



Università di Pisa

Dipartimento di Scienze Veterinarie

Corso di Laurea Specialistica in Medicina Veterinaria

TESI DI LAUREA

Identificazione di Sparidi di interesse commerciale
sui mercati internazionali mediante DNA Barcoding

Candidato:

Antonino Messina

Relatore:

Prof.ssa Daniela Gianfaldoni

Correlatore:

Dott. Andrea Armani

Anno Accademico 2012/2013

Ai miei genitori

Riassunto

La famiglia Sparidae comprende 36 generi e 133 specie. Di queste, 85 sono sfruttate commercialmente a livello internazionale. Nonostante da un punto di vista morfologico le specie appartenenti ai differenti generi possano risultare molto simili, esiste invece una netta differenza per quanto riguarda la qualità delle carni ed il loro prezzo di vendita. Inoltre, la dentatura, che spesso rappresenta l'unico elemento diagnostico per discriminare i vari generi, non risulta disponibile nel caso di prodotti preparati e trasformati. Per questo motivo, le sostituzioni fraudolente fra esemplari appartenenti a specie differenti risultano possibili e costituiscono un problema non soltanto per la lealtà commerciale nei confronti del consumatore ma anche per la corretta gestione degli stock ittici. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la possibilità di utilizzare la metodica del DNA *barcoding* per l'identificazione molecolare delle specie d'interesse commerciale appartenenti alla famiglia Sparidae. A tal fine sono stati raccolti 296 campioni di riferimento, di cui 89 esemplari freschi e 207 campioni di tessuto conservati in etanolo, provenienti da 64 specie. Inoltre, sono stati raccolti 55 campioni commerciali acquistati presso peschiere, grande distribuzione organizzata e ristorazione. Alcuni campioni freschi (34 esemplari) sono stati sottoposti a cottura tradizionale (in padella e al forno) per verificare l'effetto di degradazione a carico del DNA. Per tutti i campioni, dopo l'estrazione, il DNA è stato amplificato a mezzo di primers universali. L'amplificabilità del DNA di tutti i campioni analizzati è stata complessivamente del 78%. Nello specifico tale valore è stato dell'82.5% per il DNA dei campioni freschi, del 63% per quello dei campioni conservati in etanolo e del 50% per quello estratto dai campioni sottoposti a cottura. Sono state ottenute 199 sequenze *COI* di riferimento (lunghezza media di 649 pb) e 55 commerciali. E' stato ottenuto almeno un *barcode* per 57 specie. L'utilizzo dell'IDs sul BOLD, supportato dal *BIN discordance report*, e dell'analisi BLAST su GenBank hanno reso possibile identificare correttamente 43 (75.4%) e 34 (59.6%) specie rispettivamente. L'impossibilità di identificare le restanti specie può essere imputata sia alle strette relazioni filogenetiche all'interno della famiglia sia all'assenza di sequenze di riferimento. Le analisi effettuate sui campioni commerciali hanno evidenziato che 18 campioni (33%) presentavano *mislabeling*. Alla luce dei nostri risultati il DNA *barcoding* si conferma un metodo utile per "l'ispezione molecolare" dei prodotti della pesca.

Parole chiave: Sparidae, DNA *barcoding*, gene *COI* mitocondriale, identificazione di specie

Abstract

The family Sparidae (Porgies) comprises 36 genera and 133 species of which 85 are exploited on the international markets. These species are very similar from a morphological point of view and the dentition, that often represents the only diagnostic element for species discrimination, is not always available in prepared and processed products. Thus, considering that the different fish species have different market prices, the fraudulent substitutions among specimens belonging to different species represents a serious problem not only for the fairness of the exchanges but also for the stocks management. The aim of this work was to assess the use of the DNA *barcoding* method for the molecular identification of Porgies species. Two hundred and ninety-six reference samples, 89 from fresh specimens and 207 from ethanol preserved tissues, belonging to 64 species have been collected. Furthermore, 55 commercial samples have been purchased on the market. Part of the fresh specimens (34) were cooked using traditional procedures to verify the degradation effect on DNA. After the DNA extraction, all the samples have been amplified by using universal primers. Overall, the amplification success was of 78%. In particular, it was 82.5% for the DNA extracted from fresh specimens, 63% for those from ethanol preserved samples and 50% for those obtained from cooked samples. One hundred and ninety-nine reference and 55 commercial sequences have been obtained. At least one barcode have been obtained from 57 species. The IDs on BOLD, supported by the BIN discordance report, and the BLAST analysis on GenBank allowed to correctly identify 43 (75.4%) and 34 (59.6%) species respectively. The impossibility to identify the other species can be explained taking into consideration both the close phylogenetic relationships within the family and the unavailability of some reference sequences on the databases. The analysis performed on the commercial samples revealed a *mislabeling* involving 18 samples (33%). Our findings confirm the DNA *barcoding* as a useful tool for the "molecular inspection" of seafood products.

Key words: Porgies, DNA *barcoding*, mitochondrial *COI* gene, species identification

INDICE

INTRODUZIONE	8
CAP. 1 CLASSIFICAZIONE E BIOLOGIA DELLA FAMIGLIA SPARIDAE	11
1.1. CLASSIFICAZIONE	11
1.2. EVOLUZIONE FILOGENETICA	15
1.3. CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE	15
1.3.1. <i>Dentatura</i>	16
1.3.2. <i>Alimentazione</i>	20
1.4. DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA E HABITAT	22
1.5. RIPRODUZIONE	24
CAP. 2 PESCA E ACQUACOLTURA	26
2.1. PANORAMICA SULLA PESCA E SULL'ACQUACOLTURA MONDIALE	26
2.2. PESCA	27
2.3. ACQUACOLTURA	29
2.3.1. <i>Produzione totale di pesce</i>	30
2.3.2. <i>Produzione nelle varie regioni</i>	30
2.3.3. <i>Produzione nei diversi ambienti di allevamento</i>	33
2.3.4. <i>Specie prodotte in acquacoltura</i>	34
2.3.5. <i>Impiego di specie acquatiche in acquacoltura</i>	35
2.4. SPARIDI: PESCA E ACQUACOLTURA	35
2.5. ACQUACOLTURA DELLE SPECIE MEDITERRANEO-ATLANTICHE	37
2.5.1. <i>Sparus aurata (Gilthead seabream)</i>	37
2.5.2. <i>Pagellus erythrinus (Common pandora)</i>	38
2.5.3. <i>Pagellus bogaraveo (Blackspot sea bream)</i>	38

2.5.4.	<i>Diplodus sargus (White sea bream)</i>	38
2.5.5.	<i>Diplodus puntazzo (Sharpsnout sea bream)</i>	39
2.5.6.	<i>Dentex dentex (Common dentex)</i>	39
2.5.7.	<i>Pagrus auriga (Red porgy)</i>	40
2.6.	ACQUACOLTURA DELLE SPECIE INDOPACIFICHE	40
2.6.1.	<i>Pagrus major (Red sea bream)</i>	40
2.6.2.	<i>Acanthopagrus schlegelii schlegelii (Blackhead sea bream)</i>	41
2.6.3.	<i>Sparidentex hasta (Sobaity sea bream)</i>	41
2.6.4.	<i>Rhabdosargus sarba (Goldlined sea bream)</i>	41
CAP. 3	FRODI E TRACCIABILITA' NEL COMPARTO ITTICO	43
3.1.	FRODI NEL COMPARTO ITTICO	43
3.1.1.	<i>Fattori che hanno determinato l'aumento delle frodi nel comparto ittico</i>	44
3.1.2.	<i>Principali problematiche connesse alle frodi</i>	46
3.2.	FRODI NELL'AMBITO DELLA FAMIGLIA SPARIDAE	47
3.2.1.	<i>Sostituzione fra specie appartenenti allo stesso genere</i>	48
3.2.2.	<i>Sostituzione fra specie appartenenti a generi diversi</i>	49
3.2.3.	<i>Sostituzione fra specie appartenenti a famiglie diverse</i>	49
3.3.	NORMATIVA COMUNITARIA SULLA SICUREZZA ALIMENTARE	50
3.3.1.	<i>Regolamento (CE) 178/2002</i>	50
3.3.2.	<i>Pacchetto igiene</i>	51
3.4.	TRACCIABILITA' E RINTRACCIABILITA'	53
3.4.1.	<i>Obblighi del produttore</i>	54
3.4.2.	<i>Obblighi degli operatori della vendita al dettaglio o della distribuzione</i>	54
3.4.3.	<i>Tracciare e rintracciare</i>	55
3.5.	ETICHETTATURA E TRACCIABILITA' DEI PRODOTTO ITTICI	55

CAP. 4 METODICHE PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE NEL COMPARTO ITTICO	65
4.1. METODI BASATI SUL DNA PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE ITTICHE	67
4.2. SELEZIONE DEL MATERIALE GENETICO	68
4.2.1. <i>DNA mitocondriale</i>	68
4.2.2. <i>Geni mitocondriali</i>	69
4.3. ESTRAZIONE DEL DEL DNA	70
4.4. VALUTAZIONE DEL DNA ESTRATTO	71
4.5. AMPLIFICAZIONE DEL DNA: POLYMERASE CHAIN REACTION	72
4.5.1. <i>Componenti essenziali della PCR</i>	72
4.5.2. <i>Principio di funzionamento della PCR</i>	72
4.5.3. <i>PCR quantitativa</i>	75
4.5.4. <i>Primer</i>	75
4.5.5. <i>Elettroforesi</i>	77
4.5.6. <i>Purificazione dei prodotti di PCR</i>	78
4.6. METODI DI ANALISI POST PCR	79
4.6.1. <i>Restriction fragment length polymorphism (RFLP)</i>	80
4.6.2. <i>FINS (Forensically informative nucleotide sequencing)</i>	81
4.7. DNA BARCODING	82
4.7.1. <i>BOLD</i>	85
CAP. 5 MATERIALI E METODI	87
5.1. RACCOLTA DEI CAMPIONI DI RIFERIMENTO E COMMERCIALI	87
5.2. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI COTTI	87
5.3. ESTRAZIONE DEL DNA E VALUTAZIONE DEL LIVELLO DI DEGRADAZIONE MEDIANTE ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO	87
5.4. AMPLIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEL GENE COI	88

5.5. ANALISI DELLE SEQUENZE E CONFRONTO CON I DATABASES	89
CAP. 6 RISULTATI E DISCUSSIONI	98
6.1. RACCOLTA DEI CAMPIONI	98
6.2. VALUTAZIONE DEL LIVELLO DI DEGRADAZIONE DEL DNA MEDIANTE ELETTROFORESI SU GEL	98
6.2.1. <i>Campioni cotti</i>	98
6.2.2. <i>Campioni conservati in etanolo</i>	99
6.3. AMPLIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEL GENE COI	99
6.3.1. <i>Performance di amplificazione</i>	99
6.3.2. <i>Amplificabilità del DNA</i>	100
6.4. ANALISI DELLE SEQUENZE E CONFRONTO CON I DATABASES	102
6.4.1. <i>Risultati IDs e rapporto di discordanza BIN BOLD e BLAST NCBI</i>	102
6.5. <i>MISLABELING</i> DEI CAMPIONI COMMERCIALI	106
CAP. 7 CONCLUSIONI	116
BIBLIOGRAFIA	117
RIFERIMENTI NORMATIVI	139
APPENDICE 1	142
RINGRAZIAMENTI	175

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni si è assistito ad una crescente richiesta di prodotti della pesca a livello mondiale. Conseguentemente, oltre all'aumento delle catture si è assistito anche ad una crescita esponenziale delle attività di acquacoltura, in particolare in Asia. Questo fenomeno ha portato sia all'aumento del numero di specie ittiche commercializzate a livello internazionale, che allo sviluppo ed alla diffusione di nuove tipologie di prodotti a base di pesce.

Purtroppo, ad oggi, vista la pluralità di intermediari coinvolti nella filiera ittica, risulta complicato effettuare i controlli sulla qualità e sulla tracciabilità dei prodotti tanto da impedire talvolta di fornire le dovute corrette informazioni sul prodotto. In particolare, durante l'attività ispettiva, spesso risulta impossibile verificare, sulla base delle caratteristiche morfologiche, l'identità di quei prodotti “*ready to eat*” e “*ready to cook*”. Per tale motivo, il comparto ittico si trova maggiormente esposto, rispetto ad altri settori, a frodi commerciali, per sostituzione di specie pregiate con specie di valore inferiore, o sanitarie, quando la sostituzione viene effettuata con specie tossiche.

L'Unione Europea è già ripetutamente intervenuta sulla questione dell'etichettatura e della tracciabilità nei prodotti ittici e, a partire dal Reg. (CE) 104/2000 fino al recente Reg. (UE) 1379/2013, ha previsto che una serie di informazioni obbligatorie quali la denominazione commerciale e scientifica, il metodo di produzione, l'area di cattura o di allevamento e la categoria di attrezzi da pesca utilizzati per la cattura fossero fornite lungo tutta la filiera.

Tra i prodotti ittici più pescati, allevati e commercializzati a livello mondiale rientrano le specie appartenenti alla famiglia Sparidae. Delle 133 specie appartenenti alla famiglia, almeno 85, sulla base degli elenchi ufficiali europei ed internazionali, sono di interesse per i mercati. La classificazione degli sparidi può essere effettuata sulla base delle caratteristiche morfologiche, tra cui il numero di raggi duri e molli, le scaglie, il colore del corpo e la tavola dentaria. Quest'ultima è il fattore discriminante più importante e viene utilizzata come caratteristica principale per la classificazione dei vari generi. Purtroppo, le somiglianze morfologiche all'interno della famiglia sono molto accentuate sia fra specie appartenenti allo stesso genere che a generi differenti.

Inoltre, nel caso di prodotti preparati e trasformati, in seguito alla scomparsa delle suddette caratteristiche morfologiche, l'identificazione risulta ancora più complicata.

Ad oggi, le metodiche molecolari, in particolar modo quelle basate sull'analisi del DNA, rappresentano un valido supporto sia per garantire la correttezza delle transazioni commerciali sia per garantire la corretta gestione degli stock ittici.

I geni che codificano per la subunità 16S dell'RNA ribosomiale (*16S rRNA*), per la subunità 1 della citocromo *c* ossidasi (*COI*) e per il citocromo *b* (*Cyt b*) costituiscono i target mitocondriali maggiormente utilizzati. In particolare, la tecnica del DNA *barcoding*, che prevede l'amplificazione di una regione di circa 650 pb del gene *COI* a mezzo di primers universali e la successiva analisi delle sequenze, rappresenta ad oggi il sistema maggiormente utilizzato nel comparto ittico. Infatti, sulla base dei valori di identità risultanti dal confronto delle sequenze ottenute dai campioni da identificare con quelle di riferimento presenti sui database come BOLD e GenBank possibile identificare la specie.

In questo lavoro è stata valutata la possibilità di utilizzare la metodica del DNA *barcoding* per l'identificazione molecolare delle varie specie di sparidi d'interesse commerciale presenti sui mercati internazionali. Sono stati pertanto raccolti 296 campioni di riferimento, di cui 89 esemplari freschi e 207 campioni in etanolo (forniti da vari Istituti di Ricerca), per un totale di 64 specie appartenenti a 21 generi, con l'obiettivo di formare un database di riferimento il più ampio possibile. Sono stati raccolti anche 55 campioni commerciali, acquistati in Italia nei mercati al dettaglio e nella grande distribuzione organizzata (GDO). Inoltre, sono state effettuate delle prove di cottura per valutare l'effetto di degradazione del DNA.

Il DNA è stato amplificato mediante primers universali che sono stati leggermente modificati a partire da quelli comunemente utilizzati per l'amplificazione della regione del "*barcode*". Tutte le sequenze sono state sottoposte a un'analisi BLAST su GenBank e analizzate usando il sistema di identificazione "IDS" su BOLD.

Sono state ottenute 254 sequenze *COI* complete (199 dai campioni di riferimento e 55 dai campioni commerciali), producendo almeno un *barcode* completo per 57 specie. Il grado di amplificabilità del DNA su tutti i campioni analizzati è stato complessivamente del 78%; in particolare è stato dell'82.5% per il DNA dei campioni freschi e inferiore per i campioni conservati in etanolo e i campioni sottoposti a cottura (63% e 50% rispettivamente). La degradazione osservata soprattutto nei campioni di DNA estratto da

tessuti cotti e conservati, ma in alcuni casi anche da quelli freschi, potrebbe spiegare la mancata amplificazione di suddetti campioni.

Nel complesso, il metodo d'identificazione basato sui risultati dell'IDs di BOLD ha consentito di identificare correttamente l'81% delle sequenze, relative a 43 specie (75.4%), mentre il BLAST NCBI ha consentito di identificare correttamente il 67.3% delle sequenze relative a 34 specie (59.6%). Va tuttavia specificato che per alcune specie non è stata possibile l'identificazione a causa dell'assenza di esemplari di riferimento nei database e che in alcuni casi è stato necessario effettuare una revisione dei risultati che risultavano falsati dalla presenza di sequenze non correttamente identificate sui database.

Le sequenze complete dei 55 campioni commerciali sono state confrontate con i database e sono stati identificati correttamente a livello di specie 53 campioni su BOLD e 44 campioni su GenBank. Dall'analisi è emerso che 18 campioni su 55 (33%), di cui 15 interi e 3 sfilettati, erano etichettati in maniera non corretta.

Alla luce dei nostri risultati il DNA *barcoding* si conferma un metodo utile e versatile per "l'ispezione molecolare" dei prodotti della pesca. L'unica limitazione è rappresentata dall'impossibilità di recuperare "barcodes" da quei prodotti in cui il DNA ha subito un certo grado di degradazione.

CAPITOLO 1

CLASSIFICAZIONE E BIOLOGIA DELLA FAMIGLIA SPARIDAE

1.1. CLASSIFICAZIONE

La famiglia degli Sparidi (Bonaparte 1831) appartiene all'ordine dei Perciformi e comprende 36 generi e 133 specie (Tabella 1.1.). L'ordine dei Perciformi è costituito da 20 sottordini, 160 famiglie, circa 1540 generi e oltre 10.000 specie. Circa 52 famiglie hanno un singolo genere, 23 una singola specie e 21 hanno 100 o più specie (Nelson 2006).

Il sottordine dei Percoidei è il più grande dei 20 sottordini dei Perciformi e contiene 79 famiglie, compresa la famiglia degli Sparidi, 540 generi e circa 3176 specie (Nelson 2006).

DENOMINAZIONE SCIENTIFICA	AUTORE	DENOMINAZIONE INGLESE
<i>Acanthopagrus akazakii</i>	Iwatsuki, Kimura, Yoshino, 2006	-
<i>Acanthopagrus australis</i>	Günther, 1859	Surf bream
<i>Acanthopagrus berda</i>	Forsskål, 1775	Gold silk seabream
<i>Acanthopagrus bifasciatus</i>	Forsskål, 1775	Twobar seabream
<i>Acanthopagrus butcheri</i>	Munro, 1949	Southern black bream
<i>Acanthopagrus chinshira</i>	Kume & Yoshino, 2008	Okinawan yellow-fin seabream
<i>Acanthopagrus latus</i>	Houttuyn, 1782	Yellowfin seabream
<i>Acanthopagrus omanensis</i>	Iwatsuki & Heemstra, 2010	Black Margined Seabream
<i>Acanthopagrus pacificus</i>	Iwatsuki, Kume & Yoshino, 2010	Pacific seabream
<i>Acanthopagrus palmaris</i>	Whitley, 1935	North west black bream
<i>Acanthopagrus randalli</i>	Iwatsuki & Carpenter, 2009	Middle East Black Seabream
<i>Acanthopagrus schlegelii czerskii</i>	Berg, 1914	-
<i>Acanthopagrus schlegelii schlegelii</i>	Bleeker, 1854	Blackhead seabream
<i>Acanthopagrus sivicolus</i>	Akazaki, 1962	Okinawa seabream
<i>Acanthopagrus taiwanensis</i>	Iwatsuki & Carpenter, 2006	-
<i>Acanthopagrus vagus</i>	Peters, 1852	Wandering seabream
<i>Archosargus pourtalesii</i>	Steindachner, 1881	Blackspot porgy
<i>Archosargus probatocephalus</i>	Walbaum, 1792	Sheepshead
<i>Archosargus rhomboidalis</i>	Linnaeus, 1758	Western Atlantic seabream
<i>Argyrops bleekeri</i>	Oshima, 1927	Taiwan tai

<i>Argyrops filamentosus</i>	Valenciennes, 1830	Soldierbream
<i>Argyrops megalommatus</i>	Klunzinger, 1870	-
<i>Argyrops spinifer</i>	Forsskål, 1775	King soldier bream
<i>Argyrozona argyrozona</i>	Valenciennes, 1830	Carpenter seabream
<i>Boops boops</i>	Linnaeus, 1758	Bogue
<i>Boops lineatus</i>	Boulenger, 1892	Striped boga
<i>Boopsoidea inornata</i>	Castelnau, 1861	Fransmadam
<i>Calamus arctifrons</i>	Goode & Bean, 1882	Grass porgy
<i>Calamus bajonado</i>	Bloch & Schneider, 1801	Jolthead porgy
<i>Calamus brachysomus</i>	Lockington, 1880	Pacific porgy
<i>Calamus calamus</i>	Valenciennes, 1830	Saucereye porgy
<i>Calamus campechanus</i>	Randall & Caldwell, 1966	Campeche porgy
<i>Calamus cervigoni</i>	Randall & Caldwell, 1966	Spotfin porgy
<i>Calamus leucosteus</i>	Jordan & Gilbert, 1885	Whitebone porgy
<i>Calamus mu</i>	Randall & Caldwell, 1966	Flathead porgy
<i>Calamus nodosus</i>	Randall & Caldwell, 1966	Knobbed porgy
<i>Calamus penna</i>	Valenciennes, 1830	Sheepshead porgy
<i>Calamus pennatula</i>	Guichenot, 1868	Pluma porgy
<i>Calamus proridens</i>	Jordan & Gilbert, 1884	Littlehead porgy
<i>Calamus taurinus</i>	Jenyns, 1840	Galapagos porgy
<i>Cheimeri</i>	Akazaki, 1962	Hoshierenko
<i>Cheimeri nufar</i>	Valenciennes, 1830	Santer seabream
<i>Chrysoblephus anglicus</i>	Gilchrist & Thompson, 1908	Englishman seabream
<i>Chrysoblephus cristiceps</i>	Valenciennes, 1830	Daggerhead seabream
<i>Chrysoblephus gibbiceps</i>	Valenciennes, 1830	Red stumpnose seabream
<i>Chrysoblephus laticeps</i>	Valenciennes, 1830	Roman seabream
<i>Chrysoblephus lophus</i>	Fowler, 1925	False red stumpnose
<i>Chrysoblephus puniceus</i>	Gilchrist & Thompson, 1908	Slinger seabream
<i>Chrysophrys auratus</i>	Forster, 1801	Silver seabream
<i>Chrysophrys major</i>	Temminck & Schlegel, 1843	Red seabream
<i>Crenidens crenidens</i>	Forsskål, 1775	Karanteen seabream
<i>Cymatoceps nasutus</i>	Castelnau, 1861	Black musselcracker
<i>Dentex abei</i>	Iwatsuki, Akazaki & Taniguchi, 2007	-
<i>Dentex angolensis</i>	Poll & Maul, 1953	Angolan dentex
<i>Dentex barnardi</i>	Cadenat, 1970	Barnard's dentex
<i>Dentex canariensis</i>	Steindachner, 1881	Canary dentex
<i>Dentex congoensis</i>	Poll, 1954	Congo dentex
<i>Dentex dentex</i>	Linnaeus, 1758	Common dentex
<i>Dentex fourmanoiri</i>	Akazaki & Séret, 1999	-
<i>Dentex gibbosus</i>	Rafinesque, 1810	Pink dentex
<i>Dentex macrophthalmus</i>	Bloch, 1791	Large-eye dentex

<i>Dentex maroccanus</i>	Valenciennes, 1830	Morocco dentex
<i>Dentex spariformis</i>	Ogilby, 1910	-
<i>Diplodus annularis</i>	Linnaeus, 1758	Annular seabream
<i>Diplodus argenteus argenteus</i>	Valenciennes, 1830	South American silver porgy
<i>Diplodus argenteus caudimacula</i>	Poey, 1860	Silver porgy
<i>Diplodus bellottii</i>	Steindachner, 1882	Senegal seabream
<i>Diplodus bermudensis</i>	Caldwell, 1965	Bermuda porgy
<i>Diplodus capensis</i>	Smith, 1844	Cape white seabream
<i>Diplodus cervinus cervinus</i>	Lowe, 1838	Zebra seabream
<i>Diplodus cervinus hottentotus</i>	Smith, 1844	Zebra
<i>Diplodus cervinus omanensis</i>	Bauchot & Bianchi, 1984	Oman porgy
<i>Diplodus fasciatus</i>	Valenciennes, 1830	Banded seabream
<i>Diplodus holbrookii</i>	Bean, 1878	Spottail seabream
<i>Diplodus noct</i>	Valenciennes, 1830	Red Sea seabream
<i>Diplodus prayensis</i>	Cadenat, 1964	Two-banded seabream
<i>Diplodus puntazzo</i>	Walbaum, 1792	Sharpsnout seabream
<i>Diplodus sargus ascensionis</i>	Valenciennes, 1830	-
<i>Diplodus sargus cadenati</i>	De la Paz, Bauchot & Daget, 1974	Moroccan white seabream
<i>Diplodus sargus helenae</i>	Sauvage, 1879	St. Helena white seabream
<i>Diplodus sargus kotschy</i>	Steindachner, 1876	One spot seabream
<i>Diplodus sargus lineatus</i>	Valenciennes, 1830	-
<i>Diplodus sargus sargus</i>	Linnaeus, 1758	White seabream
<i>Diplodus vulgaris</i>	Geoffroy Saint-Hilaire, 1817	Common two-banded seabream
<i>Evyinnis cardinalis</i>	Lacepède, 1802	Threadfin porgy
<i>Evyinnis ehrenbergii</i>	Valenciennes, 1830	-
<i>Evyinnis mononematos</i>	Guan, Tang & Wu, 2012	-
<i>Evyinnis tumifrons</i>	Temminck & Schlegel, 1843	Yellowback seabream
<i>Gymnocrotaphus curvidens</i>	Günther, 1859	Janbruin
<i>Lagodon rhomboides</i>	Linnaeus, 1766	Pinfish
<i>Lithognathus aureti</i>	Smith, 1962	West coast seabream
<i>Lithognathus lithognathus</i>	Cuvier, 1829	White steenbras
<i>Lithognathus mormyrus</i>	Linnaeus, 1758	Sand steenbras
<i>Lithognathus olivieri</i>	Penrith & Penrith, 1969	Steenbras
<i>Oblada melanura</i>	Linnaeus, 1758	Saddled seabream
<i>Pachymetopon aeneum</i>	Gilchrist & Thompson, 1908	Blue hottentot
<i>Pachymetopon blochii</i>	Valenciennes, 1830	Hottentot seabream
<i>Pachymetopon grande</i>	Günther, 1859	Bronze seabream
<i>Pagellus acarne</i>	Risso, 1827	Axillary seabream
<i>Pagellus affinis</i>	Boulenger, 1888	Arabian pandora
<i>Pagellus bellottii</i>	Steindachner, 1882	Red pandora
<i>Pagellus bogaraveo</i>	Brünnich, 1768	Blackspot seabream

<i>Pagellus erythrinus</i>	Linnaeus, 1758	Common pandora
<i>Pagellus natalensis</i>	Steindachner, 1903	Natal pandora
<i>Pagrus africanus</i>	Akazaki, 1962	Southern common seabream
<i>Pagrus auriga</i>	Valenciennes, 1843	Redbanded seabream
<i>Pagrus caeruleostictus</i>	Valenciennes, 1830	Bluespotted seabream
<i>Pagrus pagrus</i>	Linnaeus, 1758	Red porgy
<i>Parargyrops edita</i>	Tanaka, 1916	-
<i>Petrus rupestris</i>	Valenciennes, 1830	Red steenbras
<i>Polyamblyodon germanum</i>	Barnard, 1934	German seabream
<i>Polyamblyodon gibbosum</i>	Pellegrin, 1914	Knife-back seabream
<i>Polysteganus baissaci</i>	Smith, 1978	Frenchman seabream
<i>Polysteganus coeruleopunctatus</i>	Klunzinger, 1870	Blueskin seabream
<i>Polysteganus mascarenensis</i>	Iwatsuki & Heemstra, 2011	Mascarene Red Seabream
<i>Polysteganus praeorbitalis</i>	Günther, 1859	Scotsman seabream
<i>Polysteganus undulosus</i>	Regan, 1908	Seventyfour seabream
<i>Porcostoma dentata</i>	Gilchrist & Thompson, 1908	Dane seabream
<i>Pterogymnus lanarius</i>	Valenciennes, 1830	Panga seabream
<i>Rhabdosargus globiceps</i>	Valenciennes, 1830	White stumpnose
<i>Rhabdosargus haffara</i>	Forsskål, 1775	Haffara seabream
<i>Rhabdosargus holubi</i>	Steindachner, 1881	Cape stumpnose
<i>Rhabdosargus sarba</i>	Forsskål, 1775	Goldlined seabream
<i>Rhabdosargus thorpei</i>	Smith, 1979	Bigeye stumpnose
<i>Sarpa salpa</i>	Linnaeus, 1758	Salema
<i>Sparidentex hasta</i>	Valenciennes, 1830	Sobaity seabream
<i>Sparodon durbanensis</i>	Castelnau, 1861	Musselcrackers seabream
<i>Sparus aurata</i>	Linnaeus, 1758	Gilthead seabream
<i>Spondyliosoma cantharus</i>	Linnaeus, 1758	Black seabream
<i>Spondyliosoma emarginatum</i>	Valenciennes, 1830	Steentjie seabream
<i>Stenotomus caprinus</i>	Jordan & Gilbert, 1882	Longspine porgy
<i>Stenotomus chrysops</i>	Linnaeus, 1766	Scup
<i>Virididentex acromegalus</i>	Osório, 1911	Bulldog dentex

Tabella 1.1. Elenco dei generi e delle specie della famiglia Sparidae (www.fishbase.org).

