimensioni di 2000 bp e 1650 bp rispettivamente per *Xiphias gladius* e *Makaira nigricans* (foto 3)

In base al parziale sequenziamento di tale tratto di DNA in *Makaira nigricans* sembrerebbe che tale fenomeno di delezione/inserzione si sia realizzato a livello del 15° o 16° introne.

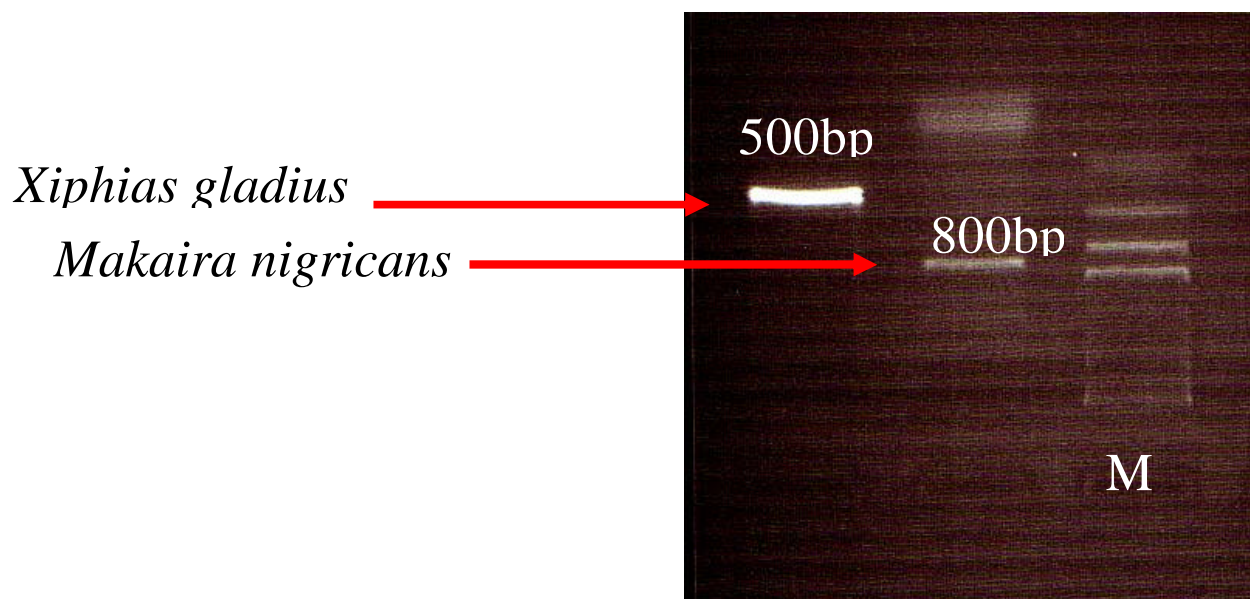


Foto 1: Tracciato elettroforetico del prodotto di amplificazione per mezzo di PCR del tratto di DNA compreso tra l'8° e il 10° esone del gene SERCA1 di *Xiphias gladius* e *Makaira nigricans*. M:Marker 1000 bp

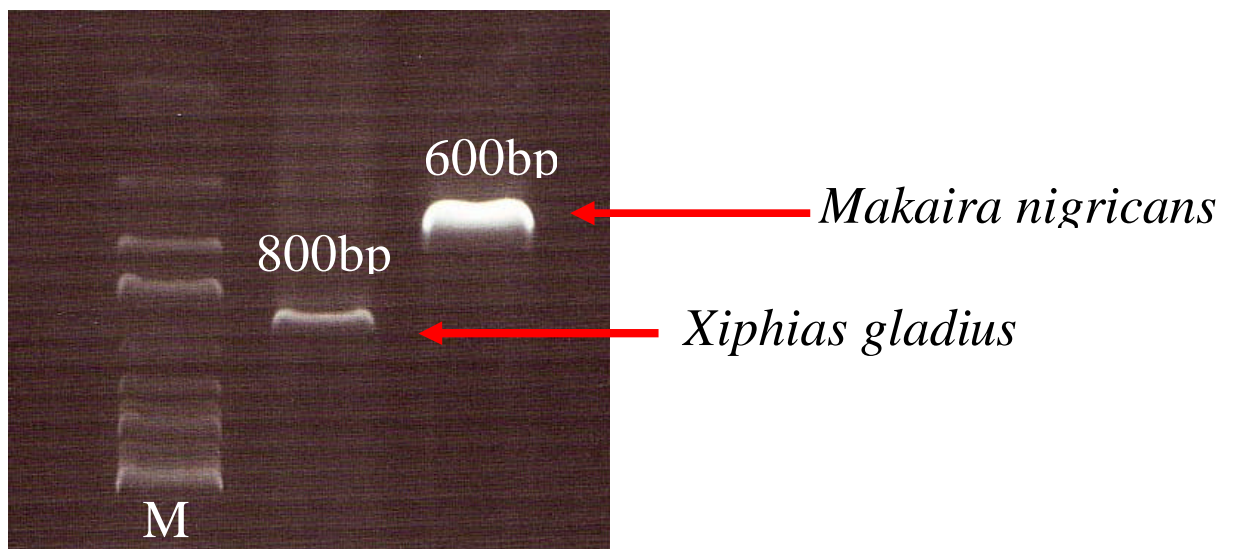


Foto 2: Tracciato elettroforetico del prodotto di amplificazione per mezzo di PCR del tratto di DNA compreso tra il 17° e il 19° esone del gene SERCA1 di *Xiphias gladius* e *Makaira nigricans*. M:Marker 1000 bp

