

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICOII

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ZOOTECNICHE ED ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI



TESI DI DOTTORATO

IN

Produzione e sanità degli alimenti di Origine Animale

XXI CICLO

METODI DI IDENTIFICAZIONE DI SPECIE IN MOLLUSCHI BIVALVI

Tutor:

Prof.ssa Tiziana Pepe

Coordinatore:

Prof.ssa Maria Luisa Cortesi

Candidata:

Dott.ssa **Ines Vincenti**

Anni Accademici

2005-2008

INDICE

1. Introduzione	pag. 4
Il commercio dei prodotti ittici	pag. 4
Riferimenti legislativi e criteri di freschezza	pag. 11
I molluschi nell'alimentazione umana	pag. 36
Frodi alimentari	pag. 38
Criteri di identificazione di specie in prodotti della pesca	pag. 41
Tecniche di biologia molecolare per l'identificazione di specie	pag. 46
Caratterizzazione del DNA satellite per l'identificazione di specie in molluschi bivalve	pag. 49
Identificazione di specie mediante ITS1 e ITS2	pag. 53
2. I Bivalvi	pag. 56
Biologia dei molluschi	pag. 59
3. Scopo della ricerca	pag. 84
Materiali e Metodi	pag. 86
3. Risultati e discussioni	pag. 101

4. Conclusioni

pag. 120

5. Bibliografia

pag. 125

INTRODUZIONE

IL COMMERCIO DEI PRODOTTI ITTICI

Il commercio dei prodotti ittici ha registrato, negli ultimi dieci anni, un considerevole incremento sia in campo nazionale che internazionale. La maggiore richiesta interessa pesci, crostacei e molluschi sia freschi che congelati, oppure sottoposti a differenti processi di lavorazione (affumicamento, salagione, ecc.).

Tale tendenza può essere attribuita a diversi fattori tra loro concomitanti nel determinare una rapida crescita della domanda e, come conseguenza, dell'offerta.

È da considerare che la crescente affermazione di sistemi di vendita *on-line* e di mercati ittici elettronici, ha notevolmente ampliato la capacità di offerta degli operatori, grazie anche alle economie di scala determinate dall'ampliamento dei mercati, accrescendo le potenzialità d'acquisto dei consumatori.

Inoltre, ha contribuito ad orientare le scelte dei consumatori la maggiore e sempre più diffusa educazione alimentare e la conseguente rinnovata attenzione al livello qualitativo dei prodotti posti in commercio.

All'affermazione del prodotto ittico come componente della dieta quotidiana, hanno contribuito in modo determinante le sue qualità intrinseche, ovvero "l'insieme delle proprietà e delle caratteristiche che influenzano l'accettabilità per il consumatore finale" (Howgate, 1982), proprietà ben attribuibili ai prodotti della pesca.

Infatti, tali prodotti sono attualmente percepiti dal consumatore come alimenti in sé sani e dietetici, di elevato valore nutritivo.

In particolare, l'ampia versatilità di presentazione (sgusciati, surgelati, precotti), è funzionale ai tempi ed alle modalità di preparazione dei pasti, imposti dagli attuali ritmi di vita e di lavoro. Inoltre, sotto l'aspetto dietetico, tra i prodotti ittici, i molluschi sono dotati di caratteristiche nutrizionali più che apprezzabili, in quanto composti da:

- 66% d'acqua;
- 15-24% di proteine ad alto valore biologico;
- 0,1-22% di acidi grassi, di cui 80% insaturi; tra quest'ultimi assumono rilevanza gli "omega tre", che agendo come depressori sull'attività piastrinica, conferiscono benefici al distretto cardiovascolare; essi, infatti, determinano la diminuzione del Trombossano (TXA₂), che esercita attività anti-aggregante, e l'aumento della prostaciclina PG₁₃ fortemente antiaggregante e vasodilatatrice;

- 0,8-2% di elementi minerali tra cui fosforo, iodio, calcio e fluoro;
- presenza di alcune vitamine;
- modesta percentuale di estratti inazotati.

Gli aspetti dietetici e nutrizionali legati al consumo di molluschi sono in grado di incidere sullo stato di salute dell'uomo.

E' noto che nelle popolazioni eschimesi della Groenlandia, dove il consumo di prodotti della pesca è elevato (oltre 400 grammi/pro-capite/giorno) la mortalità per coronopatie è notevolmente bassa. Ciò sembra dovuto ad una scarsa trombogenicità piastrinica, caratterizzata da una ridotta tendenza all'aggregazione "in vitro" e ad un notevole allungamento del tempo di sanguinamento. Inoltre, si è potuto evidenziare come la somministrazione di olio di pesce sia in grado di modificare l'assetto lipidico e lipoproteico nell'uomo con riduzione dei livelli di colesterolo totale e LDL-colesterolo.

Si è riscontrato, inoltre, un abbassamento del 30% del valore plasmatico dei trigliceridi ed un aumento di HDL-colesterolo .

E' noto che gli acidi grassi "omega-3" hanno effetti benefici nella prevenzione primaria e secondaria dell'aterosclerosi ed effetto antiaritmico sulla frequenza cardiaca per la quale è nota l'affermazione "maggiore variabilità cardiaca, maggiore sanezza".

A conferma dell'importanza economica mondiale che sta assumendo il consumo dei prodotti ittici la FAO ha indicato negli ultimi anni un incremento nella produzione di pesci, crostacei e molluschi rispetto agli anni precedenti.

La FAO prevede che entro l'anno 2010 si assisterà ad un forte incremento della produzione ittica sino a raggiungere un quantitativo di 107-144 milioni di tonnellate di prodotto.

Per l'Italia l'I.C.R.A.M. (Istituto Centrale per la Ricerca Scientifica e Tecnologica Applicata al Mare) ha rilevato un aumento del commercio del complesso dei prodotti ittici su scala nazionale, registrando un consumo pro-capite in crescita dall'inizio del nuovo millennio

Dati più recenti del Ministero per le Politiche Agricole italiano descrivono i consumi di molluschi sottoposti a trattamenti di preparazione pari a 1.3 kg pro-capite (pari a 50.000 t/anno) contro un media europea 3.2 kg pro-capite, lasciando intravedere le potenzialità di espansione di questo settore del commercio dei prodotti ittici.

Occorre sottolineare che taluni fenomeni collettivi hanno contribuito a spingere in alto la domanda di prodotti ittici. E' il caso della maggiore richiesta riscontrata nel periodo novembre 2000/gennaio 2001, quando allarmismo, disinformazione e timore di contrarre la variante umana della BSE (malattia di Creutzfeld-Jacob) hanno determinato un netto cambiamento

delle dinamiche d'acquisto dei consumatori a tutto vantaggio dei prodotti ittici ed a svantaggio dei prodotti carnei.

Infatti, come riportato da un'indagine periodica condotta dall'I.S.M.E.A. in collaborazione con l'istituto NIELSEN, si è rilevato un aumento del 12,9% nel mese di novembre 2000 rispetto all'anno precedente ed un forte balzo nel mese di gennaio 2001 con un incremento pari al 16,9% per il pesce fresco e congelato ed al 26,2% per i prodotti trasformati.

A fronte di questi elevati trend di crescita della domanda interna la produzione nazionale di prodotti ittici non è stata tale da soddisfare la domanda interna e, contemporaneamente, sostenere l'esportazione. Come si evidenzia da dati ISTAT, per soddisfare la domanda del mercato nazionale si è avuta la necessità d'importazione del 22% del consumo totale dei prodotti ittici per le categorie dei prodotti sgusciati e congelati.

Ciò ha comportato l'ingresso di nuove specie, non usuali sui nostri mercati, per le quali spesso non esiste la denominazione in lingua italiana e che possono essere vendute in luogo di specie più comuni e maggiormente apprezzate e richieste dal consumatore.

Appare evidente che il transito sul mercato di partite di derrate alimentari ittiche di considerevole entità non può che esigere adeguati controlli, che, nell'intento primo di tutelare il consumatore, possano garantire

le qualità sensoriali, nutrizionali, funzionali e microbiologiche che hanno, nel passato recente, determinato lo sviluppo e l'affermazione del prodotto ittico nella dieta del consumatore italiano ed europeo.

D'altra parte, a seguito dell'entrata in vigore dei nuovi Regolamenti comunitari, l'insieme del settore industriale agro-alimentare europeo si trova nella necessità di dovere affrontare la concreta realizzazione di un sistema di controllo affidabile della sicurezza e della qualità degli alimenti, dalla produzione delle materie prime alla distribuzione del prodotto finale destinato al consumatore.

Solo l'attuazione ed il conseguimento di tale obiettivo permetterà di fornire reali garanzie di sicurezza, salubrità e qualità degli alimenti al consumatore e di consolidare le posizioni raggiunte sul mercato dei prodotti alimentari (Reg.(CE) N.178/2002).

Sinora la sicurezza degli alimenti, pur garantita per legge, non è stata sempre assicurata, soprattutto a causa di specifiche manchevolezze nei sistemi di controllo lungo la filiera produttiva.

Una serie di scandali che hanno coinvolto i prodotti alimentari, tra cui la già ricordata sindrome BSE (encefalopatia spongiforme bovina), ma anche il caso di carni avicole e suinicole inquinate da diossina, hanno scosso l'opinione pubblica dei Paesi dell'Unione Europea rischiando di

compromettere definitivamente la fiducia del consumatore sulla qualità delle produzioni agroalimentari e sull'efficacia del sistema di controlli.

Tali evenienze hanno accresciuto notevolmente le preoccupazioni del consumatore e hanno fatto emergere l'esigenza di una completa trasparenza, con garanzia della tracciabilità dei prodotti destinati al consumo umano, come indicato negli articoli dei regolamenti comunitari del Pacchetto Igiene.

Su questa linea i legislatori europei hanno rivolto maggiore attenzione alle procedure per garantire la sicurezza e la qualità del prodotto, riconoscendo la necessità di ottenere prodotti che abbiano i requisiti di igienicità, gli aspetti di qualità e/o tipicità, e le garanzie di procedimenti produttivi rispettosi del benessere animale e della conservazione dell'ambiente.

Le considerazioni dei rappresentanti dei Paesi Europei sono state concordi nel riconoscere che, per venire incontro alle necessità di informazione dei consumatori e per fornire loro maggiore sicurezza è necessario realizzare un'etichetta che descriva la qualità "tecnica" del pesce e consenta una facile ed immediata tracciabilità dei molluschi bivalvi immessi sul mercato.

RIFERIMENTI LEGISLATIVI E CRITERI DI FRESCHEZZA

Sono stati emanati un gruppo di regolamenti, approvati nell'aprile del 2004 ed entrati in vigore il 1 gennaio 2006, per razionalizzare la normativa comunitaria in materia di igiene e di controlli su alimenti: il Reg. CE 853/04 che stabilisce norme specifiche per gli alimenti di origine animale, il Reg. CE 854/04 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano. Con l'applicazione di questi nuovi regolamenti, è prevista l'abrogazione di tutte le norme che disciplinano, dal punto di vista sanitario tutti i settori compreso quello della pesca. I nuovi regolamenti separano nettamente le responsabilità degli operatori del settore alimentare da quelle delle Autorità di controllo, individuando come primo responsabile della sicurezza alimentare, lo stesso operatore che deve garantire la salubrità dei prodotti alimentari, in tutte le fasi della catena alimentare, a partire dalla produzione primaria. La grande novità è rappresentata dal coinvolgimento diretto degli operatori della pesca e della acquacoltura che, a pieno titolo, rientrano nella definizione di "operatore del settore alimentare" Nell'allegato II dal reg. CE 854/2004 vengono stabilite le regole da applicare al controllo ufficiale relativo ai molluschi bivalvi vivi, agli

echinodermi, ai tunicati e ai gasteropodi marini vivi. Il controllo consiste nella classificazione e nel successivo monitoraggio delle zone di produzione e di stabulazione in riferimento ai contaminanti. Nell'allegato III viene regolamentata la verifica sui prodotti della pesca, partendo da un controllo sulle condizioni igieniche dello sbarco e della prima vendita e da ispezioni periodiche, sulle navi e sugli stabilimenti a terra, per verificare il corretto trattamento dei prodotti della pesca e il rispetto dei requisiti di igiene e temperatura, fino al controllo sulle fasi di magazzinaggio e di trasporto. Sono definiti gli elementi basilari del controllo ufficiale, quali gli esami organolettici, gli esami sugli indicatori di freschezza, i controlli microbiologici, i parassiti e la non immissione sul mercato di prodotti velenosi.

MOLLUSCHI BIVALVI VIVI (Reg. CE 853/2004)

2.1. "molluschi bivalvi": i molluschi lamellibranchi filtratori;

2.2. "biotossine marine": sostanze tossiche accumulate dai molluschi bivalvi in particolare quale risultato dell'assorbimento di plancton contenente tossine;

2.3. "rifinitura": la conservazione di molluschi bivalvi vivi provenienti da zone di produzione di classe A, da centri di purificazione o centri di spedizione, in bacini o in qualsiasi altro impianto contenente acqua di mare pulita o in bacini naturali allo scopo di asportarne sabbia, fanghi o muco, preservare o migliorarne le qualità organolettiche e assicurare un buon stato di vitalità prima del loro confezionamento o imballaggio;

2.4. "produttore": la persona fisica o giuridica che raccoglie molluschi bivalvi vivi con qualsiasi mezzo in una zona di raccolta allo scopo di trattarli e immetterli sul mercato;

2.5. "zona di produzione": le parti di mare, di laguna o di estuario dove si trovano banchi naturali di molluschi bivalvi oppure luoghi utilizzati per la coltivazione di molluschi bivalvi, dove questi ultimi vengono raccolti vivi;

2.6. "zona di stabulazione": le parti di mare, di laguna o di estuario, chiaramente delimitate e segnalate mediante boe, paletti o qualsiasi altro strumento fisso e destinate esclusivamente alla depurazione naturale dei molluschi bivalvi vivi;

2.7. "centro di spedizione": lo stabilimento a terra o galleggiante, riservato al

ricevimento, alla rifinitura, al lavaggio, alla pulitura, alla calibratura, al confezionamento e all'imballaggio dei molluschi bivalvi vivi idonei al consumo umano;

2.8. "centro di depurazione": lo stabilimento comprendente bacini alimentati con acqua marina pulita, in cui i molluschi bivalvi vivi sono collocati per il tempo necessario alla riduzione dei contaminanti affinché diventino idonei al consumo umano;

2.9. "stabulazione": trasferimento di molluschi bivalvi vivi in zone marine, lagunari o di estuari per il tempo necessario alla riduzione dei contaminanti affinché diventino idonei al consumo umano; ciò non include l'operazione specifica di trasferimento di molluschi bivalvi in zone più adatte a una crescita o un ingrasso ulteriori.

3. PRODOTTI DELLA PESCA

3.1. "prodotti della pesca": tutti gli animali marini o di acqua dolce (ad eccezione dei molluschi bivalvi vivi, echinodermi vivi, tunicati vivi e gasteropodi marini vivi e di tutti i mammiferi, rettili e rane), selvatici o di allevamento, e tutte le forme, parti e prodotti commestibili di tali animali;

3.2. "nave officina": la nave a bordo della quale i prodotti della pesca sono sottoposti a una o più delle seguenti operazioni, seguite da un confezionamento o imballaggio e, se necessario, da un congelamento o surgelazione: sfilettatura, affettatura, pelatura, sgusciatura, tritatura o trasformazione;

3.3. "nave frigorifero": la nave a bordo della quale i prodotti della pesca sono congelati, se necessario dopo operazioni preliminari quali il dissanguamento, la decapitazione, l'eviscerazione e il taglio delle pinne; ove del caso, tali operazioni sono seguite da confezionamento o imballaggio;

3.4. "prodotto della pesca separato meccanicamente": prodotto ottenuto rimuovendo la carne dai prodotti della pesca utilizzando mezzi meccanici che conducono alla perdita o modificazione della struttura della carne;

3.5. "prodotti della pesca freschi": i prodotti della pesca non trasformati, interi o preparati, compresi i prodotti imballati sotto vuoto o in atmosfera modificata che, ai fini della conservazione, non hanno subito alcun trattamento diverso dalla refrigerazione, inteso a garantirne la conservazione;

3.6. "prodotti della pesca preparati": i prodotti della pesca non trasformati

sottoposti ad una operazione che ne abbia modificato l'integrità anatomica, quali l'eviscerazione, la decapitazione, l'affettatura, la sfilettatura e la tritatura

II PARTE 853/04

CAPITOLO I: REQUISITI GENERALI PER L'IMMISSIONE SUL MERCATO DEI MOLLUSCHI BIVALVI VIVI

1. I molluschi bivalvi vivi non possono essere immessi sul mercato per la vendita al dettaglio se non attraverso un centro di spedizione in cui deve essere apposto un marchio di identificazione a norma del capitolo VII.

2. Gli operatori del settore alimentare possono accettare lotti di molluschi bivalvi vivi solo se sono soddisfatti i requisiti documentali di cui ai punti da 3 a 7.

3. In caso di trasferimento da uno stabilimento all'altro di un lotto di molluschi bivalvi vivi da parte di un operatore del settore alimentare, un documento di registrazione deve accompagnare il lotto dal momento dell'invio fino a quello dell'arrivo al centro di spedizione o di trasformazione.

4. Il documento di registrazione deve essere redatto in almeno una delle lingue ufficiali dello Stato membro in cui è situato lo stabilimento ricevente e deve contenere almeno le indicazioni specificate in appresso.

a) In caso di un lotto di molluschi bivalvi vivi inviato da un'area di produzione, il documento di registrazione deve contenere almeno le seguenti informazioni:

i) identità e indirizzo del produttore,

ii) data di raccolta,

iii) ubicazione della zona di produzione, definita nel modo più circostanziato possibile, oppure con un numero di codice,

iv) status sanitario della zona di produzione;

v) specie di molluschi e quantità ispettiva; e

vi) destinazione del lotto.

b) In caso di lotto di molluschi bivalvi vivi inviato da una zona di

stabulazione, il documento di registrazione deve contenere almeno le informazioni di cui alla lettera a) e le informazioni seguenti:

i) ubicazione della zona di stabulazione; e

ii) durata della stabulazione.

c) In caso di un lotto di molluschi bivalvi vivi inviato da un centro di depurazione, il documento di registrazione deve contenere almeno le informazioni di cui alla lettera a) e le informazioni seguenti:

i) indirizzo del centro di depurazione,

ii) durata della depurazione, e iii) date in cui il lotto è entrato e uscito dal centro di depurazione.

5. Gli operatori del settore alimentare che inviano lotti di molluschi bivalvi vivi devono compilare le pertinenti sezioni del documento di registrazione in maniera facilmente leggibile e non alterabile. Gli operatori del settore alimentare che ricevono i lotti devono apporre sul documento un timbro con la data al ricevimento del lotto o registrare la data di ricevimento in altro modo.

6. Gli operatori del settore alimentare devono conservare una copia del documento di registrazione per ciascun lotto inviato e ricevuto per almeno dodici mesi dall'invio o dalla ricezione (o per il periodo eventualmente specificato dalla competente autorità).