1.2. EVOLUZIONE FILOGENETICA

La monofilia della famiglia degli Sparidi non è stata sostenuta con assoluta sicurezza, soprattutto per l'incertezza sulla collocazione della famiglia *Centracanthidae* (pesci ossei marini appartenenti, come gli Sparidi, all'ordine dei Perciformi). Infatti, anche se le due famiglie sono attualmente considerate distinte e separate (Nelson 2006; Froese & Pauly 2009), la collocazione della famiglia *Centracanthidae* nella famiglia *Sparidae*, è stata sostenuta in base al risultato degli studi morfologici (Jordan & Felser 1893; Day 2002) e molecolari (Orrel & Carpenter 2004). In particolare, molti autori hanno rilevato una stretta somiglianza fra le due famiglie per quanto riguarda l'articolazione mascellare e premaxillare (Regan 1913; Smith 1938; Johnson 1993).

Con soltanto 9 specie in due generi, la famiglia *Centracanthidae* è una famiglia di pesci planctivori localizzata nell'oceano Atlantico orientale, mar Mediterraneo e Sud Africa. Soltanto una specie (*Spicara Martinicus*, Valenciennes 1830), si trova nell'Atlantico occidentale (Froese & Pauly 2009) ed è endemica nell'isola di Martinica.

Mentre il genere *Centracanthus* è monospecifico, con la specie *Centracanthus cirrus*, localizzato principalmente nel mar Mediterraneo, nell'oceano Atlantico nord-orientale, lungo le coste dal Portogallo alla Mauritania, comprese le Azzorre, Madeira e le isole Canarie, il genere *Spicara* è molto diffuso.

I c.d. *Picarel porgies* (*Centrocanthus cirrus*, Nelson 2006) hanno un premaxillare molto protrattile e piccoli denti conici su più file (Tortonese 1983), e sono quindi facilmente distinguibili dagli Sparidi che presentano invece una bocca poco protrattile ed una spiccata eterodontia (Bauchot & Hureau 1986).

Concludendo, le analisi filogenetiche mettono in evidenza l'origine parafiletica (Day 2002; Orrell & Carpenter 2004) della famiglia *Centracanthidae*, confermando quindi la monofilia della famiglia *Sparidae*.

1.3. CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE

Gli Sparidi hanno corpo di forma ovale in vista laterale, oppure fusiforme, compresso, molto alto e con profilo del muso semirettilineo (Vedi Appendice 1). Il corpo è ricoperto di squame piuttosto grandi, che sono presenti sulle guance ed assenti sul muso e sullo spazio suborbitale. Hanno testa grande e massiccia, con cresta occipitale molto sviluppata. Negli individui anziani la regione frontale risulta marcatamente prominente. Il premaxillare generalmente non è protrattile, il mascellare non è visibile a bocca

chiusa e viene coperto nell'estremità posteriore dal premascellare. L'osso sovramascellare è assente.

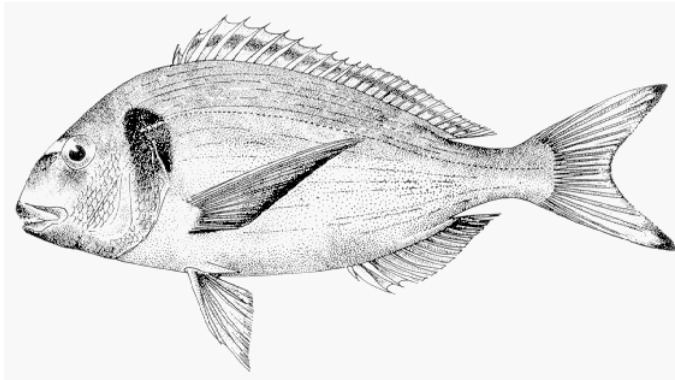


Figura 1.1. Sparus aurata (www.fao.org).

Bocca relativamente piccola in posizione orizzontale e dentatura eterodonte con varia tipologia a seconda delle abitudini alimentari con vomere e palatini sprovvisti di denti. Preopercolo con bordo posteriore liscio e opercolo privo di spine. Presenza di due paia di narici. Vescica natatoria presente e stomaco provvisto di appendici piloriche.

La linea laterale è evidente, ricalca all'incirca l'andamento del profilo dorsale, ed è estesa fino alla base della pinna caudale. Pinna dorsale unica con margine uniforme, senza incisura nella zona tra raggi spiniformi e molli. Pinne pettorali lunghe e appuntite. Pinne ventrali situate in posizione toracica dotate di processo ascellare, inserite presso l'origine delle pettorali o leggermente all'indietro, munite di un raggio spiniforme e di 5 raggi molli. Pinna caudale biloba, forcuta. (Manzoni e Trepedino, 2008).

1.3.1. Dentatura

La classificazione degli Sparidi è basata sulla morfologia, in particolare sulle caratteristiche dei denti e sulle caratteristiche esterne, come ad esempio il numero di raggi duri e molli, le scaglie, il colore del corpo tra le diverse specie. La dentatura è il più importante fattore discriminante ed è stato successivamente utilizzato come caratteristica morfologica principale per distinguere i vari generi (Vedi Appendice 1). Di seguito vengono riportate le tavole dentarie dei principali generi appartenenti alla famiglia Sparidae. (Malandra e Pagani, 2007).

Genere *Dentex*

<p><i>Dentex</i></p> 	DENTI ANTERIORI	Grossi denti caniniformi.
	DENTI LATERO- POSTERIORI	Una fila di piccoli denti caniniformi.
	PARTICOLARITA' DI SPECIE	<i>D. Barnardi</i> e <i>D. Canariensis</i> hanno caniniformi molto sviluppati. <i>D. Macrophthalmus</i> , <i>D. Gibbosus</i> e <i>D. Nufar</i> hanno denti molto sporgenti.

Genere *Pagrus*

<p><i>Pagrus</i></p> 	DENTI ANTERIORI	Grossi denti caniniformi.
	DENTI LATERO- POSTERIORI	Grossi denti caniniformi. Lateralmente una fila di denti conici; posteriormente due file di molariformi.
	PARTICOLARITA' DI SPECIE	<i>P. auriga</i> ha la punta dei denti grigio scura; negli altri pagri è chiara.

Genere *Pagellus*

<p><i>Pagellus</i></p> 	DENTI ANTERIORI	Numerosi piccoli caniniformi.
	DENTI LATERO- POSTERIORI	Lateralmente una fila di denti conici e posteriormente due file di caniniformi.
	PARTICOLARITA' DI SPECIE	<i>Pagellus erythrinus</i> ha la mandibola biloba e canini più sviluppati e sporgenti; <i>Pagellus bellottii</i> ha caniniformi più sottili.

Genere *Diplodus*

<p><i>Diplodus</i></p> 	DENTI ANTERIORI	Una fila di grossi incisiviformi
	DENTI LATERO- POSTERIORI	Due file di molariformi
	PARTICOLARITA' DI SPECIE	Lo Sparaglione ha una fila di incisivi corti e tozzi; il Pizzuto ha una fila di incisivi lunghi e sporgenti.


Genere *Sparus*

<p><i>Sparus</i></p> 	DENTI ANTERIORI	Grossi denti conici.
	DENTI LATERO- POSTERIORI	Lateralmente, una fila di premolari, posteriormente; una fila di denti conici.
	PARTICOLARITA' DI SPECIE	Presenza di Ovale posteriore.


Genere *Boops*

<p><i>Boops</i></p> 	DENTI ANTERIORI	Una fila di incisiviformi cuspidati o crenulati.
	DENTI LATERO- POSTERIORI	Una fila di incisiviformi cuspidati crenulati.
	PARTICOLARITA' DI SPECIE	Superiori con 3-4 punte; inferiori con 3-5 punte, con la centrale più larga e sviluppata.

Genere *Lithognatus*

<p><i>Lithognatus</i></p> 	DENTI ANTERIORI	8 grossi denti conici.
	DENTI LATERO- POSTERIORI	2 file di denti molariformi.
	PARTICOLARITA' DI SPECIE	Molariformi perpendicolari all'asse maggiore delle mascelle e allungati.

Genere *Oblada*

<p><i>Oblada</i></p> 	DENTI ANTERIORI	10 denti incisiviformi bicuspidati.
	DENTI LATERO- POSTERIORI	Una fila di denti conici.
	PARTICOLARITA' DI SPECIE	Prominenza mandibolare nella specie adulta.

Genere *Sarpa*

<p><i>Sarpa</i></p> 	DENTI ANTERIORI	Una fila di incisiviformi cuspidati
	DENTI LATERO- POSTERIORI	Una fila di denti insiviformi bicuspidati.
	PARTICOLARITA' DI SPECIE	Denti superiori bicuspidati e denti inferiori mono e bicuspidati.

Genere *Spondyliosoma*

	DENTI ANTERIORI	Grossi denti conici.
	DENTI LATERO- POSTERIORI	Lateralmente una fila conici, posteriormente 3-4 file di denti villiformi.
	PARTICOLARITA' DI SPECIE	Grossi denti conici presenti solo nell'adulto.

1.3.2. Alimentazione

Smith (1938) e Smith & Smith (1986), hanno proposto una classificazione degli Sparidi in 4 sottofamiglie (Sparinae, Pagellinae, Denticinae, Boopsinae) in base alla dentatura che è a sua volta correlata con il tipo di alimentazione.

Le due sottofamiglie Sparinae e Pagellinae sono caratterizzati dalla presenza di molari posteriori e si differenziano principalmente in base alla forma dei loro denti anteriori. La sottofamiglia Sparinae presenta dei grossi canini o incisivi compressi mentre la sottofamiglia Pagellinae presenta dei piccoli canini di forma conica. Queste piccole differenze hanno portato Fielder (1991) a unire queste due sottofamiglie in un'unica sottofamiglia (Sparinae).

Le altre due sottofamiglie (Boopsinae e Denticinae) sono sprovviste di denti molariformi. La sottofamiglia Denticinae presenta una mascella con grossi canini anteriormente e denti conici più piccoli posteriormente mentre la sottofamiglia Boopsinae presenta anteriormente denti incisiviformi compressi oppure diverse file di piccoli denti conici come nel genere *Spondilyosoma*.

Questa classificazione implica una successiva suddivisione in base alla specializzazione trofica. Nella famiglia Sparidae si ritrovano quindi pesci piscivori appartenenti alla sottofamiglia Denticinae, bentivori nella sottofamiglia Sparinae e Pagellinae mentre la sottofamiglia Boopsinae comprende sia gli erbivori che i planctivori.

Tuttavia la classificazione di queste specie non è del tutto chiara a causa delle differenze tra i risultati degli esami morfologici e molecolari. Quindi, in base alle analisi

filogenetiche molecolari, gli Sparidi possono essere suddivisi in sei sottofamiglie: Boopsinae, Denticinae, Diplodinae, Pagellinae, Pagrinae e Sparinae (Orrel *et al* 2002; Nelson 2006).

Le differenze all'interno della famiglia degli Sparidi potrebbe essere il risultato di una ridotta competizione e di un'elevata adattabilità alle diverse risorse alimentari ed ai diversi habitat marini in acque tropicali e temperate.

L'alimentazione degli Sparidi è varia ed è strettamente correlata alle caratteristiche della dentatura e alla lunghezza dell'intestino che è decisamente più sviluppato nelle specie nella cui dieta prevalgono i vegetali.

Lo sviluppo di denti molariformi, che vengono utilizzati per frantumare il guscio di molti invertebrati, può essere considerata la chiave del loro successo evolutivo.

Lo sviluppo di diversi tipi di denti ha consentito agli Sparidi di poter utilizzare differenti tipi di alimenti fino ad arrivare a delle vere e proprie specializzazioni trofiche e, soprattutto nel mar Mediterraneo e nella regione del Capo (Sud Africa), gli Sparidi occupano una grande varietà di nicchie ecologiche.

La Salpa (*Sarpa salpa*) differisce dalle altre specie in quanto può essere considerato un vero e proprio erbivoro, anche se gli esemplari giovani si nutrono di plancton (Fagianelli & Cook 1981; Whitefield 1985).

La famiglia Boopsinae comprende un piccolo numero di specie onnivore. La loro dentatura è poco uniforme. Hanno una sola fila di denti incisiviformi sia nell'arcata superiore che nell'arcata inferiore come nella Boga (*Boops boops*) oppure più file di piccoli denti conici come nella Tanuta (*Spondilyosoma cantharus*) e nello *Spondilyosoma marginatum*.

Tuttavia la maggior parte degli Sparidi sono bentivori e sono provvisti di denti posteriori molariformi.

Grazie alla loro capacità di distruggere il guscio di piccoli invertebrati come molluschi ed echinodermi, gli Sparidi riescono ad utilizzare degli alimenti difficilmente utilizzabili da altre specie e quindi occupano un ruolo primario rispetto agli altri animali bentonici.

Tra le specie predatrici, i più importanti sono il *Diplodus sargus* e il *Diplodus vulgaris*.

Circa 21 specie dei 7 generi della famiglia Denticinae sono piscivori e sono dotati di grossi canini anteriormente e grossi denti conici posteriormente. Essi comprendono gli Sparidi di maggiore valore economico. Con la lunghezza massima di 200 cm e il peso di 80 Kg, il *Petrus rupestris*, è il più grosso sparide vivente e la principale specie predatrice presente nelle coste del Sudafrica.

Il Dentice (*Dentex dentex*) occupa un'analogica nicchia ecologica nell'oceano Atlantico nord-orientale e nel mar Mediterraneo.

1.4. DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA E HABITAT

Gli Sparidi sono diffusi in tutte le acque temperate e tropicali del mondo, compreso il mar Mediterraneo, dove sono estremamente comuni e, spesso, costituiscono la maggior parte della fauna ittica delle aree costiere. La zona dove sono rappresentati dal maggior numero di specie è però il Sudafrica. Alcuni Sparidi sono eurialini e possono trovarsi in acque salmastre o dolci. Sono più frequenti nelle zone costiere ma si possono trovare in gran numero anche nel circalitorale (Vedi Appendice 1).

Gli Sparidi vivono sia sui fondali rocciosi che sui fondali sabbiosi. I giovani Sparidi e anche le specie di taglia più piccola formano dei banchi e stanno in acque poco profonde a differenza degli adulti e delle specie di taglia più grande che in genere tendono a vivere non in gruppo e si spostano verso le acque più profonde. Raramente si trovano nelle acque più fredde e solo occasionalmente nelle zone salmastre, come gli estuari, usati come luogo di riproduzione.

Anche se gli Sparidi sono ampiamente diffusi, la loro massima concentrazione si ha lungo le coste meridionali e occidentali dell'Africa. Gli Sparidi sono gli unici pesci della superfamiglia Sparoidea a essere presenti nell'oceano Atlantico occidentale (Helfman 1997). Con oltre 44 specie la regione del capo nel Sudafrica, vede la più alta concentrazione di Sparidi.

A nord-ovest, nelle acque fredde della corrente del Benguela, al largo della Namibia, il numero delle specie di Sparidi si riduce drasticamente per poi aumentare di nuovo nelle acque più calde al largo dell'Angola e del golfo di Guinea.

A nord-est della regione del Capo, il numero delle specie di Sparidi diminuisce nelle acque calde della corrente di Agulhas fino ad arrivare soltanto a 12 specie nel mar Rosso.

L'oceano Pacifico occidentale riveste minore importanza per quanto riguarda la distribuzione degli Sparidi. Soltanto 21 specie sono state trovate dal nord del Giappone al sud dell'Australia e a sud della Nuova Caledonia. Mentre gli Sparidi mancano completamente nel Pacifico centrale, nel Pacifico orientale sono presenti altre due specie di Sparidi (*Archesargus pourtalesii* e *Calamus brachisomus*).

Le aree di distribuzione differiscono tra le singole specie. Alcune specie sono ampiamente distribuite in un'area che si estende dal Sudafrica al nord-ovest dell'Australia, come per esempio l'*A. bifasciatus* e l'*A. berda*.

Le specie endemiche sono presenti nell'arcipelago di Capo Verde (*Diplodus fasciatus*, *Diplodus prayensis* e *Virididentex acromegalus*), nelle isole Bermuda (*Diplodus bermudensis*), le isole Galapagos (*A. pourtalesii*), Nuova Caledonia e le isole Chesterfield (*Acanthopagrus akazaii* e *Dentex fourmanairi*).

Il *Pagrus pagrus* è diffuso nell'oceano Atlantico nord-orientale dalle isole britanniche alle Canarie compreso il mar Mediterraneo, ma anche dal versante settentrionale del golfo del Messico all'Argentina (Robins & Ray 1986) compresa la costa continentale del mar dei Caraibi (Cervigòn 1993).

Nei nostri mari si trovano, inoltre, Dentici (Gen. *Dentex*), Pagelli (Gen. *Pagellus*), Saraghi (Gen. *Diplodus*), Occhiate (*Oblada melanura*), Salpe (*Boops boops*) e Orate (*Sparus aurata*). In America è comune la specie *Stenotomus chrysops*, lunga circa 30 cm, molto abbondante al largo della costa orientale degli Stati Uniti e la specie *Lagodon rhomboides* (molto simile agli abramidi), che misura dai 15 ai 30 cm, che vive nell'oceano Atlantico da Capo Cod a Cuba e che viene spesso usato come esca. Molte specie affini vivono nei pressi della Florida e delle Indie Occidentali.

Il *Diplodus sargus*, che comprende 6 (Froese & Pauly 2009) o 7 (De la Paz 1973) sottospecie, è presente in un'area che si estende dal golfo di Guascona, nell'oceano Atlantico nord orientale, fino alle isole Canarie (*Diplodus sargus cadenati*) compreso il mar Mediterraneo (*Diplodus sargus sargus*), il golfo Persico e la costa indiana settentrionale .

Ci sono anche alcune sottospecie endemiche presenti nell'arcipelago di Capo Verde (*Diplodus sargus lineatus*), nell'isola dell'Ascensione (*Diplodus sargus ascensionis*), nell'isola di Sant' Elena (*Diplodus sargus helanae*).

Il genere *Diplodus* comprende anche altre specie come il *Diplodus capensis* (presente dall'Angola al Mozambico), *Diplodus noct* (endemico nel Mar Rosso), *Diplodus argenteus* (presente dal sud-est della Florida all'Argentina), *Diplodus holbrooki* (presente dalla baia di Chesapeake alla Florida e nel golfo del Messico nord orientale) e *Diplodus bermudensis* (endemico nelle Bermuda).

1.5. RIPRODUZIONE

Tra i teleostei, gli Sparidi, sono una delle famiglie più variegata per quanto riguarda la sessualità (Atz 1964; Buxton & Garrat 1990).

All'interno della famiglia, le singole specie differiscono notevolmente per quanto riguarda la loro strategia riproduttiva.

È frequente l'ermafroditismo, con specie proteroginiche (tanuta, ecc.) che sono femmine nella prima parte della loro vita, e specie proterandriche (orata, sarago sparaglione, mormora, salpa) che sono maschi nella prima parte della loro vita, con interessamento in alcune specie dell'intera popolazione mentre in altre sono coinvolti solo pochi soggetti. Infine ci sono anche specie gonocoriche (dentice), ovvero a sessi separati.

Inoltre in alcune specie si sviluppa una gonade intersessuale immatura (ermafroditismo rudimentale). Buxton e Garrat considerano queste specie come "gonocoriche tardive", facendo riferimento al periodo dello sviluppo in cui sono presenti sessi separati per distinguerle dalle specie "gonocoriche vere" dove non è presente tessuto ermafrodita in nessuna fase dello sviluppo.

Infine nel *Pagellus bogaraveo* è stato identificato un ermafroditismo simultaneo, ovvero la presenza di gonadi maschili e femminili (Williamson 1911; Le Gall 1929; Buxton & Garrat 1990).

Le cause e il percorso sull'evoluzione dell'ermafroditismo come stile riproduttivo sono state, e sono ancora, causa di dibattito (Atz 1964; Smith 1967, 1975; Ghiselin 1969; Reinboth 1970; Policansky 1982).

Un vantaggio potrebbe essere quello di massimizzare il potenziale riproduttivo (Williamson 1966) e quindi le loro opportunità individuali.

Negli Sparidi, e nei pesci in generale, l'ermafroditismo sequenziale (nel quale un individuo si riproduce prima in un sesso e poi nell'altro) è considerato la forma più comune di ermafroditismo (Reinboth; Choat & Robertson 1975; Robertson & Warner 1979; Warner e Robertson 1978; Shapiro 1981; Garrat 1986; Buxton 1987).

Tuttavia l'ermafroditismo sequenziale è considerato vantaggioso quando un individuo si riproduce in un sesso in un particolare momento della vita e nell'altro sesso in un altro. (Ghiselin 1969; Warner 1984; Shapiro 1987).

Come regola generale il periodo di deposizione delle uova deve soddisfare le esigenze fisiologiche della prole. Siccome la famiglia degli Sparidi occupa un vasto range, dalle

acque temperate alle acque tropicali, gli Sparidi vivono, e devono deporre le uova in una molteplice combinazione di condizioni fisiche.

Tuttavia, il periodo di deposizione delle uova è influenzato, oltre che dal fotoperiodo e dal termoperiodo, da una varietà di parametri ambientali, come la predazione, la competizione e la disponibilità di cibo (Johannes 1978; Norcross & Shaw 1984).

CAPITOLO 2

PESCA E ACQUACOLTURA

2.1. PANORAMICA SULLA PESCA E SULL'ACQUACOLTURA MONDIALE

La pesca e l'acquacoltura hanno fornito a livello mondiale circa 148 milioni di tonnellate di pesce (dati FAO 2010), dei quali 128 milioni di tonnellate sono state utilizzate per l'alimentazione umana. All'inizio del 2011 è stato registrato un ulteriore aumento e la produzione ha raggiunto i 154 milioni di tonnellate.

Il consumo di pesce è più basso in Africa con 9,1 milioni di tonnellate (circa 9,1 Kg pro capite) mentre l'Asia registra 2/3 del consumo totale con oltre 85,4 milioni di tonnellate (circa 20,7 Kg pro capite). Di queste 42,8 milioni di tonnellate sono consumate al di fuori della Cina.

In Oceania, Nord America, Europa, America latina e Caraibi, il consumo pro capite è rispettivamente di 24,6 Kg, 24,1 Kg, 22,0 Kg, 9,9 Kg.

La Cina è stata la principale responsabile dell'aumento del consumo pro capite di pesce a livello mondiale, grazie alle sue elevate produzioni derivanti principalmente dall'acquacoltura.

Per quanto riguarda l'utilizzazione del pesce prodotto a livello mondiale, il 40,5% (60,2 milioni di tonnellate) è stato commercializzato vivo, fresco o refrigerato, il 45,9% (68,1 milioni di tonnellate) sottoposto a congelamento, salatura, affumicatura o altre preparazioni destinate al consumo umano diretto e il 13,6 % destinato a usi non alimentari (dati FAO 2010). Infatti, mentre negli anni '80 circa il 68% del pesce prodotto era destinato al consumo umano, questa quota è aumentata molto nel 2010 arrivando fino all' 86% (circa 128,3 milioni di tonnellate).

Nel 2010 circa 20,2 milioni di tonnellate erano destinati a scopi non alimentari. Di questi il 75% (15 milioni di tonnellate) era trasformato in farina di pesce e olio di pesce; e la rimanente parte (5,1 milioni di tonnellate) era commercializzata come pesci ornamentali, esche, per usi farmaceutici oltre che per l'alimentazione in acquacoltura.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
PRODUZIONE PESCA (Mtn)						
Acque interne	9.8	10	10.2	10.4	11.2	11.5
Mare	80.2	80.4	79.5	79.2	77.4	78.9
TOTALE	90.0	90.3	89.7	89.6	88.6	90.4
PRODUZIONE ACQUACOLTURA						
Acque interne	31.3	33.4	36.0	38.1	41.7	44.3
Mare	16.0	16.6	16.9	17.6	18.1	19.3
TOTALE	47.3	49.9	52.9	55.7	59.9	63.6
Totale pesca a livello mondiale	137.3	140.2	142.6	145.3	148.5	144.0
UTILIZZAZIONE						
Consumo umano	114.3	117.3	119.7	123.6	128.3	130.8
Uso non alimentare	23.0	23.0	22.9	21.0	20.2	23.2
Popolazione (Miliardi)	6.6	6.7	6.7	6.8	6.9	7.0
Quantità pro capite di pesce (Kg)	17.4	17.6	17.8	18.1	18.6	18.8

Tabella 2.1. Pesca e acquacoltura: produzione e utilizzazione a livello mondiale.

Note: Sono escluse le piante acquatiche.

(The State of World Fisheries and Aquaculture 2012)

2.2. PESCA

Nel 2010, non soltanto i principali paesi asiatici leader nel settore della pesca (Cina, India, Indonesia, Myanmar, Vietnam) hanno riportato un significativo aumento delle catture ma anche altri paesi come Norvegia, Russia e Spagna hanno mostrato un significativo aumento delle catture dopo alcuni anni di produzione rallentata.

I paesi che invece hanno subito un calo nella pesca marina sono: Giappone, Corea, Tailandia (in Asia); Argentina, Canada e Messico (in America); Islanda (in Europa); e in misura minore la Nuova Zelanda. Nonostante le tendenze variabili, Marocco, Sud Africa e Senegal rimangono i tre principali paesi produttori in Africa.

Quanto alle aree tropicali, le catture sono aumentate nell'Oceano Indiano orientale e occidentale e nell'Oceano Pacifico centro-occidentale. Nel 2010 la produzione nell'Oceano Atlantico centro-occidentale è diminuita, con una riduzione negli Stati Uniti di circa 100.000 tonnellate, probabilmente per la fuoriuscita di petrolio nel Golfo del Messico. Dal 1978 ci sono state delle fluttuazioni per quanto riguarda le catture nell'oceano Pacifico centro-orientale con un ciclo di circa 5-9 anni. Il Mediterraneo, il mar Nero e l'oceano Atlantico sud-occidentale hanno avuto un calo delle catture del 15-30% dal 2007. Nel sud-est Pacifico e nel sud-est Atlantico, dove ogni anno si verifica il

fenomeno della risalita delle acque profonde, le catture hanno subito un forte calo. Nell'Oceano Atlantico nord-orientale invece le catture hanno subito un aumento negli ultimi tre anni.

La pesca mondiale nelle acque interne ha subito un notevole aumento a partire dalla metà del 2000. La produzione totale, secondo i dati FAO, ha raggiunto gli 11,2 milioni di tonnellate nel 2010, con un aumento di circa il 30% rispetto al 2004. Da sottolineare che la pesca nelle acque interne è sottostimata in alcune regioni. Inoltre, c'è da considerare che in alcune parti del mondo la pressione dell'uomo ed i cambiamenti delle condizioni ambientali hanno danneggiato seriamente numerosi organismi d'acqua dolce in seguito ad un loro sovra sfruttamento.