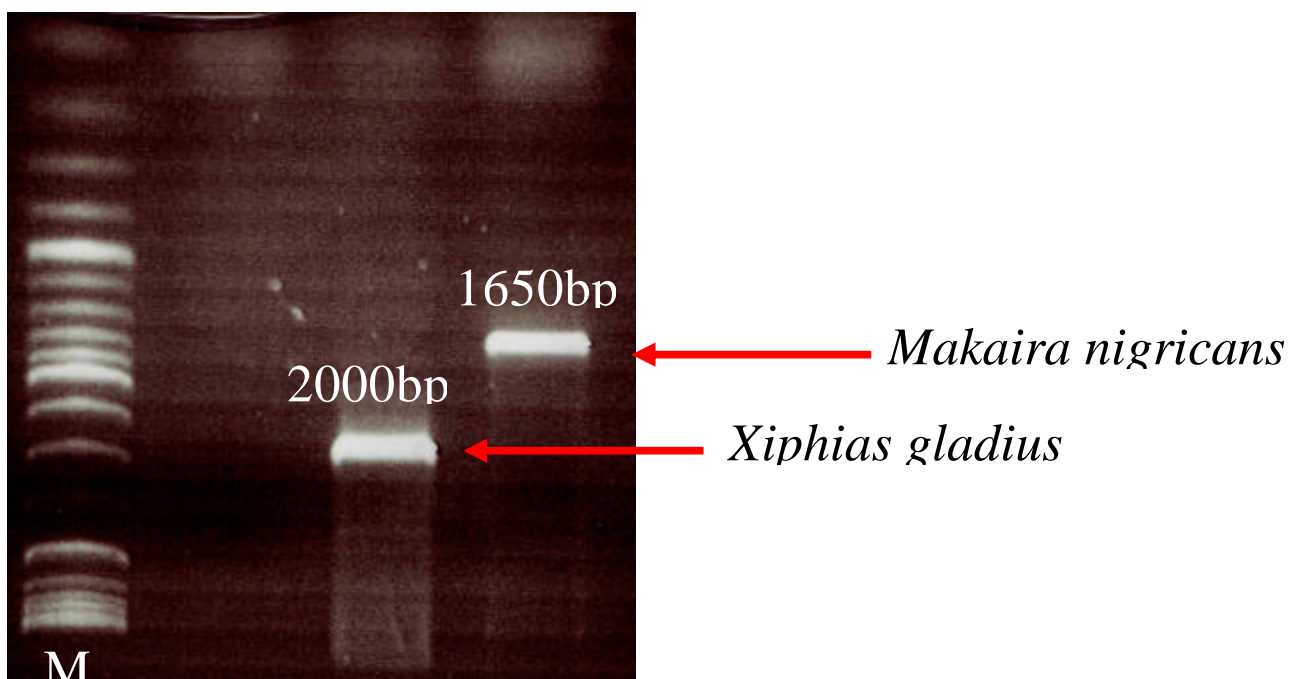


Foto 3: Tracciato elettroforetico del prodotto di amplificazione per mezzo di PCR del tratto di DNA compreso tra l'11° e il 17° esone del gene SERCA1 di *Xiphias gladius* e *Makaira nigricans*. M:Marker 100 bp

4.2 Preliminare Analisi Strutturale del gene SERCA1 in *Xiphias gladius*

Dei prodotti di amplificazione ottenuti dai due campioni individuali di DNA di *Xiphias gladius*, si è proceduto al sequenziamento in entrambi i sensi (forward e reverse). Attualmente è stato sequenziato circa il 60% dei 5,8 kb del DNA amplificato che corrispondono a circa il 30% dell'intera sequenza genomica.

In particolare, a tutt'oggi, per *Xiphias gladius*, è stata sequenziata la regione di DNA che va dal 6° all'8° esone (circa 698 bp), dal 105° nt del 10° introne al 46° nt del 15° introne (1319 bp), dagli ultimi 128 nt del 17° intr. ai primi 169 nt del 18° introne (492 bp), dal nt 2846 del 16° intr. al nt 2310 del 17° esone (362 bp) ed il tratto di DNA compreso tra gli ultimi 80 nt del 19° introne e i primi 85 nt del 21° esone (490 bp), per un totale di DNA genomico sequenziato di 3361 bp.

Dall'analisi delle sequenze ottenute, come atteso, il gene Serca1 in *Xiphias gladius* si caratterizza per una struttura simile a quella dell'omologo gene in *Danio rerio* con un rapporto pari ad 1 di G/C e di A/T.

4.2.1 Analisi delle regioni esoniche

A tutt'oggi sono state sequenziate circa 11 dei 23 esoni del gene SERCA1 in *Xiphias gladius* per un totale di 1652 bp e presentano un contenuto in G/C pari al 54.9% e in A/T pari al 45.1%.

La grandezza degli esoni va da un massimo di 299 bp (8° esone) ad un minimo di 86 bp (7° esone). Tutte le giunzioni di splice seguono la regola comune 5'GT/3'AG.

Attraverso l'utilizzo di un software, è stato possibile stabilire, per le intere regioni esoniche ottenute, la corrispondente sequenza aminoacidica.

Esone 7

```
5'  GT GAG TCC GTC AGT GTG ATC AAG CAC ACT GAG TCT GTT CCC GAT CCC AGA GCT GTC
      E  S  V  S  V  I  K  H  T  E  S  V  P  D  P  R  A  V
AAC CAG GAC AAG AAG AAC ATG CTT TTC TCT 3'
      N  Q  D  K  K  N  M  L  F  S
```

Esome 8

5' GGC ACC AAC ATC GCT GCT GGC AGG GCC GTC GGT GTG GCT GTG GCC ACC GGA GTC
G T N I A A G R A V G V A V A T G V
TCC ACT GAG ATT GGC AAG ATC CGT GAC CAG ATG GCT GCC ACC GAG CAG GAG AAG
S T E I G K I R D Q M A A T E Q E K
ACT CCT CTG CAG GCC AAG TTG GAC GAG TTC GGC GAG CAG CTG TCC AAG GTT ATC
T P L Q A K L D E F G E Q L S K V I
TCC CTA ATC TGC GTT GCT GTC TGG GCC ATC AAC ATC GGC CAC TTC AAT GAC CCC
S L I C V A V W A I N I G H F N D P
GTC CAT GGA GGC TCA TGG ATC CGT GGT GCT GTG TAC TAC TTC AAG ATC GCC GTC
V H G G S W I R G A V Y Y F K I A V
GCT CTG GCT GTG GCT GCC ATC CCT GAG G 3'
A L A V A A I P E