7. Tuttavia se:

a) il personale che raccoglie molluschi bivalvi vivi gestisce anche il centro di spedizione, il centro di depurazione, la zona di stabulazione o lo stabilimento di trasformazione che riceve i molluschi bivalvi vivi, e

b) un'unica autorità competente controlla tutti gli stabilimenti in questione, i documenti di registrazione non sono necessari, se tale autorità competente lo permette.

CAPITOLO II: REQUISITI IN MATERIA DI IGIENE APPLICABILI ALLA PRODUZIONE E ALLA RACCOLTA DI MOLLUSCHI BIVALVI VIVI

A. REQUISITI DELLE ZONE DI PRODUZIONE

1. I produttori possono raccogliere i molluschi bivalvi vivi soltanto nelle zone

di produzione la cui ubicazione e i cui confini sono fissati e classificati dall'autorità competente – se del caso in cooperazione con gli operatori del settore alimentare – come appartenenti alle classi A, B o C, ai sensi del regolamento (CE) n. .../2004 .

2. Gli operatori del settore alimentare possono immettere sul mercato i molluschi bivalvi vivi, destinati al consumo umano diretto, raccolti nelle zone di produzione della classe A solo se soddisfano i requisiti di cui al capitolo V.

3. Gli operatori del settore alimentare possono immettere sul mercato ai fini del consumo umano i molluschi bivalvi vivi raccolti nelle zone di produzione della classe B soltanto dopo averli sottoposti a un trattamento in un centro di depurazione o previa stabulazione.

4. Gli operatori del settore alimentare possono immettere sul mercato ai fini del consumo umano i molluschi bivalvi vivi raccolti nelle zone di produzione della classe C soltanto previa stabulazione di lunga durata, conformemente alla parte C del presente capitolo. L'Ufficio delle pubblicazioni inserirà il numero ufficiale del regolamento sull'organizzazione dei controlli ufficiali.

5. Dopo la depurazione o la stabulazione, i molluschi bivalvi vivi provenienti

da zone di produzione delle classi B o C devono soddisfare tutti i requisiti previsti al capitolo V. Tuttavia, i molluschi bivalvi vivi provenienti da dette zone che non sono stati sottoposti a depurazione o stabulazione possono essere inviati a uno stabilimento di trasformazione, dove devono essere sottoposti ad un trattamento per l'eliminazione dei microrganismi patogeni (se del caso, previa asportazione di sabbia, fanghi o muco nello stesso o in altro stabilimento). I metodi di trattamento consentiti sono i seguenti:

a) trattamento sterilizzante in contenitori ermeticamente chiusi;

b) trattamenti termici comprendenti

i) immersione in acqua bollente per il tempo necessario a portare la temperatura interna della loro carne ad un minimo di 90°C e mantenimento di questa temperatura interna minima per almeno 90°secondi;

ii) cottura, da 3 a 5 minuti, in un contenitore chiuso la cui temperatura sia compresa fra 120 e 160°C e la pressione compresa fra 2 e 5 kg/cm², con successiva sgusciatura nonché congelamento della carne a - 20°C al centro della massa;

iii) cottura a vapore sotto pressione, in un contenitore chiuso in cui siano rispettati i requisiti di cui al punto i), per quanto riguarda il tempo di cottura e la temperatura interna della carne dei molluschi. Dev'essere utilizzata una metodologia convalidata. Devono essere definite procedure basate sui principi del sistema HACCP per verificare la omogenea distribuzione del calore.

6. Gli operatori del settore alimentare non devono produrre, né raccogliere, molluschi bivalvi vivi in zone che non sono state classificate dall'autorità competente o che sono inadatte per ragioni sanitarie. Gli operatori del settore alimentare devono tener conto di tutte le pertinenti informazioni relativamente all'adeguatezza delle zone per quanto riguarda la produzione e la raccolta, comprese le informazioni ottenute attraverso gli autocontrolli e l'autorità competente. Essi debbono utilizzare tali informazioni, segnatamente quelle sulle condizioni ambientali e meteorologiche, per stabilire il trattamento appropriato cui sottoporre i lotti raccolti.

B. REQUISITI PER LA RACCOLTA E IL SUCCESSIVO TRATTAMENTO

Gli operatori del settore alimentare che raccolgono molluschi bivalvi o li manipolano immediatamente dopo la raccolta, devono conformarsi ai seguenti requisiti.

1. Le tecniche di raccolta e le successive manipolazioni non devono provocare una contaminazione ulteriore del prodotto o danni eccessivi ai gusci o ai tessuti dei molluschi bivalvi vivi, o cambiamenti tali da comprometterne la possibilità di depurazione, trasformazione o stabulazione. In particolare gli operatori del settore alimentare:

a) devono proteggere in modo adeguato i molluschi bivalvi da compressioni, abrasioni o vibrazioni;

b) non devono esporre i molluschi bivalvi vivi a temperature eccessive;

c) non devono immergere nuovamente i molluschi bivalvi vivi in acqua che potrebbe

contaminarli ulteriormente;

d) se la rifinitura avviene in bacini naturali, devono utilizzare unicamente le zone che

l'autorità competente ha definito di classe A.

2. I mezzi di trasporto devono consentire un adeguato drenaggio, devono

essere attrezzati in modo da garantire le migliori condizioni di sopravvivenza e devono fornire una protezione efficace contro la contaminazione.

C. REQUISITI PER LA STABULAZIONE DEI MOLLUSCHI BIVALVI VIVI

Gli operatori del settore alimentare che procedono alla stabulazione dei molluschi bivalvi vivi devono conformarsi ai seguenti requisiti.

1. Gli operatori del settore alimentare possono utilizzare soltanto le zone riconosciute dall'autorità competente per la stabulazione dei molluschi bivalvi vivi. I confini di tali zone devono essere chiaramente segnalati con boe, pali o altri materiali fissi; una distanza minima deve separare le zone di stabulazione tra di loro e queste ultime dalle zone di produzione, in modo da ridurre al minimo i rischi di estensione della contaminazione.

2. Nelle zone di stabulazione devono essere assicurate condizioni ottimali di depurazione. In particolare, gli operatori del settore alimentare:

- a) devono usare tecniche di manipolazione dei molluschi bivalvi vivi destinati alla stabulazione che permettano loro di riprendere a nutrirsi con il processo di

filtrazione una volta immersi in acque naturali;

b) non devono procedere alla stabulazione dei molluschi bivalvi vivi ad una densità che ne impedisca la depurazione;

c) devono immergere i molluschi bivalvi vivi in acqua di mare nella zona di stabulazione per un adeguato periodo di tempo stabilito in funzione della temperatura dell'acqua, periodo che non può essere inferiore a due mesi salvo qualora l'autorità competente decida altrimenti sulla scorta dell'analisi di rischio dell'operatore del settore alimentare; e

d) nell'ambito della zona di stabulazione, devono provvedere ad una separazione dei settori sufficiente ad impedire che i diversi lotti si mescolino tra loro; si deve ricorrere al sistema "tutto dentro, tutto fuori" in modo che non sia possibile introdurre un nuovo lotto prima che sia stata estratta la totalità di quello precedente.

3. Gli operatori del settore alimentare che gestiscono le zone di stabulazione devono tenere a disposizione dell'autorità competente a fini ispettivi i registri in cui annotano regolarmente la provenienza dei molluschi bivalvi vivi, i periodi di stabulazione, i settori di stabulazione impiegati e la successiva

destinazione di ciascun lotto stabulato.

CAPITOLO III: REQUISITI STRUTTURALI PER I CENTRI DI SPEDIZIONE E DI DEPURAZIONE

1. Gli impianti sulla terraferma non devono essere situati in aree soggette a inondazioni in seguito a normali alte maree o allo scolo delle acque dalle zone circostanti.

2. I bacini e i serbatoi per l'acqua devono soddisfare i seguenti requisiti:

a) le superfici interne devono essere lisce, resistenti e impermeabili, nonché facili da pulire;

b) devono essere costruiti in modo tale da consentire lo scolo completo dell'acqua;

c) i punti di alimentazione dell'acqua devono essere situati in modo da evitare contaminazioni nell'approvvigionamento idrico.

3. Inoltre, nei centri di depurazione, i bacini devono essere adatti al volume e

al tipo di prodotto da depurare.

CAPITOLO IV: REQUISITI D'IGIENE PER I CENTRI DI DEPURAZIONE E DI SPEDIZIONE

A. REQUISITI PER I CENTRI DI DEPURAZIONE

Gli operatori del settore alimentare che depurano i molluschi bivalvi devono conformarsi ai seguenti requisiti.

1. Prima della depurazione i molluschi bivalvi vivi devono essere liberati dal fango e dai detriti accumulati con acqua pulita.

2. Il sistema di depurazione deve consentire che i molluschi bivalvi vivi riprendano rapidamente e continuino a nutrirsi mediante filtrazione, eliminino la contaminazione residua, non vengano ricontaminati e siano in grado, una volta depurati, di mantenere la propria vitalità in condizioni idonee per il confezionamento, la conservazione e il trasporto prima di essere commercializzati.

3. La quantità di molluschi bivalvi vivi da depurare non deve essere superiore

alla capacità del centro di depurazione. I molluschi devono essere depurati ininterrottamente per il periodo necessario affinché siano conformi alle norme sanitarie di cui al capitolo V e ai requisiti microbiologici adottati ai sensi del regolamento (CE) n. .../2004

4. Qualora un bacino di depurazione contenga diversi lotti di molluschi bivalvi vivi, gli stessi debbono essere della medesima specie e il trattamento deve estendersi in funzione del periodo richiesto dal lotto che necessita della depurazione più lunga. L'Ufficio delle pubblicazioni inserirà il numero ufficiale del regolamento sull'igiene dei prodotti alimentari.

5. I contenitori in cui vengono collocati i molluschi bivalvi vivi negli impianti di depurazione devono essere costruiti in modo che l'acqua di mare pulita possa passare; lo spessore degli strati di molluschi bivalvi vivi non deve ostacolare l'apertura dei gusci durante il processo di depurazione.

6. Nel bacino in cui sono sottoposti a depurazione molluschi bivalvi vivi non devono essere tenuti crostacei, pesci o altri animali marini.

7. Ogni confezione di molluschi bivalvi vivi depurati inviata a un centro di spedizione deve essere munita di un'etichetta attestante che i molluschi sono

stati depurati.

B. REQUISITI PER I CENTRI DI SPEDIZIONE

Gli operatori del settore alimentare che lavorano nei centri di spedizione devono conformarsi ai seguenti requisiti.

1. Le operazioni di manipolazione dei molluschi bivalvi vivi, in particolare la rifinitura, la cernita, il confezionamento e l'imballaggio non devono provocare contaminazioni del prodotto né alterarne la vitalità.

2. Prima della spedizione, i gusci dei molluschi bivalvi vivi devono essere accuratamente lavati con acqua pulita.

3. I molluschi bivalvi vivi devono provenire da:

a) una zona di produzione di classe A;

b) una zona di stabulazione;

c) un centro di depurazione, o

d) un altro centro di spedizione.

4. I requisiti di cui ai punti 1 e 2 si applicano anche ai centri di spedizione che si trovano a bordo dei pescherecci. I molluschi manipolati in tali centri devono provenire da una zona di produzione di classe A o da una zona di stabulazione.

CAPITOLO V: NORME SANITARIE PER I MOLLUSCHI BIVALVI VIVI

Oltre a garantire la conformità ai requisiti microbiologici adottati ai sensi del regolamento (CE) n. .../2004 *, gli operatori del settore alimentare devono garantire che i molluschi bivalvi vivi immessi sul mercato e destinati al consumo umano soddisfino i requisiti contenuti nel presente capitolo.

1. Essi devono presentare caratteristiche organolettiche tipiche del prodotto fresco e vitale, in particolare gusci privi di sudiciume, reazione adeguata a percussioni e livelli normali di liquido intervalvolare.

2. Essi non devono contenere biotossine marine in quantità totali (misurate nel corpo intero o nelle parti consumabili separatamente) superiori ai seguenti limiti:

a) PSP ("Paralytic Shellfish Poison"): 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$;

b) ASP ("Amnesic Shellfish Poison"): 20 mg/kg di acido domoico;

L'Ufficio delle pubblicazioni inserirà il numero ufficiale del regolamento sull'igiene dei prodotti alimentari.

c) acido okadaico, dinophysitossine e pectenotossine complessivamente: 160 μg di

equivalente acido okadaico/kg;

d) yessotossine: 1 mg di equivalente yessotossine/kg;

e) azaspiracidi: 160 μg di equivalente azaspiracido/kg.

CAPITOLO VI: CONFEZIONAMENTO E IMBALLAGGIO DEI MOLLUSCHI BIVALVI VIVI

1. Le ostriche devono essere confezionate o imballate con la parte concava del guscio rivolta verso il basso.

2. I colli per la vendita al minuto di molluschi bivalvi vivi devono essere e restare chiusi da quando lasciano il centro di spedizione fino alla presentazione per la vendita al consumatore finale.

CAPITOLO VII: MARCHIATURA DI IDENTIFICAZIONE ED ETICHETTATURA

1. L'etichetta, compreso il marchio di identificazione, deve essere impermeabile.

2. Ferme restando le disposizioni generali in materia di marchi di identificazione di cui all'allegato II, Sezione I, l'etichetta deve recare le seguenti informazioni:

a) specie di molluschi bivalvi (denominazione comune e denominazione scientifica);

b) data di imballaggio, con indicazione almeno del giorno e del mese.

In deroga alla direttiva 2000/13/CE, il termine minimo di conservazione può essere sostituito dalla menzione «Questi animali devono essere vivi al

momento dell'acquisto»

3. Una volta che ne abbia frazionato il contenuto, il venditore al dettaglio deve conservare per almeno 60 giorni l'etichetta apposta su ogni imballaggio di molluschi bivalvi vivi che non siano imballati in colli per la vendita al minuto.

CAPITOLO VIII: ALTRI REQUISITI

1. Gli operatori del settore alimentare che conservano e trasportano molluschi bivalvi vivi devono garantire che questi ultimi siano mantenuti ad una temperatura che non pregiudichi la sicurezza alimentare e la loro vitalità.

2. Una volta imballati per la vendita al dettaglio e usciti dal centro di spedizione, i molluschi bivalvi vivi non devono essere immersi nuovamente in acqua o aspersi d'acqua.

CAPITOLO IX: REQUISITI SPECIFICI PER I PETTINIDI RACCOLTI FUORI DALLE ZONE DI PRODUZIONE CLASSIFICATE

Gli operatori del settore alimentare che raccolgono pettinidi fuori dalle zone di produzione classificate o che trattano siffatti pettinidi devono conformarsi ai

seguenti requisiti.

1. I pettinidi possono essere immessi sul mercato soltanto se sono stati raccolti e trattati conformemente al capitolo II, parte B e se soddisfano le norme fissate nel capitolo V, secondo quanto comprovato da un sistema di autocontrollo.

2. Inoltre, se i dati risultanti dai programmi ufficiali di controllo consentono all'autorità competente di classificare i fondali, se del caso, in cooperazione con gli operatori del settore alimentare, le disposizioni del capitolo II, parte A si applicano per analogia ai pettinidi.

3. I pettinidi possono essere immessi sul mercato per il consumo umano soltanto attraverso un impianto per le aste, un centro di distribuzione o uno stabilimento di trasformazione. Quando trattano i pettinidi, gli operatori del settore alimentare che gestiscono tali stabilimenti devono informare la competente autorità e, per quanto concerne i centri di distribuzione, devono rispettare le pertinenti disposizioni dei capitoli III e IV.

4. Gli operatori del settore alimentare che trattano i pettinidi devono conformarsi:

a) ai requisiti documentali di cui al capitolo I, punti da 3 a 7, ove applicabili.

In tal caso il documento di registrazione deve indicare chiaramente l'ubicazione della zona in cui i pettinidi sono stati raccolti; o

b) per quanto riguarda i pettinidi imballati e i pettinidi confezionati se il confezionamento fornisce una protezione equivalente a quella dell'imballaggio, ai requisiti del capitolo VII concernenti la marchiatura di identificazione e l'etichettatura.

I MOLLUSCHI NELL'ALIMENTAZIONE UMANA

E' da presumere che i molluschi marini abbiano sempre fatto parte della dieta umana: tutti i popoli che vivono presso il mare, anche i più primitivi, li raccolgono per mangiarli. In molti paesi si usa allevare i mitili, o cozze (gen. *Mytilus*) nelle acque salmastre ponendoli su ruvide funi alle quali il mollusco si attacca col bisso, mentre le ostriche (*Ostrea*) vengono allevate su fondali sassosi. In Giappone si allevano anche le ostriche del gen. *Pinctada* per la produzione delle perle. Poiché questi animali si nutrono per filtrazione di microorganismi vari, e specialmente di batteri, quando vengono allevati in acque inquinate possono diventare veicolo di malattie infettive: prima di essere venduti debbono essere posti pure a purgare. Altri molluschi bivalvi che dimorano nei fondali marini sabbiosi sono oggetto di pesca molto attiva mediante reti a strascico: vongole (*Venus gallina* e specie affini), cappe sante (*Pecten jacobaeus*), canestrelli (*Spondylus*), cappe lunghe (*Solen* ed *Ensis*) giungono in abbondanza sui nostri mercati, purtroppo la loro pesca danneggia assai gravemente la fauna marina, comprese le uova di molti pesci. I datteri di mare (*Lithophaga*, *Pholas dactylus*) venivano estratti frantumando le nicchie che si scavano entro la roccia, per essere poi cucinati; attualmente in Italia ne è stato vietato il commercio. Nei paesi mediterranei si fa anche grande

consumo di polmonati terrestri (*Helix hortensis*, *H. aperta* e altre specie) che si possono comprare anche inscatolati: la loro raccolta è in molti luoghi opportunamente regolamentata, vi sono quindi aziende che li allevano. Per motivi culturali certe popolazioni rifiutano di mangiarle. Importante fonte di cibo per l'uomo sono soprattutto i cefalopodi: calamari e calamaretti, seppie, totani e polpi vengono pescati in grandi quantità; giungono surgelati sul nostro mercato sin dall'oriente asiatico.

FRODI ALIMENTARI

Con l'espressione "frode alimentare" ci si riferisce ad una pluralità di condotte illecite che inducono negli alimenti delle modificazioni non consentite dalla normativa. Le frodi alimentari comportano un danno economico per il consumatore e, ancor peggio, per la sua salute.

Sostituzione di specie tra *Tapes decussata* e *M. lyrata*

Le frodi nel commercio dei prodotti ittici non costituiscono un argomento di facile trattazione, in quanto il mercato di tali prodotti è sottoposto a mutamenti talvolta repentini, che possono rendere una frode "obsoleta" di grande attualità o viceversa, in relazione a diversi fattori quali cambiamenti commerciali, la riduzione delle catture di determinate specie, le mode gastronomiche del momento, etc.

Inoltre le frodi possono essere differenti tra nazione e nazione o addirittura mutano tra località diverse nell'ambito di una stessa nazione, e nel caso particolare dei prodotti della pesca importati da Paesi Terzi la frode riguarda soprattutto i prodotti trasformati refrigerati e congelati.