In alcuni paesi che occupano una posizione importante per quanto riguarda la pesca nelle acque interne, come la Cina, una buona parte delle catture proviene da organismi introdotti artificialmente. Considerando le statistiche, l'aumento della pesca nelle acque interne è attribuibile principalmente ai paesi asiatici. Con l'aumento, nel 2010, delle produzioni in India, Cina e Myanmar, l'Asia rappresenta il 70% della produzione mondiale.

In generale, secondo le statistiche FAO, è possibile distinguere tre aree geografiche in funzione dei quantitativi di catture. Aree in cui c'è stata un'oscillazione nelle catture totali: Atlantico centro-orientale (Area FAO 34); nord-est Pacifico (Area FAO 67); sud-est Pacifico (Area FAO 87); sud-ovest Atlantico (Area FAO 41); nord-ovest Pacifico (Area FAO 61). Queste aree hanno fornito, in media, il 52% delle catture totali negli ultimi 5 anni e sono caratterizzate da un'alta variabilità delle condizioni naturali. Il secondo gruppo comprende quelle aree che hanno avuto una diminuzione delle catture. Questo gruppo ha fornito in media il 20% delle catture totali, e comprende il nord-est Atlantico (Area FAO 27), nord-ovest Atlantico (Area FAO 21), Atlantico centro-occidentale (Area FAO 31), Mediterraneo e mar Nero (Area FAO 37), sud-ovest Pacifico (Area FAO 81), sud-est Atlantico (Area FAO 47). Il terzo gruppo comprende le aree FAO che hanno mostrato un aumento delle catture a partire dal 1950 e comprendono il Pacifico centro-occidentale (Area FAO 71), l'oceano Indiano orientale (Area FAO 57) e occidentale (Area FAO 51). Esse hanno fornito il 28% delle catture totali negli ultimi 5 anni. La pesca di specie molto importanti dal punto di vista commerciale come tonni e gamberetti è rimasta stabile nel 2010. La pesca di cefalopodi è aumentata, dopo la diminuzione del 2008, di circa 0,8 milioni di tonnellate. Nelle aree

dell'Antartico è stato registrato un aumento di oltre il 70% nella pesca di Krill (specie di creature marine invertebrate appartenenti all'ordine *Euphausiacea*).

Relativamente al gruppo dei bivalvi, arselle e telline, che all'inizio degli anni '90 rappresentavano la metà della produzione totale, si è verificato un declino negli ultimi anni e nel 2009-2010 la loro produzione è stata superata da quella delle cappe sante. La pesca di molluschi e ostriche invece non ha subito delle notevoli variazioni negli anni anche se la loro produzione è legata principalmente dall'acquacoltura.

2.3. ACQUACOLTURA

Nel corso di mezzo secolo l'acquacoltura si è notevolmente espansa, diventando paragonabile da un punto di vista dei quantitativi di produzione alla pesca.

Negli ultimi trent'anni (1980-2010) la produzione mondiale di pesce derivante dall'acquacoltura è aumentata di 12 volte. L'acquacoltura ha raggiunto la crescita massima nel 2010 con una produzione di oltre 60 milioni di tonnellate (escluse le piante acquatiche e i prodotti non destinati all'alimentazione). L'acquacoltura si è evoluta negli ultimi anni grazie alle innovazioni tecnologiche e adattandosi alle esigenze di cambiamento. Circa 600 specie acquatiche sono state allevate in cattività in 190 paesi per la produzione in vari sistemi di allevamento e strutture con differente densità e caratteristiche tecnologiche, impiegando acqua dolce, acqua salmastra e acqua marina.

I pesci d'acqua dolce dominano l'acquacoltura mondiale (56,4%, 33,7 milioni di tonnellate), seguiti dai molluschi (23,6%, 14,2 milioni di tonnellate), crostacei (9,6%, 5,7 milioni di tonnellate), pesci diadromi (6%, 3,6 milioni di tonnellate), pesci marini (3,1 %, 1,8 milioni di tonnellate). I prodotti dell'acquacoltura sono quasi interamente destinati al consumo umano.

Tuttavia lo sviluppo dell'acquacoltura non è uguale in tutte le regioni. Alcuni Paesi in via di sviluppo come l'Asia, nel Pacifico, l'Africa sub-sahariana e il sud America, hanno avuto un notevole progresso nello sviluppo dell'acquacoltura negli ultimi anni e sono diventati i principali produttori nelle loro regioni.

Tuttavia le disparità sono enormi tra i continenti e le regioni, nonché tra paesi con condizioni naturali simili nella stessa regione.

Le statistiche mondiali sulla produzione acquicola mancano relativamente a: a) prodotti non alimentari, incluse le esche vive per pescare, le specie ornamentali (piante e animali), i prodotti ornamentali (perle e conchiglie) b) pesci allevati come alimento per

alcune specie carnivore allevate; c) plankton, *Artemia*, larve marine, utilizzate come alimento nei vivai e nelle fasi di crescita; d) pesci allevati in cattività e poi liberati.

2.3.1. Produzione totale di pesce

Nel 2010 la produzione mondiale di prodotti ittici destinati all'alimentazione umana, è stato di 59,9 milioni di tonnellate, crescendo del 7,5% rispetto al 2009. Essa comprende oltre ai pesci, anche i crostacei, i molluschi, gli anfibi (rane), i rettili acquatici (tranne i coccodrilli) e altri animali acquatici (cetrioli di mare, ricci di mare, ascidie e meduse).

Negli ultimi trent'anni l'acquacoltura mondiale è cresciuta di ben 12 volte, con un incremento annuale dell' 8,8%. A partire dal 1990 l'acquacoltura è stata il motore trainante della produzione mondiale di pesce. La produzione di pesce derivante dall'acquacoltura è cresciuta notevolmente passando dal 20,9% nel 1995 al 32,4% nel 2004 e al 40,3% nel 2010. Il pesce prodotto per il consumo umano era il 47% nel 2010 rispetto al 9% del 1980.

L'aumento della produzione del pesce allevato dal 1980 al 2010 ha superato quello della popolazione mondiale, con un incremento del consumo pro capite di pesce del 7,1% l'anno, passando da 1,1 Kg nel 1980 a 8,7 Kg nel 2010. Tuttavia la produzione acquicola mondiale è influenzata da diversi fattori, quali le condizioni naturali, socio-economiche, ambientali e tecnologiche.

2.3.2. Produzione nelle varie regioni

L'Asia è al primo posto per quanto riguarda l'acquacoltura mondiale con una produzione pari a circa l'89% (dati FAO 2010). Il principale produttore è la Cina, con una produzione totale del 60%. Altri principali produttori in Asia sono l'India, il Vietnam, l'Indonesia, il Bangladesh, la Thailandia, il Myanmar, le Filippine e il Giappone. In Asia la quantità di pesci d'acqua dolce allevati è cresciuta notevolmente, passando dal 60% negli anni '90 al 65,6 % nel 2010. L'acquacoltura asiatica è dominata principalmente da pesci (64,6%), seguiti dai molluschi (24,2 %), crostacei (9,7%) e da altre specie (1,5%).

In America, la quantità di pesce prodotto dall'acquacoltura nelle acque dolci è diminuita, passando dal 54,8% nel 1990 al 37,9% nel 2010. In nord-America l'acquacoltura ha cessato la sua crescita negli ultimi anni, mentre in sud-America ha conosciuto un forte aumento, soprattutto in Brasile e Perù. L'acquacoltura in nord e sud America, è dominata dai pesci (57,9%), crostacei (21,7%), molluschi (20,4%). La

produzione di bivalvi ha subito una fluttuazione tra il 14% e il 21% dell'acquacoltura totale tra il 1990 e il 2000.

In Europa, la produzione derivante dalle acque marine e salmastre è aumentata passando dal 55,6% nel 1990 all'81,5% nel 2010, aumento legato all'allevamento del salmone atlantico e delle altre specie. Molti importanti produttori europei hanno recentemente cessato la loro crescita, soprattutto nel settore dei molluschi marini bivalvi. Nel 2010, infatti, la produzione totale dell'acquacoltura europea era rappresentata per 3/4 dai pesci e solo per 1/4 dai molluschi bivalvi. La produzione europea dei molluschi bivalvi è scesa notevolmente passando dal 61% nel 1980 al 26,2% nel 2010.

In Africa la produzione totale è cresciuta passando dall'1,2 al 2,2 % negli ultimi 10 anni. L'acquacoltura nelle acque dolci è diminuita passando dal 52,2% al 21,8 % negli anni '90, a causa della forte crescita dell'allevamento nelle acque salmastre in Egitto, ma ha recuperato a partire dal 2000, raggiungendo il 39,5% nel 2010 grazie al rapido sviluppo dell'allevamento d'acqua dolce nell'Africa sub-Sahariana, soprattutto in Nigeria, Zambia, Uganda, Ghana e Kenia. L'acquacoltura africana è dominata principalmente dai pesci, che rappresentano la quasi totalità della produzione (99,3%) e solo da una piccola frazione di gamberetti marini (0,5%) e molluschi marini (0,2%).

L'Oceania occupa una posizione marginale nel campo dell'acquacoltura. Sono prodotti principalmente molluschi marini (63,5%), pesci (31,9%), mentre i crostacei (soprattutto gamberetti) e altre specie (0,9%) rappresentano meno del 5% della produzione totale. I bivalvi marini hanno rappresentato il 95% della produzione totale nella prima metà del 1980, mentre attualmente la loro produzione arriva solo al 65%. Un notevole incremento della produzione è dato dall'allevamento del salmone atlantico in Australia e del salmone reale in Nuova Zelanda.

	1970	1980	1990	2000	2009	2010
Africa						
(t)	10.271	26.202	81.015	399.676	991.183	1.288.320
(%)	0.40	0.60	0.60	1.20	1.80	1.20
Africa sub-sahariana						
(t)	4.243	7.048	17.184	55.690	276.906	359.790
(%)	0.20	0.10	0.10	0.20	0.50	0.60
Nord Africa						
(t)	6.028	19.154	63.831	343.986	714.277	928.530
(%)	0.20	0.40	0.50	1.10	1.30	1.60
America						
(t)	173.491	198.850	548.479	1.423.433	2.512.829	2.576.428
(%)	6.80	4.20	4.20	4.40	4.50	4.30
Caraibi						
(t)	350	2.329	12.169	39.704	42.514	36.871
(%)	0.00	0.00	0.10	0.10	0.10	0.10
America Latina						
(t)	869	24.590	179.367	799.234	1.835.888	1.883.134
(%)	0.00	0.50	1.40	2.50	3.30	3.10
Nord America						
(t)	172.272	171.931	356.943	584.495	634.427	656.423
(%)	6.70	3.70	2.70	1.80	1.80	1.10
Asia						
(t)	1.799.101	3.552.382	10.801.356	28.422.189	49.538.019	53.301.157
(%)	70.10	75.5	82.60	87.70	88.90	89.00
Asia (esclusa Cina e Medio Oriente)						
(t)	1.034.703	2.222.670	4.278.355	6.843.429	14.522.862	16.288.881
(%)	40.3	47.20	32.70	21.10	26.10	27.20
Cina						
(t)	764.380	1.316.278	6.482.402	21.522.095	34.779.870	36.734.215
(%)	29.80	28.00	49.60	66.40	62.40	61.40
Medio Oriente						
(t)	18	13.434	40.599	56.665	235.286	278.061
(%)	0.00	0.30	0.30	0.20	0.40	0.50
Europa						
(t)	575.598	916.183	1.601.524	2.050.958	2.499.042	2.523.179
(%)	22.40	19.50	12.20	6.30	4.50	4.20
Unione Europea (27)						
(t)	471.282	720.215	1.033.982	1.395.669	1.275.833	1.261.592
(%)	18.40	15.30	18.90	4.30	2.30	2.10
Paesi non Unione Europea						
(t)	26.616	38.594	567.667	657.167	1.226.625	1.265.703
(%)	1.00	0.80	4.30	2.00	2.20	2.10
Oceania						
(t)	8.421	12.224	42.005	121.482	173.283	183.516
(%)	0.30	0.30	0.30	0.40	0.30	0.30
Mondo						
(t)	2.566.882	4.705.841	13.074.379	32.417.738	55.714.357	59.872.600

Tabella 2.2. Produzione acquacoltura nei vari Paesi.

Note: non sono comprese le piante acquatiche e i prodotti non alimentari. I dati relativi al 2010 in alcuni paesi sono provvisori e soggetti a revisione. La produzione del 1980 per l'Europa comprende l'ex l'Unione Sovietica. (The State of World Fisheries and Aquaculture 2012)

La produzione totale nelle diverse regioni e paesi con differente livello di sviluppo economico non è equilibrata.

Mentre l'acquacoltura ha conosciuto una grande crescita nei paesi in via di sviluppo, soprattutto in Asia, nei paesi industrializzati, invece, la crescita è stata solo del 2,1% e 1,5% nel 1990 e nel 2000 rispettivamente.

La produzione nel campo dell'acquacoltura si è ridotta o addirittura arrestata in Giappone, USA, Spagna, Francia, Gran Bretagna, Irlanda del nord, Canada e Italia. Un'eccezione è la Norvegia, dove grazie all'allevamento del salmone Atlantico in gabbie marine, la produzione è cresciuta passando da 151.000 tonnellate nel 1990 a più di un milione di tonnellate nel 2010.

Immediatamente dopo la loro indipendenza, più di vent'anni fa, i paesi dell' Ex Unione Sovietica hanno raggiunto una produzione annuale di circa 350.000 tonnellate. Tuttavia la produzione in questi paesi è diminuita notevolmente negli anni '90, diventando un terzo di quella iniziale e arrivando nel 2010 soltanto al 59% della produzione del 1988.

2.3.3. Produzione nei diversi ambienti di allevamento

In acquacoltura la produzione può provenire da acque salmastre, acque dolci e acque marine. I dati FAO dimostrano che, in termini quantitativi, la percentuale di produzione in acque dolci è cresciuta, passando da meno del 50% nel 1980 a più del 62% nel 2010, con un calo della produzione nelle acque marine da più del 40% ad appena il 30%. La produzione nelle acque salmastre si è mantenuta stabile, tra il 6% e l'8%.

A livello globale, le specie allevate nei diversi ambienti di allevamento sono differenti e hanno subito notevoli cambiamenti nel corso degli anni.

La produzione in acque dolci (36,9 milioni di tonnellate) era rappresentata, nel 2010, principalmente dai pesci (91,7%, 33,9 milioni di tonnellate). I crostacei rappresentavano il 6,4% della produzione, e le altre specie solo l'1,9 %. La quantità di pesci diadromi, trote iridee, e altri salmonidi, anguille, storioni, è diminuita, passando dal 6,3% nel 1990 al 2,5% nel 2010.

La produzione nelle acque salmastre (4,7 milioni di tonnellate) era rappresentata, nel 2010, da crostacei (57,2%, 2,7 milioni di tonnellate), pesci d'acqua dolce (18,7%), pesci diadromi (15,4%), pesci marini (6,5%), molluschi marini (2,1%). Più del 99% dei crostacei erano gamberetti marini.

La produzione nelle acque marine (18,3 milioni di tonnellate) è costituita principalmente da molluschi marini (75,5%, 13,9 milioni di tonnellate), pesci (18,7%,

3,4 milioni di tonnellate), crostacei marini (3,8%) e altri animali acquatici (2,1%) come cetrioli di mare e ricci di mare. La quantità di molluschi (ostriche, cozze, vongole, telline, arselle, cappe sante) è calata, passando dall'84,6% nel 1990 al 75,5% nel 2010, mentre l'allevamento di pesci marini è cresciuto di circa il 9,3% all'anno dal 1990 al 2010. La produzione di salmonidi, soprattutto salmone atlantico, è cresciuta notevolmente, passando da 299.000 tonnellate nel 1990 a 1,9 milioni di tonnellate nel 2010, con una crescita annua del 9,5%. Altre specie di pesci allevate nelle acque marine sono: ricciole, saraghi, spigole, corvine, cernie, pesce tamburo, triglia, rombo e altri pesci piatti, dentici, cobia, pompano, merluzzi, pesce palla e tonni.

2.3.4. Specie prodotte in acquacoltura

Nel 2010 la produzione mondiale nell'acquacoltura era costituita da: pesci d'acqua dolce (54,6%, 34, milioni di tonnellate), molluschi (23,6%, 14,2 milioni di tonnellate), crostacei (9,6%, 5,7 milioni di tonnellate), pesci diadromi (6%, 3,6 milioni di tonnellate), pesci marini (3,1%, 1,8 milioni di tonnellate) e altri animali acquatici (1,4%, 814,300 tonnellate). La produzione di pesci d'acqua dolce è stata costituita principalmente da carpe (71,9%, 24,2 milioni di tonnellate, nel 2010). La produzione di tialapie è stata molto vasta e il 71% era allevato in Asia, soprattutto in Cina e sud-est asiatico, 19% in Africa e 9% in America. In Vietnam abbiamo la maggiore produzione di pangasio, specie prodotta anche in altri paesi come Indonesia e Bangladesh. Le specie carnivore hanno rappresentato soltanto il 2,6% della produzione totale di pesce d'acqua dolce nel 2010.

Sin dall'inizio degli anni '90 più della metà della produzione mondiale di pesci diadromi era costituita da salmonidi. La produzione giapponese ed europea di anguille, allevate soprattutto nell'Asia dell'est e molto meno in Europa, è rimasta intorno a 270.000 tonnellate negli ultimi anni. L'allevamento di storioni, sia per la produzione di carne che per la produzione di caviale, è cresciuta costantemente in Asia, America ed Europa, sebbene la produzione sia ancora bassa.

La produzione mondiale di pesci marini ha una distribuzione più omogenea. Tuttavia un quarto della produzione mondiale è rappresentata da specie non identificate, soprattutto provenienti da alcuni principali paesi produttori asiatici. È evidente che la produzione europea di spigole e orate è stata ampiamente sottostimata nel Mediterraneo.

La produzione mondiale di crostacei è rappresentata da specie d'acqua dolce (29,4%) e specie marine (70,6%). La produzione di specie marine è rappresentata dal gambero

bianco del Pacifico (*Panaeus vannamei*). Le principali specie d'acqua dolce sono il gambero rosso di palude, il granchio cinese, il gambero orientale, il gamberetto gigante di fiume.

2.3.5. Impiego di specie acquatiche in acquacoltura

Il numero di specie riportate nelle statistiche FAO sull'acquacoltura è salito a 541 nel 2010, includendo 327 specie di pesci (5 ibridi), 102 molluschi, 62 crostacei, 6 anfibi e rettili, 9 invertebrati acquatici e 35 alghe. Le specie esotiche sono state ampiamente introdotte e usate per la produzione di massa in acquacoltura, soprattutto nei paesi asiatici. Grande successo, a livello internazionale, ha avuto l'introduzione di specie di pesci come le tilapie africane (soprattutto la tilapia del Nilo), le carpe cinesi (carpa argentea, carpa testa grossa e carpa erbivora), il salmone atlantico (*Salmo salar*), il pangasio (*Pangasius* spp.), il persico trota (*Micropterus salmoides*), il rombo gigante (*Scophthalmus maximus*), il pirapatinga (*Piaractus brachypomus*), il pacu (*Piractus mesopotamicus*) e la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Il gambero bianco del pacifico è la specie introdotta in acquacoltura che avuto il maggior successo a livello internazionale. Nel 2010 ha raggiunto il 71,8% della produzione mondiale di gamberi marini, dei quali il 77,9% era prodotto in Asia. Il gambero rosso di palude (*Procambarus clarkii*) dal nord America e il gambero gigante di fiume (*Macrobrachium rosenbergii*) dal sud e sud-est asiatico sono diventate importanti specie d'acqua dolce allevate in paesi esteri. Una parte importante della produzione mondiale di molluschi marini soprattutto in Europa e in America si basa su una specie proveniente dal Giappone (*Ruditapes philippinarum*) e sull'ostrica concava del Pacifico (*Crassostrea gigas*). La Cina attualmente produce una grande quantità di cappelletto (*Argopecten irradians* e *Patinopecten yessoensis*).

L'utilizzo di specie ibride si ha solo in quei paesi in cui le tecnologie applicate all'acquacoltura sono più sviluppate.

2.4. SPARIDI: PESCA E ACQUACOLTURA

Nel nostro Paese i prodotti dell'acquacoltura soddisfano il 30% circa del consumo di pesce e tale quota è composta per il 70% da bivalvi e per il 30% da pesci; di questi ultimi, la maggior parte (circa il 90%) sono trote, spigole e orate, il resto sono storioni, anguille, ombrine, sarago pizzuto e sarago reale (dati Unimar, 2008). La specie trainante dell'acquacoltura nazionale rimane comunque l'orata.

Per quanto riguarda l'acquacoltura i *Percoidi* rappresentano l'11% della produzione totale, con una quantità di pesce prodotto pari a 3,585,396 mtn.

Questo gruppo di pesci costituisce la maggior parte della produzione mondiale di acquacoltura dopo i cipriniformi (63%) e seguiti dai salmoniformi (7%).

Molte specie di pesci pescate e allevate commercialmente appartengono all'ordine dei Perciformi, comprese le tilapie (famiglia *Cichlidae*), gli Sparidi, le spigole (famiglia *Latidae*), le seriole (famiglia *Carangidae*), le cernie (famiglia *Serranidae*), il barramundi (famiglia *Latidae*), il cobia (famiglia *Rachycentridae*), il perca (famiglia *Percidae*), etc.

Per quanto riguarda l'acquacoltura la famiglia *Cichlidae* (tilapia) rappresenta il 65% della quantità prodotta, mentre la famiglia degli Sparidi il 6,8% con una produzione di 244,153 mtn.

Nel 1986 la produzione di Sparidi era di 35,540 mtn ma nel 2006 ha raggiunto 244,153 mtn (FAO FishStatPlus 2006), con un 65% della produzione proveniente dalla pesca (449,579 mtn) e il rimanente 35% dall'acquacoltura (244,153 mtn). I dati FAO sulla pesca riguardano 45 specie. Tuttavia circa il 55% del pescato (244,870 mtn) è riportato come Sparidi, senza indicare le varie specie. Quattro specie hanno registrato una produzione superiore a 10.000 mtn (*Boops boops*; *Pagrus auratus*; *Dentex spp.*; *Pagellus bellottii*) mentre le specie rimanenti hanno avuto un'importanza minore. Le principali specie allevate nel mondo sono: *Acanthopagrus schlegeli*, *Pagellus bogaraveo*, *Dentex dentex*, *Pagellus erythrinus*, *Diplodus vulgaris*, *Evynnis japonica*, *Sparus aurata*, *Rhabdosargus sarba*, *Acanthopagrus berda*, *Pagrus pagrus*, *Diplodus puntazzo*, *Pagrus auratus*, *Sparidentex hasta*, *Diplodus sargus*, *Dentex tumiformis*, *Acanthopagrus latus*.

Secondo i dati FAO del 2006 il 75% della produzione riguarda due specie: *Sparus aurata* (107,620 mtn) e *Pagrus major* (75,754 mtn).

Per quanto riguarda la distribuzione geografica delle specie allevate, nel 2006, circa il 55% dei 244,153 mtn prodotti provenivano dall'Asia, soprattutto *Pagrus major*. Circa il 44% (soprattutto *Sparus aurata*) dal Mediterraneo (principalmente Grecia, Turchia, Spagna, Italia) e i rimanenti 824 mtn (0,33%) dal Medio-oriente e dalla Repubblica Dominicana.

2.5. ACQUACOLTURA DELLE SPECIE MEDITERRANEO-ATLANTICHE

2.5.1. *Sparus aurata* (Gilthead sea bream)

La produzione totale di orate nel 2006 era di 115,091 mtn (FAO- FishStatPlus 2008), di cui il 93% proveniva dall'acquacoltura e il rimanente 7% dalla pesca in alcuni paesi del Mediterraneo, principalmente Egitto, Tunisia, Spagna, Turchia, Francia. L'orata è stata tradizionalmente allevata in alcuni paesi del Mediterraneo in stretta relazione con la spigola (*Dicentrarchus labrax*). Nel 2006 più del 90% della produzione totale di orate è stata ottenuta in soli 5 dei 20 paesi produttori, con la Grecia che è di gran lunga il principale produttore (41%), seguito dalla Turchia (26%), Spagna (15%), Italia (6%) e Israele (3%). Attualmente questa specie è allevata anche in altri paesi del Mediterraneo, come Cipro, Francia, Portogallo, Croazia, Bosnia Erzegovina, Libia, Algeria, Marocco, Slovenia. La produzione ha avuto luogo principalmente nel mar Mediterraneo, sebbene una piccola produzione c'è stata nell'Oceano Atlantico (5645 mtn nel 2006 nelle Isole Canarie, Spagna) e nel mar Rosso (Eliat, Israele). La produzione è recentemente cominciata anche nel golfo Persico e nel mar Arabico (Bahrein, Kuwait, Repubblica islamica dell'Iran, Oman, Emirati Arabi Uniti) (FAO/RECOFI 2009). Analizzando l'evoluzione della produzione di orate, le prime statistiche FAO sono quelle relative all'Italia, nel 1970, con una produzione di 10 mtn. Dieci anni più tardi, nel 1980, otto paesi hanno riportato una produzione di 775 mtn. Sin da allora la produzione è cresciuta rapidamente e le statistiche del 2006 includono 20 paesi.

I sistemi di produzione delle orate sono molteplici e vanno dalla produzione estensiva (vallicoltura in Italia e produzione nelle lagune in Egitto) o semi-intensiva nelle lagune (Portogallo e Spagna meridionale) a sistemi di allevamento altamente intensivi sulla terraferma, sulle coste (Grecia e Turchia) e in gabbie in mare aperto (Cipro, Italia e Spagna).

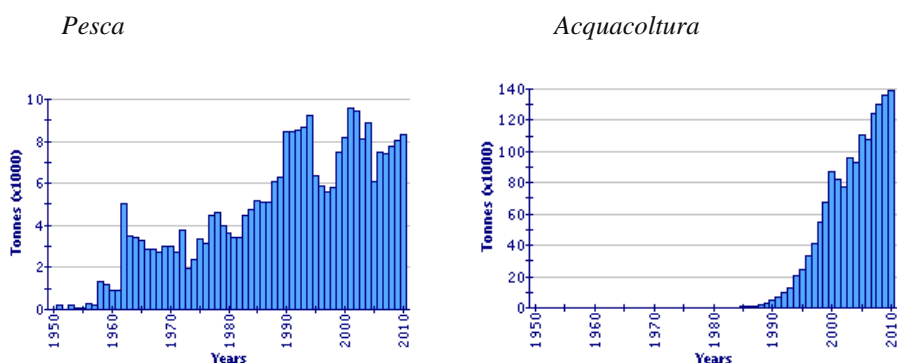


Figura 2.1. *S. Aurata*:Produzione totale pesca e acquacoltura (www.fao.org)

2.5.2. *Pagellus erytrinus* (Common pandora)

La produzione totale di specie del genere *Pagellus*, derivante dalla pesca, va da 19.000 a 33.000 mtn tra il 1996 e il 2006 (FAO FishStatPlus 2008). Nel 2006 il Pagello fragolino ha raggiunto circa il 20% della produzione annuale (4686 mtn). Le principali specie pescate sono il *Pagellus bellottii* (47%), *Pagellus acarne* (5%) e altre specie di pagelli (21%). Ad eccezione del Portogallo, tutto il pagello fragolino pescato proviene dal mar Mediterraneo, principalmente (circa il 94%) da Algeria, Spagna, Tunisia. Per quanto riguarda l'acquacoltura, si ha una piccola produzione in qualche allevamento in Grecia.

2.5.3. *Pagellus bogaraveo* (Blackspot sea bream)

Il pagello (*Pagellus bogaraveo*) è pescato principalmente nel nord-est Atlantico (99%) e la rimanente parte nel Mediterraneo e nell'Atlantico centro-orientale. Portogallo (1108 mtn) e Spagna (302 mtn) sono i principali produttori.

Per quanto riguarda l'acquacoltura, il pagello (*Pagellus bogaraveo*) è stato allevato soltanto in Spagna. La produzione è partita nel 2002 con 2 mtn ed è arrivata nel 2006 a 134 mtn (FAO FishStatPlus 2008). La produzione nel 2007 è arrivata a 195 mtn (JACUMAR 2009). In Spagna questa specie è allevata in Galizia (costa atlantica) da una sola società (Isidro de la Cal) utilizzando delle gabbie galleggianti (Ipac. Acuicultura 2005).