Esome 11

TCC CAG GGA GGT GCC AAG ACC AAC TGC AGT ACA TAC AAT GGC CTT GTT GAA CTC
S Q G G A K T N C S T Y N G L V E L
GCC ACT ATC TGC TCC CTG TGC AAC GAC TCC TCT CTG GAC TTC AAC AAG 3'
A T I C S L C N D S S L D F N K

Esome 12

GA AGG TTG GTG AGG CTA CTG AGA CTG CCC TGT GCT GCC TGG TTG AGA AGA TGA
K V G E A T E T A L C C L V E K M
ATG TGT TAA CAG CAA CGT GAA GAA CCT GTC CAA GAT TGA GAG AGC CAA CGC CTG
N V F N S N V K N L S K I E R A N A
CTG CAC A 3'
C T

Esome 13

GTG ATC AAG CAC CTC ATG AAG AAG AAC TTC ACT CTG GAG TTC TCC CGT GAC AGG
V I K H L M K K N F T L E F S R D R

AAG TCC ATG TCC GTG TAC TGC ACC CCA GCT AAG GGT GAT GGT GGT GCC AAG ATG
K S M S V Y C T P A K G D G G A K M

TCC GTG A
S V

Esome 14

GTG ATC AAG CAC CTC ATG AAG AAG AAC TTC ACT CTG GAG TTC TCC CGT GAC AGG
V I K H L M K K N F T L E F S R D R

AAG TCC ATG TCC GTG TAC TGC ACC CCA GCT AAG GGT GAT GGT GGT GCC AAG ATG
K S M S V Y C T P A K G D G G A K M

TCC GTG A 3'
S V

Esome 15

ACT GAT CTG ACC TTT GTT GGA TGC GTG GGT ATG CTG GAT CCC CCT CGT AAG GAG
T D L T F V G C V G M L D P P R K E

GTC ACT GGC TCC ATT GAG CTG TGT AGA GAT GCT GGA ATC CGT GTC ATT ATG ATC
V T G S I E L C R D A G I R V I M I

ACT G
T

Esome 18

ATC TTC CTG ACT GCT GCT CTG GGT CTG CCC GAG GCT CTG ATC CCC GTC CAG CTG
I F L T A A L G L P E A L I P V Q L

CTG TGG GTC AAC CTG GTG ACT GAC GGT CTG CCT GCC ACC GCT CTG GGC TTC AAC
L W V N L V T D G L P A T A L G F N

CCC CCT GAT CTG GAC ATC ATG GGC AAG CCC CCA CGT TCA CCC AGG GAG CCC CTG
P P D L D I M G K P P R S P R E P L

ATC TCT GGC TGG CTG TTC TTC AGA TAC ATG GCT ATT GGT GGT
I S G W L F F R Y M A I G G

Esone 20

```
CCC ACT TCA TGC AGT GCC ACA ATG AAA ACG AAG ACT TTG GCA ACA TCG ACT GTG
H F M Q C H N E N E D F G N I D C E

AAA TCT TTG AGG CTT CTC CTC CAA TGA CCA TGG CCC TTT CTG TGC TGG TCA CCA
I F E A S P P M T M A L S V L V T I

TTG AGA TGT GCA ACG CTC TCA ACA
E M C N A L N
```

Nessuna differenza è stata evidenziata tra le sequenze relative agli esoni 12, 13 e 14 del gene SERCA1 di *Xiphias gladius* presenti in banca dati e quelle ottenute durante la presente ricerca.

Come atteso dalla loro vicinanza filogenetica, il confronto tra le regioni esoniche ottenute per *Xiphias gladius* con quelle di *Makaira nigricans* presenti in Banca dati ed ottenute, evidenzia un'omologia decisamente alta.

La differenza con la sequenza di *Makaira nigricans* depositata è la diretta conseguenza di 85 mutazioni puntiformi 45 delle quali responsabili di 34 cambiamenti aminoacidici come riportato in tabella 8.

Tabella 8.

| Posizione rispetto all'esone | Esone | <i>Xiphias gladius</i> | | <i>Makaira nigricans</i> | |
|------------------------------|-------|------------------------|------------|--------------------------|------------|
| | | nt | aminoacido | nt | aminoacido |
| - | VI | - | - | - | - |
| - | VII | - | - | - | - |
| 23 | VIII | G | R | A | K |
| 28-30 | VIII | G-C | V | A-T | I |
| 40-42 | VIII | G-G | V | A-T | I |
| - | IX | - | - | - | - |
| - | X | - | - | - | - |
| 6 | XI | G | Q | T | H |
| 13-14 | XI | G-C | A | A-G | S |
| 31 | XI | A | A | G | A |
| 37-39 | XI | A-T | N | G-C | D |
| 67 | XI | T | S | G | A |
| 95 | XI | T | F | A | Y |
| 100 | XI | A | K | G | E |
| 9 | XII | T | N | G | K |
| 16 | XII | A | K | G | E |
| 104-105 | XII | A-G | K | G-A | R |
| 12 | XIII | C | H | G | Q |
| 205 | XIII | C | S | T | F |
| 1-2 | XIV | C-A | Q | A-A | K |
| 34-36 | XIV | A-T | T | G-C | A |
| 74 | XIV | A | N | G | S |
| 87 | XVI | T | D | G | E |
| 94 | XIV | T | L | A | M |
| 180 | XIV | T | D | G | E |
| 196 | XIV | G | D | T | Y |
| 212 | XIV | T | L | C | A |
| 7 | XV | C | L | A | M |
| - | XVI | - | - | - | - |
| 115 | XVII | T | Y | A | N |
| 152 | XVIII | G | R | A | K |
| - | XIX | - | - | - | - |
| 26-27 | XX | G-A | E | A-C | H |
| 39-40 | XX | G-G | G | A-C | T |
| 42-43 | XX | A-A | N | G-C | G |

| | | | | | |
|-------|-----|---|---|---|---|
| 45 | XX | A | E | C | V |
| 53-54 | XX | A | E | T | D |
| 45 | XXI | T | F | C | L |
| 56 | XXI | C | I | G | M |
| 57 | XXI | T | S | G | A |

Il confronto delle sequenze ottenute dai 2 campioni di *Xiphias gladius* presi in esame non ha evidenziato alcuna differenza nucleotidica.