Le frodi più comuni di carattere commerciale, perpetrate nei mercati ittici all'ingrosso, nelle piattaforme, negli stabilimenti, nelle pescherie, nei luoghi di somministrazione, nelle rivendite ambulanti, hanno finalità prevalentemente

lucrative, ma possono purtroppo provocare anche conseguenze dannose, alla salute del consumatore, sconfinando in reati sanitari di varia gravità. Come già ricordato l'identificazione delle specie ittiche presenti in commercio si rende necessario per vari ordini di motivi, tra cui :

- il rispetto delle norme sul controllo e tracciabilità della filiera commerciale;
- la prevenzione dell'insorgenza di fenomeni morbosi, dovuti ad intolleranze alimentari individuali;
- il rispetto di particolari vincoli etici o religiosi.

Tra le più frequenti frodi per sostituzione di specie dei prodotti ittici trasformati riscontrate sui mercati al dettaglio dell'Italia meridionale sono da annoverare la sostituzione nella vendita di *Tapes decussata* con le meno pregiate *Tapes filippinarum* e *Meretrix lyrata*.

Le specie riconducibili alle tre denominazioni commerciali hanno caratteristiche morfologiche simili, ma le caratteristiche organolettiche, il prezzo esitato sul mercato e le aree di provenienza sono fortemente differenziate.

Per quanto riguarda, inoltre, le vongole comuni (lupino: *Chamelea gallinae*; vongola filippina: *Tapes philippinarum*) vengono spacciate per veraci (*Tapes decussatus*). La verace è riconoscibile dalla vongola normale o lupino per la

forma più allungata e per i cerchi più marcati della superficie esterna delle valve. Si distingue dalla filippina in quanto i sifoni sono separati e liberi tra loro.

CRITERI DI IDENTIFICAZIONE DI SPECIE IN PRODOTTI DELLA PESCA.

Per evidenziare frodi commerciali, per prevenire l'insorgenza di fenomeni morbosi, dovuti ad intolleranze alimentari individuali è indispensabile identificare i molluschi bivalvi posti in commercio.

Il riconoscimento di specie risulta agevole per i prodotti della pesca freschi, interi o preparati che non hanno subito alcun trattamento diverso dalla refrigerazione (All. 1 Reg.(CE) N. 853/2004) per cui è sufficiente applicare correttamente i criteri tassonomici disponibili in letteratura.

L'identificazione di una specie può essere incerta ogni qualvolta le sue caratteristiche quali la forma, le dimensioni, l'aspetto (riflesso delle differenze genetiche), sono rimosse dalla lavorazione e sono disponibili solo parti del prodotto.

Nel caso di prodotti preparati, ovvero sottoposti ad operazioni che ne abbiano modificato l'integrità anatomica, quali la sgusciatura, non è più possibile procedere al riconoscimento dei molluschi.

Più complesso si rivela il caso di differenziazione di specie in prodotti ittici preparati e trasformati, sottoposti durante la lavorazione a modificazione dell'integrità anatomica che ne impedisce il riconoscimento visivo.

Questi prodotti vanno assumendo un sempre maggiore peso sul mercato complessivo dei prodotti ittici. A tale proposito l'I.S.M.E.A. ha rilevato che circa il 20% dei prodotti ittici consumati negli ultimi anni è costituito da prodotti congelati e su 47.000 tonnellate di pesce surgelato vendute, 17.000 tonnellate erano rappresentate da filetti al naturale ed oltre 18.000 tonnellate da prodotti panati o pastellati.

Per i prodotti ittici sottoposti a processi di lavorazione, per lo più semplici preparazioni, che non abbiano indotto la denaturazione delle proteine sono ampiamente utilizzati i saggi immunoenzimatici e le tecniche elettroforetiche, in cui le differenze chimico-fisiche di dimensione o carica delle proteine appaiono come differenze di mobilità elettroforetica, di punto isoelettrico o di tempo di eluizione cromatografica.

Pertanto, quando proteine idrosolubili vengono separate per elettroforesi, focalizzazione isoelettrica o cromatografia, si ottengono profili tipici di specie, ed è possibile definire l'identità confrontandone il profilo con quelli della specie di riferimento.

La specificità dell'interazione fra anticorpo ed antigene, così come impiegata nei saggi immunoenzimatici, offre un metodo alternativo di differenziazione di specie in cui possono essere impiegati anticorpi prodotti contro una specifica proteina o gruppo di esse.

Il saggio, tuttavia, non fornisce alcuna indicazione sulla presenza o assenza di altre specie in quanto si basa su analisi specifica di specie pre-selezionata verso cui è stato prodotto l'anticorpo.

Per quanto concerne il pesce questo metodo risulta poco pratico, a causa dell'elevato numero di specie che potrebbero essere coinvolte e poco valido per prodotti cotti poiché gli anticorpi sono normalmente diretti verso proteine non denaturate.

Per tutti i prodotti della pesca non sottoposti ad alcun trattamento conservativo i metodi elettivi di riconoscimento di specie sono rappresentate dalle tecniche elettroforetiche, tra le quali si distinguono:

elettroforesi capillare, la quale rivela un importante progresso tecnico nella elettroforesi analitica. E, inoltre, offre un approccio alternativo alle tecniche convenzionali con i vantaggi di una rapida separazione delle proteine nel loro stato nativo, della loro analisi qualitativa e dell'automatizzazione del sistema elettroforetico;

elettroforesi isoenzimatica in cui l'alta velocità di evoluzione molecolare enzimatica permette di evidenziare facilmente le differenti mobilità elettroforetiche anche in specie filogeneticamente molto vicine; resta, comunque, una metodologia d'indagine laboriosa che presuppone un'elevata esperienza tecnica;

IEF (isoelettrofocalizzazione), si realizza tramite focalizzazione delle proteine sarcoplasmatiche nel loro punto isoelettrico su gradiente formato da anfoline sintetiche; è stata indicata come tra le tecniche più attendibili ed ha permesso l'individuazione tassonomica di 53 specie ittiche, come indicato dalla *Food and Drug Administration*.

I suddetti metodi analitici elettroforetici, le tecniche immunologiche, immunoelettroforetiche e cromatografiche pur permettendo una rapida e sicura identificazione di specie, presentano il rilevante limite di non poter essere applicate ad alimenti sottoposti a trattamenti termici di sterilizzazione che comportano una più o meno sensibile denaturazione proteica.

In tal caso le bande proteiche sugli elettroferogrammi divengono indistinte e si sviluppa una estesa colorazione dello sfondo, dipendente dal grado di denaturazione che rende impossibile un'identificazione attendibile della specie.

Un'ulteriore limitazione delle tecniche elettroforetiche si può evidenziare se applicate a specie strettamente correlate tra loro o se l'identificazione viene effettuata su polpa di molluschi sottoposta a lavaggi in cui i prodotti ottenuti sono privati di molte proteine idrosolubili.

Il riconoscimento di specie si presenta ancora più complesso nel caso di prodotti trasformati, ovvero di quei prodotti della pesca che hanno subito un

procedimento chimico o fisico come cottura, affumicamento, salagione, essiccazione, marinatura successivo ad un intervento di modificazione dell'integrità anatomica.

Per sopperire alle difficoltà dovute ai trattamenti denaturanti del prodotto recentemente sono state allestite tecniche che utilizzano peculiari proprietà di proteine acide stabili e specie specifiche, come le parvalbumine.

In caso di denaturazione proteica completa e di specie prive di parvalbumine si rende necessario ricorrere a metodi d'indagine alternativi sviluppati a partire dalle biotecnologie innovative, e supportate dalle recenti acquisizioni scientifiche dell'ingegneria genetica e della biologia molecolare.

TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE

Lo studio e l'analisi del DNA genomico si presenta come il metodo più diretto per l'identificazione di specie nei molluschi bivalve.

Il DNA, infatti, risulta essere un substrato estremamente specie-specifico, molto resistente ai trattamenti termici, alla stagionatura e ad ulteriori interventi tecnologici ai quali un prodotto ittico può essere sottoposto.

Basilare per il procedimento d'identificazione è la reazione a catena della polimerasi (PCR) nella quale *primers* selezionati con sequenze complementari alle estremità opposte dei due singoli filamenti di un frammento di DNA specie-specifico permettono d'individuare il frammento bersaglio e di risintetizzare enzimaticamente il DNA a doppia catena.

L'enzima DNA polimerasi è richiesto per la sintesi iniziale e per la successiva reazione a catena per mezzo della quale milioni di copie del frammento di DNA desiderato possono essere sintetizzate così da dare un prodotto sufficiente (amplicone) per il sequenziamento o per altre analisi basate sul DNA.

E' necessario infatti prima di avviare un ciclo di PCR, identificare quei frammenti di DNA che mostrano differenze nella sequenza nucleotidica per

specie strettamente affini; tali frammenti possono essere selezionati per diversi livelli di variabilità sia tra individui che tra popolazioni, specie o famiglie, in modo che possano mostrare la massima differenza fra specie e la minima fra individui di una stessa specie.

Per un corretto avvio della reazione è necessaria una scelta oculata e idonea dei *primers* d'innescio, l'introduzione di DNA polimerasi termostabile, di efficienti soluzioni tampone, di nucleotidi oltre che del frammento di DNA bersaglio estratto e purificato, nella miscela d'avvio.

I prodotti amplificati possono essere studiati mediante sequenziamento ed attraverso tecniche secondarie d'indagine del DNA quali l'analisi dei frammenti di restrizione (RFLP), l'analisi del DNA polimorfico amplificato con *primers* casuali (RAPD) o analisi della conformazione del DNA a singola catena. Visualizzati i frammenti d'amplificazione si procede con lo studio dei profili di restrizione e con il confronto tra le sequenze specifiche per stabilirne il grado d'omologia.

Il DNA genomico può essere inoltre digerito con enzimi di restrizione e ibridato con sonde specifiche in esperimenti di Southern Blotting che consentono di identificare il DNA satellite, anch'esso specie specifico.

Nell'ambito delle attività di ispezione degli alimenti, la PCR e il Southern consentono non solo di differenziare con certezza diverse specie ma di

identificare variazioni genetiche intraspecie evidenziando le diverse origini di un prodotto. Tali tecniche hanno riscosso particolare interesse per lo sviluppo di metodi routinari e di *kit* d'analisi rapida rivelandosi estremamente sensibili e precise.

CARATTERIZZAZIONE DEL DNA SATELLITE PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE IN MOLLUSCHI BIVALVE

Nel genoma degli eucarioti sono presenti quattro tipi di sequenze ripetute in tandem: i DNA satelliti, i minisatelliti, i microsatelliti e il DNA codificante per gli rRNA. Esse sono costituite da unità identiche o quasi identiche e disposte con lo stesso orientamento, una dopo l'altra, senza soluzione di continuità.

Il DNA satellite è organizzato in migliaia di unità ripetitive di dimensioni che possono variare da poche decine a più di 1000 coppie di basi. Il DNA satellite rappresenta una parte consistente del genoma degli eucarioti (dal 5% al 20%), è comune sia nelle piante che negli animali ed è il principale componente dell'eterocromatina costitutiva (Beridze, 1986).

Il DNA satellite di solito non viene trascritto e il suo ruolo funzionale nella struttura del genoma rimane oscuro. Per la sua grande variabilità e omogeneità all'interno della stessa specie, può fornire preziose informazioni sulle affinità sistematiche e filogenetiche tra specie (Brutlag, 1980).

Il DNA satellite è localizzato nell'eterocromatina costitutiva, di cui è il componente principale. Nel genoma degli eucarioti, l'eterocromatina costitutiva è localizzata prevalentemente in prossimità dei centromeri e dei

telomeri e in piccola parte anche in posizione pericentromerica.

Normalmente in ogni specie sono presenti vari tipi di DNA satellite e ciascun tipo possiede di solito una caratteristica localizzazione e distribuzione cromosomica. Specie correlate presentano spesso DNA satelliti simili ma non identici e, in genere, l'abbondanza relativa e la distribuzione sui cromosomi dello stesso DNA satellite varia da specie a specie. Per questa specie-specificità, alcuni DNA satelliti sono stati usati come marcatori molecolari di specie. Questo uso è stato possibile per l'alta omogeneità delle sequenze del DNA all'interno degli individui di una stessa specie.

Sono stati postulati diversi meccanismi molecolari che mantengono uniformi le sequenze del DNA satellite all'interno di una specie, quali la conversione genica, il crossing-over ineguale e la replicazione per rolling-circle. Non esiste una concordanza sul relativo ruolo e peso che questi meccanismi hanno nel determinare l'evoluzione concertata. I DNA satelliti non sono trascritti e il loro significato funzionale è abbastanza oscuro. Per i DNA satelliti centromerici è stato postulato un ruolo nel corretto appaiamento e segregazione dei centromeri. È stato anche proposto che la differente distribuzione e organizzazione dei DNA satelliti lungo i cromosomi abbia un ruolo fondamentale nel differenziare il cariotipo di specie strettamente correlate.

I DNA minisatelliti e microsatelliti sono rappresentati da brevi sequenze di DNA (1- 20 bp) ripetute in tandem un numero moderato di volte.

I mini e microsatelliti si distinguono per la lunghezza dell'unità ripetuta e spesso anche per la loro ripetitività.

I minisatelliti contengono unità ripetitive formate da cinque a venti nucleotidi e sono in genere mediamente ripetuti, mentre i microsatelliti contengono unità ripetitive formate da una a quattro nucleotidi (di solito due) e sono normalmente presenti nel genoma ad alta o media ripetitività.

Sia i mini che i microsatelliti presentano di solito in ogni locus un numero di unità ripetitive che può variare da individuo a individuo. Questa proprietà costituisce la base per il loro utilizzo in genetica. Ad esempio, i minisatelliti sono stati utilizzati per l'identificazione di individui mediante la tecnica di Southern-blot.

Digerendo con un enzima di restrizione il genoma di un individuo si ottengono una serie di bande contenenti il minisatellite e perciò di dimensioni differenti da individuo a individuo. Si ottiene così una impronta digitale genetica di ogni individuo (fingerprint). Una analoga metodologia può essere impiegata analizzando i microsatelliti, o meglio, più DNA microsatellitari ipervariabili.

Il DNA satellite viene studiato anche allo scopo di chiarire problemi di

filogenesi e tassonomia. Lo studio di questo DNA si basa su numerose osservazioni che provano che il suo tasso di divergenza è quasi sempre direttamente proporzionale alla distanza filogenetica tra le specie (Miklos, 1985).

Anche nei molluschi il DNA satellite è organizzato con notevole uniformità all'interno delle specie, mentre è fortemente differenziato tra le differenti specie; ciò è confermato dalle ricerche di altri autori (Barsacchi, 1991).

Se si digerisce questo DNA con alcuni enzimi di restrizione si osservano dei pattern di bande satellitari che variano da specie a specie. Questi pattern sono tipici per ogni specie e restano invariati per tutte le popolazioni di una determinata specie. Quindi il DNA satellite si comporta come un marcatore molecolare assoluto di specie, in quanto è una molecola che da sola è in grado di definire la specie di appartenenza di un certo mollusco.

IDENTIFICAZIONE DI SPECIE MEDIANTE ITS1 E ITS2

I ribosomi degli organismi eucariotici sono formati da due subunità strutturali, 60S e 40S, costituite da frammenti di rRNA e proteine che prendono il nome dalla misura della loro velocità di sedimentazione, in seguito a centrifugazione, definita in unità di Svedberg (S).

La subunità 60S presenta i frammenti di rRNA 28S, chiamato anche LSU (large subunit), 5,8S e 5S e circa 50 proteine. La subunità 40S presenta un unico frammento di RNA 18S, chiamato anche SSU (small subunit) e circa 33 proteine.

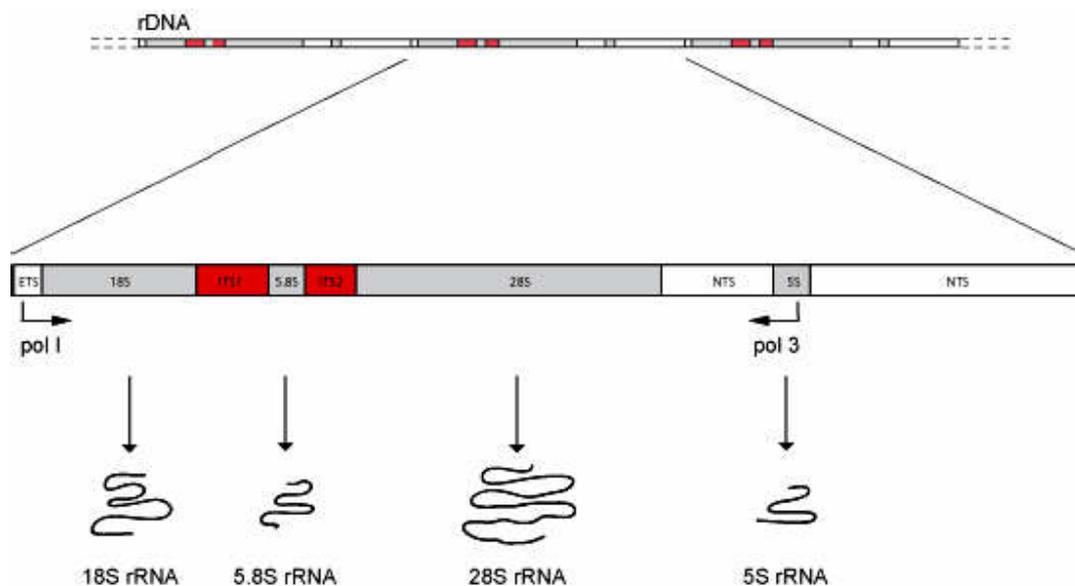
Al momento della traduzione del mRNA queste subunità si uniranno per formare i ribosomi 80 S.

		Subunità	rRNA	Proteine
Procarioti	70s	50s	23s+5s	31
		30s	16s	21
Eucarioti	80s	60s	28s+5,8s+5s	50
		40s	18s	33

I geni che codificano per i diversi frammenti di rRNA sono geni ripetuti, costituenti dell'organizzatore nucleolare, NOR (Nucleolus organizer region).

All'interno del cromosoma sono raggruppati in unità strutturali separate da sequenze spaziatrici non codificanti, NTS (nontranscribed spacer) o IGS (intergenic spacer). Ogni unità strutturale é costituita da un spaziatore trascritto esterno, ETS (external transcribed spacer), situato all'estremità 3' del gene 18S, due spaziatori trascritti interni, ITS (internal transcribed spacer), situati rispettivamente: l'ITS1 fra il gene 18S ed il gene 5,8S, l'ITS2 tra il gene 5,8S e l'estremità 3' del gene 28S ed in fine il gene 5S separato dal gene 28S da una sequenza spaziatrice non codificante.

I geni 18S, 5,8S e 28S verranno trascritti dalla DNA polimerasi I in un pre-rRNA 45S che in seguito a maturazione tramite eliminazione delle sequenze spaziatrici ETS ed ITS formerà i rispettivi frammenti di rRNA. Il gene 5S verrà trascritto dalla DNA polimerasi III nel suo corrispettivo rRNA.