2.5.4. *Diplodus sargus* (White sea bream)

Il genere *Diplodus* è il più grande genere all'interno della famiglia degli Sparidi e comprende 13 specie e 11 sottospecie (Fishbase 2008). Secondo FishBase, *Diplodus sargus*, comprende le seguenti sei sottospecie: *D. sargus ascensionensis* (Valenciennes 1830), *D. sargus cadenati* (de la Paz Bauchot & Daget 1974), *D. sargus helenae* (Sauvage 1879), *D. sargus kotschy* (Steindachner 1876), *D. sargus lineatus* (Valenciennes 1830) and *D. sargus sargus* (Linnaeus 1758).

La produzione totale, derivante dalla pesca, di specie del genere *Diplodus*, dal 1996 al 2006 ha raggiunto 8600 mtn. L'85% delle specie pescate era indicata come *Diplodus* spp., seguita da *Diplodus sargus* (14,5%) e *Diplodus argentus* (circa l'1%) (FAO-FishStatPlus 2008). La maggior parte dei saraghi (*Diplodus sargus*) pescati proviene dalla Francia, Grecia, Spagna e Siria. Per quanto riguarda l'acquacoltura, soltanto una piccola percentuale di produzione è stata riportata, nel 1995, da Grecia, Spagna e Francia. La produzione massima si è verificata nel 1996 con 122 mtn.

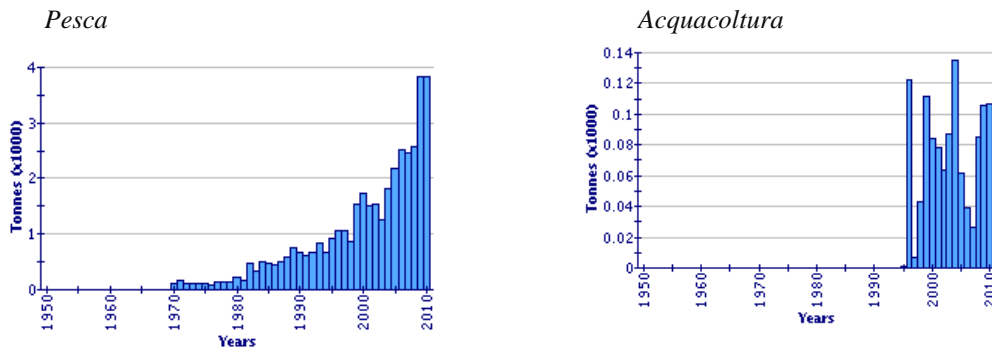


Figura 2.2. *D. sargus*: produzione totale pesca e acquacoltura (www.fao.org)

2.5.5. *Diplodus puntazzo* (Sharpsnout sea bream)

Non ci sono dati FAO relativi alla pesca del Sarago pizzuto. Nel 2006 la pesca totale di specie del genere *Diplodus* era di 9.309 mtn dei quali l'85% era indicato come *Diplodus* spp., pescato principalmente nell'Atlantico occidentale e nel Mediterraneo. Per quanto riguarda l'acquacoltura, circa 200-400 mtn, sono state prodotte in Italia tra il 1997 e il 2003 (FAO-FishStatPlus 2008).

Non ci sono dei dati relativi alla produzione nel periodo 2004-2006. La FEAP (*Federation of European Aquaculture Producers*) ha fornito dei dati sulla produzione annuale (circa 4 milioni di esemplari giovani all'anno in Grecia) tra il 2006 e il 2008 e le statistiche della Commissione Europea hanno riportato una produzione di 159 mtn di queste specie in Italia nel 2007.

2.5.6. *Dentex dentex* (Common dentex)

Nel 2006 la pesca totale di specie del genere *Dentex* era di circa 35,542 mtn (FAO-FishStatPlus 2008), con il 75% indicato come dentice, senza indicare la specie, il 3,5% indicato come *Dentex dentex* (Dentice) e la rimanente parte (21,5%) costituita da *Dentex macrophtalmus* (2.577 mtn), *Dentex angolensis* (3.151 mtn), *Dentex congoensis* (664 mtn). Relativamente al dentice (*Dentex dentex*) la maggior parte del pescato proviene dal Mar Mediterraneo, con Grecia, Turchia, Italia, Tunisia, e Spagna dove abbiamo il 90% della produzione.

Per quanto riguarda l'acquacoltura, soltanto due paesi (Bosnia Erzegovina e Spagna) hanno riportato una produzione per queste specie. I primi dati relativi all'acquacoltura provengono dalla Spagna, con una produzione di 1 mtn nel 1995-1997 e di 2 mtn nel 2006. La Bosnia Erzegovina ha dichiarato una produzione di 12 mtn, nel 2006 in allevamenti in gabbie marine vicino a Neum, nel mar Adriatico (FAO 2006-2009).

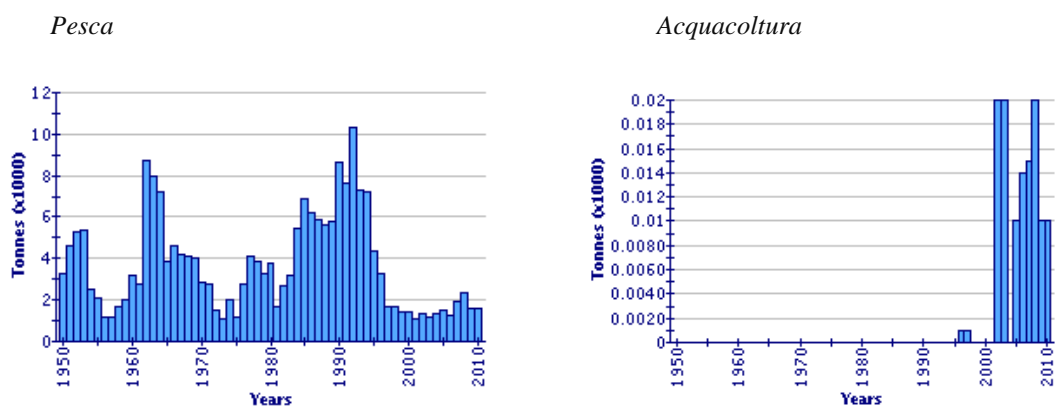


Figura 2.3. *D. Dentex*: Produzione totale pesca e acquacoltura (www.fao.org)

2.5.7. *Pagrus pagrus* (Red porgy)

La pesca totale di specie del genere *Pagrus* tra il 1996 e il 2006 è stata tra 41.000 e 51.000 mtn. Le principali specie pescate del genere *Pagrus*, sono il *Pagrus auratus* (60%), seguito dal *Pagrus pagrus* (24%). Queste specie sono pescate principalmente nell'Atlantico occidentale (Argentina, Brasile, Uruguay,) e nel Mediterraneo (Cipro, Egitto, Francia, Grecia, Portogallo, Malta Spagna, Tunisia, Turchia).

Per quanto riguarda l'acquacoltura, le principali statistiche sulla produzione di *Pagrus pagrus* provengono dalla Grecia e sono relative al periodo 1993-1994, e da Cipro per quanto riguarda il periodo 1994-1995 (FAO-FishStatPlus 2008). La produzione si è successivamente interrotta e nel 2002 e nel 2004 soltanto Cipro ha riportato una piccola produzione (23 mtn). Sebbene le statistiche FAO non riportano dati sulla produzione nel 2006, la FEAP (2008) ha riportato che 2-3 milioni di giovani pagri (*Pagrus pagrus*) sono stati prodotti nei precedenti tre anni, evidenziando una ripresa nella produzione. Il Pagro (*Pagrus pagrus*) è stato considerato la specie più adatta ad essere allevata nel Mediterraneo, grazie alla sua adattabilità alle varie condizioni di allevamento, al buon tasso di crescita e al minor rischio di patologie. Tuttavia la produzione commerciale non ha avuto successo, a causa della perdita della sua naturale colorazione in cattività.

2.6. ACQUACOLTURA DELLE SPECIE INDOPACIFICHE

2.6.1. *Pagrus major* (Red sea bream)

La maggior quantità di Pagro del Giappone è pescato nel Pacifico settentrionale.

Per quanto riguarda l'acquacoltura, il *Pagrus major* è stato il primo della famiglia degli Sparidi ad essere allevato intensivamente. I primi dati relativi alla produzione in

Giappone risalgono al 1957 (FAO-FishStatPlus 2008). La produzione è cresciuta rapidamente negli anni '70 e nel giro di dieci anni la quantità allevata ha di gran lunga superato quella pescata nel Pacifico settentrionale. L'allevamento del *Pagrus major* ha continuato a crescere negli anni '80-'90 ma poi è diminuita all'inizio del 2000. Nel 2006 la produzione era di 75,750 mtn ed il Giappone era il principale produttore (94% della produzione) seguito dalla Corea (6% della produzione). Il *Pagrus major* è una specie molto importante, allevata sia in mare aperto che presso la costa, soprattutto in Cina (Chen *et al.* 2008). Oltre al *Pagrus major* altre specie allevate in Cina sono l'*Acanthopagrus schlegelii schlegelii*, l'*Acanthopagrus latus* e *Rabadosargus sarba*.

2.6.2. *Acanthopagrus schlegelii schlegelii* (Blackhead sea bream)

La pesca di specie del genere *Acanthopagrus* è cresciuta passando da 441 mtn nel 1996 a 4.500 mtn nel 2000 (FAO-FishStatPlus 2008). Circa il 72% del pescato (3.311 mtn) è rappresentato dall'*Acanthopagrus bifasciatus*, seguito dall'*Acanthopagrus schlegelii schlegelii* (14 %), *Acanthopagrus latus* (13%), *Acanthopagrus berda* (1%).

Per quanto riguarda l'acquacoltura i dati FAO sono relativi a Giappone, Corea, Taiwan. Nel 2006 la quantità prodotta era di 3.221 mtn e la Corea è diventata il principale produttore nel 2006 (FAO-FishStatPlus 2008). In Taiwan l'*Acanthopagrus schlegelii schlegelii* è allevato in laghi con acqua salmastra. Nelle regioni settentrionali e meridionali della Cina, invece è allevato in gabbie in mare aperto o lungo la costa (Hong and Zang 2003; Chen *et al.* 2008).

2.6.3. *Sparidentex hasta* (Sobaity sea bream)

Sparidentex hasta è l'unica specie del genere *Sparidentex*. I dati relativi alla pesca di questa specie sono stati riportati a partire dal 2000 nel golfo persico. La quantità pescata è poca, si aggira intorno a 83 mtn (FAO-FishStatPlus 2008). Nel 2006 circa 191 mtn sono state ottenute dall'acquacoltura e i principali produttori sono gli Emirati Arabi Uniti.

2.6.4. *Rhabdosargus sarba* (Goldlined sea bream)

Rhabdosargus sarba è una delle cinque specie che appartengono al genere *Rhabdosargus*.

La quantità di specie pescate appartenenti al genere *Rhabdosargus* è cresciuta passando da 237 mtn nel 1996 a 1.523 mtn nel 2006 (FAO-FishStatPlus 2008). Non ci sono delle

statistiche per la specie *Rhabdosargus sarba*, ma solo per le specie *R. haffara* (1.414 mtn nel 2006) e *R. globiceps* (1009 mtn nel 2006). Ci sono, tuttavia, dei dati sulla pesca relativi ad alcuni paesi come l'India (FishBase 2008), Kuwait (Samuel & Bawazeer 1985), Australia (NSW-DPI 2007), e Sud Africa (Van Der Elst & Adkin 1991).

Per quanto riguarda l'acquacoltura, le prime statistiche sulla produzione risalgono al 1971 (FAO-FishStatPlus 2008). Il massimo della produzione si è verificato tra gli anni '80-'90. Una piccola produzione era presente in Arabia Saudita tra il 1990 e il 1997, e negli Emirati Arabi Uniti tra il 1999 e il 2003 (FAO-FishStatPlus 2008).

CAPITOLO 3

FRODI E TRACCIABILITA' NEL COMPARTO ITTICO

3.1. FRODI NEL COMPARTO ITTICO

In senso generico, con il termine “frode alimentare” si indica la produzione, detenzione, commercio, vendita o somministrazione di alimenti non conformi alle leggi vigenti.

Le frodi alimentari possono essere divise in due tipologie:

- **frodi sanitarie**, dette anche frodi tossiche, in quanto costituiscono una minaccia per la salute del consumatore;
- **frodi commerciali**, perché danneggiano gli interessi economici del consumatore senza arrecare necessariamente un danno alla sua salute.

Inoltre, in base agli effetti esercitati sulla composizione e/o sugli aspetti esteriori dell'alimento, distinguiamo: frodi sulla qualità intrinseca del prodotto e frodi riguardanti la commercializzazione degli alimenti.

Frodi sulla qualità intrinseca del prodotto:

- **Alterazioni:** sono modifiche della composizione e dei caratteri organolettici degli alimenti causate da fenomeni degenerativi per cattiva o prolungata conservazione.
- **Adulterazioni:** Sono modifiche della naturale composizione di un prodotto alimentare, dovute ad aggiunta o sottrazione volontaria e non dichiarata di alcuni componenti, allo scopo di ottenere un tornaconto economico. In alcuni casi è una frode con riflessi negativi sia di tipo commerciale che nutrizionale; in altri casi l'adulterazione può esporre il consumatore a rischi per la salute per l'innescarsi di reazioni allergiche.
- **Sofisticazioni:** sono modifiche volontarie della naturale composizione di un prodotto alimentare mediante l'aggiunta di sostanze estranee, o la sostituzione di uno o più elementi propri dell'alimento con sostanze di qualità e valore inferiore, o mediante l'aggiunta di sostanze chimiche non consentite dalle leggi, al fine di migliorarne l'aspetto o per coprirne i difetti.

Frodi riguardanti la commercializzazione degli alimenti:

- **Falsificazioni:** sono operazioni fraudolente che consistono nella sostituzione di un alimento per un altro.

-Contraffazioni: Sono azioni fraudolente finalizzate a far apparire un alimento diverso da come è nella sua costituzione o a creare un prodotto ex novo apparentemente simile a quello reale. Questa pratica può essere ricondotta all'adulterazione o alla sofisticazione.

Esempi: vendita di prodotti nazionali o esteri che inducono in errore il consumatore sull'origine o provenienza, sulla qualità; vendita di un prodotto scongelato per fresco; usare impropriamente nomi e marchi di prodotti alimentari molto noti. In questi casi l'inganno può essere esplicito, quando l'etichetta dichiara il falso, o implicito, quando il tipo di confezione, la forma, il marchio, pur in assenza di una dichiarazione di falso, possono confondere il consumatore. Vengono, in tal caso, sfruttati i vantaggi commerciali che un marchio noto può dare. Oltre al danno economico per le aziende che fabbricano il prodotto originale e per il consumatore che acquista un prodotto con un controvalore inferiore al prezzo pagato, in qualche caso può configurarsi il reato di frode sanitaria, in quanto i prodotti, frutto di falsificazioni, spesso sono fabbricati senza il rispetto delle norme igienico sanitarie (Colavita et al. 2012).

3.1.1. Fattori che hanno determinato l'aumento delle frodi nel comparto ittico

La crescente richiesta di prodotti della pesca e la globalizzazione del commercio hanno portato ad un aumento del numero di specie commercializzate e allo sviluppo e commercializzazione di nuovi prodotti che hanno influenzato le scelte dei consumatori che non si limitano più a consumare i prodotti locali. Ciò ha aumentato il rischio di frodi commerciali, in cui una specie è illegalmente sostituita con un'altra (Civera, 2003; Martinez *et al.*, 2005), e di frodi sanitarie, quando un prodotto potenzialmente tossico viene immesso sul mercato.

Lo sviluppo di nuove tecniche di conservazione e di trasporto ha potenziato il commercio mondiale di pesce, rendendo più facile l'importazione dall'estero (Mansfield, 2003; Hajipieris, 2009). Di conseguenza, la commercializzazione di nuovi prodotti provenienti da tutte le parti del mondo, rende difficile verificare il sistema di tracciabilità lungo tutta la filiera. L'importazione di prodotti da paesi molto lontani comporta la presenza di più intermediari nella catena produttiva, rendendo così più difficile effettuare i controlli sulla qualità dei prodotti e sulla tracciabilità. Anche se un primo livello di tracciabilità potrebbe essere facilmente raggiunto in un anello della catena, la possibilità di tracciare un prodotto lungo tutta la catena produttiva è molto più complicato, perché passa attraverso 5-7 intermediari (Moe T., 1998; Lovejoy H., 2007).

In questo modo le informazioni sul prodotto potrebbero essere talvolta perse, e nel momento che arriva al consumatore finale, il suo nome potrebbe essere completamente cambiato (Jacquet e Pauly, 2007).

I consumatori preferiscono acquistare soprattutto prodotti trasformati, puliti, *ready-to-cook*, piuttosto che il pesce non lavorato, che rappresenta solo una piccola frazione del pesce importato (Rasmussen, 2009). Il pesce lavorato (decapitato, spellato, sfilettato) non è facilmente identificabile: i filetti di pesce sono quelli più difficili da identificare (Garcia *et al.*, 2011; Stiles *et al.*, 2011) e in molti Paesi una gran parte di prodotti vengono commercializzati sotto la denominazione di “filetti di pesce.” (NET, 2004).

Dato l’elevato numero di specie commercializzate non è facile riconoscerle tutte e conoscere la loro denominazione corretta. Su FishBase, un database che supporta il lavoro di professionisti operanti nel settore ittico, sono riportate attualmente 32.700 specie di pesce. Nel 2003 Rehbein ha stimato che più di 20.000 specie di pesce potrebbero essere usate per il consumo umano, e di queste soltanto 500 in Europa.

Il FIPS (FAO Statistics and Information Service), basato sul sistema di informazione sulla pesca e sulle scienze acquatiche (ASFIS, Aquatic Sciences and Fisheries Informating System), può essere utilizzato per stimare il numero di prodotti ittici commercializzati a livello globale. Nel 2011 è stata fatta una lista con 11.562 specie, ma molti nomi non corrispondono a quelli utilizzati comunemente dai consumatori (FAO, 2012). Le denominazioni FAO non sono finalizzate a sostituire le denominazioni locali, ma sono necessarie per superare le difficoltà in questo campo, dove un singolo nome può essere utilizzato per più specie, o più nomi per una singola specie. Inoltre possono essere utilizzate diverse denominazioni locali nelle varie regioni.

In questo scenario, la possibilità di sostituire delle specie di un certo valore con specie di valore inferiore rende il *mislabeled* una pratica conveniente. Nel 1997, l’NSIL (National Seafood Inspection Laboratory) ha emanato un comunicato che indicava che il 37% del pesce e il 13% di altri prodotti era etichettato in maniera non corretta (Tennyson *et al.*, 1997). In una recente rivista è stata riportata la presenza di etichette false in più di un terzo del pesce (Jacquet e Pauly, 2008), mentre altri studi hanno dimostrato che più di un quarto del pesce analizzato negli USA e in Canada era etichettato in maniera scorretta (Wong e Hanner, 2008). Recentemente, alcuni autori hanno riportato che una certa quantità di specie di scarso valore è stata venduta sotto il nome di Red Snapper (*Lutjanus campechanus*), una delle specie infatti più sostituite al mondo (Stiles *et al.*, 2011; Cawtorn *et al.*, 2012). Uno studio condotto in Irlanda ha

rivelato che una grande quantità di pesce venduto come merluzzo era in realtà costituito da altre specie di pesci (Miller *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2011). Il Nototenide della Patagonia (*Dissosticus eleginoides*) è stato commercializzato come branzino cileno (Marko *et al.*, 2004). In Sud Africa lo squalo mako è stato commercializzato con il nome “*ocean fillets*”, proprio per attrarre di più il consumatore (Atkins, 2010). Tra i prodotti della pesca, i molluschi bivalvi sono spesso soggetti a frodi, e alcune specie sono fraudolentemente vendute con il nome di vongola verace (Mafra, 2008). Paradossalmente il merluzzo del sud del Pacifico, pesce di mare pelagico, è stato venduto come tilapia, pesce allevato d’acqua dolce (Martinez-Ortiz, J., 2005). Alcune specie etichettate come “pesce spada” e “*White steenbras*” (*Lithognatus lithognatus*) sono state sostituite con il Ruvetto, *Ruvettus pretiosus* (oil fish), una specie tossica, la cui commercializzazione è stata già regolamentata in Europa e in alcuni Paesi asiatici (Ling *et al.*, 2009).

Dal momento che l’etichettatura non è in grado da sola di garantire la veridicità circa la composizione di un prodotto, è necessario identificare e autenticare i componenti di un alimento trasformato, tutelando così sia i consumatori che i produttori da eventuali frodi. Un ulteriore problema che favorisce le frodi è che alcune norme sull’etichettatura sono applicate soltanto ai grossisti e non ai ristoranti e i principali responsabili delle frodi, sono nella maggior parte dei casi i distributori e i rivenditori finali (ristoranti, pescherie), i quali in questo modo aumentano il loro profitto.

3.1.2. *Principali problematiche connesse alle frodi*

Le frodi hanno degli effetti negativi sia dal punto di vista economico, in quanto alcune specie di minor valore possono essere vendute come specie pregiate, sia per la salute a causa della sostituzione di specie potenzialmente tossiche, velenose o che possono contenere contaminanti.

Le sostituzioni illecite possono determinare, infatti, la commercializzazione di specie pericolose come il pesce palla, la cui vendita è vietata in Europa (Reg. CE 854/2004). Il *mislabeleding* dei prodotti della pesca non soltanto provoca danni economici e sulla salute del consumatore ma minaccia anche la pesca (Jacquet e Pauly, 2007) a causa del fatto che alcune specie protette o soggette a regolamentazione della pesca potrebbero essere immesse sul mercato, riducendo l’efficacia di programmi di tutela e gestione delle specie e delle aree marine protette. Infatti, molte specie, che prima erano scartate, come l’halibut e il tonno rosso atlantico, oggi sono ampiamente pescate e commercializzate,

provocando così una drastica riduzione delle riserve di pesce con effetti negativi anche sull'ecosistema marino e sulla biodiversità. (Cushing, 1988; Pauly, 2003).

Emanando il **Reg. (CE) 1005/2008** (istituzione di un regime comunitario per prevenire, scoraggiare ed eliminare la pesca illegale, non dichiarata e non regolamentata) e il **Reg. (CE) 1010/2009** (recante le modalità di applicazione del Reg. CE 1005/2008), l'Unione Europea si è unita al piano internazionale della FAO per prevenire, scoraggiare ed eliminare la pesca illegale, non dichiarata e non regolamentata (FAO 2011). Infine, considerando che è importante assistere i consumatori che hanno delle intolleranze alimentari o allergie, fornendo loro delle informazioni più chiare sulla composizione degli alimenti, la normativa comunitaria ha reso obbligatorio includere tutti gli allergeni, come crostacei, molluschi e loro derivati, nella lista degli ingredienti (**Direttiva 2003/89 CE** del Parlamento europeo e del Consiglio del 10 novembre del 2003 che modifica la Direttiva 2000/13 CE relativamente all'indicazione degli ingredienti contenuti nei prodotti alimentari; **Direttiva 2006/142 CE** della Commissione del 22 dicembre 2006 che modifica l'allegato III bis della Direttiva 2000/13 CE del Parlamento europeo e del Consiglio, concernente l'elenco degli ingredienti che devono essere citati in ogni caso sull'etichettatura dei prodotti alimentari).

3.2. FRODI NELL'AMBITO DELLA FAMIGLIA SPARIDAE

La famiglia degli sparidi annovera numerosi generi e contiene numerose specie pregiate dal punto di vista commerciale per la qualità delle loro carni, ma anche specie di valore inferiore che possono essere facilmente confuse. Tale confusione è data dal fatto che, all'interno dei vari generi, le specie sono molto simili tra loro o addirittura simili a specie di famiglie diverse. Per questo motivo nell'ambito della famiglia Sparidae si possono verificare differenti scenari di sostituzione: la prima riguardante le specie appartenenti allo stesso genere; la seconda relativa a specie simili ma appartenenti a generi diversi; la terza è legata invece alla possibilità di confondere specie molto simili ma appartenenti addirittura a famiglie diverse. Le frodi per sostituzione di specie simili tra loro sono molto frequenti poiché la richiesta sul mercato europeo di specie pregiate è così alta che ci si rivolge a specie importate dai Paesi extracomunitari, dagli oceani Atlantico e Indopacifico per sopperire alle necessità interne. Fortunatamente, la marcata eterodontia che caratterizza i differenti generi della famiglia degli sparidi può essere sfruttata per l'identificazione di quelle specie che possono essere facilmente confuse o

volutamente sostituite infatti, le differenze dentarie sono oggettive e di facile riscontro. In generale, è più facile smascherare le frodi di sostituzione fra specie di genere diverso rispetto a quelle che implicano l'utilizzo di specie appartenenti allo stesso genere. Ancora più facile risulta identificare le frodi di sostituzione di specie appartenenti a famiglie diverse.

Se per i dentici, in modo particolare il dentice occhione e il dentice atlantico, la mormora, ben diversa dai pagelli, l'occhiata, l'orata, i pagri, in modo particolare il *Pagrus auriga*, i saraghi, in modo particolare il sarago pizzuto (*Diplodus puntazzo*) e il sarago sparaglione (*Diplodus annularis*), e la tanuta (*Spondylisoma cantharus*), l'evidenziazione della frode è abbastanza facile attraverso l'esame macroscopico della tavola dentaria, per riconoscere con sicurezza le altre specie della famiglia Sparidae (Boga, Salpa e Pagelli) è necessario l'utilizzo del microscopio poiché le differenze nella loro dentatura sono impercettibili a occhio nudo

3.2.1. Sostituzione fra specie appartenenti allo stesso genere

- **DENTICI:** è possibile differenziare il *Dentex dentex* (Dentice) dagli altri dentici poiché nel DENTICE i denti caniniformi sono piuttosto lineari e abbastanza sottili rispetto ai DENTICI ATLANTICI dove sono molto più robusti e di diametro più grosso (es. il *D. barnardi* e il *D. canariensis*). Il DENTICE OCCHIONE (*Dentex macrophthalmus*) è caratterizzato da caniniformi sottili, sporgenti e leggermente arcuati, mentre i denti del DENTICE GIBBOSO (*Dentex gibbosus*) (e anche dell' INDIANO) sono più sottili anche se sono meno sottili di quelli del *Dentex dentex*.

- **PAGRI:** anche se le specie più importanti e frequenti sul mercato italiano vengono tutte denominate con il termine di PAGRO, può tornare utile, per il suo pregio, sapere riconoscere con sicurezza il *Pagrus auriga*. Infatti in questa specie i denti conici (detti anche premolari) sono presenti sempre in numero inferiore (1-2 per emiarcata) rispetto agli altri pagri. Inoltre la punta di tutti i denti canini e conici è di colore grigio scuro, mentre negli altri è sempre chiara.

- **PAGELLI:** differenziare il PAGELLO FRAGOLINO (*Pagellus erythrinus*) dal PAGELLO ATLANTICO (*Pagellus bellottii*) è possibile perché il *Pagellus erythrinus* presenta i denti conici superiori particolarmente sviluppati e quelli inferiori sono disposti quasi a V. Attraverso una visione dorsale del profilo mandibolare, si nota che la mandibola è bilobata e su ogni lato simmetricamente sporge lateralmente un canino. Nel *Pagellus bellottii* i canini, sempre equidistanti tra loro, sono più esili quasi

trasparenti e attraverso un'osservazione al microscopio, si può evidenziare la loro tipica forma ad uncino (soprattutto gli inferiori).

- **SARAGHI:** Si riesce agevolmente a distinguere il *Diplodus annularis* (sarago sparaglione) dal *Diplodus vulgaris* (sarago) in quanto il primo possiede denti incisiviformi piuttosto corti e tozzi mentre nell'altro sono più sottili e allungati. Il *Diplodus sargus* si differenzia dagli altri saraghi per la presenza di incisiviformi molto più robusti.

3.2.2. Sostituzione fra specie appartenenti a generi diversi

Un'altra possibilità di frode si può verificare con la vendita di specie appartenenti a generi diversi. Per esempio:

- PAGRI venduti per DENTICI ATLANTICI in quanto entrambi di colore rosso-rosato.
- PAGRI venduti per PAGELLI, addirittura per PAGELLO FRAGOLINO.
- SARAGO (*Diplodus sargus*) venduto per ORATA.
- SALPA venduta per ORATA.
- TANUTA venduta per SARAGO.