4.2.2 Analisi delle regioni introniche

A tutt'oggi sono state sequenziate 13 regioni introniche che si estendono per un totale di 1709 bp. La grandezza degli introni esaminati è risultata piuttosto omogenea. In particolare trattasi di piccoli tratti il più grande dei quali è di appena 192 bp (20° introne).

Per quanto riguarda l'analisi delle sequenze introniche finalizzata alla ricerca di marcatori, sono state evidenziate in *Xiphias gladius* diverse sequenze microsatelliti.

I microsatelliti sono sequenze di nucleotidi ripetute nel genoma e ben conservate durante il processo evolutivo; sono pertanto considerati strumenti importanti negli studi di variabilità genetica in quanto altamente polimorfi ed utili marcatori molecolari.

La prima di tali ripetizioni trattasi di una sequenza continua di 25 T localizzata tra il nt 417 ed il nt 443 del 7° introne.(figura 12).

Figura 12.

Xiphias gladius GTAAGTGTCTACCATCATCAATAATCTAATAATCTTCACTGTTACAGCCATGTTTCA
AGCTTTTTCCTGTTATTTCCACCATTACCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
ACCTTCCTCCCCTACTCTCCTACCACAG

Figura 12: microsatellite individuato a livello del 7° introne in *Xiphias gladius*

Un'altra breve sequenza microsatellite (ripetizione GT) è stata individuata a livello del 16° introne tra i nt 3011/nt 3021. (figura 13).

Figura 12.

Xiphias gladius
GTCTGTAGTG TCTTTGGGCA AGATACTGAA CCCCAAATCG CCCCCGATGT
GAATGTGTGT GGACATAAAG CGCTGTTCGT ATAGAAAAGC GCTGTATTAA
TGTGTGTGTA ATGGCTGAA TGTGCCATTC ACTGCACTTT GAGTGGTCGA
TAAGACTAGA AAAGCACCAT ATAAGTGCAAG TCCATTTACC ATTTGTGCTT

Figura 13: microsatellite individuato a livello del 16° introne in *Xiphias gladius*

Da un'indagine preliminare realizzata per mezzo di elettroforesi su gel non denaturante di poliacrilammide (12%) di prodotti di PCR non è stato evidenziato a tutt'ora un polimorfismo di tali microsatelliti nella specie *Xiphias gladius*

Il confronto delle sequenze ottenute dai 2 campioni di *Xiphias gladius* presi in esame non ha evidenziato alcuna differenza nucleotidica.

4.3 Preliminare Analisi Strutturale del gene SERCA1 in *Makaira nigricans*

Dei prodotti di amplificazione ottenuti si è proceduto al sequenziamento in entrambi i sensi (forward e reverse) di due campioni individuali di DNA di *Makaira nigricans*. Attualmente è stato sequenziato circa il 20% dei 5,8 kb amplificati

In particolare, a tutt'oggi, per *Makaira nigricans*, è stata sequenziata la regione di DNA che va dal 7° esone al 230° nt dell'8° esone (circa 500 bp), dal 15° nt dell'11° introne al 21° nt del 12° introne (circa 240 bp) dal 161° nt del 12° introne al 60° nt del 14° esone (circa 300 bp), dal 71° nt del 17° introne al 10° nt del 18° introne (circa 270 bp) per un totale di circa 1300 bp.

4.3.1 Analisi delle regioni esoniche

Delle 23 regioni esoniche che costituiscono il gene, a tutt'oggi ne sono state caratterizzate 5 che si estendono per un tratto di DNA di circa 750 bp e che presentano un contenuto in G/C pari al 55,4% e in A/T pari al 44,6%.

Il confronto delle sequenze ottenute dai 2 campioni di *Makaira nigricans* presi in esame non ha evidenziato alcuna differenza nucleotidica.

Diverse mutazioni puntiformi, invece, sono state individuate analizzando le sequenze relative ai campioni di *Makaira nigricans* esaminati e quella depositata in banca dati (EMBL n° di accesso U65228). Tale confronto, infatti, ha messo in

evidenza 7 differenze nucleotidiche, 3 delle quali responsabili di cambiamenti aminoacidici. (tabella 9).

Tabella 9.

| Esone | | <i>Makaira nigricans</i> oggetto di studio | | | <i>Makaira nigricans</i> depositato in banca dati (EMBL n° di accesso U65228) | | |
|-------|------------------------------------|---|-----|------------------------------------|---|-----|--|
| N° | Posizione rispetto alla Met. | Mutazione | aa | Posizione rispetto alla Met. | Mutazione | aa | |
| 8 | 220 | ATT | Val | 220 | GTT | Ile | |
| 8 | 242 | ACC | Thr | 242 | ACT | Thr | |
| 8 | 276 | ATC | Ile | 276 | ATT | Ile | |
| 12 | 455 | AGC | Ser | 455 | AAC | Asn | |
| 18 | 806 | GAC | Asp | 806 | GAT | Asp | |
| 18 | 835 | GGT | Gly | 835 | GGA | Gly | |
| 18 | 836 | TAC | Tyr | 836 | AAC | Asn | |

Tabella x: confronto delle differenze esoniche.

4.3.2 Analisi delle regioni introniche

Attualmente sono state sequenziate 4 regioni introniche per un totale di circa 550 bp.