Struttura dei geni ribosomali degli organismi eucarioti

L'identificazione di specie gioca un ruolo importante nella commercializzazione dei molluschi surgelati.

Un' identificazione basata sulla morfologia non è purtroppo facile sul prodotto sgusciato poiché specie molto vicine filogeneticamente possono presentare tratti fenotipici uguali o difficilmente differenziabili.

Oltre alle difficoltà di identificazione morfologica si devono prendere in considerazione i tempi che altre tecniche, quali il DNA satellite, richiedono.

I BIVALVI

I Bivalvi hanno adottato un modo di alimentarsi unico presso i Molluschi: essi filtrano grandi masse di acqua attraverso le branchie molto ampie e reticolate, trattenendo il microplancton; in rapporto a ciò essi sono rimasti confinati nelle acque e il loro mantello e la loro conchiglia si sono modificati profondamente.

ANATOMIA DEI BIVALVI

Nei Bivalvi il mantello è formato da due ampi lembi che coprono i fianchi dell'animale e spesso si saldano anche al disotto del corpo: ciascun lembo secerne una valva della conchiglia; le due valve sono incernierate lungo la linea mediana dorsale. Il capo è molto ridotto; di esso rimangono uno o due lembi ciliati a forma di proboscide e un paio di palpi disposti attorno alla bocca; nelle specie detritivore i lembi muniti di ciglia raccolgono il detrito organico e i palpi ne fanno la cernita e l'introducono nella bocca, ma nelle forme filtratrici la proboscide manca e i palpi buccali ricevono il materiale dalle branchie. Il piede è compresso lateralmente, di solito è privo di suola,

sicché acquista la forma di una falce o di una accetta (molto evidente nelle vongole). Nelle forme che vivono nella sabbia o nel fango il piede funge da organo di scavo, ma in quelle che vivono attaccate agli scogli, come fanno i mitili, esso è ridotto o assente. Le branchie dei bivalvi, oltre che agli scambi gassosi, provvedono alla filtrazione del materiale nutritivo. Ciascuna branchia ha la forma di un vasto crivello coperto di ciglia: una parte dell'apparato ciliare spinge l'acqua nella cavità del mantello, la fa fluire attraverso le branchie, e quindi la espelle dalla parte posteriore. Un'altra parte dell'apparato ciliare convoglia verso i palpi buccali il cordone mucoso in cui si sono invischiate le particelle nutritive trattenute dal filtro. I margini del mantello hanno importanza decisiva nel convogliare il flusso d'acqua verso le branchie e poi di nuovo verso l'esterno. Nei bivalvi che vivono attaccati a un substrato (mitili), il margine posteriore del mantello si ripiega in modo da formare due imboccature: attraverso quella inferiore entra l'acqua che va alle branchie, attraverso quella superiore esce l'acqua che è stata filtrata, portando con sé gli escrementi dell'animale. In altri bivalvi gli opposti bordi del mantello si saldano lasciando tre varchi: uno anteriore per l'uscita del piede e due per l'entrata e l'uscita dell'acqua; eventualmente rimane una quarta apertura per l'uscita del 'bisso'. Le aperture attraverso cui l'acqua entra ed esce vengono dette, rispettivamente, sifone inalante e di sifone esalante. Nei bivalvi che

vivono sepolti nella sabbia (vongole, telline), o dentro gallerie scavate nel legno o nella roccia (teredini), i sifoni inalante ed esalante si allungano molto, di modo che il corpo dell'animale sta al riparo in profondità e l'acqua necessaria alla nutrizione e alla respirazione continua ad arrivare non commista a sabbia o detriti. I Bivalvi sono oggetto di intensa predazione da parte di molti animali diversi specializzati nell'aprirne o nell'infrangerne la conchiglia. I più antichi loro nemici sono le stelle marine. Predatori di quei Bivalvi che si rifugiano dentro la sabbia sono le razze e le torpedini, pesci cartilaginei di fondo, piatti, muniti spesso di dentatura atta a schiacciare le solide conchiglie. Tra i mammiferi predatori di bivalvi marini figura il tricheco che vive nei mari artici. Nonostante questa decimazione, alla quale si aggiunge quella operata dall'uomo spesso con sistemi brutali e distruttivi, i Bivalvi rimangono numerosi e formano una biomassa imponente. I Bivalvi sono comparsi verso la fine del Cambriano e hanno poi goduto di un successo crescente tanto da spiazzare i Brachiopodi, simili per modo di nutrirsi che si sono molto ridotti, sia per numero di specie, sia per numero di individui.

BIOLOGIA DEI MOLLUSCHI (MOLLUSCA Linnaeus, 1758)

EVOLUZIONE E SISTEMATICA

Conchiglie fossili sono note fin dal Cambriano inferiore (570 milioni di anni fa).

L'antenato dei Molluschi probabilmente era un animale vermiforme, in cui la conchiglia si formò a partire da scaglie sparse sul dorso, simili a quelle degli attuali Caudofoveati e Solenogastri. Essi si sono indubbiamente differenziati in molte direzioni perchè la biologia e la struttura dei Molluschi si differenziano molto da un gruppo all'altro tanto da non poter dare una descrizione generale. Emerge tuttavia un punto estremamente chiaro: i Molluschi hanno acquisito molto presto un mantello, una grande plicatura che ricopre il dorso e i fianchi del corpo. La superficie del mantello ha prodotto una conchiglia resistente di materiale calcareo, sotto la quale il corpo dell'animale può rifugiarsi in caso di pericolo. Una volta acquisita questa protezione, i molluschi seguono proprie vie evolutive.

Nelle varie classi di Molluschi i caratteri distintivi variano, nel senso di una loro assenza o, viceversa di un loro notevole sviluppo. Questa plasticità evolutiva ha probabilmente favorito la diffusione di questi animali primitivamente marini bentonici a tutti gli ambienti marini e a molti d'acqua

dolce e terrestri.

Si conoscono circa 140.000 specie di Molluschi viventi, distribuiti in otto classi molto diverse tra loro per aspetto ed anatomia, ossia i Caudofoveati, i Solenogastri, i Poliplacofori, i Monoplacofori, gli Scafopodi, i Gasteropodi, i Bivalvi e i Cefalopodi.

In quanto alla distribuzione geografica, sono diffusi praticamente in tutto il mondo.

ANATOMIA

Caratteristiche generali

I Molluschi hanno generalmente un corpo molle appiattito ed allungato, con un capo munito di occhi e tentacoli sensori come nei Cefalopodi, tutti hanno un piede ventrale, una massa dorsale che contiene i visceri e una plica del tegumento, il mantello, che dorsalmente delimita una cavità palleale che comunica con l'esterno anteriormente o posteriormente. La superficie dorsale del mantello secerne una conchiglia per lo più calcarea. Nella cavità della bocca dei Gasteropodi si trova la radula, struttura rigida ad arco munita di serie di dentelli trasversali: essa viene estroflessa e usata originariamente per grattare le particelle alimentari dal substrato. L'ano si apre nella cavità

palleale; in essa trovano posto anche le branchie, a forma di pettine (ctenidi) come nei Bivalvi.

Il sistema circolatorio è formato per lo più da lacune aperte, con un cuore contrattile da cui partono vasi che raggiungono le branchie. Di solito vi è una sola coppia di reni e gonadi, con dotti comuni o separati che sboccano nella cavità palleale.

Il sistema nervoso appare differenziato secondo due schemi. Nel primo caso (Anfineuri) è formato da un anello intorno all'esofago e due paia di cordoni longitudinali con gangli; nel secondo schema il sistema nervoso consiste di singole paia di gangli ciascuno con un definito territorio di innervazione (cerebroidi per il capo; pedali per il piede; palleali o pleurali per il mantello; viscerali per i principali organi del corpo) uniti tra loro da connettivi longitudinali e commisure trasversali: il tutto fa pensare al pantografo di un locomotore elettrico. Nei Cefalopodi tutti i gangli si riuniscono in una massa unica contenuta in una capsula cartilaginea.

I vari gruppi di Molluschi sono diversificati per: presenza o assenza di metameria; presenza o assenza di un capo; presenza o riduzione del piede; presenza, morfologia o assenza di una conchiglia.

La parete del corpo

Nei Molluschi si compone di tre strati: la cuticola, l'epidermide e la muscolatura. La cuticola è composta da vari aminoacidi e proteine sclerotizzate, conchine. L'epidermide è formata da uno strato epiteliale di cellule cuboidi o cilindriche quasi sempre provviste di ciglia, queste hanno attività secretoria e partecipano alla formazione della cuticola; altre sono localizzate sulla superficie ventrale e secernono muco. Sulla parete dorsale o mantello invece vi sono cellule che costituiscono le ghiandole della conchiglia. Altre cellule epidermiche formano le papille epidermiche che sono strutture recettrici. Lo strato muscolare è separato da una membrana basale. Esso è formato generalmente da due strati di fibre muscolari lisce: uno circolare esterno, uno diagonale medio ed uno longitudinale interno.

Mantello e cavità palleale

Il mantello costituisce la parete corporea dorsale. Nelle fasi del suo sviluppo si forma la cavità del mantello che contiene le branchie o ctenidi e riceve il materiale fecale nonché i prodotti dei sistemi escretorio e riproduttore.

Le pliche rivestono le conchiglie poste lateralmente e sul lato posteriore formano i sifoni inalanti ed esalanti per il passaggio dell'acqua. Questa viene a

contatto con i ctenidi che estraggono materiale alimentare e provvedono agli scambi gassosi. L'acqua viene fatta scorrere dal movimento delle ciglia.

Nei Cefalopodi questa funzione è esercitata dalla muscolatura del mantello, poichè non essendo costretto dalla conchiglia, il mantello si contrae e si espande facendo entrare l'acqua nella cavità del mantello, e poi, la spinge fuori attraverso il sifone, (dopo che è entrata in contatto con i ctenidi, ano, pori genitali e sistemi escretori), fungendo da sistema di locomozione.

Conchiglia

Benchè la varietà di forme e di dimensioni delle conchiglie dei molluschi sia grande, esse sono costituite tutte da carbonato di calcio a strati, rivestiti da uno strato di materiale organico chiamato periostraco che è formato da proteine combinate a chinoni (conchine). Gli strati di calcio sono nella porzione esterna calcitica e/o aragonitica prismatica ed uno strato interno lamellare o madreperlaceo non sempre presente.

I pigmenti che danno luogo alla colorazione delle conchiglie rappresentano sottoprodotti metabolici, sul tipo delle melanine, purine, porfirine e pirroli. La forma e la complessità delle conchiglie è correlata all'habitat e al comportamento. Ad esempio le conchiglie con spirali basse danno maggiore stabilità col moto ondoso potente, come le conchiglie basse

delle patelle sono adatte a resistere alle forti onde. Le conchiglie spesse o rigonfie ed una fessura stretta nei Bivalvi sono di protezione dai predatori.

Le conchiglie degli scafopodi sono tubulari ed affusolate, aperte su ambedue le estremità; sono generalmente ricurve e la parte concava corrisponde alla superficie dorsale. Anche in questi molluschi il mantello è ampio e riveste per intero la parte ventrale della conchiglia. Lo stomaco posteriore funge da poro sia afferente che efferente per le correnti d'acqua.

Riproduzione

I molluschi sono di norma a sessi separati, tuttavia è abbastanza diffuso l'ermafroditismo. L'incontro dei gameti avviene nel mezzo liquido, ovvero implica metodiche di fecondazione interna più o meno sofisticate. Le uova presentano normalmente una segmentazione totale, ma ineguale, di tipo spirale. La larva che primitivamente ne deriva è spesso omologata a quella degli Anellidi, e correlativamente definita trocofora. In realtà, essa è simile ad una vera trocofora, ma non presenta una completa omologia con essa. Le larve di tipo trocofora derivano indipendentemente da una forma larvale, definita pericalimma, caratterizzata da un rivestimento di cellule disposte a campana (calimma) e da una placca apicale al centro della quale si situa un ciuffo di ciglia. Attraverso una serie graduale di modifiche, la larva pericalimma,

presente ancora oggi in alcuni Solenogastri e Bivalvi, si è trasformata nelle larve, dette stenocalimma, dei Solenogastri e degli Scafopodi, nella pseudotrocofora dei Poliplacofori e di taluni Gasteropodi, e nel veliger dei Gasteropodi Prosobranchi più evoluti e della gran parte dei Bivalvi.

BIOLOGIA DEI BIVALVI

Evoluzione e sistematica

Noti anche come Pelecipodi, i Bivalvi comprendono circa 20.000 specie distribuite sia in acque marine (circa 600 sarebbero presenti nel Mediterraneo) che in acque dolci di tutto il mondo. Le dimensioni secondo l'asse maggiore della conchiglia variano fra il millimetro e oltre un metro (*Tridacna gigas*).

I Bivalvi, molto probabilmente, hanno preso origine da antenati comuni ai primitivi Monoplacofori adattati a vivere su fondi sabbiosi e che hanno subito una progressiva compressione laterale del corpo e, quindi, un prolungamento e un appiattimento laterale della conchiglia. Il processo evolutivo dei Bivalvi si ritiene corrisponda, in linea di massima, al loro sviluppo embrionale, che dal "veliger" (larva), porta alla formazione di una conchiglia bivalve, attraverso una fase con iniziale conchiglietta singola. In tale processo i lobi del mantello

avrebbero aderito alle valve, mediante muscoli palleali e, solo in un secondo momento, sarebbero comparsi i muscoli adduttori. I Bivalvi più primitivi sono i cosiddetti Paleotassodonti: da questi, sarebbero poi derivati tutti gli altri, per progressivo adattamento alla nutrizione per filtrazione e per successiva modificazione della struttura della conchiglia e della sua cerniera, in rapporto alle varie tipologie ecologiche.

I Bivalvi si suddividono in *Paleotassodonti* (*Nucula*), *Criptodonti* (*Solemya*), *Pteriomorfi* (arche, cozze, pettini, ostriche), *Paleoeterodonti* (Bivalvi d'acqua dolce) *Eterodonti* (vongole, telline, cuori, canalicchi), e *Anomaledesmati*. Le prime due corrispondono in una diffusa classificazione oggi chiaramente inadeguata, alla sottoclasse dei Protobranchi, le tre successive e parte dell'ultima alla sottoclasse dei Lamellibranchi e la restante parte dell'ultima alla sottoclasse dei Settibranchi.

Anatomia interna

Nei Bivalvi, i lobi del mantello possono rimanere distinti l'uno dall'altro, semplicemente collabendo, a valve chiuse, oppure nella maggioranza dei casi, si saldano tra loro in uno o più punti. Spesso sono presenti tre aperture che corrispondono rispettivamente all'apertura esalante o anale, alla apertura

inalante o branchiale ed alla fenditura pedale, attraverso la quale possono sporgere all'esterno il piede e il fascio di filamenti del bisso (quando presente). Attorno alle due aperture posteriori, il mantello può estendersi in due tubi più o meno lunghi: il sifone inalante (dorsale) e il sifone esalante (Fig. 2), che permettono all'acqua di entrare ed uscire anche quando i lobi del mantello collabiscono o si saldano per gran parte della loro estensione.

Il processo di fusione dei lobi del mantello ha grande importanza, non solo per regolare la circolazione dell'acqua nella cavità palleale, ma anche per impedire la penetrazione in essa di particelle di sabbia o di fango, soprattutto nel caso delle specie che vivono infossate nel substrato. In queste ultime, tra l'altro, i sifoni spingendosi al pari o al di sopra del livello superficiale del substrato, sono in grado di evitare o limitare l'ingresso dei detriti nella cavità palleale. In alcuni casi (*Tellina*, *Scrobicularia*), il sifone inalante è più lungo dell'esalante e viene utilizzato per aspirare dalla superficie del fondo materiali utili per l'alimentazione.

Nella maggior parte dei Bivalvi l'acqua penetra all'interno della cavità palleale dalla parte posteriore del corpo, tramite l'apertura od il sifone inalante. Dopo esser fluita nella parte inferiore della cavità palleale (camera inalante o sottobranchiale), è richiamata a filtrare attraverso le branchie e, spinta nella parte superiore (camera esalante o soprabranchiale), viene espulsa

all'esterno tramite l'apertura o il sifone esalante.

È opinione comune che i Bivalvi più primitivi vivessero superficialmente infossati in substrati sabbiosi e fangosi, come è ancora oggi evidente nei Paleotassodonti e nei Criptodonti. Quando, in seguito all'appiattimento laterale del corpo e alla comparsa delle valve, la bocca venne a trovarsi non più a livello del substrato, come negli antenati Monoplacofori, ma in alto, le labbra boccali si sarebbero trasformate in strutture tentacolari, adatte a raccogliere il cibo da portar alla bocca. A tali strutture corrispondono i palpi labiali, ossia appendici munite di un tentacolo estensibile, detto proboscide del palpo.

Tramite le proboscidi, i primitivi Bivalvi (come gli attuali Nuculoidi), raccoglievano le particelle alimentari da condurre alla bocca. In qualche gruppo di Paleotassodonti ebbe inizio il meccanismo di filtrazione delle particelle direttamente dalla corrente d'acqua inalante, tramite le branchie, e ciò dette il via ad un imponente processo di radiazione evolutiva. Comparvero così, Bivalvi a branchie più sviluppate (Lamellibranchi). In tali branchie si sviluppò un solco alimentare, un solco, cioè, collocato in basso sulle lamelle branchiali, nel quale il cibo trattenuto dalle ciglia e inglobato in passerelle mucose veniva avviato per essere spinto, sempre tramite battito ciliare, verso i palpi labiali e da questi alla bocca. Per migliorare la capacità filtrante, vennero

selezionate branchie con lamelle più lunghe e più numerose. Si realizzarono perciò branchie più estese verso l'avanti del corpo e lamelle trasformate in filamenti via via più lunghi, con un andamento "a V", cioè con un ramo discendente saldato al rachide branchiale ed uno ascendente. Ogni branchia si trasformò in una lunga sequenza laminare di filamenti, disposti con regolarità, sia a destra che a sinistra del rachide, originando una emibranchia destra e una sinistra.

Una parte della muscolatura collega il piede alle valve e corrisponde alla muscolatura dorso ventrale degli altri Molluschi, l'altra parte, invece, rappresenta una muscolatura propria, limitata al solo piede. I muscoli dorso ventrali vengono a volte a mancare con la regressione e scomparsa del piede, ma in genere possono raggiungere il numero di sette coppie. In molti casi il piede (a volte in sinergia con il margine delle due valve della conchiglia), viene utilizzato per lo scavo e per l'ancoraggio al substrato molle, altre volte può modificarsi fino a mancare del tutto (*Ostrea*). In molte specie, che si sono adattate alla vita sessile, il piede si riduce notevolmente e si trasforma in un'appendice muscolosa, più o meno allungata, che viene spesso utilizzata per piccoli spostamenti ma, in particolare, per raccogliere e far aderire al substrato i filamenti, appena secreti ed ancora malleabili, della ghiandola del bisso. Quest'ultima rappresenta una delle caratteristiche principali dei Bivalvi, che è

sempre presente negli stadi larvali, ma può regredire o scomparire negli stadi adulti.