I Generi monospecifici come *Sparus* (Orata, *Sparus aurata*), *Oblada* (Occhiata, *Oblada melanura*), *Sarpa* (Salpa, *Sarpa salpa*), *Spondyliosoma* (Tanuta, *Spondyliosoma cantharus*), per la loro differente conformazione dentaria, non pongono dubbi alla loro precisa identificazione.

3.2.3. Sostituzione fra specie appartenenti a famiglie diverse.

Per quanto riguarda la sostituzione tra specie appartenenti a famiglie diverse, dentici rossi, pagelli o pagri, essendo di colore rosso rosato, si prestano ad essere sostituiti fraudolentemente con alcune specie di Lutianidi. La sostituzione si può verificare anche tra Sparidi di colore grigio argenteo (dentici e pagri) e Letrinidi. Anche in questo caso è indispensabile l'analisi della tavola dentaria, poiché le famiglie *Sparidae*, *Luthianidae* e *Lethrinidae* hanno in comune i seguenti caratteri: pinne ventrali in posizione toracica, un'unica pinna dorsale lungo tutto il margine dorsale, forma ovoidale del corpo, pinna caudale bilobata.

3.3. NORMATIVA COMUNITARIA SULLA SICUREZZA ALIMENTARE

Le emergenze alimentari verificatesi in Europa negli scorsi anni hanno messo in evidenza una serie di lacune nella legislazione comunitaria in materia alimentare, una inefficace strategia nel fronteggiare trattamenti illegali di animali, alimenti e mangimi e la carenza di strumenti e di organi di controllo.

Ciò ha portato, negli anni, ad una rivisitazione dell'intero quadro normativo alimentare, in modo tale da garantire ai consumatori dei prodotti sicuri lungo l'intero percorso della filiera: "dal campo alla tavola".

Le esigenze di riforma nel campo alimentare hanno portato la Commissione europea a stilare nel gennaio del 2000 il "*Libro bianco sulla sicurezza alimentare*" con lo scopo di dare priorità alla sicurezza alimentare e salvaguardare la salute dei cittadini, di rivedere, aggiornare e unificare la normativa del settore, e di istituire un'Autorità alimentare europea. L'obiettivo principale è stato quello di fissare dei principi comuni alle legislazioni alimentari europee per perseguire un livello elevato di tutela della salute, assicurando una base normativa a carattere orizzontale ed eliminando le divergenze tra gli Stati. In particolare è stata sollevata l'esigenza di istituire un organismo indipendente che fornisse garanzie sulla non nocività degli alimenti immessi in commercio, che informasse i consumatori sulla gestione sanitaria del rischio e fosse in grado di garantire la costituzione di un sistema ufficiale di controllo in ogni Stato.

Gli obiettivi previsti dal "*libro bianco sulla sicurezza alimentare*" sono stati concretizzati con l'emanazione del Regolamento (CE) 178/2002.

3.3.1. Regolamento (CE) 178/2002

Il **Regolamento (CE) n°178/2002** del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002 (c.d. *General Food Law*) riprende e fissa come norma quanto era nelle intenzioni del Libro bianco:

- stabilisce i principi e i requisiti generali all'interno della legislazione alimentare (requisiti di sicurezza degli alimenti e dei mangimi; rintracciabilità degli alimenti, dei mangimi e degli animali; commercio di alimenti e di mangimi da e per la Comunità; trasparenza nei confronti dei cittadini);
- istituisce l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (con compiti di consulenza scientifica, assistenza tecnica, raccolta dati e divulgazione delle informazioni ai cittadini);
- fissa inoltre le procedure nel campo della sicurezza alimentare.

3.3.2. Pacchetto igiene

Successivamente al Reg. CE n. 178/2002 sono stati emanati una serie di Regolamenti, denominati “**Pacchetto Igiene**,” entrati in vigore il primo gennaio del 2006 e contenenti le norme relative a i requisiti igienico sanitari e al sistema dei controlli ufficiali degli alimenti e dei mangimi. Il pacchetto igiene si applica alla produzione vegetale (primaria e trasformazione), animale (primaria e trasformazione) e a quello dei mangimi. È composto da:

Regolamento (CE) 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 sull’igiene dei prodotti alimentari; non si applica alla produzione primaria per uso domestico e privato, né alla preparazione e conservazione di alimenti per uso domestico e privato.

Il Regolamento stabilisce quanto segue:

- Requisiti generali e specifici in materia di igiene, validi anche per la produzione primaria;
- Analisi dei pericoli e dei punti critici di controllo e conferma del sistema HACCP come strumento di analisi e controllo delle condizioni di igiene e sicurezza delle produzioni alimentari;
- Rimangono in vigore i manuali di buona prassi elaborati ai sensi della Direttiva 93/43/CEE;
- Viene promossa l’elaborazione e la divulgazione di manuali di buona prassi comunitari e nazionali, la cui applicazione rimane comunque volontaria.

Regolamento (CE) 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile del 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene degli alimenti di origine animale: carni (ungulati domestici, pollame e lagomorfi, selvaggina di allevamento e selvatica, prodotti a base di carne), molluschi bivalvi vivi, prodotti della pesca, latte e prodotti a base di latte, ovo prodotti, cosce di rana e lumache, grassi animali trasformati, gelatine, collagene. Non si applica alla produzione primaria per uso domestico.

Il Regolamento stabilisce quanto segue:

- Gli stabilimenti adibiti alle lavorazioni di prodotti animali devono essere riconosciuti dalle autorità nazionali competenti. Tale obbligo non si applica agli stabilimenti che esercitano unicamente attività di produzione primaria, trasporto, magazzinaggio di prodotti che non vanno stoccati a temperatura controllata;
- I prodotti di origine animale devono essere contrassegnati, nei casi previsti, da un apposito bollo sanitario apposto ai sensi del Regolamento (CE) 854/2004;

- Devono essere redatti elenchi di Paesi Terzi dai quali sono consentite le importazioni di prodotti animali . Il Regolamento stabilisce i requisiti di base per l'ammissione di un determinato paese terzo nel suddetto elenco; sono previste delle disposizioni specifiche per l'importazione dei prodotti della pesca; i gestori dei macelli devono ottenere delle informazioni che consentono la rintracciabilità per le carni di tutte le specie da loro trattate, eccetto la selvaggina selvatica;
- Vengono definite le operazioni di lavorazione, stoccaggio, trasporto dei diversi tipi di prodotti di origine animale, precisando anche le temperature a cui tali operazioni devono essere effettuate.

Regolamento (CE) 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile del 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano.

Il Regolamento stabilisce quanto segue:

- Requisiti per il riconoscimento degli stabilimenti da parte delle autorità competenti;
- Obbligo per gli operatori del settore alimentare di fornire all'autorità tutta l'assistenza richiesta nell'esecuzione del controllo;
- I controlli sono basati sui principi dell' HACCP;
- Compiti e responsabilità del veterinario ufficiale nel controllo delle carni fresche;
- Modalità e frequenza dei controlli da parte delle Autorità competenti riguardo ai seguenti alimenti di origine animale: molluschi bivalvi vivi, prodotti della pesca, latte e prodotti da esso derivati;
- Sanzioni in caso di mancato rispetto degli obblighi fissati dal Regolamento stesso;
- Completamento delle regole per l'importazione di prodotti di origine animale dai Paesi Terzi stabilite dal Regolamento CE 853/2004.

Regolamento (CE) 882/2004 del Parlamento europeo e del consiglio del 29 aprile del 2004 relativo ai controlli ufficiali destinato a verificare la conformità della normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. Non si applica ai controlli ufficiali volti a verificare la conformità alle regole sull'organizzazione comune del mercato dei prodotti agricoli. Gli obiettivi sono quelli di prevenire o di ridurre ad un livello accettabile i rischi derivati dall'ambiente per la

salute umana ed animale, nonché garantire la trasparenza nel mercato degli alimenti e dei mangimi e la tutela degli interessi dei consumatori.

Il Regolamento stabilisce in particolare quanto segue:

- Obblighi per i Paesi comunitari e scopi dei controlli ufficiali in materia di mangimi e alimenti;
- Criteri operativi per le autorità competenti designate dai Paesi membri dell'UE per tali controlli ;
- Accessibilità alle informazioni di pubblico interesse;
- Tutela delle informazioni soggette a segreto professionale;
- Requisiti dei metodi di campionamento e analisi;
- Elaborazione di misure attuate nel caso in cui i controlli rivelino rischi per la salute dell'uomo o degli animali;
- Completamento delle disposizioni della direttiva 97/78/CEE in materia di controlli sui prodotti animali provenienti dai Paesi terzi con riferimento ai mangimi ed ai prodotti di origine non animale importati dai Paesi non facenti parte dell'UE;
- Istituzione di Laboratori comunitari a cui i Laboratori nazionali possono fare riferimento nella loro attività;
- Misure amministrative in materia di: elaborazione di Piani nazionali di controllo, formazione del personale addetto ai controlli, controlli da effettuarsi nei Paesi comunitari ed extracomunitari, sanzioni a livello comunitario.

3.4. TRACCIABILITA' E RINTRACCIABILITA'

Come richiesto dal Reg. (CE) 178/2002 la tracciabilità degli alimenti è un elemento fondamentale per garantire la sicurezza degli alimenti, considerando tutti gli aspetti della catena di produzione come un unico processo, partendo dalla produzione primaria, dalla produzione di mangimi fino alla vendita al consumatore. Con questo Regolamento la Commissione europea ha voluto stabilire come necessario un sistema generale di tracciabilità per il settore, allo scopo di garantire la necessaria sicurezza per tutti gli animali, i prodotti e gli alimenti lungo tutte le fasi delle relative filiere, di ovviare ad eventuali emergenze e criticità e di fornire informazioni ai cittadini e agli operatori.

L'articolo 18 del Regolamento (CE) 178/2002 rende obbligatoria la rintracciabilità degli alimenti e dei mangimi, intesa come: *“la possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento, di un mangime, di un animale destinato alla produzione alimentare o di*

una sostanza destinata o atta ad entrare a far parte di un alimento o di un mangime attraverso tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione”.

La rintracciabilità così intesa è finalizzata a consentire agli operatori e alle autorità di controllo, di attivare e gestire i sistemi di allarme qualora sorgano eventuali problemi di sicurezza alimentare.

Per quanto riguarda i sistemi e le procedure messe in atto dalle aziende ai fini della rintracciabilità, gli organi di controllo dovranno verificare che siano soddisfatte le esigenze del regolamento rispetto al raggiungimento dell'obiettivo, senza entrare nel merito di scelte aziendali, in quanto la responsabilità primaria spetta all'operatore.

3.4.1 Obblighi del produttore

Secondo quanto previsto dall' art. 19 Reg.(CE) 178/2002, in caso di prodotto non conforme ai requisiti di sicurezza stabiliti dall'art. 14, i produttori devono :

- Identificare il prodotto;
- Identificare l'ambito di commercializzazione;
- Provvedere all'immediato ritiro;
- Informare l'AUSL;
- Informare l'anello a monte;
- Attuare altre misure atte a tutelare la salute pubblica;
- Informare il consumatore;

3.4.2. Obblighi degli operatori della vendita al dettaglio o della distribuzione

Gli operatori della vendita al dettaglio o della distribuzione (art. 19 Reg. (CE) 178/2002) devono:

- Ritirare dal mercato i prodotti di cui hanno ricevuto informazione di non conformità;
- Ritirare dal mercato, informando il fornitore, i prodotti che loro stessi, o a seguito di segnalazioni dei consumatori hanno motivo di ritenere non conformi;
- Collaborare con gli OSA a monte e con l' AUSL ai fini della rintracciabilità;
- Collaborare alle campagne di informazione e richiamo dei prodotti non conformi.

3.4.3. *Tracciare e rintracciare*

Parlando di tracciabilità, è importante capire la distinzione tra i termini “tracciare” e “rintracciare”:

Tracciare (“Tracking”) è la capacità di seguire il percorso di un’unità e/o di un lotto specifico di prodotti a valle attraverso la filiera.

Rintracciare (“Tracing”) è la capacità di identificare la provenienza di una specifica unità localizzata all’interno della filiera. Al flusso fisico delle merci viene associato sistematicamente un flusso di informazioni conservate a monte della filiera.

La **tracciabilità** è il processo che segue il prodotto da monte a valle della filiera e fa in modo che, ad ogni stadio attraverso cui passa vengono lasciate opportune tracce (informazioni). Il compito principale è quello di stabilire quali elementi e quali informazioni devono essere tracciate.

La **rintracciabilità** è il processo inverso, che deve essere in grado di raccogliere le informazioni precedentemente rilasciate. Si tratta principalmente di evidenziare lo strumento tecnico più idoneo a rintracciare queste “tracce.” È la possibilità di rintracciare lungo tutto il processo produttivo tutte le componenti che hanno influito sul prodotto.

3.5. ETICHETTATURA E TRACCIABILITA’ DEI PRODOTTI ITTICI

La sicurezza alimentare ha assunto un ruolo prioritario nella filiera ittica. Un sistema efficace di tracciabilità deve consentire di identificare con precisione eventuali problemi di sicurezza alimentare relativi a una data origine geografica, a un impianto di macellazione o di lavorazione, a un peschereccio e persino a un singolo pesce, e non limitarsi a identificare un gruppo generico di prodotti di consumo.

L’Unione europea ha riconosciuto l’assoluta necessità di riconquistare la fiducia dei consumatori nei prodotti ittici commercializzati e ritiene pertanto che una veloce tracciabilità del prodotto nella filiera sia ormai una priorità.

La crescente attenzione verso gli aspetti igienico-sanitari dei prodotti alimentari insieme all’esigenza di salvaguardare le produzioni ittiche comunitarie, attraverso la qualificazione e la valorizzazione dei prodotti della pesca e dell’acquacoltura ha reso opportuna l’introduzione, da parte dell’UE, di un sistema normativo per l’etichettatura del pesce.

Così, il 1° gennaio 2002 sono entrate in vigore le nuove norme, contenute nell’art.4 del **Regolamento (CE) n°104/2000** del 17 dicembre 1999, in materia di informazione per il

consumatore, di rintracciabilità di filiera e di origine dei prodotti ittici: in tutti i paesi comunitari i prodotti ittici freschi o refrigerati, congelati, secchi, salati o in salamoia destinati al consumatore finale potevano essere commercializzati solo se recavano un'indicazione o un'etichetta che conteneva la denominazione commerciale della specie, il metodo di produzione e la zona di cattura.

Il **Regolamento (CE) n°2065/2001** del 22 ottobre 2001 contiene le modalità di applicazione dell'art. 4 del Regolamento (CE) n°104/2000. Il provvedimento, direttamente efficace in tutti gli Stati Membri, descriveva le informazioni obbligatorie che dovevano accompagnare la specie ittica e quelle che potevano essere indicate facoltativamente, in quale stadio c'era l'obbligo dell'etichettatura, i prodotti ai quali non si applicava l'etichettatura, gli obblighi per gli operatori e per gli Stati Membri. Alle Amministrazioni nazionali è stato demandato il compito di definire l'elenco delle denominazioni commerciali delle specie, i piccoli quantitativi di prodotti per i quali non vige l'obbligo dell'etichettatura, i necessari sistemi di controllo e le eventuali sanzioni per i trasgressori.

Per quanto riguarda le denominazioni commerciali in Italia i riferimenti normativi specifici sono rappresentati dagli elenchi ufficiali pubblicati con i decreti MIPAF che, nel corso degli anni, hanno modificato quello del 27 marzo 2002 riportante l'elenco delle denominazioni in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale, suddivise in pesci, molluschi bivalvi, molluschi cefalopodi, molluschi gasteropodi, tunicati ed echinodermi (Decreto MIPAF 27 marzo 2002).

Tra questi :

- **Decreto MIPAF 14 gennaio 2005** *“Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale ai sensi del Regolamento (CE) n. 2065/2001 della commissione del 22 ottobre del 2001”*;
- **Decreto MIPAF 25 luglio 2005** *“Modifiche ed integrazioni all'elenco delle denominazioni commerciali dei prodotti ittici, allegati al decreto ministeriale del 14 gennaio 2005”*;
- **Decreto MIPAF 31 gennaio 2008** *“Denominazione in lingua italiana delle specie di interesse commerciale. Modifiche ed integrazioni dell'elenco di cui al decreto del 25 luglio del 2005”*;

- **Decreto MIPAF 5 marzo 2010** “*Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale. Modifiche e integrazioni dell’elenco allegato al decreto del 27 marzo 2002 e successive modifiche e integrazioni*”;
- **Decreto MIPAF 23 dicembre 2010** “*Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale. Modifiche e integrazioni del DM del 31 gennaio 2008 successivamente modificato e integrato dal DM del 5 marzo del 2010*”;
- **Decreto MIPAF 12 agosto 2011** “*Attribuzione della denominazione in lingua italiana di alcune specie ittiche, che integra e modifica l’elenco allegato al DM del 31 gennaio 2008 e al DM del 23 dicembre 2010*”.
- **Decreto MIPAF 19 novembre 2012** “*Integrazione elenco decreto ministeriale del 31 gennaio 2008*”

Il decreto del 27 marzo 2002 ha subito negli anni sette integrazioni riguardanti essenzialmente l’elenco delle denominazioni commerciali in lingua italiana delle specie ittiche. Il fenomeno è in parte spiegabile dall’introduzione ogni anno di nuove specie.

La disciplina sull’etichettatura si applica a:

- pesci,
- molluschi e crostacei vivi, freschi, refrigerati, congelati, secchi, salati o in salamoia, sia provenienti dall’attività di pesca sia dall’acquicoltura, commercializzati sul territorio comunitario a prescindere dalla loro origine (anche quando importati da Paesi Terzi).

L’Allegato I (**Regolamento (CE) n. 104/2000**) riporta, in maniera dettagliata, i prodotti ittici ai quali si applica la normativa. Rientrano nel campo di applicazione anche:

- prodotti preimballati;
- prodotti decapitati, tagliati a pezzi, o in filetti, oppure triturati.

Sono esclusi, invece, i prodotti cotti, i preparati o conservati con procedimenti diversi da quelli contenuti nell’Allegato I: ad esempio, le conserve di pesci (tonno, sardine all’olio, ecc), di crostacei e di molluschi, gli impanati e altre preparazioni.

ALLEGATO I (elenco dei prodotti ittici ai quali si applica l’etichettatura di cui al **Regolamento (CE) n. 104/2000**) :

- Pesci vivi;
- Pesci freschi o refrigerati (esclusi i filetti di pesce o altra carne di pesce);
- Pesci congelati (esclusi i filetti e altre carni di pesce);

- Filetti di pesce e altra carne di pesce (anche tritata), freschi, refrigerati o congelati;
- Pesci secchi, salati o in salamoia: pesci affumicati, anche cotti prima o durante l'affumicatura; farine, polveri e agglomerati in forma di pellets di pesci, atti all'alimentazione umana;
- Crostacei, anche sgusciati, vivi, freschi, refrigerati, congelati, secchi, salati o in salamoia; crostacei non sgusciati, cotti in acqua o al vapore, anche refrigerati, congelati, secchi, salati o in salamoia; farine, polveri e agglomerati in forme di pellet di crostacei, atti all'alimentazione umana;
- Molluschi, anche separati dalla loro conchiglia, vivi, freschi, refrigerati, congelati, secchi, salati o in salamoia; invertebrati acquatici diversi dai crostacei e dai molluschi, vivi, freschi, refrigerati, congelati, secchi, salati o in salamoia; farine, polveri e agglomerati in forme di pellet di invertebrati acquatici, diversi dai crostacei, atti all'alimentazione umana.

In merito alle **informazioni obbligatorie** da fornire con l'etichettatura (Reg. (CE) 104/2000), nella vendita al dettaglio, devono essere fornite le seguenti informazioni:

1. **La denominazione commerciale della specie** (contenuta nell'elenco predisposto dallo Stato membro e allegato al D.M. del 27/03/2002);

2. **Il metodo di produzione.** Le diciture che possono essere utilizzate sono:

- pescato in mare;
- pescato in acque dolci;
- allevato.

3. **La zona di cattura o di allevamento.** Tale indicazione implica:

- per i prodotti pescati in mare, l'indicazione di una delle zone di pesca definite dalla FAO (Tabella 3.1.).

Zone di cattura	Definizione della zona
Atlantico nord-occidentale	Zona FAO n. 21
Atlantico nord-orientale	Zona FAO n.27
Mar Baltico	Zona FAO n. 27. III.d
Atlantico centro-occidentale	Zona FAO n. 34
Atlantico sud-occidentale	Zona FAO n. 41
Atlantico sud-orientale	Zona FAO n. 47
Mar Mediterraneo	Zona FAO n.37.1, 37.2,
Mar Nero	Zona FAO n. 37.4
Oceano indiano	Zona FAO 51 e 57
Oceano pacifico	Zona FAO n. 61, 67, 71, 77, 81, 87
Atlantico	Zona FAO N. 48, 58, 88

Tabella 3.1. Zone di pesca FAO (Allegato alla circolare 27 maggio 2002, n. 1329; Reg. CE n. 2066/2001)

- per i prodotti pescati in acque dolci, l'indicazione dello Stato Membro o del Paese terzo di origine del prodotto;

- per i prodotti allevati, l'indicazione dello Stato Membro o del Paese terzo di allevamento in cui si è svolta la fase finale di sviluppo del prodotto, ovvero la fase che intercorre tra lo stadio giovanile e la taglia commerciale. Quando l'allevamento è avvenuto in più Stati Membri o Paesi terzi, lo Stato Membro in cui si effettua la vendita al consumatore finale può, in base a quanto indicato dal **Regolamento (CE) n°2065/2001**, autorizzare al momento della vendita l'indicazione dei diversi Stati Membri o Paesi terzi di allevamento.

Per i prodotti pescati in mare è consentito omettere il metodo di produzione nella vendita al dettaglio, solo se risulta chiaramente dalla denominazione commerciale e dalla zona di cattura che si tratta di una specie pescata in mare (per esempio, le alici, le sardine, ecc.). Per i prodotti di acquacoltura è facoltà del venditore aggiungere alla dizione "allevato", quella di "prodotto di acquacoltura".

In relazione, invece, alla denominazione commerciale, se una specie non figura nell'elenco appositamente predisposto, può essere commercializzata con una denominazione provvisoria, stabilita dall'autorità sanitaria di controllo che provvede poi a darne comunicazione al Ministero delle Politiche e Forestali. Successivamente, spetta al Ministero stabilire la denominazione commerciale definitiva.

Sempre nella vendita al dettaglio, è inoltre consentito indicare una **zona di cattura o di allevamento più dettagliata**. In effetti, e questo vale particolarmente per i paesi comunitari del Mediterraneo, l'indicazione della zona "Mar Mediterraneo" appare alquanto generica, poiché con questa denominazione vengono identificati tutti i pesci, crostacei e molluschi pescati in questo mare. L'elemento positivo è che il regolamento di attuazione dà agli operatori la possibilità di menzionare una zona di cattura più precisa, con riferimento ad esempio al Mar Adriatico o al Mar Tirreno, anche in un'ottica di valorizzazione delle produzioni locali.

In Italia è stato da poco pubblicato il **Decreto MIPAAF 25 luglio 2013** che: *"definisce le modalità applicative di cui all'art. 59, commi 14 e 15 del D.L. 22 giugno 2012 n. 83, ai fini della definizione dell'attestazione di origine anche in relazione all'identificazione delle zone di cattura e/o di allevamento nonché alla conformità alle disposizioni al Reg. (CE) n. 2065/2001. Ai fini del presente decreto si intende per:*

- **Attestazione di origine:** la dicitura prodotto italiano o altra indicazione relativa all'origine italiana o alla zona di cattura più precisa di quella obbligatoriamente

prevista dalle disposizioni vigenti in materia riportata nelle etichette e in qualsiasi altra informazione riportata per iscritto al consumatore finale;

- **Prodotto italiano:** i prodotti provenienti dall'attività di pesca professionale esercitata da pescherecci battenti bandiera italiana nelle GSAs (*Geographical sub areas*) (Tabella 3.2.) di cui all' Allegato I al presente decreto, ovvero provenienti da impianti di acquacoltura in acque dolci, salmastre o marine del territorio nazionale.

GSA	Area
GSA 9	Mar Ligure e Tirreno Settentrionale
GSA 10	Mar Tirreno Meridionale
GSA 11.2	Mar di Sardegna (Orientale)
GSA 17	Mar Adriatico Settentrionale
GSA 18	Mar Adriatico Meridionale (parte)
GSA 16	Mar di Sicilia Meridionale
GSA 19	Mar Ionio Occidentale
GSA 20	Mar Ionio Orientale
GSA 21	Mar Ionio Meridionale

Tabella 3.2. Definizione delle Geographical Subareas in conformità alla Risoluzione FAO/GFCM/33/2009/2.

Il regolamento è applicabile anche ai prodotti importati dai Paesi Terzi, ma non:

- Ai “piccoli quantitativi di prodotti venduti direttamente ai consumatori dai pescatori o dai produttori d’acquacoltura” (**art. 4 del Regolamento (CE) n°104/2000**).
- Ai prodotti a base di pesce non menzionati all’articolo 4 del Regolamento (CE) n° 104/2000, perciò i filetti crudi semplicemente ricoperti di pasta o di pane grattugiato (impanati), i surimi, il tonno e le sardine sott’olio ed altre preparazioni (cottura) e conserve di pesce, di crostacei e di molluschi;
- Ai prodotti immessi sul mercato etichettati prima del 1° gennaio 2002 (per permettere che anche gli imballaggi non conformi alle disposizioni del regolamento potessero essere commercializzati fino ad esaurimento delle scorte).

La normativa contiene alcune prescrizioni per i diversi casi nei quali si può presentare un **miscuglio (art. 6 Reg. (CE) 2065/2001)**:

- se il miscuglio riguarda specie diverse, le informazioni obbligatorie (denominazione commerciale, metodo di produzione e zona di cattura) devono

essere fornite per ciascuna specie presente nel miscuglio; se il miscuglio riguarda specie identiche con un diverso metodo di produzione, occorre indicare il metodo di produzione di ogni frazione presente nel miscuglio;

- se il miscuglio riguarda specie identiche la cui zona di cattura o Paese di allevamento è diverso, va indicata la zona della frazione quantitativamente prevalente nel miscuglio, con l'avvertenza che il prodotto proviene, quando si tratta di un prodotto della pesca, da zone di catture diverse e, quando si tratta di prodotti di allevamento, da Paesi diversi.

Per i **prodotti della pesca trasformati** si deve fare riferimento a quanto previsto dal decreto legislativo n° 109/1992 e successive modifiche: i prodotti della pesca trasformati vedranno nell'indicazione degli ingredienti la denominazione "pesce", se non viene posta in essere alcuna specifica specie ittica come previsto dall'Allegato I della direttiva 2000/13.

Attualmente è entrato in vigore il **Reg. (CE) 1379/2013** dell' 11 dicembre 2013, relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura, recante modifica ai regolamenti (CE) n. 1184/2006 e 1224/2009 del Consiglio e che abroga il reg. (CE) n. 104/2000 del Consiglio.

Con il presente regolamento, il Reg. (CE) n. 104/2000 è abrogato. Tuttavia l'articolo 4 (relativo alle informazioni dei consumatori) si applica fino al 12 dicembre 2014.

Il Reg. (CE) 1379/2013 si applica a decorrere dal 1° gennaio 2014, ad eccezione del capo IV e dell'articolo 45 che si applicano a decorrere dal 13 dicembre 2014.

Nel capo IV (dall' articolo 35 all'articolo 39) sono descritte le informazioni per i consumatori.

Articolo 35. Informazioni obbligatorie:

1. Fatto salvo il regolamento (UE) n. 1169/2011, i prodotti della pesca e dell'acquacoltura di cui alle lettere a), b), c) ed e) dell'allegato I del presente regolamento commercializzati nell'Unione, indipendentemente dall'origine e dal loro metodo di commercializzazione, possono essere offerti per la vendita al consumatore finale o a una collettività solo a condizione che un contrassegno o un'etichettatura adeguati indichino:

- a) la denominazione commerciale della specie e il suo nome scientifico;
- b) il metodo di produzione, in particolare mediante i termini "...pescato..." o "...pescato in acque dolci..." o "...allevato...",

- c) la zona in cui il prodotto è stato catturato o allevato e la categoria di attrezzi da pesca usati nella cattura di pesci, come previsto nella prima colonna dell'allegato III del presente regolamento;
- d) se il prodotto è stato scongelato;
- e) il termine minimo di conservazione, se appropriato.