La struttura degli introni di *Makaira nigricans* è simile a quella osservata per *Xiphias gladius* fatta eccezione per il tratto di DNA che contiene il 7° introne. Infatti, il sequenziamento di tale introne ha messo in evidenza un fenomeno di ricombinazione genica rappresentato da una delezione di 27 nt in *Makaira nigricans* rispetto a *Xiphias gladius*. 10 di questi 27 nucleotidi rappresentano la serie di timine che caratterizza la sequenza microsatellite in *Xiphias gladius*. Di conseguenza il microsatellite in *Makaira nigricans* risulta più corto e degenerato poiché intervallato da A. (figura 14)

Figura 14

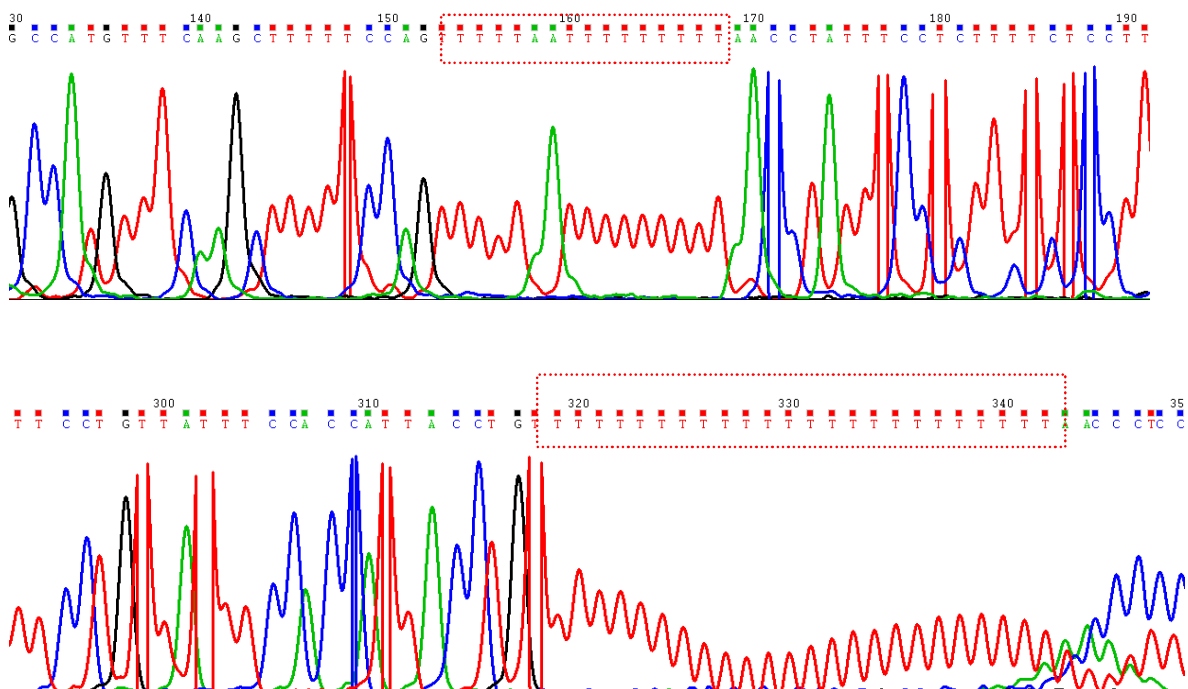


Figura 14: Elettroferogrammi ottenuti dal sequenziamento dell'introne 7 di *Makaira nigricans* e *Xiphias gladius*

4.4. Messa a punto di metodiche per la rintracciabilità di *Xiphias gladius* in prodotti alimentari

Per la messa a punto di una metodica basata sull'applicazione di tecniche di biologia molecolare, che consenta di individuare la presenza/assenza di *Xiphias gladius* e *Makaira nigricans* in prodotti alimentari è stato preso in esame il marcatore individuato nel tratto di DNA che va dal 15° al 17° esone del gene SERCA 1.

L'indagine sui campioni di DNA individuali disponibili (14 di pesce spada e 2 di blue marlin), per mezzo di PCR, ha mostrato che il marcatore individuato è costante tra le due specie e, conseguentemente, variabile tra queste.

La presenza di un polimorfismo intraspecie è causa di una misinterpretazione e, pertanto, invalidante la messa a punto di una metodica molecolare per una corretta e non ambigua determinazione qualitativa delle componenti animali in un preparato alimentare.

Pertanto, la presenza/assenza dell'inserzione tra il 15° e il 17° esone può rivelarsi un utile strumento per accurate e rapide analisi molecolari per la rintracciabilità di *Xiphias gladius* in prodotti alimentari.

Come applicazione di tale protocollo, durante lo svolgimento della presente ricerca sono stati analizzati prodotti quali patè e bottarga di *Xiphias gladius*.

È stato inoltre analizzato un campione di filetto con denominazione commerciale ingannevole, in quanto, in etichetta è riportata la dicitura "Pesce spada"

– “Marlyn” che fa riferimento contemporaneamente alle due specie prese in esame.
(foto 2).

Foto 4



Foto 2: Etichetta con denominazione ingannevole

Il DNA genomico estratto dal tessuto del campione sospetto è stato amplificato mediante lo specifico protocollo di PCR messo a punto, insieme ad un campione di *Xiphias gladius* e di *Makaira nigricans* certi.

È stato, inoltre, valutata la sensibilità del metodo per l'identificazione della specie in miscele di DNA. A tal fine è stata realizzata una reazione di PCR su una mistura di DNA di blue marlin e pesce spada con concentrazioni comprese tra 0.1, 0.5, 1, 5, 10 e 100% (?g/?g) del DNA di ogni singola specie. È stato osservato che più bassa era la percentuale di DNA di una delle 2 specie nella miscela, più debole era la banda elettroforetica dell'amplicone prodotto con un limite di risoluzione pari allo 0,01% di template iniziale.