La ghiandola del bisso secerne una sostanza fluida collosa che si accumula in una cavità (cavità del bisso), quindi scorre in un solco che percorre il lato posteriore del piede e forma un filamento che, pressato sul substrato, vi si incolla solidificandosi.

Il bisso è un materiale complesso, costituito da proteine tannate e da collagene. Alcuni Bivalvi, conservano le ghiandole ipobranchiali nella cavità palleale.

Anche se esistono numerosi tipi di ghiandole palleali, ricordiamo solo le ghiandole acide delle *Lithophaga*, utilizzate per ammorbidire le rocce calcaree nelle quali scavano le loro tane.

Morfologia

Il corpo di un tipico Bivalve è caratterizzato da una massa viscerale, un mantello, un piede ed una conchiglia. La massa viscerale è sospesa lungo la linea dorsale mediana ed il piede muscolare è attaccato alla massa viscerale antero-ventralmente.

Gli ctenidi sono trattenuti in basso da entrambi i lati e ciascuno di essi è coperto da una piega del mantello. I margini posteriori delle pieghe del

mantello sono modificati per formare le aperture dorsale esalante e ventrale inalante.

In alcuni Bivalvi marini il mantello è trasformato in lunghi sifoni muscolosi, che consentono all'organismo di affossarsi nel fango o nella sabbia e di estendere i sifoni verso l'acqua sovrastante. I Bivalvi iniziano il movimento estendendo un sottile piede muscoloso tra le valve. Il sangue penetra nel piede, rendendolo turgido in modo che agisca come un'ancora nel fango o nella sabbia. Successivamente i muscoli longitudinali si contraggono per accorciare il piede e trascinare in avanti l'animale. Si muovono, generalmente, infossandosi per mezzo di un grosso piede muscolare, oppure possono attaccarsi al substrato o, in alcuni casi, muoversi con un caratteristico movimento a jet, chiudendo rapidamente le valve.

Conchiglia

La conchiglia dei Bivalvi è tipicamente costituita da tre strati: uno strato esterno, poco sviluppato, proteico (periostraco); uno strato intermedio prismatico, costituito da carbonato di calcio in fase calcitica (mesostraco); uno strato più interno, costituito da carbonato di calcio in fase aragonitica (ipostraco); quest'ultimo, detto anche madreperlaceo, è responsabile della formazione della madreperla e delle perle.

La conchiglia dei Bivalvi, è formata da due valve, una destra e una sinistra, articolate lungo il margine dorsale, in corrispondenza di una zona detta cerniera (Fig. 1).

In tutti i Bivalvi, la conchiglia, allo stadio larvale si presenta come un pezzo unico di natura cuticolare, non calcificato, collocato in posizione dorsale in corrispondenza della ghiandola della conchiglia. La calcificazione prende inizio sui due lati, destro e sinistro, di questo scudo (produssoconca) che, quindi, si piega e si divide in due piccole valve tenute assieme da una parte non calcificata, in corrispondenza della quale si originerà il legamento (Fig. 1). Il margine del mantello è suddiviso in tre pieghe, di cui quella esterna è addetta alla secrezione della conchiglia.

Sul margine dorsale della zona di articolazione, è generalmente presente il legamento elastico, in quasi tutti i Bivalvi, anche se spesso ridotto. Quest'ultimo tiene unite le valve laddove si articolano e, soprattutto, le mantiene divaricate. Il legamento elastico è costituito da uno strato esterno formato da lamelle parallele di una proteina fibrosa, e da uno interno, detto cartilagine o resilium, a struttura fibrosa e composto da proteine tannate e da carbonato di calcio sotto forma aragonitica. Il legamento è una struttura elastica con proprietà simili a quelle della gomma, che, quando le valve si chiudono per l'azione dei muscoli adduttori, è in alcuni casi compressa, in altri

striata.

Con il rilassamento degli adduttori, il legamento tende progressivamente ad acquisire la sua forma originaria e, quindi, a divaricare le valve.

La cerniera è rappresentata da una placca più o meno estesa lungo il margine dorsale della conchiglia, quasi sempre provvista di un sistema di dentelli e fossette che ingranandosi, i denti della valva destra nelle fossette della valva sinistra e viceversa, assicurano la perfetta apposizione delle valve e ne impediscono lo scivolamento l'uno sull'altra. La struttura della cerniera è diversa nei diversi gruppi di Bivalvi. L'intera superficie esterna delle valve può essere liscia, o è solcata da striature parallele al margine di accrescimento, che corrispondono alle strie di accrescimento, cioè alle zone dove, tra una fase e l'altra, l'accrescimento delle valve si arresta. La superficie interna delle valve è liscia, madreperlacea, e reca le impronte muscolari, quelle dei muscoli pedali, quelle dei muscoli adduttori e anche quelle dei muscoli del margine del mantello. Questi ultimi generano una linea curva, detta linea palleale, che, dall'impronta del muscolo adduttore anteriore, si continua fino a quella del muscolo adduttore posteriore. La linea forma talvolta rientranze più o meno marcate in corrispondenza dei sifoni palleali.

La conchiglia è equivalve se le due valve sono una l'immagine speculare dell'altra, come accade in molte specie, dette eutetiche, che vivono

presentando il piano che separa le due valve perpendicolari al substrato. È invece inequivalve quando una è più o meno marcatamente diversa dall'altra, come accade in molte specie pleurotetiche, che vivono adagiate o fuse con una valva al substrato(per esempio *Ostrea*, *Spondylus* etc.) e che, perciò, presentano il piano che separa le due valve parallelo al substrato stesso.

Sistema muscolare

Le due metà della conchiglia dei Bivalvi sono collegate da uno o due muscoli adduttori che, attraversando il corpo da una parte all'altra si inseriscono sulle parti anteriore e posteriore della porzione medio-dorsale delle valve. Essi agiscono in antagonismo con il legamento elastico e, contraendosi, determinano lo schiacciamento o lo stiramento del legamento e la chiusura delle valve, anche per lunghi periodi di tempo.

La situazione primitiva è quella dimiaria, che comporta la presenza di un adduttore anteriore e di uno posteriore di dimensioni coincidenti (situazioni isomiaria), ma, spesso, si ha la regressione (situazione anisomiaria), o addirittura la scomparsa del muscolo adduttore anteriore (situazione monomiaria). Negli Anomalodesmati, comunemente dimiari, possono anche sparire gli adduttori (situazione amiaria). Molti Bivalvi presentano muscoli adduttori costituiti da due parti: una translucida ed una opaca. Quella

translucida corrisponde a fibre muscolari lisce e, quella opaca a fibre muscolari striate, che costituiscono il cosiddetto muscolo a blocco.

Tale muscolo può bloccare il suo stato di contrazione per lunghi periodi di tempo, con minimo dispendio energetico.

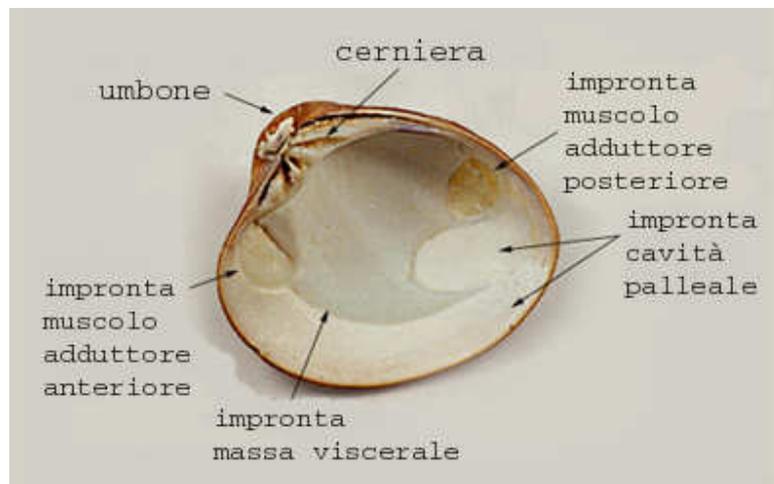


Fig. 1

Apparato respiratorio

Lo scambio gassoso viene effettuato sia dal mantello che dalle branchie.

Le branchie sono contenute all'interno della cavità palleale, nell'incavo tra

i lobi del mantello e il piede, e sono quasi sempre in numero di due, una per parte.

In alcuni Anomalodesmati abissali tuttavia, possono ridursi fino a scomparire quasi del tutto, lasciando solo un setto privo di lamelle. Originariamente posteriori e simili a quelle dei Gasteropodi primitivi, le branchie dei Paleotassodonti (*Nucula*) si sono trasformate nelle altre sottoclassi, acquisendo con l'evoluzione, una posizione più laterale e si sono allungate estendendosi verso l'avanti. Il motivo di tale trasformazione e delle successive ulteriori modificazioni nella forma e nella struttura può essere identificato nel successivo adattamento alla loro utilizzazione non solo come organi respiratori, ma anche come organi per filtrare dall'acqua particelle alimentari e plancton.

Nella maggior parte dei Bivalvi le branchie sono notevolmente modificate per la filtrazione: l'acqua entra nel sifone inalante, spinta dall'azione ciliare, penetra poi nei dotti attraverso dei pori, collocati tra i filamenti delle lamelle, prosegue dorsalmente entro la camera soprabrancale comune ed esce infine attraverso l'apertura esalante.

I principali tipi di nutrizione dei Bivalvi sono definiti dalla struttura delle branchie: nei Protobranchi, ad esempio, gli ctenidi vengono usati solamente per la respirazione ed il cibo è preso tramite i palpi labiali. Nei Lamellibranchi

e nei Filibranchi gli ctenidi catturano le particelle di cibo tramite il loro rivestimento mucoso, trasferendole successivamente ai palpi labiali per mezzo di cilia; questi due gruppi differiscono nel fatto che nei Filibranchi i vari tipi di ctenidi sono connessi solo da giunzioni ciliari, mentre nei Lamellibranchi le giunzioni sono ricoperte da tessuto. I Settibranchi presentano un setto-pompa attorno alla cavità del mantello, la cui funzione è quella di pompare il cibo.

Apparato digerente

L'apparato digerente è semplificato: mancano mandibole, ghiandole faringee, apparato radulare e organo subradulare. Lo stomaco, (come nei Monoplacofori e dei Gasteropodi), è affiancato da un sacco dello stilo, che secerne lo stilo cristallino.

Quest'ultimo spinto in avanti e costretto a ruotare su se stesso dal battito delle ciglia del suo sacco, batte contro lo scudo gastrico, disfacendosi e amalgamandosi al cibo. Le particelle alimentari, parzialmente digerite dagli enzimi dello stilo, vengono convogliate da creste ciliate alle aperture dei dotti dei due lobi della ghiandola digestiva. In questa avviene la digestione intracellulare.

Le particelle di rifiuto vengono invece avviate, tramite un solco intestinale ciliato, direttamente all'intestino. La ghiandola digestiva secerne anche enzimi

che agiscono a livello dello stomaco. Nei Paleotassodonti (*Nucula*), la digestione è totalmente extracellulare e avviene nello stomaco. L'intestino è più o meno lungo e spesso forma delle anse attorno allo stomaco e nella ghiandola digestiva. L'epitelio interno dell'intestino si solleva ad originare una piega interna, il tiflosolis.

Accanto a rare forme carnivore, sono noti vari Bivalvi commensali ed alcuni parassiti dell'intestino di Oloturie (*Entovalva*).

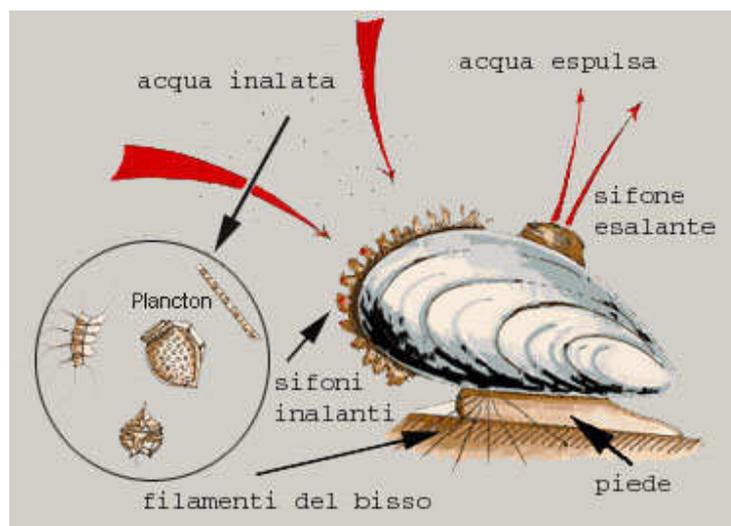


Fig. 2

Apparato circolatorio

Il sistema circolatorio è costituito da un cuore tricamerato, che giace nella cavità pericardica ed è costituito da due atri e un ventricolo. Una parte del

sangue viene ossigenata nel mantello e successivamente riportata nel ventricolo attraverso gli atri; la restante parte circola attraverso i seni e con una vena raggiunge i reni; da lì va fino alle branchie per l'ossigenazione, ritornando poi agli atri.

Apparato escretore

L'apparato escretore consta di due nefridi foggiate "ad U", di tipo metanefridiale (Organi di Bojanus) collocati in genere sotto la cavità pericardica, in posizione ventrale e posteriore rispetto al cuore. Il nefrostoma ciliato si apre nella cavità pericardica che è ripiena di un liquido rappresentante (come nei Gasteropodi), un ultrafiltrato dell'emolinfa. I prodotti del catabolismo proteico sono rappresentati principalmente da ammoniaca, urea e, forse, anche da acido urico.

Una coppia di ghiandole pericardiche, associate alla cavità pericardica nella quale sboccano, eliminano acido ippurico.

Sistema nervoso

Il sistema nervoso è semplice ed è costituito da due gangli cerebrali più o meno fusi a due gangli pleurali situati a lato dell'esofago. I due gangli

cerebrali, si collegano tra loro tramite una breve commessura sopraesofagea. Dal complesso gangliare cerebro pleurale si diparte, sui due lati, un cordone nervoso, detto connettivo cerebroviscerale, che va a collegarsi ad uno dei due gangli viscerali situati posteriormente, al disotto del muscolo adduttore posteriore. Per ogni lato, inoltre, sempre dal complesso cerebropleurale, si diparte un cordone nervoso, detto connettivo comune cerebro e pleuropedale, che termina in un ganglio pedale. Tra gli organi di senso più significativi si elencano le statocisti innervate dai gangli cerebrali.

Mancano gli occhi cefalici, ma sono presenti ocelli con varie collocazioni: sui bordi dei lobi del mantello, sul primo filamento branchiale e sulle piccole appendici tentacolari che bordano le aperture sifonali.

Apparato riproduttore

L'apparato riproduttore consta di due gonadi che non hanno alcun contatto diretto con la cavità pericardica e che possono fondersi in un unico complesso. I gameti maturi sono riversati all'esterno attraverso i nefridi, oppure attraverso veri e propri gonodotti.

La fecondazione è esterna, anche se talvolta avviene all'interno della cavità palleale. I sessi sono separati, ma non rari sono i casi di ermafroditismo. Gli spermatozoi sono di tipo primitivo. Le uova fecondate, trattenute all'interno

della cavità palleale, o all'interno dei tubi acquiferi delle emibranchie esterne, o espulse nell'acqua ambientale, subiscono una segmentazione totale di tipo spirale, ma ineguale fin dalla prima divisione. Ne risulta, talvolta, una larva di tipo pericalimma, simile a quella dei Solenogastri, ma più spesso di tipo veliger. Il veliger possiede, talvolta, piccoli occhi, un velum non lobato (viene perso nella metamorfosi) e una ghiandola della conchiglia. Alla base del piccolo abbozzo del piede è sempre presente la ghiandola del bisso, anche nelle numerose specie che da adulte ne sono totalmente prive.

Nei Paleoeterodonti di acqua dolce si conoscono non solo fenomeni di incubazione delle larve, ma anche tipi larvali peculiari corrispondenti a veliger modificati, come glochidium (Unionidi) e i lasidium (Mustelidi). Tali larve, dopo che hanno compiuto le prime fasi dello sviluppo all'interno delle emibranchie esterne, vengono espulse dalla cavità palleale tramite l'apertura esalante, proprio quando il mollusco madre percepisce il passaggio di un pesce. I glochidium non hanno velum, ma possiedono un filamento di bisso embrionale ed un apice delle due valve embrionali munito di apofisi spinescenti.

Essi possono, così, agganciarsi ed ancorarsi al corpo del pesce, su tessuti molli, in corrispondenza delle pinne, delle branchie o delle labbra.

L'ospite reagisce incapsulando il glochidium in una sorta di cisti la quale,

tuttavia, non serve altro che a meglio proteggere il piccolo parassita. Quest'ultimo, dopo essersi nutrito a spese dei tessuti dell'ospite per 10-30 giorni, esce dalla cisti e si lascia cadere sul fondo, avviando la sua trasformazione in adulto.

Ecologia

La gran parte dei Bivalvi è marina, bentonica, e vive in prossimità delle coste.

Non mancano, tuttavia, le specie abissali che si spingono fino ai 5000 metri di profondità. Molte specie sono adattate ad infossarsi più o meno profondamente nel substrato, nascondendosi così ai predatori ed utilizzando come alimento i detriti del fondo o particelle sospese nell'acqua. Anche la maggior parte dei Bivalvi di acqua dolce appartiene a questa categoria. Altre specie vivono, invece, sulla superficie del substrato ancorandosi con il bisso o saldandosi al substrato ora con la valva destra, ora con la valva sinistra. Altre specie di superficie non si agganciano al substrato, né con il bisso, né mediante fusione di una valva; queste sono specie adattate alla vita su fondi sabbiosi, con valve vistosamente colorate e dotate della possibilità di nuotare a propulsione, chiudendo velocemente le valve. Nelle acque dolci, lacustri o fluviali, *Dreissena polymorpha*, si aggancia al fondo e ai substrati scoscesi o

sospesi, mediante filamenti di bisso, originando fitte popolazioni, spesso dannose all'ambiente e all'economia umana.

Particolarmente interessante è il modo di vita dei Bivalvi scavatori, alcuni derivanti da specie dell'epifauna provviste di bisso, altre da specie che usavano infossarsi nel substrato. Sin dalle prime fasi che seguono la caduta sul fondo, la larva in metamorfosi si ancora, vuoi mediante il piede provvisto di una superficie a ventosa, vuoi mediante il bisso, ed inizia a scavare meccanicamente, mediante l'azione della parte anteriore delle valve, o mediante l'azione combinata di secrezioni del mantello e l'azione delle valve. Alcune specie di Bivalvi scavano il legno, nutrendosi del materiale via via asportato. Tali specie erano particolarmente temute in passato, quando il legno era l'unico materiale utilizzato nell'industria canteristica. I Bivalvi ora ricordati restano imprigionati, per tutta la vita, nelle loro gallerie e comunicano con l'esterno solo tramite lunghi sifoni.

Il principale fattore limitante per le specie marine è ovviamente la salinità. Esistono, tuttavia, accanto alle specie stenoaline, numerose specie eurialine, che tollerano variazioni ampie della salinità e che, quindi, sono in grado di colonizzare le foci dei fiumi, o lagune costiere o mari poco salati.