Il requisito di cui alla lettera d) non si applica:

- a) agli ingredienti presenti nel prodotto finito;
- b) agli alimenti per i quali il congelamento costituisce una fase tecnologicamente necessaria del processo di produzione;
- c) ai prodotti della pesca e dell'acquacoltura precedentemente congelati per ragioni di sicurezza sanitaria, conformemente all'allegato III, sezione VIII, del regolamento (CE) n. 853/2004;
- d) ai prodotti della pesca e dell'acquacoltura che sono stati scongelati prima di essere sottoposti ad affumicatura, salatura, cottura, marinatura, essiccazione o ad una combinazione di uno di questi processi.

2. Per i prodotti non preimballati della pesca e dell'acquacoltura le informazioni obbligatorie elencate al paragrafo 1 possono essere fornite per la vendita al dettaglio tramite informazioni commerciali come cartelloni pubblicitari o poster.

3. Quando sia offerto per la vendita al consumatore finale o a una collettività un miscuglio di specie identiche il cui metodo di produzione è diverso, occorre indicare il metodo di produzione di ogni partita. Quando sia offerto per la vendita al consumatore finale o a una collettività un miscuglio di specie identiche le cui zone di cattura o i cui paesi di allevamento sono diversi, occorre indicare almeno la zona della partita quantitativamente più rappresentativa, con l'avvertenza che il prodotto proviene anch'esso, quando si tratta di un prodotto della pesca, da zone di cattura diverse e, quando si tratta di prodotti d'allevamento, da paesi diversi.

4. Lo Stato membro può esonerare dagli obblighi di cui al paragrafo 1 i piccoli quantitativi di prodotti venduti direttamente dal peschereccio al consumatore, purché non superino il valore di cui all'articolo 58, paragrafo 8, del regolamento (CE) n. 1224/2009.

5. I prodotti della pesca e dell'acquacoltura e i loro imballaggi che sono etichettati o contrassegnati prima del 31 dicembre 2014 e che non sono conformi a quest'ultimo possono essere commercializzati fino ad esaurimento di detti stock.

Articolo 36. Informazioni sulla certificazione ecologica:

Previa consultazione degli Stati membri e dei soggetti interessati, entro il 1 o gennaio 2015 la Commissione presenta al Parlamento europeo e al Consiglio una relazione di fattibilità concernente le opzioni per un sistema di certificazione ecologica per i prodotti della pesca e dell'acquacoltura, in particolare per quanto riguarda l'istituzione di un siffatto sistema a livello di Unione e la fissazione di requisiti minimi per l'uso di un marchio di qualità ecologica dell'Unione da parte degli Stati membri.

Articolo 37. Denominazione commerciale:

1. Ai fini dell'articolo 35, gli Stati membri redigono e pubblicano un elenco delle denominazioni commerciali ammesse nel proprio territorio, accompagnate dal loro nome scientifico. Tale elenco reca:

a) il nome scientifico di ciascuna specie quale riportato nel sistema d'informazione FishBase o nel database ASFIS dell'organizzazione per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO), se del caso;

b) la denominazione commerciale:

i) il nome della specie nella lingua o nelle lingue ufficiali dello Stato membro interessato;

ii) se del caso, ogni altro nome accettato o autorizzato a livello locale o regionale.

2. Qualsiasi specie di pesce che costituisca un ingrediente di un altro alimento, può essere denominata "pesce", purché la denominazione e la presentazione di tale alimento non facciano riferimento a una precisa specie.

3. Qualsiasi modifica nell'elenco delle denominazioni commerciali autorizzate da uno Stato membro è immediatamente notificata alla Commissione, che ne informa gli altri Stati membri.

Articolo 38. Indicazione della zona di cattura o di produzione:

L'indicazione della zona di cattura o di produzione di cui all'articolo 35, paragrafo 1, lettera c) reca:

a) nel caso di prodotti della pesca catturati in mare, la denominazione scritta della sottozona o divisione compresa nelle zone di pesca della FAO, nonché la denominazione di tale zona espressa in termini comprensibili per il consumatore, oppure una carta o un pittogramma indicante detta zona o, a titolo di deroga da tale requisito, per i prodotti della pesca catturati in acque diverse dall'Atlantico nord-orientale (zona di pesca FAO 27) e dal Mediterraneo e dal Mar Nero (zona di pesca FAO 37), la denominazione della zona di pesca FAO;

b) nel caso di prodotti della pesca catturati in acque dolci, la menzione del corpo idrico di origine dello Stato membro o del paese terzo di origine del prodotto;

c) nel caso di prodotti dell'acquacoltura, la menzione dello Stato membro o del paese terzo in cui il prodotto ha raggiunto oltre la metà del suo peso finale o è rimasto oltre la metà del periodo di allevamento o, nel caso di molluschi e crostacei, è stato sottoposto alla fase finale del processo di allevamento o di coltura per almeno sei mesi.

2. In aggiunta alle informazioni di cui al paragrafo 1, gli operatori possono indicare una zona di cattura o di produzione più precisa.

Articolo 39. Informazioni supplementari facoltative:

1. In aggiunta alle informazioni obbligatorie richieste a norma dell'articolo 35, le informazioni seguenti possono essere fornite su base volontaria, a condizione che siano chiare e inequivocabili:

a) la data di cattura dei prodotti della pesca o della raccolta dei prodotti dell'acquacoltura;

b) la data dello sbarco dei prodotti della pesca o informazioni riguardanti il porto di sbarco dei prodotti;

c) informazioni più dettagliate sul tipo di attrezzi da pesca ai sensi della seconda colonna dell'allegato III;

d) nel caso di prodotti della pesca catturati in mare, informazioni sullo Stato di bandiera del peschereccio che ha catturato tali prodotti;

e) informazioni di tipo ambientale;

f) informazioni di tipo etico e/o sociale;

g) informazioni sulle tecniche e sulle pratiche di produzione;

h) informazioni sul contenuto nutrizionale del prodotto.

2. Può essere utilizzato un codice di risposta rapida (QR) contenente una parte o la totalità delle informazioni di cui all'articolo 35, paragrafo 1.

3. L'indicazione delle informazioni facoltative non occupa lo spazio disponibile per le informazioni obbligatorie sul marchio o sull'etichettatura.

4. Non sono fornite informazioni facoltative che non sia possibile verificare.

CAPITOLO 4

METODICHE PER L' IDENTIFICAZIONE DI SPECIE NEL COMPARTO ITTICO

L'identificazione di specie è uno fra gli aspetti più importanti dell'ispezione degli alimenti e costituisce un sistema per garantire la correttezza degli scambi commerciali e delle informazioni fornite al consumatore. Inoltre, costituisce un sistema d'ausilio per evitare la commercializzazione di specie per le quali non esiste una politica di tutela, come per esempio per le uova di pesci appartenenti alla famiglia Acipenseridae (Storioni) (**Allegato B Reg. CE 338/97**) e per scoraggiare la pesca illegale (Baker *et al.*, 2000; Kyle and Wilson, 2007).

Come visto nel capitolo precedente, la difficoltà nell'identificazione delle specie ittiche è dovuta ad una serie di fattori tra i quali:

- La globalizzazione dei mercati e l'elevato numero di specie in commercio;
- L'elevato numero di prodotti della pesca trasformati, con conseguente perdita delle caratteristiche morfologiche usate normalmente per l'identificazione;
- La presenza di un numero ridotto di esperti nell'identificazione di specie.

Si capisce quindi come, l'applicazione di metodiche analitiche più sensibili che possono essere utilizzate per l'identificazione di specie in prodotti ittici che non sono facilmente riconoscibili attraverso le loro caratteristiche morfologiche (Gil, 2007; Mafra *et al.*, 2007), come le analisi molecolari o proteiche risulti di fondamentale importanza in questo settore.

Le metodiche analitiche per l'identificazione dei prodotti della pesca si sono basate tradizionalmente sull'elettroforesi specie specifica, sulla cromatografia e sulle caratteristiche immunologiche delle proteine (Sotero *et al.*, 1993 Civera, 2003; Moretti *et al.*, 2003). Alcune tecniche comunemente usate sono: l'IEF (Isoelectric Focusing), la CE (Capillary Electrophoresis), e l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ed i sistemi immunologici. Questi metodi sono affidabili se effettuati su tessuto fresco o congelato, invece, in caso di prodotti sottoposti ad elevate temperature o essiccati, nei quali si verifica un'alterazione delle proprietà biochimiche e dell'integrità strutturale delle proteine, questi metodi analitici non possono essere

applicati (Mckie *et al.*, 1999; Akasaki *et al.*, 2006). Un metodo basato sulle proteine efficace anche sui prodotti sterilizzati è l'ELISA (Enzyme Linked Immuno Assorbent Assay), che è stato utilizzato per l'identificazione di diverse specie di pesce (Carrera *et al.*, 2003; Asensio *et al.*, 2003). Tuttavia l'ELISA non è efficace per l'identificazione di specie strettamente correlate, poiché in questo caso è necessario l'utilizzo di un anticorpo specifico per la proteina di interesse (Barlett e Davidson, 1992; Sotelo *et al.*, 1993; Wolfe e Primrose 1994).

L'elettroforesi è il metodo più conosciuto per l'analisi d'identificazione di specie. Possono essere utilizzate diverse tecniche elettroforetiche in base al prodotto da analizzare. Infatti, nel caso in cui il tessuto muscolare del pesce subisca dei trattamenti come la salatura, l'essiccazione e la cottura, le proteine idrosolubili, che sono specie-specifiche, sono denaturate e non possono essere utilizzate per l'identificazione. Tra le varie tecniche di elettroforesi, la IEF (Isoelectric focusing) delle proteine sarcoplasmatiche è stata ampiamente utilizzata per l'identificazione di specie e la sua affidabilità è stata confermata in diversi studi (Rebhein, 1990; Rebhein *et al.*, 1995). Nella IEF la separazione delle proteine sarcoplasmatiche è basata sul loro punto isoelettrico, usando differenti range di pH (range ampio : 3-10; range stretto: 3-6).

Le specie sono riconosciute in base al tracciato elettroforetico di tutte le proteine o a quello della parvalbumina. La parvalbumina è una proteina a basso peso molecolare (12 kDa), termostabile, appartenente alla famiglia delle albumine in grado di legare il calcio, presente in elevate concentrazioni nelle fibre muscolari bianche di alcune specie di pesci come i gadiformi ed i pleuronettiformi (Esteve-Romeo *et al.*, 1996).

Paragonando i tracciati delle specie sconosciute con quelli delle specie note è possibile effettuare il riconoscimento. Questa metodica è stata utilizzata come metodo ufficiale di riferimento dall' FDA americana. Questo grazie all' RFE, un database che oltre a raccogliere le informazioni come il nome comune, la denominazione commerciale, la denominazione scientifica, il nome della famiglia, contiene anche i tracciati elettroforetici delle proteine sarcoplasmatiche di 77 specie di pesci commercializzate principalmente in nord America. Attualmente sono state aggiunte anche informazioni relative al DNA *Barcoding*.

Oltre che sul pesce fresco l'IEF è stata utilizzata anche sul pesce cotto, affumicato, sulle uova di storione, usando l'urea (Etienne *et al.*, 1999; Rebhein *et al.*, 1999) o l' SDS (Piñeiro *et al.*, 1999) per la solubilizzazione delle proteine

Tuttavia a causa della denaturazione delle proteine al calore, l'identificazione con questo tipo di analisi risulta a volte molto difficile, così l'applicazione di tecniche basate sul DNA ha riscosso grande interesse recentemente.

4.1. METODI BASATI SUL DNA PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE ITTICHE

L'evoluzione molecolare e filogenetica ha dimostrato che, a causa della degenerazione del codice genetico e della presenza di alcune sequenze non codificanti, il DNA fornisce più informazioni delle proteine. Inoltre, dal momento che le tecniche basate sul DNA hanno mostrato più vantaggi rispetto a quelle basate sulle proteine, sono attualmente utilizzate per l'identificazione di specie (Civera, 2003; Gil, 2007; Mafra *et al.*, 2007).

Molti degli alimenti analizzati sono trasformati e i campioni di DNA sono spesso alterati. Alcuni studi effettuati sul DNA antico (fossili, resti organici, saliva, sangue) hanno dimostrato che, nonostante sia alterato, il DNA è più resistente e termostabile delle proteine ed è possibile amplificare tramite PCR un piccolo frammento di DNA ottenendo informazioni sufficienti per l'identificazione (Teletchea *et al.*, 2005).

Durante i processi produttivi, gli alimenti possono essere sottoposti a trattamenti termici (cottura, pastorizzazione, ecc.), alta pressione, variazione di pH, irradiazione, essiccazione. Per esempio, alcuni prodotti alimentari sono sottoposti a temperature superiori ai 100 °C per 10-60 minuti ed ad un pH <4. Di conseguenza i metodi di identificazione molecolare a partire da questi substrati altamente degradati dovrebbero essere basati sull'analisi di un frammento corto, circa 100-200 pb, (alcuni ricercatori non sono stati in grado di amplificare frammenti più lunghi di 200 pb da tonno in scatola (Quinteiro *et al.*, 1998) o farine animali trasformate (Frezza *et al.*, 2003; Prado *et al.*, 2004). Il DNA, in questi prodotti trasformati, non soltanto è degradato ma è presente anche in piccole quantità e quindi c'è uno scarso numero di frammenti di DNA utilizzabili per le analisi molecolari. Per cui è spesso necessario aumentare i cicli di PCR per ottenere un numero sufficiente di DNA amplificato per successive analisi (Teletchea *et al.*, 2005).

Il vantaggio delle analisi basate sul DNA è stato ben dimostrato da Wolff *et al.* (2000). Infatti, le analisi sono indipendenti dal campione utilizzato (muscolo, spine, pinne, gonadi, ecc.) perché tutte le cellule dell'individuo contengono la stessa informazione genetica; l'informazione contenuta nel DNA è maggiore di quella delle proteine, a causa

della degenerazione del codice genetico; il DNA è una molecola abbastanza stabile, così è possibile l'estrazione da diversi tipi campione.

4.2. SELEZIONE DEL MATERIALE GENETICO

Dato che molte delle tecniche genetiche utilizzate nell'identificazione di specie richiedono l'abilità di amplificare il DNA target usando la PCR, alcuni fattori come l'integrità e l'origine del DNA possono diventare determinanti nella scelta del frammento target (Bossier, 1999). Ulteriori fattori che devono essere considerati comprendono il tasso di mutazione e la lunghezza della sequenza (Cespedes *et al.*, 2000). L'identificazione di specie ittiche può essere ottenuta utilizzando sia il DNA nucleare (nDNA) che il DNA mitocondriale (mtDNA) (Martinez *et al.*, 2005). Come alternativa all'amplificazione e all'analisi di un frammento specifico, alcuni metodi attuali si basano sull'amplificazione random di parti del DNA genomico per ottenere un' "impronta genetica" (Rego *et al.*, 2002; Ramella *et al.*, 2005; Zang e Chai, 2006).

4.2.1. DNA mitocondriale

Il genoma mitocondriale degli animali contiene 13 geni codificanti per le proteine, 22 geni codificanti per l'RNA di trasporto (tRNA), una grande regione non codificante e due geni codificanti per l' RNA ribosomiale (rRNA): il gene *12S*, di circa 819-975 pb nei vertebrati e il gene *16S* di circa 1571-1640 pb nei vertebrati (Céspedes *et al.*, 1999). Il DNA mitocondriale è quello maggiormente utilizzato per l'identificazione di specie ittiche perché presenta alcuni vantaggi:

- 1) Evolve più velocemente del DNA nucleare: il suo alto tasso di mutazione relativa risulta nell'accumulo di un numero sufficiente di sequenze differenti per consentire la differenziazione di specie strettamente correlate (Cespedes *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 1993);
- 2) È ereditato dalla madre: gli individui hanno soltanto un allele e questo evita sequenze ambigue da genotipi eterozigoti (Giles *et al.*, 1980; Dawid e Blackler, 1972);
- 3) Il numero di copie del DNA mitocondriale all'interno della cellula è più alto di quello del DNA nucleare (Rasmussen, 2009; Albert *et al.*, 1994);
- 4) La sequenza completa del DNA mitocondriale è conosciuta in numerosi organismi acquatici, perché è stata analizzata per gli studi evolutivisti (Kocher *et al.*, 1989; Palumbi *et al.*, 2002);

- 5) È più piccolo (da 160000 a 19000 nucleotidi) del DNA nucleare e ha una struttura circolare, con una resistenza maggiore al calore (Awise *et al.*, 1987; Borgo *et al.*, 1996);
- 6) Sono assenti introni e sequenze ripetute (Teletchea, 2009; Mackie *et al.*, 2009).

4.2.2. Geni mitocondriali

Il citocromo *b* (*Cyt b*), il citocromo ossidasi sub unità I (*COI*) e il *16S rRNA* sono i geni principalmente utilizzati per l'identificazione delle varie specie ittiche (Ogden, 2008; Rasmussen, 2008; Teletchea, 2009).

COI: questo gene è stato considerato da molti autori come il marker di scelta per la differenziazione di specie perché ha un enorme potenziale per gli studi filogenetici rispetto ad altri geni mitocondriali (Hebert *et al.*, 2003). Hajibabaei *et al.* hanno riportato che, anche le sequenze nucleotidiche relativamente corte (100-200 pb) possono consentire un'accurata identificazione. Per l'amplificazione di questo gene, esistono una vasta gamma di primers universali applicabili su un ampio range di taxa (Kochzius, 2010; Ward *et al.*, 2005; Baldwin *et al.*, 2009).

Cytb: questo gene è stato utilizzato in più della metà degli studi filogenetici degli ultimi dieci anni. La minore variazione intraspecifica rispetto alla variazione interspecifica, rende il *Cyt b* idoneo all'identificazione di diversi organismi (Barlett e Davidson, 1992). Questo gene non presenta soltanto delle regioni con un alto livello di variabilità, utili per gli studi evolutivi di specie strettamente correlate, ma anche delle regioni non variabili (Armani *et al.*, 2011; Jerome *et al.*, 2003). Questo ha fatto sì che possa essere utilizzato per disegnare dei primers universali che consentono l'amplificazione di frammenti di diversa lunghezza.

Considerando il fatto che le sequenze disponibili nei database sono più lunghe per il *Cytb* che per il *COI*, è stata ipotizzata una maggiore efficienza di identificazione. Infine, l'analisi dell'intera sequenza, aumentando la probabilità di trovare polimorfismi specie specifici, può facilitare lo sviluppo di metodi rapidi (Michelini *et al.*, 2007; Armani *et al.*, 2012).

16S RNA: l'alto livello di conservazione di questo gene, facilita l'uso di primers universali o il disegno di nuovi primers per l'amplificazione dello stesso frammento di DNA da un più alto numero di specie che possono anche essere filogeneticamente distanti. Per questo motivo, l'amplificazione di questo gene è spesso utilizzata per

fornire un controllo sul processo di estrazione e sul grado di degradazione del DNA (Armani *et al.*, 2012; Ivanova *et al.*, 2007).

4.3. ESTRAZIONE DEL DNA

Esistono diverse tecniche per l'estrazione del DNA nelle specie acquatiche, compresi numerosi kit disponibili in commercio, molti dei quali basati sull'utilizzo di matrici silicee. Si sfrutta in questo caso la tendenza del DNA ad adsorbirsi alla matrice silicea in presenza di alte concentrazioni di sali caotropici, in particolare idrocloruro e isotiocianato di guanidina. La eluizione degli acidi nucleici si ottiene variando la forza ionica e il pH della soluzione, utilizzando acqua distillata o un tampone a bassa concentrazione. Molto spesso, la tecnica scelta per l'estrazione del DNA dipende dalle condizioni del campione, dal tipo di tessuto, dall'integrità del DNA e dal tipo di applicazione prevista nel post estrazione.

Come detto precedentemente, il DNA presente nei prodotti ittici trasformati può aver subito notevoli danni e quindi avere qualità ridotta e sequenze target più corte di quelle raccolte nei campioni freschi. Il DNA può essere infatti danneggiato da fattori come l'esposizione ad elevate temperature, basso pH, e nucleasi che provocano degradazione enzimatica, depurinazione e idrolisi (Marmioli *et al.*, 2003). Quindi, l'obiettivo principale dei metodi genetici per l'identificazione dei prodotti ittici è quello di ottenere DNA in quantità e qualità sufficiente per le successive analisi. Per questo motivo la tecnica di estrazione deve rispettare due requisiti principali: la resa e la purezza, intesa come presenza in soluzione dell'acido nucleico in esame, sia come assenza di sostanze contaminanti che, legandosi ai reagenti in soluzione, potrebbero modificare i risultati delle successive applicazioni (Focà e Lamberti, 2003).

Il percorso di estrazione e purificazione prevede quattro fasi:

- 1) **Lisi delle cellule.** Si tratta di una fase molto delicata, durante la quale bisogna evitare di danneggiare gli acidi nucleici da analizzare. I metodi tradizionali si basano sui trattamenti complessi che includono la digestione enzimatica, la solubilizzazione tramite detergente o tecniche meccaniche di spaccatura. Esistono inoltre metodi di lisi basati su shock osmotico (Cunha *et al.*, 2001) e ultrasuoni.
- 2) **Inattivazione delle nucleasi.** Quando l'acido nucleico è il DNA si utilizza la proteinasi K, una proteinasi molto attiva, isolata da un fungo saprofito

Tritirachhium album che digerisce le proteine associate all'acido nucleico e inattiva tutte le nucleasi cellulari.

- 3) **Separazione e recupero dell'acido nucleico dalla soluzione contenente il lisato cellulare.** I metodi classici prevedono l'utilizzo di solventi organici come il fenolo e il cloroformio. Il fenolo è un potente denaturante delle proteine, in quanto, legandosi ad esse attraverso legami a idrogeno, ne altera la struttura. Le proteine denaturate, con i gruppi idrofobici esposti diventano solubili nella fase fenolica o precipitano nell'interfase fenolo acqua; il fenolo è fortemente igroscopico e deve essere sempre equilibrato con una soluzione tampone perché altrimenti assorbirebbe la soluzione acquosa contenente gli acidi nucleici. Il cloroformio completa la denaturazione delle proteine, rimuove i lipidi e grazie alla sua elevata densità, facilita la separazione della fase acquosa (contenente il DNA deproteinizzato) da quella organica (fenolica), stabilizzando l'interfaccia tra le due fasi. Un metodo alternativo per la separazione degli acidi nucleici è l'estrazione *salting out*, che sfrutta il principio secondo il quale, ad alte concentrazioni di sali, la solubilità delle proteine diminuisce bruscamente (*salting out*) causando la precipitazione delle stesse. Questo metodo prevede la lisi delle cellule mediante tampone di lisi classico e il trattamento con la proteinasi K allo scopo di estrarre gli acidi nucleici e di degradare le proteine presenti che vengono allontanate mediante precipitazione con i sali (solfato di ammonio, solfato di sodio, acetato di sodio).
- 4) **Precipitazione.** Avviene di solito in alcol etilico o isopropanolo e permette il recupero degli acidi nucleici in forma solida. Dopo lavaggio con etanolo, si ha una valutazione quali-quantitativa degli acidi nucleici estratti e quindi la loro conservazione.

4.4. VALUTAZIONE DEL DNA ESTRATTO

La valutazione quali-quantitativa del DNA estratto viene effettuata per via spettrofotometrica su un'aliquota di campione. Per una stima quantitativa si valuta l'assorbanza a 260 nm del campione mentre per la valutazione qualitativa si prendono in considerazione i valori di assorbanza a 230 e 280 nm. Il rapporto fra l'assorbanza a 260 nm e gli altri due valori fornisce un'indicazione sulla purezza del DNA: un DNA puro dovrebbe avere un rapporto compreso tra 1,8 e 2,0. La valutazione delle sostanze contaminanti deve essere presa in considerazione al momento della scelta delle

procedure successive a cui sarà sottoposta la soluzione contenente gli acidi nucleici; infatti una contaminazione da proteine o da fenolo produce, da un lato, una sovrastima della concentrazione degli acidi nucleici, dall'altro un disturbo nell'attività degli enzimi che saranno impegnati per le successive analisi (Focà e Lamberti, 2003)

4.5. AMPLIFICAZIONE DEL DNA: POLYMERASE CHAIN REACTION

4.5.1. Componenti essenziali della PCR

Una reazione di PCR contiene necessariamente diversi componenti quali:

- 1) Una DNA polimerasi termostabile (**Taq DNA Polimerasi**) per catalizzare la sintesi di DNA dipendente da un frammento stampo;
- 2) Una coppia di oligonucleotidi sintetici (**primers**) per iniziare la sintesi di DNA;
- 3) Desossinucleotidi trifosfati (**dNTP**) utilizzati per sintetizzare il nuovo filamento di DNA;
- 4) Cationi bivalenti : **MgCl₂** (cofattore della DNA Polimerasi)
- 5) Soluzione tampone (**buffer**) per mantenere la DNA polimerasi in condizioni ottimali (pH 8-9 a seconda del tipo di Taq)
- 7) **DNA stampo** che contiene la regione da amplificare

4.5.2. Principio di funzionamento della PCR

La PCR è una tecnica utilizzata per isolare e aumentare in quantità una determinata sequenza di DNA. Mediante questa tecnica è possibile amplificare in modo selettivo la parte di DNA di interesse anche a partire da una singola copia di tale molecola purché essa sia presente nella soluzione in cui avviene la reazione. Con questo metodo siamo quindi in grado di riprodurre centinaia di milioni di copie di DNA tutte uguali tra loro e alla sequenza target.

La reazione viene suddivisa in tre step, ognuno realizzato a temperatura diversa, e viene ripetuta ciclicamente per un numero di volte definito a seconda delle esigenze. Per far sì che la reazione avvenga rapidamente e in modo corretto, la provetta viene inserita all'interno di un apparecchio, il termociclatore, in grado di cambiare la temperatura al suo interno in modo estremamente rapido e per un numero di volte pari al numero di cicli desiderati.

La reazione prevede il succedersi di cicli di amplificazione durante i quali si alternano tre diverse temperature che rendono possibile rispettivamente:

1) DENATURAZIONE.

Il DNA deve essere portato ad una condizione di singola elica (single-stranded) in modo che successivamente si verifichi l'appaiamento (annealing) alle molecole di primer (anch'esse a singolo filamento). Per fare ciò la soluzione contenente il DNA viene portata ad una temperatura al di sopra della sua "temperatura di fusione (T_m)" (melting temperature), nella quale i legami ad idrogeno, non più stabili, permettono la separazione tra i due singoli filamenti del DNA.

Nel tampone di reazione in cui viene normalmente effettuata la reazione di PCR la temperatura di fusione è solitamente compresa tra 92 e 96 °C e la denaturazione viene favorita dalla presenza di concentrazioni saline relativamente alte (circa 150mM NaCl).

La *Taq* DNA polimerasi ha solitamente una emivita di 30 min a 95 °C. Questo fatto limita il numero di cicli della PCR ed il tempo di denaturazione del primo step. Infatti considerando una incubazione di 1 min a 95 °C per ogni ciclo di PCR il numero di cicli effettuabili non può essere superiore a 30-35. Diminuendo il tempo di denaturazione a 15-30 sec i cicli di PCR possono solitamente essere aumentati fino a 45. È inoltre possibile ridurre la temperatura di denaturazione dopo i primi 10 cicli di PCR. Ad esempio per ampliconi di lunghezza inferiore a 3 Kbp si può effettuare la denaturazione a 88 °C (per frammenti di DNA amplificati con meno del 50% di contenuto in G+C).

2) APPAIAMENTO DEI PRIMER (Annealings)

Nel mettere a punto le reazioni di PCR si possono seguire essenzialmente due tipi di criteri riguardo alla T_a :

- 1) T_a costante durante i cicli;
- 2) T_a che diminuisce ciclo dopo ciclo (*touch-down*)

Nella gran parte delle reazioni la T_a rimane costante per tutta la durata della reazione e non si effettuano variazioni lungo i cicli. La strategia di reazione *touch-down* permette di rendere i primi cicli di PCR estremamente "stringenti", cioè tali da promuovere l'amplificazione solo di frammenti specifici rendendo instabili eventuali annealing dei primer a sequenze di DNA non perfettamente complementari. In effetti una T_a troppo bassa porta all'*annealing* dei primer a sequenze non esattamente complementari e quindi all'amplificazione di frammenti non specifici, mentre una T_a troppo alta può ridurre la resa in quanto solo una frazione delle molecole del primer riesce ad innescare la polimerizzazione a causa dell'elevata instabilità del loro appaiamento con il DNA stampo.