Mediante successiva visualizzazione su gel di agarosio degli ampliconi prodotti, è stato possibile osservare che i 3 campioni analizzati producevano due pattern elettroforetici differenti. In particolare, quello prodotto dal campione con etichettatura ingannevole, si caratterizzava esclusivamente per la presenza di una banda elettroforetica della stessa dimensione di quello prodotta da *Makaira nigricans* (foto 5)

Foto 5

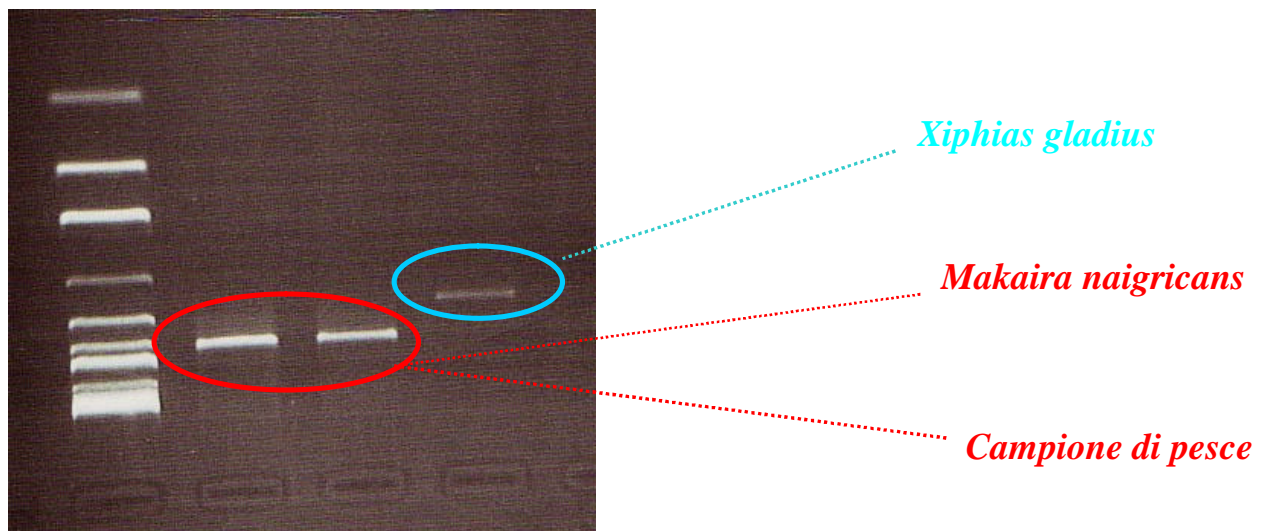


Foto 5: Tracciato elettroforetico di un campione di *Xiphias gladius*, *Makaira nigricans* e di un pesce di origine incerta.

Tale metodica ha permesso di stabilire che il prodotto congelato apparteneva alla specie *Makaira nigricans* e non *Xiphias gladius* come la dicitura in etichetta poteva erroneamente far credere al consumatore.

5. CONCLUSIONI

Utilizzando DNA genomico è stato amplificato il gene SERCA1 per un totale di circa 5,8 kb di due campioni di *Xiphias gladius* e due di *Makaira nigricans*.

A tutt'oggi sono state sequenziate circa 11 dei 23 esoni del gene SERCA1 in *Xiphias gladius* per un totale di 1652 bp e 13 regioni introniche che si estendono per un tratto di 1709 bp, per un totale di 3361 bp. In *Makaira nigricans*, invece, sono state caratterizzate 5 regioni esoniche (circa 750 bp) e 4 regioni introniche (circa 550 bp) per un totale di circa 1300 bp.

In *Xiphias gladius* e in *Makaira nigricans* il gene SERCA 1, relativamente alle regioni sia esoniche che introniche sequenziate, mostra un'organizzazione molto simile a quella dell'omologo gene in *Zebra fish*, con alcune differenze soprattutto sulla dimensione delle regioni introniche.

Le sequenze esoniche ottenute hanno evidenziato un'omologia molto alta con le rispettive regioni di *Makaira nigricans* depositate (98.4%), come atteso dalla loro vicinanza filogenetica.

Nell'ambito dei campioni analizzati, mentre sono state evidenziate differenze nella sequenza esonica di *Makaira nigricans* sequenziata e quella depositata, non è stata evidenziata alcuna differenza all'interno della specie *Xiphias gladius*. Tuttavia, nell'ambito di quest'ultima specie, sono state individuate diverse sequenze microsatelliti (stretch di T e ripetizioni GT, realizzate rispettivamente al 7° e 16° introne). Questi polimorfismi potrebbero rappresentare utili marcatori per una

rintracciabilità intraspecie dei prodotti ittici, ad esempio soggetti pescati in diverse zone FAO.

Inoltre, il confronto tra i prodotti di amplificazione del gene SERCA1 delle due specie e il confronto tra le sequenze ottenute e disponibili in banca dati ha evidenziato diversi polimorfismi interspecie, quali sostituzioni nucleotidiche esoniche e delezioni/inserzioni introniche, utili marcatori genetici per la messa a punto e l'applicazione di validi strumenti per differenziare *Xiphias gladius* da *Makaira nigricans*.

L'avvento delle moderne biotecnologie e i notevoli progressi effettuati nel campo della genetica rendono le tecniche di biologia molecolare le procedure più impiegate per la rintracciabilità dei prodotti. Il principale vantaggio è rappresentato dal fatto che tali tecniche sono particolarmente sicure come conseguenza della stabilità delle molecole di acidi nucleici, rispetto alle proteine e ai tessuti, superando quindi i limiti delle precedenti analisi. Il DNA risulta, infatti, alquanto stabile alle elevate temperature, pressioni e trattamenti chimici, comunemente utilizzati nelle preparazioni alimentari. Il DNA rappresenta una utile fonte di informazione sulla quale sviluppare saggi diagnostici per mettere a punto sistemi di tracciabilità genetica, e rintracciabilità dei prodotti alimentari

I sistemi di rintracciabilità basati sulle analisi molecolari, si confermano utili per risolvere alcune controversie che possono nascere per identificare la specie ittica originale da cui sono stati ricavati i tranci, i filetti o altre parti anatomiche.

Prodotti ittici pregiati sono spesso sostituiti con specie ittiche di minore pregio commerciale la cui identificazione, mediante una buona conoscenza delle caratteristiche morfologiche, risulta spesso difficile soprattutto quando il prodotto è trasformato. Nello specifico, la frode di sostituzione di *Makaira nigricans* spacciato per *Xiphias gladius* è molto frequente soprattutto quando il prodotto è affumicato. Durante i processi di trasformazione, i colori del prodotto vengono attenuati rendendo impossibile il riconoscimento della specie mediante analisi macroscopica.