SCOPO DELLA RICERCA

Obiettivo della presente tesi è stato l'allestimento di un saggio basato sull'analisi del DNA satellite e successivamente degli ITS (internal transcribed spacer), con il quale si è proceduto al riconoscimento di specie in prodotti della pesca preparati.

In tal modo si intende offrire una metodologia diagnostica adatta al riconoscimento di specie in prodotti alimentari per i quali i processi di trasformazione hanno alterato l'integrità anatomica così da impedire l'applicazione di tecniche di riconoscimento basate su criteri tassonomici.

Il saggio ha la funzione di rendere più certe ed incisive le attività di controllo e di identificazione di specie in casi dubbi per i quali possono ricorrere gli estremi di frode commerciale (*vendita di aliud pro alio*). La necessità di giungere ad una chiara identificazione delle partite di molluschi bivalvi è incoraggiata ed esplicitamente richiesta nella legislazione comunitaria. Una maggiore trasparenza a tutti i livelli della politica alimentare (Reg. CE 178/2000) contribuisce ad accreditare garanzia ai prodotti posti in commercio e ad infondere maggiore sicurezza nel consumatore, indirizzandolo verso una scelta consapevole.

A tal fine sono stati campionati sia molluschi bivalvi reperiti sul

mercato ed etichettati come *Tapes decussata* sia esemplari integri di sicura identificazione appartenenti al genere *Meretrix* e provenienti dalle coste del Vietnam. Infine, per avere un quadro più ampio delle possibilità applicative della metodica presa in studio, l'identificazione di specie è stata effettuata anche su campioni appartenenti ad altri generi di molluschi bivalvi reperiti sul mercato.

È stato eseguito un saggio di estrazione, clonaggio e sequenziamento del DNA satellite dei campioni dei generi *Meretrix* e *Tapes*. Successivamente, per essere sicuri che ci trovavamo in presenza di un satellite di DNA e non di una sequenza ripetuta, è stato effettuato un esperimento di Southern-Blotting e Dot-Blot quantitativo. Dall'analisi delle sequenze si è ottenuto un DNA satellite molto simile nelle varie specie appartenenti a generi diversi (dato che non è stato mai trovato in letteratura). Per questo motivo è stato eseguito un saggio di estrazione e amplificazione sugli ITS allo scopo di disegnare dei primers specifici per ogni specie oggetto di studio che ci permettessero con un solo saggio di PCR di risalire alla specie di appartenenza del DNA amplificato.

MATERIALI E METODI

ESTRAZIONE DI DNA DA TESSUTI

Il DNA è stato estratto da sacche spermatiche e dal campione in toto.

I tessuti sono stati sminuzzati e posti in provetta con Tris-EDTA (TE), pH 7,5 in ragione di 1 ml per ogni 100 mg di tessuto.

Il metodo di estrazione si basa sulla proprietà del fenolo di legarsi a proteine e lipidi, ma non al DNA. Il fenolo è un liquido più denso e non miscibile con l'acqua. Quando questi due liquidi sono mescolati sembra che si sia ottenuta una sola fase, ma dopo un istante esse tornano a separarsi per gravità: il fenolo sotto e l'acqua sopra. Una breve centrifugata le separa perfettamente. Supponiamo ora che nella fase acquosa di partenza sia contenuta una certa quantità di proteine complessate ad acidi nucleici e di lipidi. Se si centrifuga dopo aver agitato energicamente l'emulsione, si osserveranno chiaramente le due fasi, separate spesso da un residuo bianchiccio semisolido all'interfaccia. La maggior parte delle proteine si troverà adesso nella fase fenolica, detta fase organica, mentre gli acidi nucleici si troveranno in soluzione nella fase acquosa sovrastante. Quando è presente,

L'interfaccia semisolido contiene una certa quantità di proteine denaturate che non sono passate nella fase fenolica, spesso associate ad altri contaminanti cellulari ad alto peso molecolare. Se si preleva delicatamente la fase acquosa, senza portarsi dietro frammenti dell'interfaccia e si ripete l'operazione, si otterranno alla fine due fasi ben separate con un'interfaccia quasi assente. Ripetendo ancora tutta la procedura si arriverà ad ottenere due fasi limpide senza alcuna interfaccia. A questo punto bisogna separare la fase acquosa da ogni residuo di fenolo. Questo si può ottenere facilmente se l'ultimo ciclo miscelazione – agitazione - centrifugazione viene effettuato aggiungendo al fenolo anche una certa quantità di cloroformio che ha il duplice effetto di catturare il fenolo e di solubilizzare i lipidi. A questo punto il campione è pressoché privo di proteine, grassi e carboidrati.

Con questo metodo siamo riusciti ad estrarre DNA sufficiente solo per la prima parte di questo lavoro, i campioni congelati arrivati in un secondo momento erano molto degradati e per migliorare la resa abbiamo utilizzato il kit Nucleospin della M-Medical.

A causa del basso contenuto di DNA si parte almeno da 0,5 gr di campione.

Per aumentare la resa sono state apportate delle modifiche alla eluizione. Aggiungere 50µl di CE e incubare tutta la colonna per 3 minuti a 70 °C. Aggiungere altri 50 µl di CE e incubare 2 minuti tutta la colonna a 70 °C.

PRECIPITAZIONE DEL DNA

Gli acidi nucleici possono essere precipitati con etanolo o con isopropanolo. La precipitazione degli acidi nucleici necessita di sali (NaCl, sodio acetato, potassio acetato, ecc.), che in genere, sono usati in concentrazioni comprese tra 0.1 ed 1M. La percentuale di alcool richiesta tende a diminuire all'aumentare della concentrazione del sale e delle dimensioni dei frammenti di DNA. Il precipitato in etanolo è maggiormente solubile in acqua rispetto al precipitato in isopropanolo. L'isopropanolo precipita meno bene i frammenti di piccole dimensioni di DNA, per cui viene utilizzato allo scopo di purificare il DNA ad alto peso molecolare.

La precipitazione con etanolo si usa per recuperare anche DNA di piccole dimensioni, secondo la seguente procedura: si aggiunge alla soluzione del DNA 1/20 di volume di potassio (o sodio) acetato 5M oppure 1/10 di volume di NaCl 5M; si aggiungono alla soluzione ottenuta 2.5 volumi di etanolo freddo, si mescola bene e si tiene a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 1-6 ore (più le soluzioni sono diluite, più i tempi di precipitazione vanno allungati); si centrifuga a 10.000-14.000 r.p.m. per un minuto a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e si scarta il sovrnatante.

Se il DNA deve essere sottoposto a digestione con enzimi di restrizione, si

lava il precipitato con etanolo 70%, si centrifuga a 10.000-14.000 r.p.m. per un minuto a 4°C, si scarta il sovrinatante e si risospende in TE dopo aver brevemente essiccato il precipitato.

La precipitazione con isopropanolo è consigliata quando si vogliono eliminare i nucleotidi e gli oligonucleotidi nel DNA. Non è consigliata per recuperare i frammenti molto piccoli di DNA. Questa precipitazione viene in genere fatta a 0-25 °C (sul banco o in frigo, non in freezer) con la seguente procedura:

1) se il DNA è in soluzione contenente 1-2 M di sale, si aggiunge 1/2 di volume di isopropanolo.

Se il DNA è in soluzione senza sali, si aggiungono 1.0-1.5 volumi di isopropanolo 88%-potassio acetato 0.2 M.

Si mescolano bene le soluzioni e si lascia precipitare a 0-25 °C per un tempo oscillante tra 15 minuti e 2 ore (si usano i tempi più lunghi e temperature più basse per le soluzioni molto diluite).

Si centrifuga a 10.000-14.000 rpm per 5-10 minuti a temperatura ambiente e si scarta rapidamente il sovrinatante facendo attenzione a non perdere il precipitato, che è poco visibile.

Se il DNA viene da una precipitazione a bassa concentrazione salina (punto 1B), si passa direttamente al punto 5; se il DNA viene da una precipitazione

ad alta concentrazione salina (punto 1A) e deve essere usato con enzimi, si lava il precipitato con isopropanolo 70% freddo, si centrifuga per 5 minuti a 10.000-14.000 rpm e si scarta il sovrantante.

Si risospende il precipitato in TE dopo averlo brevemente seccato (centrifugazione a bassa velocità con i tubi aperti).

DIGESTIONE DEL DNA CON ENDONUCLEASI DI RESTRIZIONE

Le endonucleasi di restrizione sono enzimi capaci di idrolizzare i ponti fosfodiesterici interni del DNA, riconoscendo particolari sequenze e tagliando il DNA all'interno o vicine ad esse. L'attività catalitica delle diverse endonucleasi di restrizione varia in funzione del tampone utilizzato per l'incubazione: vengono quindi usati vari tamponi che si differenziano fra loro per composizione, forza ionica e pH.

L'attività catalitica si misura in unità internazionali: si definisce unità di una endonucleasi di restrizione la concentrazione di enzima che digerisce completamente 1 µg di DNA di fago λ in un'ora a 37 °C.

Le endonucleasi di restrizione usate per digerire il DNA genomico sono state: *Asp718I* (*KpnI*), *EcoRV*, *NdeI*, *NheI*, *StuI*.

Il tempo di incubazione usato per digerire il DNA è in genere di 14 ore, ma

può variare da 3 a 16 ore.

Almeno 5µg di DNA genomico purificato è stato sottoposto a digestione con 20 unità di diversi enzimi di restrizione BclI, EcoRI, EcoRV, HaeIII, KpnI. È stata quindi preparata una digestione con questi due enzimi partendo da almeno 20 µg di DNA.

Le bande purificate dal gel sono state clonate.

ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

L'elettroforesi su gel di agarosio rappresenta un metodo rapido ed efficace sia per determinare il peso molecolare relativo di frammenti di DNA che per separare frammenti di DNA di diverse dimensioni. La velocità di migrazione dei frammenti dipende dai seguenti fattori: peso molecolare, concentrazione del gel di agarosio, conformazione del DNA, conducibilità del mezzo e intensità del campo elettrico applicato.

La concentrazione dei gel agarosio usata in genere oscilla tra 1% e 3% e la formazione del gel, così come la corsa elettroforetica, sono effettuate in tampone TAE (Tris- Acetato- EDTA), in presenza di tracce di bromuro d'etidio che si intercala tra la doppia elica del DNA e lo rende fluorescente ai raggi ultravioletti. Al termine dell'elettroforesi il gel viene osservato al

transilluminatore a luce UV ed eventualmente fotografato.

LIGAZIONE DI FRAMMENTI DI DNA CON ESTREMITÀ “COESIVE” CON IL PLASMIDE pBS+ (CLONAGGIO)

La ligazione è una reazione che porta alla formazione di ponti fosfodiesterici tra l'estremità 3'-OH e l'estremità 5'-P adiacenti nel DNA. L'enzima di solito usato per catalizzare questa reazione è la DNA ligasi estratta dal fago T4. La reazione è, di solito, usata per inserire all'interno di vettori plasmidici frammenti di DNA estraneo. Per la ligazione di frammenti di DNA si adoperano campioni digeriti con l'enzima opportuno, precipitati con etanolo o isopropanolo e risospesi in acqua o TE oppure purificati mediante gel preparativo. In alcuni casi può essere conveniente la linearizzazione del DNA plasmidico pBS+ (vettore): per far ciò bisogna procedere ad una defosforilazione delle sue estremità per evitare che esse si rileghino riformando, quindi un vettore privo di inserto.

La miscela di reazione contiene, in 20-40 µl di volume finale, 0.2-2 µg di DNA e 14 unità di DNA ligasi di T4. Tale miscela viene incubata a 14 °C per circa 16 ore. Aliquote di questa miscela possono essere utilizzate per la successiva trasformazione.

Questo vettore è stato opportunamente linearizzato con BamH I per il clonaggio dei frammenti MboI e con ClaI per il clonaggio di quelli Taq I e defosforilato.

TRASFORMAZIONE DI *E. COLI* CON PLASMIDI DERIVATI DA LIGAZIONI

Un'aliquota (50-100%) della miscela di ligazione per la trasformazione viene incubata con 40µl di ceppi di *E. coli* XL1 competenti e si lascia la miscela in ghiaccio per 30-40 minuti. Successivamente si provoca uno shock (2 minuti a 37°C) e si incuba in ghiaccio nuovamente per 5 minuti, per favorire la penetrazione del plasmide all'interno del batterio. Dopo questo passaggio i batteri vengono piastrati su terreno contenente ampicillina ed IPTG, e le piastre incubate per circa 18 ore a 37 °C.

La caratteristica principale del ceppo *E. coli* XL1 è una mutazione (lac-ZDM15) del gene *lac-1* che determina una iperproduzione del repressore dell'operone del lattosio e la mancanza del peptide α della β -D-galattosidasi. La α -complementazione che genera enzima attivo può avvenire solo nei batteri che contengono un plasmide che esprime la parte N-terminale del gene *lacZ*. In presenza di opportuni substrati le colonie recanti il plasmide intatto (non ricombinante) presentano colorazione blu, mentre le colonie contenenti

plasmide ricombinante (con inserto) non produco α peptide e quindi non sono colorate.

SCREENING DEI CLONI RICOMBINANTI

La presenza dei cloni ricombinanti è stata fatta prelevando con un'ansa sterile la colonia bianca dalla piastra e diluita direttamente nella mix di PCR utilizzando i primers M13 direct e reverse e successivamente sequenziali.

AMPLIFICAZIONE DEL DNA SATELLITE MEDIANTE PCR

Per amplificare le unità ripetitive del DNA satellite abbiamo utilizzato i primers disegnati sull'unità ripetitiva S1 dei cloni T30 e M10.

Abbiamo utilizzato le seguenti coppie di primers:

dir.141 GTGAGCCTCTGATGG

rev.-146 GCTCACGACCCAAGA

Mer.09D GGTCGGCAACTTCGATGTAT 20mer

Mer.13R CGACCTCCGGATCCGT 16mer

Mer.315D CTCACACGAGTAAACGTGCA 20mer

Mer.321R GTGTGAGGGAGCCTGTTT 18mer

Programma della PCR:

Step 1: 95 °C, 3 min;

Step 2: 94 °C, 30 sec;

Step 3: 65 °C, 30 sec, – 0.5 °C per ciclo;

Step 4: ricicla a Step 2 per 10 volte;

Step 5: 94 °C, 30 sec;

Step 6: 55 °C, 30 sec;

Step 7: 65 °C, 30 sec;

Step 8 ricicla a step 5 30 volte;

Step 9: 70 °C, 2 min;

Step 10: 4 °C.

Per il sequenziamento delle unità ripetitive abbiamo utilizzato amplificati generati da almeno due coppie diverse di primers. In tal modo è stato possibile definire la sequenza nella zona di ciascuna coppia di primers mediante l'amplificato ottenuto con l'altra coppia di primers.

PURIFICAZIONE DI FRAMMENTI DI DNA CONTENENTI UNITÀ RIPETITIVE

Dopo opportuna digestione, il DNA genomico è stato sottoposto ad elettroforesi preparativa.

Le bande corrispondenti alle unità ripetitive S1a o S1b sono state escisse dal gel e il DNA di interesse viene recuperato. Nel caso di unità ripetitive ottenute per PCR, la miscela di amplificazione viene direttamente caricata su gel e le bande corrispondenti alle unità ripetitive sono state escisse e recuperate.

La porzione del gel contenente il frammento viene posta in microprovette Eppendorf. Si aggiungono circa 400 μ l di KI 3M per ogni 100 mg di gel, si incuba a 45-50 °C per alcuni minuti fino a che tutto il gel sia sciolto; si aggiungono 2-5 μ l di resina (glass-milk) dopo averla ben risospesa su vortex. Si mescola la sospensione su agitatore per circa 10 min. (assorbimento del DNA alla resina). Si centrifugano i tubi per 10 sec. a 6.000 rpm, si rimuove tutto il sovrnatante e si risospende sul vortex la resina con 400 μ l di New Wash Buffer (una soluzione di sali in etanolo al 95% con un pH di 7.0-8.5, che viene conservato a -20 °C), si centrifuga nuovamente per 10 sec. a 6.000 rpm e si scarta il sovrnatante. Si ripete il lavaggio con NEW WASH buffer altre due volte; dopo aver scartato l'ultimo sovrnatante si ripete la

centrifugazione e si eliminano completamente le ultime tracce di New Wash Buffer. Si risospende la resina in 10 µl di TE, si tiene 2-3 min. a 45°C circa, si centrifuga per 5 min. a 13.000 rpm e si trasferiscono 10 µl di TE con il DNA in una provetta Eppendorf, si ripete l'estrazione con 10 µl di acqua e si combinano i due sovranatanti.

I frammenti ottenuti per digestione dal DNA genomico sono stati utilizzati per esperimenti di clonaggio. I frammenti di PCR sono stati utilizzati per determinare la sequenza genomica dell'unità ripetitiva.

TRASFERIMENTO DEL DNA SU FILTRO (SOUTHERN BLOT)

Per evidenziare il DNA satellite dopo digestione con endonucleasi di restrizione lo si sottopone ad elettroforesi su un gel di agarosio. Successivamente il gel contenente il DNA viene denaturato in soluzioni alcaline con elevata forza ionica e trasferito su di una membrana di nitrocellulosa oppure di nylon, su cui successivamente viene ibridato.

La tecnica prende il nome di blotting perché gli acidi nucleici sono trasferiti per capillarità su di una membrana porosa tramite una soluzione salina.

Su un supporto piano si mette un foglio di carta assorbente (Whatman

3MM o simile) bagnato con 10x SSC, che fa da ponte tra due vaschette piene di una soluzione salina concentrata ad elevata forza ionica (10x SSC). Sopra la carta si adagia il gel, sul gel si pone il filtro di nitrocellulosa e su questo prima alcuni fogli di carta da filtro 3MM e poi una pila di carta da filtro da banco. La soluzione salina salendo attraverso il gel per capillarità trascina con sé il DNA che si attacca alla nitrocellulosa con legami di tipo elettrostatico. Tali legami si possono rendere poi quasi permanenti seccando il filtro per un paio d'ore a 80 °C, sotto vuoto.

SONDE BIOTINILATE PER ANALISI DI IBRIDAZIONE

Le analisi di Southern blot e Dot-blot sono basate sull'ibridazione con sonde marcate, contenenti sequenze specifiche per le sequenze di DNA da evidenziare.

Le sonde da noi utilizzate contengono l'unità ripetitiva di M Meretrix, marcate per tutta la sua lunghezza con biotina. La presenza di ibridi viene evidenziata mediante streptavidina, coniugata alla fosfatasi alcalina.. Gli ibridi vengono evidenziati da una reazione cromatica in cui un fosfato, il 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP), viene idrolizzato dalla fosfatasi alcalina in presenza di un sale di diazonio (NBT).

REAZIONI DI SEQUENZA

Le reazioni di sequenziamento sono state effettuate utilizzando i dideossinucleotidi trifosfati fluorescenti come terminatori e analizzando le miscele di reazione su sequenziatore automatico.