Il tempo di *annealing* infine non deve essere troppo lungo (in modo da sfavorire appaiamenti a stampi con bassa complementarietà). Di solito si utilizzano tempi dell'ordine di 30 secondi o meno.

La temperatura di *annealing* è un parametro variabile capace di determinare la specificità di un esperimento di PCR. La scelta di tale temperatura è legata alla temperatura di fusione (T_m) del DNA da amplificare. La T_m è la temperatura alla quale il 50% del DNA è presente come singolo filamento. La temperatura di *annealing* viene di solito fissata ad un valore inferiore di 3-5 °C rispetto alla T_m degli oligonucleotidi scelti come primer. La Taq polimerasi non viene denaturata alle alte temperature e quindi può essere usata negli esperimenti di PCR non essendo degradata durante i cicli di reazione. La possibilità di utilizzare cicli di reazione a temperature elevate aumenta la specificità della PCR diminuendo le interazioni aspecifiche tra i primer e i filamenti di DNA. Un appaiamento erraneo dei primer (*mismatch*) può produrre un'efficiente amplificazione di sequenze aspecifiche indesiderate. I primer possono appaiarsi con sequenze che differiscono leggermente dalle sequenze bersaglio, la DNA polimerasi impiegherà questi primer appaiati erroneamente per sintetizzare un filamento complementare a una sequenza indesiderata in direzione 3' rispetto al primer. Il primo appaiamento erraneo produrrà un filamento di DNA di lunghezza indefinita che conterrà il primo primer incorporato nell'estremità 5'. Un appaiamento erraneo del secondo primer su questo filamento indesiderato produrrà una molecola di DNA a doppia elica: in questa un filamento avrà nella sua estremità 5' il secondo primer e nell'estremità 3' la sequenza complementare al primo primer. Il secondo filamento così generato rappresenta adesso uno stampo perfetto per i successivi cicli di amplificazione, e la concentrazione del DNA indesiderato aumenta proprio come quella della sequenza bersaglio. Il frammento non corretto sintetizzato nei primi cicli della PCR può essere amplificato in modo efficiente nei cicli successivi e così via.

3) ESTENSIONE DEI PRIMER (Elongation)

La temperatura utilizzata è solitamente compresa tra 68 e 72 °C. La Taq DNA polimerasi ha un'attività specifica a 37 °C. Tuttavia l'attività della Taq DNA polimerasi ha il suo massimo a circa 70 °C e l'estensione dei primer avviene ad una velocità di circa 100 basi/sec. Generalmente 1 min è sufficiente per amplificare con una buona resa stampi lunghi circa 1 Kbp. Il tempo di estensione viene quindi calibrato sulla lunghezza dello stampo da amplificare tenendo conto che una preparazione di Taq DNA polimerasi, a causa della sua processività non alta, solitamente non amplifica con buona

resa frammenti di DNA di lunghezza superiore a 3 Kbp. Il numero di cicli di amplificazione necessari ad ottenere una banda visibile su gel di agarosio dipende in gran parte dalla concentrazione di DNA iniziale. Tuttavia l'effetto del numero dei cicli non è proporzionale a causa della presenza del cosiddetto “**effetto plateau**” in cui nelle fasi tardive dell'amplificazione il tasso di accumulo di prodotto diminuisce a causa di numerosi fattori tra cui la degradazione dei reagenti (dNTPs, DNA polimerasi), inibizione da parte del pirofosfato accumulato (inibizione da prodotto). In generale il numero di cicli è compreso tra 30 e 45.

4.5.3. PCR quantitativa

Un miglioramento della PCR si è avuto con l'introduzione della Real Time PCR, che consente di eseguire l'aumento della quantità di prodotto di PCR ad ogni ciclo di amplificazione e quindi di realizzare un'analisi quantitativa dello stampo iniziale basandosi sull'uso di coloranti fluorescenti che si legano al DNA in modo aspecifico o di sonde marcate complementari a specifiche sequenze (Scialpi & Mengoni, 2008).

Ci sono diverse tecniche basate sulla fluorescenza, compreso l'uso di primers con estremità fluorescenti (Amplifluor™), sonde con un fluoroforo fluorescente ad un'estremità e un altro fluoroforo non fluorescente all'altra estremità (TaqMan), segnali molecolari che emanano fluorescenza quando si legano ad uno specifico amplicone, Scorpion™ primer, e LightCycler™ (Lockely e Bardsley, 2000; Marras *et al.*, 2006). Questi metodi sono vantaggiosi non soltanto per la loro velocità e semplicità ma anche per la possibilità di quantificare uno specifico materiale genetico. Infatti, le sonde TaqMan sono state utilizzate per rivelare e quantificare il DNA delle varie specie di pesci (Sotelo *et al.*, 2003; Hird *et al.*, 2005) e di carne in scatola (Laube *et al.*, 2007).

4.5.4. Primer

Di tutti i componenti della reazione di PCR i primers e la loro progettazione rivestono l'importanza maggiore. Da un accurato disegno dei primers dipende la resa, l'amplificazione della sola sequenza desiderata, la successiva manipolazione del prodotto di amplificazione.

Caratteristiche dei primer:

- La lunghezza dei primer dovrebbe essere compresa tra 18 e 22 paia di basi.
- Se possibile, il primer dovrebbe avere una sequenza che contenga una percentuale di GC pari al 50-60%.

-La temperatura di *annealing* dovrebbe essere compresa tra 50 °C e 65 °C e comunque non dovrebbe essere mai troppo bassa per evitare problemi di specificità.

-Il primer non dovrebbe contenere lunghi tratti di polinucleotidi (es. GGGGGG).

-La temperatura di *annealing* teorica del primer Forward dovrebbe essere la stessa di quella del primer Reverse o, almeno, molto simile.

-Si devono evitare i tratti che potrebbero dare self “annealing”.

Si deve ovviamente tener conto di disegnare un primo primer (**primer forward**) sull'elica senso del DNA e l'altro (**primer reverse**) sull'elica opposta (antisense) in modo da avere i due terminali 3' dei primer a delimitare il segmento da amplificare.

Primer degenerati

I primer degenerati sono primer la cui sequenza non è determinata univocamente, ma contiene una o più posizioni in cui possono essere presenti più nucleotidi in miscela.

I primer degenerati possono essere utilizzati per amplificare sequenze di DNA (ignote) da un organismo utilizzando per il disegno del primer la sequenza nota (omologa) proveniente da un altro organismo o dallo stesso organismo.

I primers per la PCR possono essere universali o specie specifici e la scelta del primer appropriato per l'amplificazione del DNA è un fattore molto importante da prendere in considerazione per poter identificare correttamente le varie specie di pesce e di prodotti ittici.

Primers universali: i primers universali sono progettati per legarsi a regioni di DNA che sono di solito conservate tra i gruppi di specie e amplificare un frammento di DNA che mostra delle variazioni intraspecifiche (Carrera *et al.*, 2000). Per facilitare l'amplificazione universale, questi primers sono spesso degenerati in certe punti della sequenza nucleotidica. Un'alternativa all'utilizzo di una singola coppia di primers con siti degenerati per l'amplificazione di un frammento di gene universale è l'utilizzo di cocktail di primers associati con il gene target. Per esempio, l'uso di cocktail di primer è stato riportato nell'amplificazione e sequenziamento di segmenti del gene COI per l'uso nel DNA *barcoding* (Ivanova *et al.*, 2007).

Primers specie-specifici e PCR multiplex: i primers specie-specifici sono progettati per legarsi soltanto al DNA di una data specie (Lockely e Bardsley, 2000). Sebbene questo metodo richieda la conoscenza dettagliata delle sequenze di DNA della specie target, ciò non rappresenta un problema perché queste informazioni sono facilmente disponibili mediante l'uso di database genetici. Inoltre, l'utilizzo di primers specie specifici consente la semplice identificazione di specie sia con la presenza che con la

mancanza dell'amplicone sul gel d'agarosio, senza la necessità di procedure analitiche tradizionali come il sequenziamento, l' RFLP o l'SSCP.

Nella **PCR multiplex**, numerose specie possono essere analizzate con una singola corsa, utilizzando una combinazione di primers specie-specifici e primers universali, dando luogo a dei frammenti di DNA di lunghezza variabile a seconda delle specie (Apte and Daniel, 2003). La lunghezza del frammento può essere prevista se è conosciuta la sequenza completa, e una data specie può essere identificata dalla comparsa di un amplicone di dimensioni appropriate sul gel di agarosio.

Il vantaggio di questo metodo è il considerevole risparmio di sforzi e tempo quando si analizzano differenti regioni bersaglio. Tuttavia questa metodica può essere restrittiva dal momento che tutte le coppie di primers devono funzionare nelle stesse condizioni di amplificazione, con il rischio che si possa avere formazione di primer-dimer tra i vari primer con conseguente diminuzione della sensibilità del test e/o amplificazione preferenziale di alcuni bersagli rispetto ad altri (Markoulatos *et al.*, 2002).

La PCR multiplex con il *Cyt b* mitocondriale è stata utilizzata per la diagnosi di specie di una varietà di squali pelagici comunemente venduti sul mercato mondiale degli squali (Shivji *et al.*, 2002; Abercrombie *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 2006; Magnussen *et al.*, 2007). La PCR multiplex è stata utilizzata per l'identificazione del pesce spada (*Xiphias Gladius*) in prodotti trasformati (Hsihe *et al.*, 2004); per differenziare la sogliola (*Solea solea*) e l'halibut della Groenlandia (*Reinhardtius hippoglossoides*) (Cespedes *et al.*, 1999); per identificare tre specie di salmonidi del Pacifico (Greig *et al.*, 2002); per differenziare i filetti di pesce persico del Nilo (*Lates Niloticus*), la cernia bruna (*Epinephelus guaza*) e la cernia di fondale (*Polyprion americanus*) (Asensio *et al.*, 2001; Asensio, 2007).

4.5.5. Elettroforesi

Una volta che i frammenti del DNA sono stati amplificati con la PCR è necessario separarli ed identificarli. A tale scopo si utilizza la tecnica dell'elettroforesi che consiste nel movimento di molecole cariche sottoposte ad un campo elettrico generato dalla differenza di potenziale creata da un alimentatore di corrente. Dato che in tampone alcalino o neutro gli acidi nucleici si comportano come molecole cariche negativamente (anioni) esse migreranno verso il polo positivo. Nella pratica quotidiana l'elettroforesi viene effettuata su supporto solido, generalmente costituito da gel di agarosio o di poliacrilammide. Il primo si utilizza per separazioni rapide a bassa risoluzione, quando

i frammenti sono grandi e molto diversi tra loro per grandezza; il gel di poliacrilammide si utilizza invece per frammenti piccoli o quando essi differiscono tra loro per pochi nucleotidi, come nel caso del sequenziamento.

La velocità della migrazione dipende da diversi fattori come: il peso molecolare dei vari frammenti (i frammenti a più alto peso molecolare migrano più lentamente rispetto a quelli a più basso peso molecolare); la conformazione (la forma super avvolta corre più velocemente perché è più compatta, quella circolare più lentamente perché è più ingombrante e quella lineare ad una velocità intermedia); la concentrazione nel gel di agarosio (i pori hanno dimensione diversa a seconda della concentrazione utilizzata); il voltaggio applicato (circa 5 Volt/cm) e la composizione del buffer.

Una volta terminata la corsa elettroforetica le bande del DNA devono essere visualizzate all'interno della matrice del gel. Esistono differenti coloranti che si legano agli acidi nucleici con meccanismi diversi e che sono in grado di essere rivelati mediante sorgenti luminose di diverso tipo (raggi ultravioletti, luce visibile, etc.). Per il gel di agarosio si utilizza abitualmente il bromuro di etidio (EtBr), un agente intercalante che si lega al DNA e può essere rivelato con un transilluminatore UV. La molecola del bromuro di etidio è piatta e molto simile a quella delle basi azotate per cui si "insinua" tra una base azotata e quella successiva nella doppia elica e inoltre emette fluorescenza arancione se eccitata da luce ultravioletta con lunghezza d'onda compresa tra 254 e 306 nm, con un massimo a 302 nm, in un apparecchio che si chiama transilluminatore. Questo colorante è in grado di evidenziare quantitativi di acidi nucleici fino a 50 ng. L'uso di un ladder (una serie di frammenti a dimensione nota), permette di avere informazioni sulle dimensioni dei frammenti.

4.5.6. Purificazione dei prodotti di PCR

La purificazione dei prodotti della PCR, mediante la rimozione di primer, nucleotidi non incorporati, sali ed enzimi è essenziale per il buon esito degli esperimenti successivi, come il sequenziamento. Per purificare i prodotti della PCR sono disponibili in commercio degli appositi kit, in formato *spin column*, per il legame reversibile del DNA a microsferi di vetro, a matrici in silica-gel o matrici in Sephacryl (Guenzi, 2000). L'acido nucleico si lega infatti in modo specifico alla superficie delle fibre di vetro o dei materiali di silice, oppure ad altre speciali matrici in presenza di sali caotropici. La reazione di legame ha luogo in pochi secondi a causa della rottura (dovuta a tali sali) della struttura organizzata dell'acqua che circonda le molecole di DNA. Rompendo

l'interazione DNA acqua viene favorito l'assorbimento e, dato che il processo è specifico per gli acidi nucleici, il materiale legato viene facilmente separato da proteine, sali e nucleotidi liberi con un semplice passaggio di lavaggio. Il processo richiede una lunghezza minima di DNA (circa 100-120 pb) in maniera tale che gli oligonucleotidi, ma anche i primer dimerizzati (di 40-80 pb) siano anch'essi rimossi. Le *spin column* consentono in genere una rimozione del 90-99% dei contaminanti ed un recupero del 90-95% dei frammenti di DNA di dimensioni variabili a seconda del tipo di matrice utilizzata (compresi tra 300 pb e 5-20 kp). Il tempo della procedura di purificazione è di circa 5-15 minuti (Guenzi, 2000).

4.6. METODI DI ANALISI POST PCR

Dopo l'estrazione del DNA e la successiva amplificazione con la PCR il frammento di DNA deve essere analizzato per verificare la presenza o assenza di markers genetici specie-specifici. Nel caso della PCR specie specifica o della Multiplex-PCR, l'analisi consiste semplicemente nell'identificazione degli ampliconi mediante elettroforesi su gel. Tuttavia, con alcune metodiche come l'RFLP, SSCP, RAPD, AFLP, sono necessarie delle ulteriori procedure. Nonostante l'elevato numero di tecniche disponibili, la maggior parte degli studi basati sul DNA per l'identificazione di specie ittiche è stata effettuata utilizzando l'RFLP o il sequenziamento di un frammento di DNA mitocondriale (principalmente il *Cyt b*) amplificato con la PCR.

Il sequenziamento permette di stabilire la sequenza dei nucleotidi che costituiscono la molecola di DNA. Il metodo di sequenziamento maggiormente utilizzato nei laboratori attualmente è il metodo di Sanger, nel quale è prevista l'amplificazione del frammento di interesse mediante la "PCR di sequenziamento". Questa differisce dalla PCR classica in quanto vengono utilizzati dei dideossinucleotidi marcati (ddNTP) con quattro fluorocromi differenti. L'incorporazione di tali ddNTPS interrompe l'azione della polimerasi, portando alla formazione di una molecola di DNA fluorescente. Infatti la mancanza di un secondo gruppo idrossilico nel ddNTP in posizione 3' non permette la formazione di un legame fosfodiesterico fra questo e l'atomo di carbonio in posizione 5' del nucleotide successivo. L'incorporazione casuale dei ddNTP fa sì che alla fine della reazione, invece di ottenere molecole della stessa lunghezza, si ottengono frammenti di diversa lunghezza a seconda del ddNTP che è stato incorporato. La lettura attraverso un fascio laser dei prodotti di amplificazione produrrà dei picchi di differente lunghezza d'onda per ogni dideossinucleotide fluorocromo. L'altezza di un picco dipende

dall'intensità con cui un gruppo di molecole risponde all'eccitazione laser. La successiva lettura dei picchi permette di risalire all'esatta disposizione dei picchi sulla sequenza (Sanger et al., 1977). Una volta ottenute le sequenze queste possono essere utilizzate per una successiva analisi filogenetica.

4.6.1. *Restriction fragment length polymorphism (RFLP)*

Le molecole di DNA sono costituite da sequenze nucleotidiche differenti e questa tecnica di laboratorio sfrutta tali differenze per mettere a confronto le varie molecole di DNA.

Le variazioni specie-specifiche in alcuni punti di un determinato frammento possono, talvolta, essere analizzati semplicemente mediante amplificazione con la PCR e visualizzazione su gel di agarosio. Tuttavia, quando le variazioni sono molto piccole per essere analizzate in questo modo (<100 pb), gli ampliconi ottenuti con la PCR possono essere digeriti dagli enzimi di restrizione (endonucleasi) e poi analizzate usando elettroforesi su gel per generare dei profili di restrizione specie specifici (Liu e Corders, 2004).

Di norma si provvede per prima cosa all'estrazione e alla purificazione del DNA da un campione individuale. Il DNA viene quindi tagliato in *frammenti di restrizione* mediante enzimi di restrizione detti endonucleasi, che attuano il taglio unicamente in corrispondenza di particolari sequenze nucleotidiche, specifiche per ogni enzima. I frammenti di restrizione vengono quindi separati per lunghezza mediante elettroforesi su gel d'agarosio. Le differenze tra i genotipi sono determinate dal numero di bande che compaiono che è a sua volta determinata dal numero di siti di taglio presenti nella sequenza considerata.

Questa procedura è stata ampiamente utilizzata per l'identificazione di specie ittiche grazie ai numerosi vantaggi che offre rispetto alle altre tecniche. Innanzitutto è poco costosa, semplice e adatta per le analisi di routine in laboratorio rispetto ad altre tecniche come FINS che è basata sullo studio della sequenza nucleotidica (Carrera *et al.*, 1999; Cespedes *et al.*, 2000; Aranishi, 2005). Inoltre la PCR-RFLP è una tecnica di laboratorio che non richiede un'attrezzatura costosa (Aranishi, 2005). Grazie a questi vantaggi, questa tecnica è ampiamente utilizzata nell'ispezione degli alimenti e nell'identificazione di specie (Cespedes *et al.*, 2000; Aranishi, 2005). Il gene maggiormente utilizzato in questa tecnica è il *Cyt b* mitocondriale che è stato ampiamente utilizzato per l'identificazione di specie di pesci come gli sgombridi (Ram

et al., 1996; Quinteiro *et al.*, 1998; Chow *et al.*, 2003; Horstkotte e Rebehin, 2003), pesci piatti (Cespedes *et al.*, 1998; Sotelo *et al.*, 2001), Gadoidi (Calo-Mata *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2004; Aranishi *et al.*, 2005; Pepe *et al.*, 2005) e salmonidi (Russel *et al.*, 2000). Altri geni analizzati con la PCR-RFLP, per l'identificazione di specie, sono il 5S *rRNA* nucleare per differenziare le specie di sgombri (Aranishi, 2005); il gene *p 53*, *mt 16S rRNA* e *COSIII* per differenziare il salmone atlantico dalla trota iridea (Carrera *et al.*, 1999, 2000); *mt 16S rRNA* per identificare le varie specie di molluschi (Fernandez *et al.*, 2002; Chacraborty *et al.*, 2005); *mt 12S rRNA* per differenziare la sogliola dall'halibut della Groenlandia e per identificare le varie specie di pesci piatti (Cespedes *et al.*, 2000; Comesana *et al.*, 2003). I risultati di questi studi hanno dimostrato che la PCR-RFLP è idonea per l'analisi di specie strettamente correlate, campioni contenenti più specie e campioni che sono stati sottoposti a vari processi di trasformazione, inclusa la sterilizzazione. Il principale svantaggio della PCR-RFLP è la possibilità di variazione intraspecifica, nella quale individui della stessa specie mostrano un diverso pattern di restrizione, dovuto alla degenerazione del frammento di DNA analizzato (Mackie *et al.*, 1999; Lockely e Barsely, 2000; Akasaki *et al.*, 2006). Per evitare falsi negativi, devono essere analizzati più individui della stessa specie per verificare la mancanza di polimorfismi intraspecifici nei siti target. Un'ulteriore complicazione è che non è garantito che tutte le specie diano pattern di restrizione unici. Di conseguenza, un campione sconosciuto contenente una specie che non è stata analizzata con la PCR-RFLP potrebbe essere erroneamente amplificato se il suo profilo di restrizione coincide con quello di specie precedentemente studiate (Sotelo *et al.*, 2001).

4.6.2. *Forensically informative nucleotide sequencing (FINS)*

Questa tecnica è stata descritta per la prima volta da Barlett e Davidson (1992). Per identificare una specie utilizzando questa tecnica, un frammento specifico di DNA viene amplificato con la PCR, viene determinata la sua sequenza nucleotidica, e la sequenza viene poi comparata con le sequenze correlate presenti nel database utilizzando l'analisi filogenetica. La sequenza con la minore distanza genetica, o con il minor numero di sostituzioni nucleotidiche, dal frammento target, rappresenta il gruppo di specie dal quale deriva il campione (Barlett e Davidson, 1992).

Per effettuare l'analisi filogenetica vengono utilizzati due modelli di sistemi matematici: il metodo "Tamura-Nei" per calcolare la distanza genetica tra le sequenze (Tamura e Nei, 1993) e il metodo "Neighbor-Joining" per costruire un albero filogenetico basato

su queste differenze genetiche (Saitou e Nei, 1987). Dato che il metodo FINS è basato sulla sostituzione di sequenze nucleotidiche, è importante selezionare un frammento che mostra un'alta variabilità interspecifica ma una bassa variabilità intraspecifica per evitare ambiguità nella determinazione delle specie (Bossier, 1999). Il gene principalmente utilizzato è il gene mitocondriale *Cyt b*. Questo metodo è stato utilizzato con successo per l'identificazione di diverse specie di pesce, come il salmone, baccalà, merluzzo, aringhe in salamoia (Barlett e Davidson, 1992); specie di gadidi fresche, congelate o salate (Calo Mata *et al.*, 2003); sardine in scatola o congelate e prodotti a base di sardina (Jerome *et al.*, 2003); acciughe fresche o congelate (Santaclara *et al.*, 2006); cefalopodi freschi, congelati o in scatola e anelli di calamaro (Chapela *et al.*, 2003). Un altro frammento di DNA che è stato analizzato con questa tecnica è il gene mitocondriale *16S rRNA* che è stato usato per differenziare una varietà di specie di cefalopodi freschi, congelati e trasformati (Chapela *et al.*, 2002).

Anche se il sequenziamento è considerato il metodo più preciso e affidabile per ottenere informazioni da un frammento di PCR, tuttavia risulta essere molto lungo e costoso, e quindi difficilmente applicabile per l'uso routinario in alcuni laboratori (Lockley e Bardsley, 2000; Chapea *et al.*, 2002; Dooley *et al.*, 2005) e non è adatto per l'analisi di campioni contenenti più specie (Lenstra, 2003). Inoltre, anche se l'analisi delle sequenze con il metodo FINS è una tecnica valida per gli studi filogenetici, può risultare inappropriata per l'identificazione di specie, soprattutto quando sono coinvolti molti campioni (Carrera *et al.*, 2000).

4.7. DNA BARCODING

Il DNA *barcoding*, come metodo per l'identificazione di specie, nasce da un'iniziativa del Dr. Paul Hebert, un ricercatore dell'Università di Guelph, in Ontario. L'idea di poter identificare le varie specie utilizzando brevi sequenze di DNA, ha immediatamente attratto molti tassonomisti, genetisti e biologi evolvuzionisti.

Il DNA *barcoding* è un metodo che consente di accelerare il processo di identificazione delle specie: utilizzare brevi sequenze di DNA in modo analogo ai codici a barre dei supermercati. Ogni specie dovrà essere infatti "etichettata" con una sequenza nucleotidica di DNA univocamente associata a quella specie, da utilizzare come riferimento per comparare la sequenza di DNA di una potenziale nuova specie.

Il DNA *barcoding* può avere una duplice funzione, sia come nuovo strumento per i tassonomisti, per aumentare le loro conoscenze, sia come strumento per i meno esperti che necessitano di effettuare un' accurata identificazione (Hebert *et al.*, 2003).

Esistono geni che sono più appropriati di altri per essere utilizzati come codici a barre.

Il gene ideale deve soddisfare alcuni importanti requisiti:

1) essere sufficientemente conservato per essere amplificato, ottenendo molte copie di un gene, essenziali per poter procedere con il sequenziamento con primers uguali, che devono quindi funzionare su un vasto range di specie;

2) abbastanza divergente da consentire di identificare e distinguere anche specie strettamente imparentate tra loro;

3) non essere molto più lungo di 650 basi nucleotidiche, in quanto questa è la lunghezza ottimale affinché un gene sia sequenziato rapidamente, senza errori e con bassi costi.

La tecnica del DNA *barcoding* si basa sull'uso di primer universali per amplificare una regione di circa 650 pb del gene mitocondriale *citocromo ossidasi sub unità I (COI)* che è stata utilizzata come un "codice a barre" standard per la maggior parte delle specie animali (Hebert *et al.*, 2003; Savolainen *et al.*, 2005). Questa regione viene sequenziata per ottenere il DNA *barcode* della specie in esame e confrontarlo con la sequenza del campione di riferimento per ottenere l'identificazione di specie.

Il gene *COI* si è dimostrato un gene universale e affidabile per l'identificazione di varie specie di pesci sia marini (Ward *et al.*, 2005) che d'acqua dolce (Steinke *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2005), come i pesci piatti (Terol *et al.*, 2002; Espineira *et al.*, 2004), tonni (Terol *et al.*, 2002; Lowenstein *et al.*, 2010), acciughe (Jerome *et al.*, 2008), squali (Barbuto *et al.*, 2008; Bronwyn *et al.*, 2009), pesci gatto (Carvalho *et al.*, 2011).

Più del 95% delle specie dei vari gruppi di animali possiedono una sequenza *COI* distintiva (Hebert *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2005).

Il gene *COI* ha due principali vantaggi analitici: i primer universali per amplificare questo gene sono molto validi (Ivanova *et al.*, 2007), inoltre questo gene presenta un segnale filogenetico maggiore rispetto ad altri geni mitocondriali vasto (Hebert *et al.*, 2003).

L'uso del gene *COI* può comunque mostrare alcuni aspetti negativi, come la presenza dei cosiddetti pseudo geni mitocondriali nucleari (*numts*) che sono delle copie non funzionali del DNA mitocondriale integrati nel genoma nucleare. Infatti, alcuni studi hanno dimostrato che i *numts* sono estremamente diffusi in natura e che si verificano quando una porzione del DNA mitocondriale passa nel genoma nucleare in seguito a

fenomeni di ricombinazione o *crossing over* (Buhay, 2009). I *COI numts* sono stati trovati in alcune specie animali e sono molto comuni nei crostacei (Bensasson *et al.*, 2001; Richly *et al.*, 2004). La co-amplificazione accidentale dei *numts* non è influenzata soltanto dalla loro abbondante presenza ma anche dal tipo di primers, dal protocollo di estrazione e dal tessuto utilizzato (Bensasson *et al.*, 2001; Richly *et al.*, 2004; Pamilo *et al.*, 2007). In particolare, l'uso di primers universali, potrebbe preferenzialmente favorire l'amplificazione dei *numts* a causa della somiglianza ancestrale dei *numts* o della divergenza all'interno delle regioni del primer del DNA mitocondriale. L'assenza di una amplificazione specifica, come la presenza di bande multiple sul gel, potrebbe portare alla produzione di sequenze paraloghe, che possono essere scambiate per mtDNA ortologo (Song *et al.*, 2008). In alcuni casi, quando vi è la presenza di *numts*, è altamente probabile che un primer forward amplifichi una porzione di gene differente del primer reverse, producendo così una sequenza non corrispondente (Buhay *et al.*, 2009). Per questo motivo, sono stati proposti alcuni metodi per evitare la co-amplificazione dei *numts*, tra i quali la RT-PCR, long PCR e clonazione (Bensasson *et al.*, 2001).

Gli elementi essenziali per il DNA *barcoding* sono:

- 1) **I campioni:** musei di storia naturale, erbari, zoo, acquari, raccolte di tessuti congelati, e altre raccolte di materiale biologico rappresentano la principale fonte di campioni identificati;
- 2) **Le analisi di laboratorio:** per ottenere le sequenze di DNA da questi campioni;
- 3) **Il database:** la costruzione di una biblioteca di consultazione pubblica contenenti sequenze ottenute da esemplari di riferimento che possono essere usate per identificare le specie sconosciute. Il database principale che attualmente svolge questa funzione è il *Barcode of Life Database (BOLD)*.
- 4) **Analisi dei dati:** i campioni sono identificati sulla base del livello di corrispondenza con la sequenza di riferimento nel database.