Attualmente esistono kit molecolari per l'identificazione di alcune specie quali salmone, tonno, merluzzo e gamberi.

Tali kit sono stati realizzati per individuare fra le numerose specie in commercio il prodotto fresco, lavorato o, addirittura, già cucinato.

Attraverso l'analisi del DNA delle diverse specie di gambero, ad esempio, è stato studiato un particolare gene presente in tutti i crostacei ed individuate delle differenze che consentono di risalire alla specie di origine.

La messa a punto di un sistema efficiente di rintracciabilità dei prodotti ittici, garantita dalle analisi molecolari, può sicuramente conferire un valore aggiunto ai prodotti di origine animale contribuendo a favorirne l'espansione del mercato.

Inoltre, la disponibilità di test diagnostici accurati e di costo sostenibile come quello sviluppato nel corso della presente ricerca, fornisce a consumatori e ad Enti preposti al controllo un ulteriore strumento per garantire la sicurezza degli alimenti di origine animale.

6. BIBLIOGRAFIA.

Abitia-Cardenas, L., F. Galvan-Magaña, F. Gutierrez-Sanchez, J. Rodriguez-Romero, B. Aguilar-Palomino. 2000. Diet of blue marlin *Makaira mazara* off the coast of Cabo San Lucas, Baja California Sur, Mexico. *Fisheries Research*, 44: 95-100.

Albers RW, (1967) Biochemical Aspets of Active Transport. Annual Review of Biochemistry, 36: 727-56.

Apell HJ, (2003) Structure-function relationship in Ptype ATPases a biophysical approach. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 150:135

Barlett, S. E.; Davidson, W.S. FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing), (1992): A procedure for identifying the animal origin of biological specimens. BioTechniques 12, 408-411

Bellagamba F., Moretti VM., Comincini S., Valfre F. (2001). Identification of species in animal feedstuffs by PolYmerase Chain Reaction, AgricFood Chem. 49.

Bemjamin, Lewin, (2003) Il Gene VI.

Bini G., 1967-68 – Atlante dei Pesci delle coste italiane. Mondo sommerso Editrice.
Vol. I-IX.

Bond C.E.- Biology of Fish. Saunders College Publishing

Cappelli P.; Vannucchi V., (2002) Analisi Chimica Degli Alimenti Ed. Zanichelli
443-447

Carnevale, E.; Marletta L., (2002) Banca Dati di Composizione degli Alimenti
INRAN.

Cataudella S., Bronzi P., Acquacoltura responsabile: verso le produzioni del terzo
millennio: Unimar-Uniprom, 348-379

Cespedes A. et al., (1999), J Food Protein, 62, 1178-1182

Cespedes et al., (1999) J. AOAC, Int., 82, 903-907

Civera T., Parisi E., (1996), Annotazioni per una corretta identificazione di specie
di alcuni Gadidi salinati Il Pesce, n. 3, 61, ed. Pubblicità Italia, Modena

Colombo M., Renon P., (1998) Scansione elettronica e procedimento di chiarificazione delle lastre di gel di poliacilammide (PAGPlate©) utilizzate per la isoelettrofocalizzazione (IEF), *Ingegneria Alimentare*, n. 1, 24.

Colombo M.M., Colombo F., Biondi P.A., Malandra R., Renon P. (2000), Substitution of fish species detected by thinlayer isoelectric focusing and a computer-assisted method for evaluation of gel, *Journal of Chromatography A*, 880, 303.

Comi G. (2004). Prodotti ittici In: *Chimica degli Alimenti*. Cabras P., Martelli A. (ed). Piccin Nuova Libreria s.p.a., Padova

Commissione Delle Comunità Europee. Libro Bianco sulla sicurezza Alimentare Bruxelles 12 gennaio **2000**

Decastelli L.; Modena C., Lai J., Bottro MT., Ferrari A., Sant S., Gorla M., Squadrone S. (2004). Detection of animal DNA in feedstuffs by Polymerase Chain

Dorjsuren D, Lin Y., Wei W., Yamashita T., Nomura T., Hayashi N., Murakami S. (1998). *Mol. Cell. Biol.*, 18, 7546-7555.

Engling FP.; Jorgensen JS., Paradies-Severin I., Hahn H. (2000). Evidence of animal meal in feeds – Nachweis von Tiermehl in Futtermitteln. Kraftfutter/Feed Magazine 100.

Falson P., Menguy T., Corre F., Bouneau L., de Gracia AG., Soulie S., Centeno F., Moller JV. (1997). J. Biol. Chem., 272, 17258-17262

Ferguson, A.; Taggart, J. B.; Prodohl, P.A.; McMeel, O.; Thompson, C.; Stone, C.; McGinnity, P.; Hynes, R. A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations. J. Fish Biol. 1995, 47 (Suppl.A), 103126.

Froese R., Pauly D. F.(2003), *Fish Base. World Wide Web electronic publication*.<http://www.fishbase.org/>, version 17 February 2004.

Garcia M., De Thè H., Tiollais P., Samarut J., Dejean A. (1993). Cell Biol., 90, 89-93.

Gazzetta Ufficiale Della Comunità Europea Regolamento CE 1760/2000. **17 luglio 2000**

Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee Regolamento CE 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio **28 Gennaio 2002**

Graves, J., J. McDowell. 1995. Inter-ocean genetic divergence of istiophorid billfishes. *Marine biology*, 122: 1179-1196.

Gramitto M., (2001), In: GRAMITTO M. E. (*ed*). La gestione della pesca marittima in Italia. Fondamenti tecnico-biologici e normativa vigente Monografie Scientifiche. Consiglio Nazionale delle Ricerche.81-148.