Il DNA amplificato da sequenziare viene centrifugato a 12.000 rpm per 2 min. per eliminare eventuali tracce di resina (GeneClean). Si preleva senza agitare 1 μ l di DNA e si trasferisce in nuova provettina, si aggiungono 3 μ l di Mix contenente: H₂O, buffer e miscela Big Dye (Applied Biosystem); si aggiunge infine 1 μ l di primer specifico (uno dei due usati per l'amplificazione mediante PCR).

La reazione di sequenziamento è stata eseguita con il seguente programma:

Step 1: 94 °C, 2 min;

Step 2: 94 °C, 20 sec;

Step 3: 50 °C, 30 sec;

Step 4: 60 °C, 3 min;

Step 5: ricicla a step 2 per 25 volte.

Ai campioni, dopo amplificazione, vengono aggiunti 10 μ l di sodio acetato

0.3M pH 5.2 e 50 µl di etanolo assoluto. Dopo precipitazione a -20 °C per 30 min. e centrifugazione (12.000 rpm per 5 min. a 4 °C) il precipitato viene lavato 3 volte con etanolo 75%, seccato e risospeso in 30 µl di formammide.

I campioni, prima del caricamento su sequenziatore, vengono denaturati per 4 min. a 94 °C.

ANALISI DELLE SEQUENZE

Le sequenze acquisite dal sequenziatore ABI-PRISM 310 sono state analizzate mediante i programmi di software Sequenze Analysis, Sequence Navigator e Gene-Jockey. Il secondo programma consente di allineare gli elettroferogrammi delle sequenze diretta e inversa dello stesso amplificato o di amplificati differenti. Il terzo programma è stato utilizzato per l'allineamento e confronto delle sequenze.

Nelle posizioni della sequenza contenenti più di una base, la percentuale delle basi presenti è stata determinata come media delle quantità relative indicate dall'altezza dei picchi corrispondenti nelle sequenze diretta e inversa.

Per evitare errori risultanti da segnali di fondo, abbiamo imposto limiti soglia per l'inclusione di basi minori nella sequenza: la base minore deve possedere un segnale di altezza almeno 1/10 della base maggiore in entrambe le orientazioni di sequenziamento.

RISULTATI E DISCUSSIONE

DIGESTIONE CON ENZIMI DI RESTRIZIONE E CLONAGGIO

Dopo digestione con numerosi enzimi di restrizione, il DNA delle varie specie di Bivalvi è stato sottoposto ad elettroforesi su gel d'agarosio 0.6%. Solo il DNA di *Meretrix meretrix* digerito con l'enzima TaqI e MboI mostra una banda di circa 450 bp. È stata quindi preparata una digestione con questi due enzimi partendo da circa 20 µg di DNA genomico. Le bande visibili agli UV sono state purificate dal gel ed utilizzate in esperimenti di clonaggio nel plasmide pBS-KS+.

Questo vettore è stato opportunamente linearizzato con BamHI, per il clonaggio dei frammenti MboI e con ClaI per il clonaggio dei frammenti TaqI, successivamente defosforilato con fosfatasi.

La presenza di cloni ricombinanti è stata verificata mediante amplificazione con PCR utilizzando i primers del plasmide M13 (direct) e T7 (reverse). I frammenti così amplificati sono stati sequenziati. Le identiche sequenze del clone BamHI e del clone ClaI ci hanno permesso di ipotizzare che i due cloni in questione si siano ricombinati con uno stesso pezzo di DNA.

ANALISI DI SOUTHERN BLOT

Per dimostrare la presenza del DNA satellite in *Meretrix meretrix* è stato progettato un esperimento di Southern Blot, ibridando il DNA genomico digerito con SauIII, TaqI e MboI con una sonda biotinilata derivata dal clone MboI (fig 3).

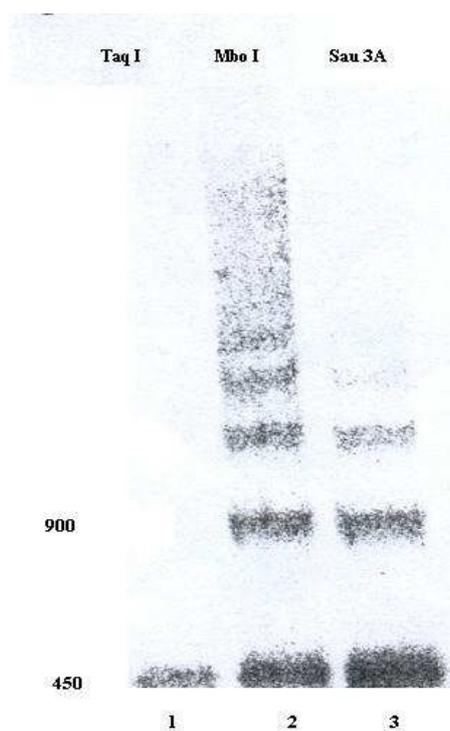


Fig. 3

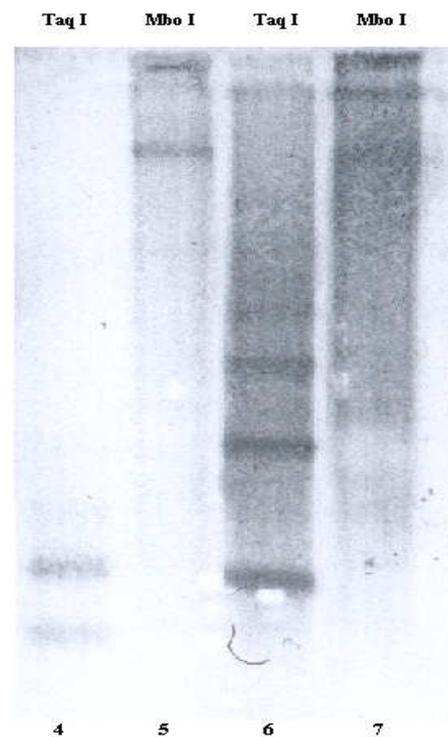


Fig. 4

Fig. 3 : Southern blot di *Meretrix meretrix* digerito O/N (linea 1) e 15' (linea 2 e 3)

Fig. 4 : Southern blot di *M. lusoria* (linea 4 e 5) e di *M. lyrata* (linea 6 e 7)

Lo stesso esperimento è stato ripetuto anche per le specie *lusoria* e *lyrata* (fig 4).

Per verificare se si trattava di una sequenza di DNA con una caratteristica organizzazione a tandem, o semplicemente di una sequenza duplicata, si è ritenuto necessario ripetere l'esperimento organizzando una cinetica di digestione con l'enzima Sau3A (MboI) (fig. 5).

Interrompendo le digestioni a differenti intervalli di tempo si osserva che dopo tre minuti si ha la presenza di un vero ladder formato da un monomero a 450 bp, dimero 900 bp, trimero a 1350 bp, etc., in tutte le specie del genere *Meretrix* e in *T. decussata*.

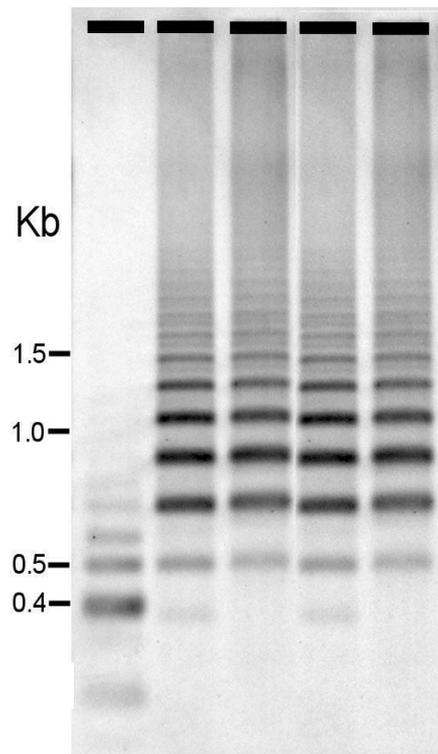


Fig.5 Linea 1: *M. meretrix*
 Linea 2: *M. lusoria*
 Linea 3: *M. lyrata*
 Linee 4-5: *T. decussata*

CARATTERIZZAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEL DNA SATELLITE

Le due unità ripetitive sono state pienamente caratterizzate mediante PCR. Il DNA satellite possiede un'organizzazione a tandem, quindi l'amplificazione delle singole unità può essere facilmente ottenuta usando coppie di primers che partono entrambi dalla stessa posizione dell'unità ripetitiva, ma aventi orientamento opposto. Il prodotto dell'amplificazione mediante PCR del DNA

dei campioni di *Meretrix* è costituito da una banda di quasi 450 bp . Dopo l'elettroforesi su gel tali bande sono state escisse, il DNA amplificato è stato estratto dal gel mediante il kit GeneClean II e sequenziato in entrambe le direzioni utilizzando il sequenziatore automatico ABIPRISM 310, Applied Biosystem, (California) usando separatamente gli stessi primers della amplificazione.

L'amplificazione mediante PCR dell'unità ripetitiva, utilizzando primers localizzati in regioni altamente conservate, determina la simultanea amplificazione di un gran numero di unità ripetitive. Sebbene ciascun prodotto di amplificazione contenga le sequenze di migliaia di unità ripetitive simili ma non identiche, amplificate simultaneamente, gli elettroferogrammi di sequenza sono risultati leggibili ed estremamente riproducibili. Come ci si dovrebbe aspettare le sequenze di tali unità mostrano la presenza di più di una base in varie posizioni. Di conseguenza la sequenza che riassume le variazioni di base viene definita "sequenza consenso". Per indicare la presenza di più basi nella stessa posizione si utilizzano codici ad una lettera: ad esempio Y indica la presenza alternativa di C o T nella stessa posizione, W indica A oppure T, D indica A o T o G (cfr. Tab. I).

A C	M
A T	W
A G	R
C G	S
G T	K
C T	Y
A C T	H
C G T	B
A G T	D
A C G	V

Tab 1

Confronto delle sequenze di varie specie con la MCS:

Satellite MCS	GGTCGGCAAC TTCGATGTAT AGCGAAAAAA GTTTAAGTCC AAAAACGTTA 50bp
M.lusoria	-----
C. chiome	-----A-----
V.gallina	-----M-----
M.meretrix	-----M-----
M lyrata	-----M-----

Satellite MCS	TAGAAACGTT TGCAAGTGCT CGTACTTCCA ACCCAGATAT AAGCGCCACT 100bp
M.lusoria	-----
C. chiome	-----
V.gallina	-----
M.meretrix	-----
M lyrata	-----

Satellite MCS	GTAGTGCAAT GGACCGGAAA CACTCTTGGG TCGTGAGCCT CTGATGGTTG 150bp
M.lusoria	-----Y-----
C. chiome	-----
V.gallina	-----
M.meretrix	-----
M lyrata	-----

Satellite MCS	GCGACCTCAA ACAAGGCTTG GTTCGCGCCA TTGCAATAAA ACGGAGCTTA 200bp
M.lusoria	-----
C. chiome	-----
V.gallina	-----
M meretrix	-----
M lyrata	-----

Satellite MCS	TATCCGTTGG TTTTCAGAGG GCCATTTTGA GCGAAAACAT AGCGAAAAAA 250bp
M.lusoria	-----
C. chiome	-----
V.gallina	-----
M meretrix	-----
M lyrata	-----

Satellite MCS	ACAGAGTCCR AAACGTAAAC ATAGCGAAAA AAACAGAGTC CAAAACAGG 300bp
M.lusoria	-----
C. chiome	-----
V.gallina	-----
M meretrix	-----
M lyrata	-----

Satellite MCS	CTCCCTCACAC GAGTAAACGT GCATGCGSAA TAAGCCAATT TCTTTGAAA 350bp
M.lusoria	--R-----
C. chiome	--R-----
V.gallina	--R-----
M meretrix	-----
M lyrata	-----

Satellite MCS	CTTTCGGGCTT CGTAGAGATG GCTGGGGTGA GTTCTTGCC AAAATTGCA 400bp
M.lusoria	-----
C. chiome	-----
V.gallina	-----
M meretrix	-----
M lyrata	-----

Satellite MCS	GGTTCAAACG TGTCGGGAAC CCACGGATCC GGA 434bp
M.lusoria	-----
C. chiome	-----
V.gallina	-----
M meretrix	-----
M lyrata	-----

Tab. 2

Si sono sempre ottenute sequenze consenso molto simili per tutti i campioni della stessa specie, indipendentemente dalle condizioni di amplificazione: tale sequenza può essere considerata come la reale sequenza consenso delle unità ripetitive presenti nel DNA genomico. Dalla sequenza consenso si può ottenere la sequenza più comune sostituendo il codice a più basi con la base più comune presente negli elettroferogrammi di sequenza (most common sequence).

Le sequenze consenso dell'unità ripetitiva di tutte le popolazioni esaminate per ciascuna specie producono sempre un'unica sequenza più comune dell'unità ripetitiva caratteristica della specie.

La sequenza dell'unità monomerica di questo DNA satellite è di 433 bp. Per essere certi della lunghezza dell'unità ripetitiva e delle differenze di base, partendo da questa sequenza, abbiamo disegnato tre coppie di primers. Questo ci ha permesso di ricercare il DNA satellite in tutte le altre specie di Molluschi Bivalvi oggetto di frodi alimentari.

La presenza del DNA satellite è stata riscontrata nelle seguenti specie:

M. meretrix; *M. lyrata*; *M. lusoria*; *Callista chione*; *Venus gallina*; *Venus verrucosa*; *Tapes decussata*; *Tapes semidecussata* (*T. philippinarum*) e *Patella coerulea*.

La sequenza dell'unità monomerica di questo satellite è fortemente omogenea nelle varie specie testate per cui è stato possibile costruire la sequenza più comune (most common sequence, MCS) (Tab. 1).

Ogni specie presenta piccole differenze rispetto alla MCS:

T. decussata presenta, in posizione 332, una maggiore frequenza della base A rispetto a G;

M. lusoria presenta A in posizione 25 al posto di AC ed A in posizione 332 al posto di AG;

C. chione presenta A in posizione 25 al posto di C, C in posizione 132 al posto di T ed A in 332 al posto di G;

Venus gallina presenta A in posizione 25 al posto di C;

M. meretrix presenta A in 25 al posto di C.

ANALISI DEI DOT-BLOT.

Allo scopo di stabilire la percentuale di DNA satellite presente nel genoma dei Molluschi Bivalvi è stato effettuato un Dot-blot di aliquote scalari di DNA genomico delle varie specie esaminate.

A tal fine sono state allestite due sonde biotinilate, una derivata dal satellite del clone MboI di *M. meretrix*, l'altra derivata dall'amplificazione

mediante PCR del DNA genomico di *Tapes decussata*.

In entrambi i Dot le sonde si sono ibrydate prevalentemente con il DNA proveniente dal clone MboI di *M. meretrix*. Nelle altre specie la percentuale di satellite sembra essere nettamente al di sotto dello 0.5% del DNA genomico.

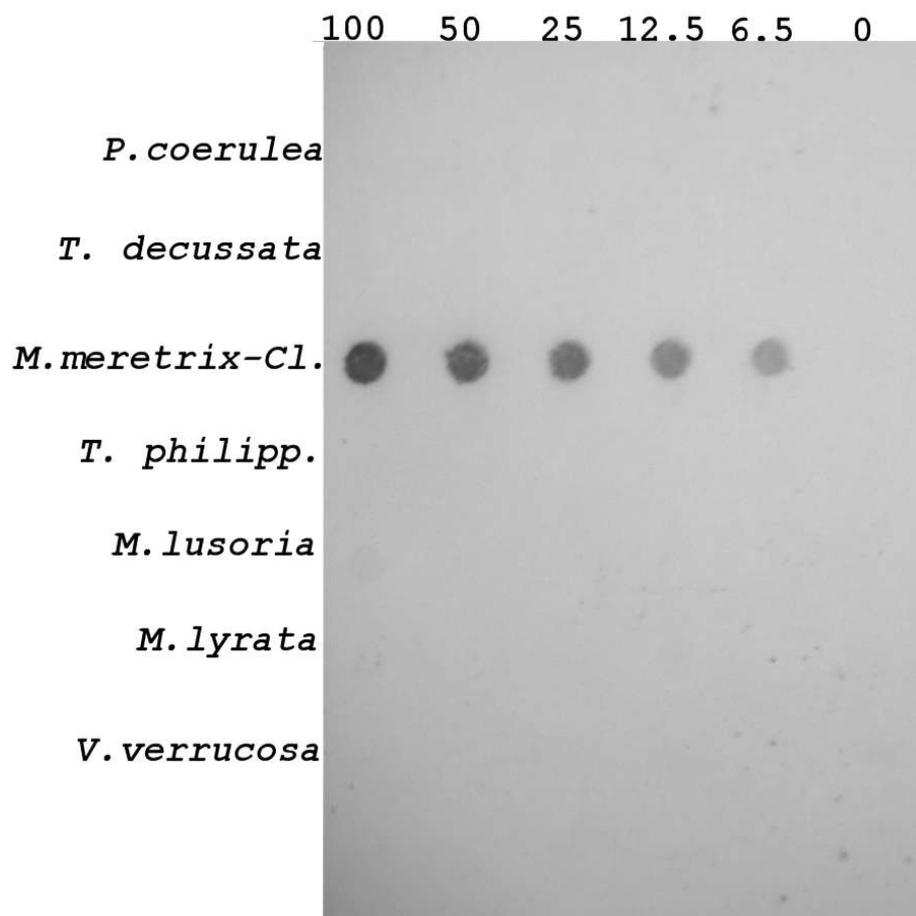


Fig. 6 : Dot-blot di varie specie di bivalvi con sonda biotilinata amplificata di *Tapes decussata*

ANALISI DEGLI SPAZIATORI RIBOSOMIALI DEI MOLLUSCHI BIVALVI (ITS)

I primers presenti in letteratura non hanno permesso di sequenziare completamente gli ITS dei Molluschi Bivalvi esaminati.

I nuovi primers disegnati su sequenze di Bivalvi depositate in GenBank hanno permesso di ottenere le sequenze degli ITS-2 di tutte le specie di Molluschi Bivalvi esaminate e le sequenze ITS-1 parziali (come si vede nella Tabella 2). Sono stati sequenziati diversi esemplari per ogni specie: tali sequenze ITS-2, confrontate tra di loro, ci hanno permesso di descrivere la sequenza completa caratteristica di ciascuna specie. L'analisi di sequenza è stata effettuata con lo stesso metodo utilizzato per i satelliti.

Allineando tra loro le sequenze ITS1 si è visto che esse non hanno sequenze in comune e non permettono di fare un saggio unico di PCR. Gli ITS2 hanno una piccola sequenza interna simile che ha permesso di disegnare un primer identico (CCGCCGTAGA) in tutte le specie esaminate da combinare con il primer ITS2Bd, identico in tutte le specie e corrispondente alle estremità 3' del 5,8 S RNA.

Per avere ulteriore conferma della presenza di tale sequenza interna in ITS2, i DNA genomici delle specie oggetto di studio sono stati digeriti con

circa 3u/μl di enzima di restrizione (Alu). I diversi pattern di restrizione evidenziati su gel di agarosio hanno confermato l'ipotesi avanzata.

TABELLA SEQUENZE ITS1 E ITS2

Nelle seguenti tabelle che mostrano le sequenze analizzate sono stati e evidenziate le posizioni del primer

ITS1

***T. decussata* 625 bp**

GATAGACTGC CGGCAGATCC CGCCTGGCCA GTCTCTAAAC TAATCTTGAA
CGCACCACGC ACGCCCAGTC GACGCGTGCC ATAAAAAAGG TCGACCCAGC
ACCCGGTCTA CGGGCTGCCC CGGCGGCGGA TTGGCCACCG CTGCCGGACT
GCGGCCACCA TTTCGGGCTG CTGGAAAAAG TCGGGAGCCG TCCGCCAGAG
GTGATTCCCA CCCAGGACAG TGGCTCTCGC AGCGCCGTGG GGTGCCGGCG
GTCGAGGACC CTCGAATCGC TCCCTTTGGC CGGGGAGCGA GGAACGGTCC
CGGACCTAGT TCGCTTGCCG ATGCTGCTCG CGAACGACGC CGGCCGCAAG
GCGATCTTCC CCCTGCCGGG AAAAGCGCCC CTCTTTCCCG TCTCTTCGGA
GACGGGATTG CGCCCTCCTC AAAGCGTACA CCAACGTTTT TCGGGGCGTC
GCGGAGGAAA ACAACGGGGG CAGAGAGAGG AGACTCTTCC TTCCCCTAGT
AGTTAGTACT CCGCGCTTGA ACGCGTGACT CTGTATCCGG GCTCTCTCGG

GAGACAGAGC GCAGGACTTC CGCCCGTGTT GCGCGGGCGG TCGACACCTG
TTCAGAAATC TGAGACAACT CTATG

M. lyrata 733bp

CAAAC TGAAG AGGCATCCTG CCTTCTTCTG TTCGCATTCA GTCGAACTTG
TGCGAAACGG CCGAGGAGTC ACCACGGGCT CTTCGGTCGA GTGAAGCGGC
CACCAATACG CGGCGGGACA TGGCTCGATG CAGCATGCAC GGGCTTCACA
GTCCGTCGAT ATTGCCTGTG GTGGGAGACC TCCGATAGAA GCGATACGCG
CTCAAAGGGG GACTCCTGCC TGGCCGCGCA AGAGGTGCC CGTCCACGAC
CTCTGCCGAG TCGGAGACGC TCTTCGCCGA CTCGTTAATC AAAAATACAT
TGGAAGAGCC CGCGGGACCC CGTGCGCGCG GCGGGGACTC TGCGGCGACC
TTAGTAGGAC TTCTCGTCCG AACGGTCGGG CCCGACCGGC GGCGATCGCA
CGGCGCGATC GTGGGCTATA AACCGAAGCC GAAGACCGAT TCAGTGGGGA
TGCCGGCGGA ACCTCCTGTG GGGCCCTCTC CGTGGAGGGG GCTCGCTTCC
GGCAGTAAAG GGTATGGTCC TGAGGAGGCG CGGAGACGCC GTACCCGGGT
GAGGACAGGA TGTGGGGAAC CCGGGTCTCG ACGCTCTCTG CAGGGCCTAT
CGCCCCGTT CACGTTGTTT CCCATACAGT GAACCTTTGA ACGCACAAGG
CTCTGGACGT CCCATCTGGG AAGTCGGGGC GCAGTCGCTC TGCCCGTGTT
GCGCGGGCGG TCGACGACTGTT CAAACTCTAGT

ITS2

T. decussata 367bp

GAACAAGTCA TCGGCTCTCA CTATTCGTGA GGGGCGAGTT GGC GCGTCGC
GCGGGCTTTC GTCCCGCTCG **TCCGCCGTAG** ATTCCAGCCT CTCTCTGCCG
GTCGAACCAG TCGCTGGAAG TGGCGCGGAG ACAGGGCTCG AACGGGCCCCG
CACGTCCCCG TCCGCGTCCT CCTTCACCGG AGGGCGGCCT TCCGTGCGGC
GTCGTGCGCCG GCAAAAGCGA GAGAGAGCGG CGAAGGACGG GTCTAGCCAG
CCCGGCCCCC AGCCGAAACC GGAGACGCGG GGAGACAGGC CGACTGACGA
CGACGACTCC AGCGATGGGG TCCGAGTCCG ATGACGCCTC AACCCCTGCA
CCACCTCAA AAAATTC

M.lyrata 306bp

GAACAAGTCA TCGCTCACCG AATGCGAAGC CGGTCTCACG GCCCCTTCGA
TCTTTCGGGA GCGCGTTGGC GTGTGCGCGG GGC GCTTGTC **CCGCTCGTCC**
GCCGTAGACT GTAGCCTCTC CTGTGACTCG ATGCTCCACT CTGAAGGGGC
GCCGGGACAT GGCTCGCGAG CCTCTCTGTC CTGCGCCGGT CCTCGCGAGG
GGACGACCTT CTCGGGCTCG AGACTTTGCC ACCTCCGCGT GGGGGAGAGC
GCGCCGCATG CGGTGCGACAGA GAGTCTTCCCGT CACGAACAGGG GAGAC
TTACGC

M.meretrix 305bp

GAACAAGTCA TCGCTCACCG AATGCGAAGC CGGTCTCACG GCCCCTTCGA
TCTTTCGGGA GCGCGTTGGC GTGTCGCGCG GGCCTTGTC **CCGCTCGTCC**
GCCGTAGACT GTAGCCTCTC CTGTGACTCG ATGCTCCACT CTGAAGGGGC
GCCGGGACAT GGCTCGCGAG CCTCTCTGTC CTGCGCCGGT CCTCGCGAGG
GGACGACCTT CTCGGGCTCG AGACTTTGCC ACCTCTGCGT GGGGGAGAGC
GCGCCGTATG CGGTGCGACA GAGAGTCTTC CCGTCACGAA CAGGGAGACT
TACGC

T.philippinarum 308bp

GAACAAGTCA TCGCCGCAGA CCGATTCGCT TCGGTCTCGG CGCGTTGGCG
AGTCGCGCGG GCACAGCGTC **CCGCTCGTCC** **GCCGTAGACT** TCAGCCTCTC
TCTTGGCCGC CAYGTGAAGT GGCAGAGGA CAGGGCTCGA ACGGGCCTTC
TGTTTAGCGC ACGTCTGCGA CGGAAACGTA GCGGACGACC TTCTCCTTTG
GCAGCCCCAA GCCCCTATCT TGGGGGAGAG AGAGCGCGGC TTTCACAGGC
CGCGAACAAG AGACGCACTC GCTTGCCCGC TTGCGCGGTG CAGAGAGTAG
TCTCGCAC

V.verrucosa 303bp

GAACAAATGA TCGCAGCATC GTGTTCATTC GCGGTGCAGC GCGTTGGCGA
GTCGCGCGGG CTTCGGCTCG **CTCGTCCGCC GCAGACTTTA** GCCTCTCTCT
CTGGGGTCGC CGAAAGAGGT GGCGCCGGGA CAGGGCATCG AGCGTGCCTT
CTGTCTCGCG CCGCGTCCCT TCACGGGGAC GGCCCTCTGT GGTATCGGCC
CCGTAGTAAA TGCATAATAA AACGGCGAGA GAGAGAGAGA GAGCAAAAAG
AGGCCTGCCA GCTAAGACGT GCTTGTGCAG TGCAATCTTG ATTATCGTAG
TTC

C.chione 305bp

GAACAAGTCA TCGCTCACCG AATGCGAAGC CGGTCTCACG GCCCCTTCSA
TCTTTCGGGA GCGCGTTGGC GTGTGCGCGG GGCCTTGTC **CCGCTCGTCC**
GCCGTAGACT GTAGCCTCTC CTGTGACTCG ATGCTCCACT CTGAAGGGGC
GCCGGGACAT GGCTCGCGAG CCTCTCTGTC CTGCGCCGGT CCTCGCGAGG
GGACGACCTT CTCGGGCTCG AGACTTTGCC ACCTCTGCGT GGGGGAGAGC
GCGCCGTATG CGGTGCGACA GAGAGTCTTC CCGTCACGAA CAGGGAGACT
TACGC

RISULTATI PCR

È stato allestito un esperimento di PCR sul DNA genomico delle seguenti specie:

T. decussata, *M. lyrata*, *T. semidecussata*, *V. verrucosa*.

Circa 50 ng di DNA purificato è stato amplificato con 1u/μl di Taq polimerasi e 0,2 μm di primer. Dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio al 3% e un ladder di 50bp si sono evidenziati i seguenti risultati.

Ogni specie mostra un amplificato di peso molecolare diverso:

T. decussata 104bp;

M. lyrata 131 bp;

T. semidecussata 111bp;

V. verrucosa 108bp.

Questo ci ha permesso di discriminare con un singolo saggio di PCR le varie specie tra loro, come si può vedere nella seguente foto (Fig.E).

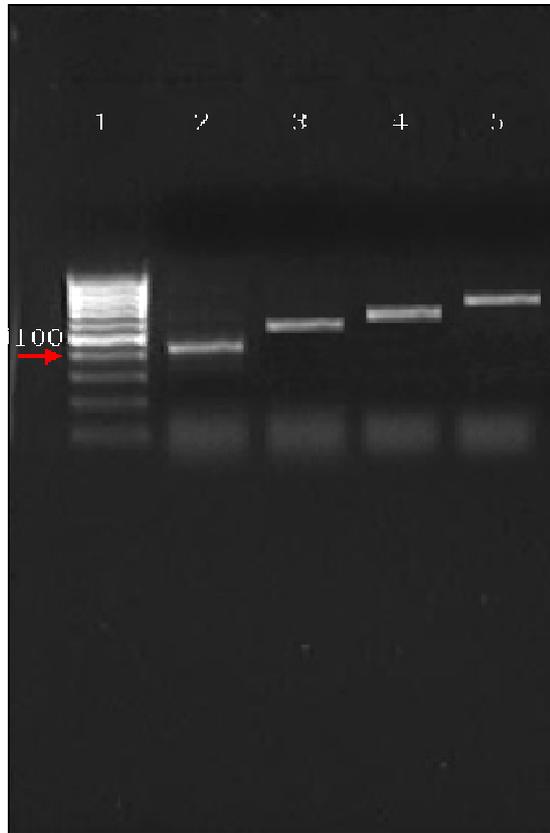


Fig.E: Lane 1 : Ladder 50 bp
Lane 2: *T. decussata* 104bp;
Lane 3: *M. lyrata* 131 bp;
Lane 4: *T. semidecussata* 111bp;
Lane 5: *V. verrucosa* 108bp.

CONCLUSIONI

È stata accertata la validità del protocollo per la tecnica di indagine molecolare descritta. È risultata utile strumento di indagine per il controllo di alimenti di origine animale. In particolare per il riconoscimento di specie in prodotti della pesca, tali studi possono essere validamente applicati per monitorare l'introduzione di specie esotiche sui nostri mercati.

A tale proposito tra i prodotti della pesca maggiormente soggetti a frode vi sono i molluschi eduli lamellibranchi, tra i quali di maggiore pregio commerciale è da considerarsi la vongola verace (*Tapes decussatus*), specie autoctona del Mare Mediterraneo. La produzione di questa specie è diminuita considerevolmente negli ultimi anni, favorendone la comparsa sul mercato nazionale di altre di minor pregio provenienti da paesi extracomunitari.

T. philippinarum morfologicamente simile a *Tapes decussatus* è attualmente allevata in Italia e messa in vendita come “vongola verace”, anche se di minor pregio e valore commerciale. La possibilità di commercializzare questa tipologia di prodotto sgusciato come surgelato, consente di aggiungere specie esotiche di ancora minor pregio quali la *M. meretrix* e *M. lyrata*. L'assenza di conchiglia rende impossibile l'identificazione di specie e quindi

il controllo della esatta corrispondenza di quanto dichiarato in etichetta.

I molluschi sgusciati sono prodotti trasformati ovvero prodotti che hanno subito un procedimento tale che ha provocato la denaturazione delle proteine. In caso di denaturazione proteica completa si rende necessario ricorrere a metodi d'indagine alternativi che si basano sullo studio del DNA, poiché tale molecola è termoresistente.

Trattandosi di miscele di molluschi diversi non è possibile utilizzare tecniche di sequenza che sarebbero in grado solo di identificare la presenza di specie estranee, ma non la loro quantità.

A questo scopo abbiamo analizzato un DNA satellite presente in tutte le specie di interesse in quanto è estremamente frequente, in questo DNA ripetitivo, la presenza di variazioni di sequenza specie-specifiche dell'unità ripetitiva. Mediante questa tecnica è possibile ottenere anche per miscele di specie la loro quantificazione definendo le percentuali relative di basi specie-specifiche. Abbiamo caratterizzato un DNA satellite presente in tutte le specie esaminate sperando di osservare l'esistenza di differenze strutturali specie-specifiche, come in genere si è sempre osservato in tutte le famiglie di DNA satellite. Con nostra grandissima sorpresa il DNA satellite non ha mostrato alcuna differenza strutturale anche tra specie di generi diversi. Non soltanto la sequenza più comune dell'unità ripetitiva era identica, ma anche le posizioni

variabili erano identiche in tutte le specie. Si tratta di un risultato assolutamente insolito e straordinario in quanto non risulta in letteratura la presenza di DNA ripetitivi che non presentino alcun tipo di evoluzione tra specie differenti. Le basi molecolari di questo fenomeno rimangono misteriose.

Abbiamo quindi incominciato a studiare altri DNA ripetitivi. In particolare la nostra attenzione si è soffermata sugli spaziatori ribosomiali interni trascritti dell'RNA ribosomiale (ITS1,ITS2). È noto infatti che, a differenza degli RNA ribosomiali, la loro sequenza varia da specie a specie. Gli ITS1 sono stati amplificati con primers corrispondenti alle estremità 3' dell'RNA 18S e 5,8S. Gli ITS2 sono stati amplificati con primers corrispondenti a due diverse posizioni dell'RNA 5,8S e all'estremità 5' dell'RNA 28S.

Le sequenze di ITS1 si sono dimostrate notevolmente diverse tra le varie specie sia come sequenza che come dimensione. A titolo di esempio sono mostrati gli ITS1 di *T. decussata* e di *M. lyrata*. L'assenza di sequenze omologhe non rende possibile in questo caso lo sviluppo di alcun metodo per la definizione merceologica del prodotto.

Al contrario l'analisi di sequenza degli ITS2 delle varie specie ha dimostrato che, nonostante la variabilità di dimensione di sequenza, esiste in tutte le specie una piccola sequenza in comune che può essere utilizzata per

amplificare con identica efficienza il DNA di tutte le specie. Dato che in ogni specie tale sequenza si trova a distanza variabile dall'estremità 5' del 5,8S RNA, i prodotti amplificati delle varie specie presentano dimensioni diverse che consentono di identificare e quantificare le specie presenti nel campione in esame. È quindi possibile non solo discriminare la presenza e la quantità relativa di molluschi del genere *Meretrix* ma anche tra “vera e falsa vongola verace”.

Dato che esiste un omologia del 100% fra i primers utilizzati e le sequenze corrispondenti nel DNA genomico di tutte le specie esaminate, l'efficienza di amplificazione è necessariamente identica in tutti i casi e quindi la quantità relativa di amplificato ottenuto da un campione sarà direttamente proporzionale alla quantità relativa dei rispettivi amplificati.

Si tratta di un metodo estremamente facile in quanto richiede semplicemente la disponibilità di un apparecchio di PCR e di una elettroforesi su gel. Il metodo si presta all'analisi di routine su numerosi campioni che può essere eseguita in poche ore dopo estrazione del DNA.

La tecnica proposta rappresenta l'unica tecnica di analisi tassonomica ed è uno strumento valido per assecondare le disposizioni normative più recenti volte all'identificazione ed alla tracciabilità del prodotto in vendita (art. 2 del D.M. 27 marzo 2001, in conformità con l'art. 8 del regolamento CE n. 2065/2001).

Considerato che la crescente domanda di preparazioni ittiche comporta una notevole movimentazione di prodotti lavorati da Paesi europei ed extraeuropei e in accordo con le indicazioni CE che prescrivono norme per una etichettatura chiara e trasparente, la metodica proposta appare utile per il riconoscimento di frodi di carattere commerciale (vendita di *aliud pro alio*).

BIBLIOGRAFIA

Aartsen J. J. van & R. Giannuzzi-Savelli, 1991 - New names for well-known European Marine Mollusca. *Bollettino Malacologico*, 27 (1-4): 1-8.

Boss K.J., 1966 - The subfamily Tellininae in the western Atlantic. The genus *Tellina* (Part I). *Johnsonia*, 4 (45).

C.l.e.ma.m., 2003 - *Check List of European Marine Mollusca*.
<http://www.somali.asso.fr/clemam/index.clemam.html>.

Giusti F., 1998 – Phylum Molluschi, 159-225pp. In: Baccetti B., Bedini C., Capanna E., Coboldi M., Ghirardelli E., Giusti F., Minelli A., Ricci N., Ruffo C., Sarà M. & A. Rullini (eds), *Lineamenti di zoologia sistematica*. Zanichelli, Milano.

Palombi A. & Santarelli M., 1986 – *Gli animali commestibili dei mari d'Italia*. Hoepli, Milano.

Beridze T., 1986 - *Satellite DNA*. Springer Verlag, Berlin.

Bostock C., 1980 - A function for satellite DNA? *Trends Biochem. Sci.*, 5: 117-119.

Cafasso D., Cozzolino S., De Luca P., Chinali G., 2003. An unusual satellite DNA from *Zamia paucijuga* (Cycadales) characterized by two

different organisation of the repetitive unit in the plant genome *Gene* 311, 71-79.

Cardone D.E., Feliciello I., Chinali G., 1997b. Hierarchical order in a satellite DNA from the European brown frog *Rana dalmatina*. *J. Biol. Res. Boll. Soc. It. Biol. Sper.* 5-6, 85-92.

Lopez-Flores I., de la Herran R., Garrido-Ramos M. A., Boudry P., Ruiz-Rejòn C., Ruiz-Rejòn M., 2004. The molecular phylogeny of oysters based on a satellite DNA related to transposons. *Gene* 339, 181-188

Feliciello, I., Chinali, G. 1993 - A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.*, 212: 394-401.

Picariello O., Feliciello I., Bellinello R., Chinali G., 2002 - S1 satellite DNA as a taxonomic marker in brown frogs: molecular evidence that *Rana graeca graeca* and *Rana graeca italica* are different species. *Genome*, 45: 63-70.

Plohl M., Cornudella L. 1996. Characterization of a complex satellite DNA in the mollusc *Donax trunculus*: analysis of sequence variations and divergence. *Gene* 169, 157-164.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (eds.), 1989 - *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring

Harbor, New York.

Analisi di un frammento di mt-DNA mediante un protocollo di PCR
per il riconoscimento di specie in prodotti ittici trasformati.

I. Di Marco, G. Esposito, R. De Dominicis, I. Vincenti, T. Pepe

giornate scientifiche 2006