Hold, G. L.; Russell, V.J.; Pryde, S. E.; Rehbein, H.; Quinteiro, J.; Vidal, R.; Rey Mendez, M.; Sotelo, C.; Perez-Martin, R. L.; Santos, A. T.; Rosa, C. Development of a DNA-Based method aimed to identifying the fish species in food products. *J. Agric. Food Chem* 2001, 49, 1175-1179.

Jerome, M.; Lemaire, C.; Bautista, J. M.; Fleurence, J.; Etienne, M. Molecular phylogeny and species identification of sardines. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 43-50.

Loftus R. (2005). Traceability of biotech-derived animals: application of DNA technology, *Revue scientifique et technique*; 24 (1): 231-42.

Malandra R., Renon P. - Le principali frodi dei prodotti della pesca- VLU - Libreria Universitaria Multimediale Milano

Marko, P. B.; Lee, S. C.; Rice, A.M.; Gramling, J.M.; Fitzhenry, T.M.; McAalister, J.S.; Harper G.R.; Moran, A.L. Mislabelling of a depleted reef fish. *Nature* 2004, 430, 309-310.

Meyer, R.; Candrian, U. PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 199, 29, 1-9.

Morrisette JM, Franck JP, Block BA. (2003). Characterization of ryanodine receptor and Ca(2+)-ATPase isoforms in the thermogenic heater organ of blue marlin (*Makaira nigricans*), *The Journal of Experimental Biology*; 206, 80512.

Mortonosi A., Pikula S., (2003). The structure of the Ca⁺⁺ - ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Acta BiochimPol*, 50: 337-65.

Nakamura, I. 1985. FAO species catalogue. Vol.5. Billfishes of the World. An annotated and illustrated catalogue of marlins, sailfishes, spearfishes and swordfishes known to date. Rome: United Nations Development Programme Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Nelson J.S., 1994 – Fishes of the world. Third Edition. John Wiley & Sons, inc., New York, 600 pp.

NMFS, "A Short Summary of the Recreational Fishing Regulations for Highly Migratory Species" (On-line). Accessed November 7, 2002 at http://animaldiversity.ummz.umich.edu/local/redirect.php/http://www.nmfs.noaa.gov/sfa/hms/rec_info.htm

Palumbi, S. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction in Molecular Systematics; Hillis, D. M., Mortiz, C., Mable, B. K., Eds.; Sinauer: Sunderland, MA, 1996.

Pellegrino C., Parisi E., Ponzoni N., Sibour M., (1986), L' isoelettrofocalizzazione come metodo per identificare i prodotti ittici, Summa, 3, 4, 263.

Poli G., S. D'Aubert, C. Cantoni (1971), Identificazione di *Lophius piscatorius* (coda di rospo) e *Uranoscopus scaber* L. (lucerna) mediante tecnica di gel diffusione in agarose, Ind. Alim., 78, novembre, 12.

Renon P., Bernardi C., Malandra R., Biondi P.A. (2005). Isoelectric focusing of Sarcoplasmic proteins to distinguish swordfish, blue marlin and mediterranean spearfish. Volume 16, 5, 473-477.

Renon P., Malandra R., Colombo M.M., Biondi P.A., (1998), Riconoscimento in filetti mediante IEF (Isoelectric Focusing) *Ingegneria Alimentare*, n. 3, 16.

Renon P., Colombo M.M., Gusmeroli L., Malandra R. (2000), IEF (Isoelectric focusing) e problematiche sulle specie ittiche *Il Pesce*, n. 6, dicembre 2000, 84, ed. Pubblicità Italia, Modena.

Renon P., Colombo M.M., Colombo F., Malandra R., Biondi P.A. (2001), Computer assisted evaluation of isoelectric focusing patterns in electrophoretic gel: identification of smoothhounds (*Mustelus mustelus*, *Mustelus asterias*) and comparison with value shark species, *Electrophoresis*, 22, 1.

Sambily V.C. JR. (1990), Interrelationships between swimming speed, caudal fin aspect ratio and body length of fishes *Fishbyte* 8 (3) : 16-20.

Secchi C. et al., *Archivio Veterinario Italiano*, 33, 5-6.

Sotelo C.; Gallardo J. M.; Perez-Martin, R.L. Fish species identification in seafood products. *Trends Food Sci. Technol.* 1993, 4, 395-401.

Sotelo, C. G.; Calo-Mata, P.; Chapela, Ma.J.; Perez-Martin, R. I.; Rehbein, H.; Hold, G. L.; Russel, V. J.; Pryde, S. E.; Quinteiro, J.; Izquierdo, M.; Rey-Mendez, M.; Rosa, C.; Santos, A.T. Identification of flatfish (Pleuronectiforme) species using DNA-based techniques. *J. Agric.Food Chem.* 2001, 49, 4562-4579.

Stangl GI--Conjugated linoleic acids exhibit a strong fat to lean partitioning effect, reduce serum VLDL lipids and redistribute tissue lipids in foodrestricted rats. *J.Nutr.* 2000 May; 130 (5): 1140-6.

Stokes DL, Green NM, (2003) Structure and function of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Annu. Rev. Biophys Biomol Struct* 32: 445-68

Tullis A.; Block BA. Expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)ATPase isoforms in marlin and swordfish muscle and heather cells. *The American journal of Physiology*, 1996 Jul; 271 (1 Pt 2): R262-75

Tepedino et al., 2001, J. AOAC 84(5), 1600-1607

Tepedino et al., 2000, Il Pesce, 1, 85-105

Terio E., Tiecco G., Tantillo G., (1985), Focalizzazione isoelettrica ed elettroforesi delle proteine sarcoplasmatiche di Thunnus alalunga, Thunnus albacares e Sarda sarda, Ind. Alim., gennaio, 8.

Tibaldi E., Lanari D., D'Agaro e., Ballestrazzi R. (2001). Nutrizione in acquacoltura. Acquacoltura Responsabile. UNIMAR-UNIPROM, pp. 144-153.

Wolf, C.; Burgener, M.; Hubner, P.; Luthy J. PCR-RFLP analysis of DANN: Differentiation of fish species. Lebensm. Wiss. Technol. 2000, 33, 144-150.