In generale, ciò che consente di ottenere informazioni dai prodotti della PCR è la sequenza nucleotidica. Infatti, le sequenze sono allineate con sequenze di riferimento presenti sui database come GENBANK o BOLD o altre banche dati simili e, utilizzando opportuni sistemi di confronto, si ricavano dei valori di identità che consentono di identificare la specie. Questa tecnica necessita di un database ricco di informazioni ma sfortunatamente questo accade solo per alcune specie. Inoltre, per produrre una sequenza di riferimento è fondamentale la corretta identificazione morfologica dei

campioni, e in caso di campioni che non possono essere analizzati interamente, dovrebbe essere prodotta una documentazione fotografica. Tuttavia, tutti i campioni utilizzati per la realizzazione del database, dovrebbero essere chiaramente identificati con un codice univoco e conservati per ulteriori analisi.

La maggior parte degli studi sull'ispezione degli alimenti che necessitano di un'identificazione di specie è basato su alcuni database come **Genbank** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) dove sono raccolte le sequenze nucleotidiche di un gran numero di specie. Questo database è stato criticato per il fatto che alcune sequenze non corrispondono alla specie dichiarata (Forster, 2003; Nillson *et al.*, 2006), molto probabilmente in relazione a una contaminazione o ad un'errata identificazione dell'esemplare, per la mancanza di alcune informazioni e per la terminologia incoerente. Nel 2005, in seguito al crescente impiego del DNA *barcoding* nell'identificazione di specie ittiche (Ward *et al.*, 2005; Wong & Hanner, 2008; Miller e Mariani, 2010; Barbuto *et al.*, 2010; Filonzi *et al.*, 2010) è stato lanciato un nuovo progetto di ricerca dal *Consortium for the Barcode of Life* (**CBOL**; <http://www.barcoding.si.edu/>) : *Fish Barcode of Life Initiative* (**FISHBOL**; <http://www.fishbol.org>) i cui dati sono inclusi in un unico database principale chiamato **BOLD** (*Barcode of Life Data System*, <http://www.barcodinglife.org/views/login.php>; Ratnasingham & Hebert, 2007) che consente l'acquisizione, la conservazione, l'analisi e la pubblicazione delle sequenze di DNA.

L'obiettivo è quello di catalogare tutte le forme di vita in termini di DNA, associando ad ogni organismo vivente una o poche sequenze di DNA in grado di identificarlo univocamente.

4.7.1. BOLD

Il *Barcode of Life Data System* è dotato di uno strumento per la caratterizzazione di specie sconosciute basato sull'analisi della loro sequenza: *Identification System* (**IDS**; <http://www.barcodinglife.org/views/idrequest.php>) che si basa sul *Reference Barcode Database* che contiene soltanto le sequenze che soddisfano alcune condizioni specifiche.

Per essere depositate nel database, le sequenze geniche devono rispettare alcuni requisiti: devono derivare da una specifica regione del gene; devono rispettare gli standard qualitativi; ci deve essere un collegamento tra la sequenza e il campione d'origine (Hanner *et al.*, 2007).

Le sequenze vengono accuratamente esaminate e se viene individuato un potenziale errore, il mittente viene informato e la sequenza viene contrassegnata. BOLD inoltre determina un "PHRED score" (Ewing & Green, 1998) per ogni posizione nucleotidica e un valore medio per l'intera sequenza. Utilizzando questi dati ogni sequenza viene collocata in una delle quattro categorie: sequenza mancata; sequenza di bassa qualità (mean PHRED < 30); sequenza di qualità media (mean PHRED= 30-40); sequenza di alta qualità (mean PHRED > 40).

In BOLD ci sono due funzioni di identificazione. Una, testa la validità di identificazioni già esistenti e l'altra funzione assegna un'identificazione ai campioni che non hanno una collocazione tassonomica. Il sistema di identificazione su BOLD consente l'identificazione se la sequenza mostra una stretta corrispondenza, con una divergenza inferiore all'1%, con la sequenza di riferimento. In quei pochi casi dove 2 o più taxa hanno in comune delle sequenze con una divergenza inferiore all' 1% sono mostrate tutte le possibili specie.

Quando viene trovata una corrispondenza a livello di specie, l'utente può accedere alla pagina della specie che contiene tutte le informazioni disponibili sulla specie presenti in BOLD o anche in altri siti correlati. Quando non viene trovata una corrispondenza a livello di specie, la sequenza viene assegnata a un genere nei casi in cui mostra una divergenza rispetto a una sequenza di riferimento di quel genere che è inferiore al 3%. Rispetto ai database classici il BOLD presenta delle condizioni più stringenti per il deposito delle sequenze: infatti, le sequenze che vengono depositate nel sistema devono riportare le seguenti informazioni:

Informazioni relative al campione:

- Il nome della specie;
- Il voucher number, cioè il codice identificativo assegnato dall'istituto che detiene il tessuto o l'organismo di riferimento;
- I dati relativi alla raccolta (data, località e nominativo del raccoglitore);
- Colui che ha identificato morfologicamente l'esemplare.

Informazioni relative alla sequenza:

- Sequenze non inferiori a 500pb;
- Primers utilizzati per l'amplificazione;
- Trace files delle sequenze.

Tutti i dati forniti vengono poi forniti agli utenti del sistema in due pagine principali.

CAPITOLO 5

MATERIALI E METODI

5.1. RACCOLTA DEI CAMPIONI DI RIFERIMENTO E COMMERCIALI

Ottantanove campioni di pesce fresco intero sono stati raccolti e identificati morfologicamente dal Veterinario Ufficiale del Mercato Ittico di Milano. Duecentosette campioni di tessuto conservati in etanolo sono stati gentilmente forniti da Istituti di ricerca (Tabella 5.1.). Cinquantacinque campioni commerciali sono stati acquistati in Italia nei mercati al dettaglio e nella grande distribuzione (Tabella 5.2.). Ogni campione di pesce intero o di tessuto è stato portato nel nostro laboratorio, etichettato con un codice interno e stoccato a -20°C .

5.2. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI COTTI

Trentaquattro esemplari interi appartenenti alle seguenti specie: *Dentex dentex*, *Diplodus puntazzo*, *D. sargus*, *D. vulgaris*, *Pagellus bogaraveo*, *P. erythrinus*, *Pagrus caeruleostictus*, *P. pagrus* e *Spondyllosoma cantharus* sono stati impiegati per la preparazione di campioni cotti utilizzando alcune ricette tradizionali. In particolare, una parte degli esemplari sono stati cotti interi in forno preriscaldato a 180°C per circa 25-40 minuti a seconda della taglia, gli altri sono stati sfilettati e cucinati in padella per circa 10-15 minuti. Da questi pesci sono stati prelevati dei campioni di tessuto, utilizzati per l'estrazione del DNA, prima e dopo la cottura.

5.3. ESTRAZIONE DEL DNA E VALUTAZIONE DEL LIVELLO DI DEGRADAZIONE MEDIANTE ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

I campioni di riferimento in etanolo sono stati lavati e reidratati in TRIS base 100 mM (pH 7,8) per 30 minuti a temperatura ambiente nel termo-shaker. L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire da almeno 20 mg di tessuto seguendo le procedure descritte da Armani *et al.*, 2012. L'estrazione del DNA a partire da campioni di tessuto freschi e cotti è stata effettuata seguendo la procedura descritta da Armani *et al.* 2014. La concentrazione del DNA è stata determinata utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop ND 1000 (NanoDrop, Technologies, Wilmington, DE, US) misurando l'assorbanza a

260 nm. La purezza del DNA è stata valutata mediante il rapporto dell'assorbanza a 260/280 nm e a 260/230 nm.

Mille nanogrammi di DNA totale sono stati sottoposti a elettroforesi in gel d'agarosio GellyPhorLE (Euroclone, Wetherby, UK) all'1%, colorati con GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA), e visualizzati mediante transilluminazione ultravioletta. La dimensione dei frammenti di DNA è stata stimata utilizzando il marker molecolare SharpMass™50-DNA ladder e SharpMass™1-DNA ladder (Euroclone, Wetherby, UK).

5.4. AMPLIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEL GENE *COI*

Alcuni primer universali, fra quelli comunemente utilizzati per l'amplificazione della regione del "barcode" (Tabella 5.3.), sono stati allineati con le sequenze *COI* complete delle specie di sparidi disponibili su GenBank (NC_010977, EF506764, NC_0185053, JQ746035, NC_009502, NC_005146, NC_003196, EF107158, DQ248312). Sono stati selezionati quelli proposti da Handy *et al.* 2011, il primer reverse è stato leggermente modificato (SPACOIREV) e ad entrambi i primer è stata aggiunta una coda oligonucleotidica proposta da Steffens, Sutter & Roemer, (1993) (Tabella 5.3.).

Successivamente, un frammento di 655 pb della regione 5' del gene *COI* è stato amplificato dal DNA estratto dai campioni di riferimento freschi per testare l'efficacia di amplificazione dei primers con il seguente protocollo di PCR: 20 µl di volume di reazione contenente 2 µl di un buffer 10x (5Prime, Gaithersburg, USA), 100 µM di ogni dNTP (Euroclone S.p.A-Life Sciences Division, Pavia, Italy), 300 nM del primer forward, 400 nM del primer reverse, 25 ng/µL di BSA (BSA purificata 100X, Bew England BIOLABS® Inc. Ipswich, MA, USA), 1,25 U di PerfectTaq DNA Polimerasi (5Prime, Gaithersburg, USA), 100 ng of DNA e DNase free water (Water Mol. Bio. Grade, DNase-RNase and Protease free, 5Prime GmbH, Hamburg, Germany) con il seguente programma: denaturazione a 94 °C per 3 minuti; 45 cicli a 94 °C per 30 secondi, 53 °C per 30 secondi, 72 °C per 35 secondi; estensione a 72 °C per 10 minuti. I prodotti della PCR (5 µL) sono stati verificati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,8%. La presenza di frammenti della lunghezza prevista è stata valutata mediante il confronto con il marker SharpMass™50-DNA ladder (Euroclone, Wetherby, UK). Successivamente, i campioni che hanno presentato gli ampliconi attesi sono stati purificati e sequenziati dall'High-Throughput Genomics Center (Washington, USA).

Lo stesso protocollo di PCR e sequenziamento è stato successivamente utilizzato per l'amplificazione del DNA estratto dai campioni cotti, in etanolo e commerciali.

5.5. ANALISI DELLE SEQUENZE E CONFRONTO CON I DATABASES

Le sequenze ottenute sono state analizzate utilizzando *Clustal W in MEGA version 5.2.2* (Tamura, Peterson, Peterson, Stecher, Nei & Kumar, 2011). Dopo un'analisi visiva, è stata effettuata una piccola rettifica manuale. Tutte le sequenze di riferimento sono state depositate su BOLD dopo aver creato un progetto dedicato. Prima del deposito tutte le sequenze sono state sottoposte ad un'analisi BLAST su GenBank e analizzate usando il sistema di identificazione "IDS" su BOLD (Species Level Barcode Records) (Ratnasingham, 2007) per valutare la concordanza tra la specie identificata sulla base dell'analisi morfologica e l'*Operational Taxonomic Units* (OTUs) riconosciuta dall'analisi molecolare (Ratnasingham, 2013). Una corrispondenza di almeno il 98% è stata utilizzata come criterio per indicare una potenziale identificazione di specie (Barbutto et al., 2010). Inoltre, tutte le sequenze depositate sono state utilizzate per produrre un rapporto di discordanza c.d. *Barcode Index Number (BIN)* (http://www.barcodinglife.org/index.php/resources/handbook?chapter=5_analysis_extended.html§ion=bin_discord).

Dal momento che le sequenze *COI* ottenute in questo studio a partire da campioni commerciali non sono state ottenute da campioni di riferimento o da campioni accuratamente identificati, non sono state depositate sul database e sono state utilizzate soltanto per valutare il potere discriminatorio delle sequenze analizzate.

Specie	Denominazione commerciale	Istituto	Numero di campioni	Provenienza (Area FAO)
<i>Acanthopagrus berda</i>	Goldsilk seabream	Biodiversity Research Center - Academia Sinica Taipei, TAIWAN	4	61
		Louisiana State University - Museum of Natural Science Baton Rouge, LA, USA	1	71
<i>Acanthopagrus bifasciatus</i>	Pagro bifasciato	Department of Biotechnology and Biosciences - University of Milan –Bicocca, Milan, Italy	3	**ND
<i>Acanthopagrus butcheri</i>	NR	The Academy of Natural Sciences of Drexel University - ANSP Ichthyology Philadelphia, Pennsylvania, USA	1	57.5.2
		Australian Center for Applied Acquaculture Research – Challenger Institute of Technology Fremantle, Western Australia	7	57
<i>Acanthopagrus latus</i>	Yellowfin seabream	Fisheries Research Laboratory, Mie University Mie, JAPAN	2	61
		Center for Molecular Biodiversity Research - National Museum of Nature and Science Tsukuba, Ibaraki, Japan	3	
		Questo studio	1	
<i>Acanthopagrus pacificus</i>	NR	Center for Molecular Biodiversity Research - National Museum of Nature and Science Tsukuba, Ibaraki, Japan	3	61
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	Blackhead seabream	Biodiversity Research Center - Academia Sinica Taipei, TAIWAN	4	61
		Fisheries Research Laboratory, Mie University Mie, JAPAN	2	
		Kanagawa Prefectural Museum of Natural History Odawara, Kanagawa, Japan	1	
<i>Acanthopagrus sivicolus</i>	NR	Center for Molecular Biodiversity Research - National Museum of Nature and Science Tsukuba, Ibaraki, Japan	3	61
<i>Archosargus probatocephalus</i>	Sheepshead	University of Kansas - Biodiversity Institute, Dyche Hall Lawrence, KS, USA	2	31
		North Carolina Museum of Natural Sciences Raleigh, NC, USA	1	
		Fish and Wildlife Research Institute St. Petersburg, FL, USA	1	
		Florida Museum of Natural History –Genetic Resources Repository, University of Florida Gainesville, FL, USA	1	
		Mississippi Museum of Natural Science Jackson, MS, USA	1	
<i>Archosargus rhomboidalis</i>	Western atlantic seabream	University of Kansas - Biodiversity Institute, Dyche Hall Lawrence, KS, USA	2	31
<i>Argyrops bleekeri</i>	Taiwan tai	Biodiversity Research Center - Academia Sinica Taipei, TAIWAN	1	61
		Center for Molecular Biodiversity Research - National Museum of Nature and Science Tsukuba, Ibaraki, Japan	2	
		American Museum of Natural History - Department of Ichthyology New York, NY,	1	

		USA		
<i>Argyrops filamentosus</i>	Pagro indiano	South African Institute for Aquatic Biodiversity Grahamstown, South Africa	2	51.8
<i>Argyrops spinifer</i>	Pagro reale	The Academy of Natural Sciences of Drexel University - ANSP Ichthyology Philadelphia, Pennsylvania, USA	1	61
		South African Institute for Aquatic Biodiversity Grahamstown, South Africa	5	51.8
		Questo studio	2	
<i>Boops boops</i>	Boga	Department of Zoology - George S. Wise Faculty of Life Science Tel Aviv University	3	37.2.2
		Wholesale fish market of Scoglitti Ragusa, Italy	3	
<i>Calamus arctifrons</i>	Grass porgy	The Academy of Natural Sciences of Drexel University - ANSP Ichthyology Philadelphia, Pennsylvania, USA	1	31
		Florida Museum of Natural History –Genetic Resources Repository, University of Florida Gainesville, FL, USA	5	
		Fish and Wildlife Research Institute St. Petersburg, FL, USA	1	
<i>Calamus bajonado</i>	Jolthead porgy	The Academy of Natural Sciences of Drexel University - ANSP Ichthyology Philadelphia, Pennsylvania, USA	1	31
		Fish and Wildlife Research Institute St. Petersburg, FL, USA	4	
<i>Calamus brachysomus</i>	Pacific porgy	Institution of Oceanography - University of California La Jolla, CA, USA	1	77
<i>Calamus calamus</i>	Saucereye porgy	University of Kansas - Biodiversity Institute, Dyche Hall Lawrence, KS, USA	3	31
		Florida Museum of Natural History –Genetic Resources Repository, University of Florida Gainesville, FL, USA	1	**ND
<i>Calamus leucosteus</i>	NR	US FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition College Park, MD, USA*	1	31
		University of Kansas - Biodiversity Institute, Dyche Hall Lawrence, KS, USA	3	
		Fish and Wildlife Research Institute St. Petersburg, FL, USA	2	
<i>Calamus nodosus</i>	NR	University of Kansas - Biodiversity Institute, Dyche Hall Lawrence, KS, USA	2	31
		Fish and Wildlife Research Institute St. Petersburg, FL, USA	3	
<i>Calamus penna</i>	Sheepshead porgy	Fish and Wildlife Research Institute St. Petersburg, FL, USA	2	31
<i>Calamus pennatula</i>	NR	The Academy of Natural Sciences of Drexel University - ANSP Ichthyology Philadelphia, Pennsylvania, USA	1	31
<i>Calamus proridens</i>	Littlehead porgy	Fish and Wildlife Research Institute St. Petersburg, FL, USA	4	31
		Florida Museum of Natural History –Genetic	1	

		Resources Repository, University of Florida Gainesville, FL, USA		
<i>Cheimierius nufar</i>	Dentale indiano (Dentice rosa)	South African Institute for Aquatic Biodiversity Grahamstown, South Africa	5	51.6 51.8
<i>Chrysoblephus puniceus</i>	Slinger seabream	The University of Salford – School of Environment & Life Sciences United Kingdom	1	51
<i>Dentex angolensis</i>	Dentice atlantico	California Academy of Sciences San Francisco, CA, USA	4	34.3.1 34.3.4
		Questo studio	2	34
<i>Dentex canariensis</i>	Dentice atlantico	Michigan State University – College of Veterinary Medicine, Department of Pathobiology and Diagnostic Investigation, Aquatic Animal Health Laboratory East Lansing, MI, USA	1	34.3.1
		Questo studio	1	34
<i>Dentex congoensis</i>	Congo dentex	California Academy of Sciences San Francisco, CA, USA	1	**ND
<i>Dentex dentex</i>	Dentice	The Academy of Natural Sciences of Drexel University - ANSP Ichthyology Philadelphia, Pennsylvania, USA	1	37
		Questo studio	4	37.1.3
			2	34
<i>Dentex gibbosus</i>	Dentice gibboso	Michigan State University - College of Veterinary Medicine Department of Pathobiology and Diagnostic Investigationm Aquatic Animal Health Laboratory East Lansing, MI, USA	1	34.3.1
<i>Dentex macrophthalmus</i>	Dentice occhione	Department of Zoology - George S. Wise Faculty of Life Science Tel Aviv University	3	37.3.2
<i>Dentex maroccanus</i>	Dentice marocchino	Department of Zoology - George S. Wise Faculty of Life Science Tel Aviv University	3	37.3.2
<i>Diplodus annularis</i>	Sarago sparaglione	Department of Zoology - George S. Wise Faculty of Life Science Tel Aviv University	3	37.3.2
		Questo studio	2	
<i>Diplodus argenteus</i>	Sarago atlantico	The Academy of Natural Sciences of Drexel University - ANSP Ichthyology Philadelphia, Pennsylvania, USA	1	31
<i>Diplodus bellotii</i>	Senegal seabream	Michigan State University - College of Veterinary Medicine Department of Pathobiology and Diagnostic Investigation Aquatic Animal Health Laboratory East Lansing, MI, USA	1	*ND
<i>Diplodus cervinus</i>	Sarago	South African Institute for Aquatic Biodiversity Grahamstown, South Africa	2	51.8
		American Museum of Natural History - Department of Ichthyology - New York, NY, USA	1	**ND

<i>Diplodus cervinus hottentotus</i>	Sarago	Institution of Oceanography - University of California La Jolla, CA, USA	1	47
		University of Kansas - Biodiversity Institute, Dyche Hall Lawrence, KS, USA	1	47.2.2
<i>Diplodus holbrookii</i>	Spottail seabream	The Academy of Natural Sciences of Drexel University - ANSP Ichthyology Philadelphia, Pennsylvania, USA	2	31
		Fish and Wildlife Research Institute St. Petersburg, FL, USA	3	
<i>Diplodus noct</i>	Redsea seabream	Department of Biotechnology and Biosciences - University of Milan –Bicocca Milan, Italy	2	51.1
<i>Diplodus puntazzo</i>	Sarago pizzuto	Questo studio	5	37.1.3
<i>Diplodus sargus</i>	Sarago	Department of Zoology - George S. Wise Faculty of Life Science, Tel Aviv University	3	37.3.2
		Museu Nacional de História Natural e da Ciência Lisboa, Portugal	1	27 IXa
		Questo studio	6	37.1.3
<i>Diplodus vulgaris</i>	Sarago	Department of Zoology - George S. Wise Faculty of Life Science, Tel Aviv University	3	**ND
		Questo studio	4	
<i>Evygnis cardinalis</i>	Threadfin porgy	Biodiversity Research Center - Academia Sinica Taipei, TAIWAN	8	61
<i>Evygnis tumifrons</i>	NR	Graduate School of Biosphere Science - Hiroshima University Hiroshima, Japan	2	61
		Biodiversity Research Center - Academia Sinica Taipei, TAIWAN	3	
<i>Lagodon rhomboides</i>	Pinfish	US FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition College Park, MD, USA*	1	31
		University of Kansas - Biodiversity Institute, Dyche Hall Lawrence, KS, USA	3	
		Florida Museum of Natural History –Genetic Resources Repository, University of Florida Gainesville, FL, USA	1	
		Louisiana State University - Museum of Natural Science Baton Rouge, LA,USA	1	
<i>Lithognathus mormyrus</i>	Mormora	The University of Salford - School of Environment & Life Sciences, United Kingdom	1	37.1.1
		Department of Zoology - George S. Wise Faculty of Life Science, Tel Aviv University	3	37.3.2
		Questo studio	3	
<i>Oblada melanura</i>	Occhiata	The University of Salford - School of Environment & Life Sciences, United Kingdom	1	37.1.2
		Questo studio	10	37.1.3
<i>Pagellus acarne</i>	Pagello	Department of Zoology - George S. Wise Faculty of Life Science, Tel Aviv University	3	37.2.2
		Wholesale fish market of Scoglitti Ragusa, Italy	3	
<i>Pagellus bellotti</i>	Pagello atlantico	Michigan State University - College of Veterinary Medicine, Department of	1	34.3.1

		Pathobiology and Diagnostic Investigation, Aquatic Animal Health Laboratory East Lansing, MI, USA		
<i>Pagellus bogaraveo</i>	Pagello	Wholesale fish market of Scoglitti Ragusa, Italy	3	37.2.2
		The Academy of Natural Sciences of Drexel University - ANSP Ichthyology Philadelphia, Pennsylvania, USA	1	37.1.3
		Questo studio	4	37.1.1
<i>Pagellus erythrinus</i>	Pagello fragolino	The University of Salford - School of Environment & Life Sciences, United Kingdom	1	37.1.2
		Questo studio	5	37.1.3
<i>Pagrus africanus</i>	Pagro africano	Departamento de Oceanografia e Pescas - Universidade dos Açores, Açores, Portugal	1	34.3.2
<i>Pagrus auratus</i>	Silver seabream	The Academy of Natural Sciences of Drexel University - ANSP Ichthyology Philadelphia, Pennsylvania, USA	1	77
		Plant & Food Research Nelson - Seafood and Marine Extracts, Nelson, New Zeland	6	81
		Cawthron Institute, Nelson, New Zeland	1	
<i>Pagrus auriga</i>	Pagro	Michigan State University - College of Veterinary Medicine, Department of Pathobiology and Diagnostic Investigation, Aquatic Animal Health Laboratory East Lansing, MI, USA	1	34.3.1
		Questo studio	1	
<i>Pagrus caeruleostictus</i>	Pagro	Department of Zoology - George S. Wise Faculty of Life Science, Tel Aviv University	3	37.3.2
		California Academy of Sciences San Francisco, CA, USA	2	34.3.1 34.1.3
		Questo studio	2	37.1.3
<i>Pagrus major</i>	Pagro del Giappone	Biodiversity Research Center - Academia Sinica Taipei, Taiwan	4	61
		Graduate School of Biosphere Science - Hiroshima University, Hiroshima, Japan	2	
<i>Pagrus pagrus</i>	Pagro	Wholesale fish market of Scoglitti Ragusa, Italy	3	37.2.2
		US FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition College Park, MD, USA*	1	31
		Questo studio	5	37.1.3
<i>Rhabdosargus haffara</i>	Haffara seabream	Department of Biotechnology and Biosciences - University of Milan –Bicocca Milan, Italy	1	51.1
<i>Rhabdosargus sarba</i>	Sarago dorato	Biodiversity Research Center - Academia Sinica Taipei, Taiwan	2	61
		Fisheries Research Laboratory, Mie University Mie, Japan	2	
		Kanagawa Prefectural Museum of Natural History Odawara, Kanagawa, Japan	1	

<i>Sarpa salpa</i>	Salpa	Mercato Ittico Scoglitti Ragusa, Italy	2	37.2.2
		Questo studio	3	37
<i>Sparus aurata</i>	Orata	Questo studio	5	37.1.3
<i>Spondyliosoma cantharus</i>	Tanuta	Museu Nacional de História Natural e da Ciência Lisboa, Portugal	1	27 IXa
		Questo studio	5	37.1.3
<i>Stenotomus caprinus</i>	Longspine porgy	The Academy of Natural Sciences of Drexel University - ANSP Ichthyology, Philadelphia, Pennsylvania, USA	1	31
		University of Kansas - Biodiversity Institute, Dyche Hall Lawrence, KS, USA	1	
		Fish and Wildlife Research Institute St. Petersburg, FL, USA	2	
<i>Stenotomus chrysops</i>	Scup	University of Kansas - Biodiversity Institute, Dyche Hall Lawrence, KS, USA	4	21.6
		The Academy of Natural Sciences of Drexel University - ANSP Ichthyology Philadelphia, Pennsylvania, USA	1	21.6B
		North Carolina Museum of Natural Sciences Raleigh, NC, USA	1	31
		Herpetology and Ichthyology - Division of Vertebrate Zoology, Yale Peabody Museum of Natural History New Haven, CT, USA	1	21.6A
		US FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition College Park, MD, USA*	1	21
<i>Virididentex acromegalus</i>	Bulldog dentex	Departamento de Oceanografia e Pescas - Universidade dos Açores Açores, Portugal	2	34.3.2

Tabella 5.1. Campioni istituzioni.

* I campioni di DNA sono stati utilizzati soltanto per testare le performances di amplificazione dei primers e non sono stati sequenziati.

**ND = non disponibile

Codice	Origine	Informazione sull'etichetta		Prodotto
		Denominazione commerciale	Denominazione scientifica	
MS1	GDO	Pagello	NR	Intero
MS2	GDO	Dentale indiano	<i>Cheimerius nufar</i>	Intero
MS3	GDO	Dentice atlantico	<i>Dentex angolensis</i>	Filletti
MS4	GDO	Dentice atlantico	<i>Dentex angolensis</i>	Filletti
MS5	GDO	Dentice atlantico	<i>Dentex canariensis</i>	Intero
MS6	GDO	Dentice	<i>Dentex dentex</i>	Intero
MS7	VD	Sarago sparaglione	<i>Diplodus annularis</i>	Intero
MS8	GDO	Sarago sparaglione	<i>Diplodus annularis</i>	Intero
MS9	VD	Sarago pizzuto	<i>Diplodus puntazzo</i>	Intero
MS10	GDO	Sarago	<i>Diplodus sargus</i>	Intero
MS11	VD	Sarago	<i>Diplodus vulgaris</i>	Intero
MS12	VD	Mormora	<i>Lithognathus mormyrus</i>	Intero
MS13	GDO	Occhiata	<i>Oblada melanura</i>	Filetti
MS14	GDO	Occhiata	NR	Filetti
MS15	GDO	Occhiata	NR	Filetti
MS16	VD	Pagello atlantico	<i>Pagellus bellotii</i>	Intero
MS17	VD	Pagello fragolino	<i>Pagellus erythrinus</i>	Intero
MS18	GDO	Pagro	<i>Pagrus auriga</i>	Intero
MS19	GDO	Pagro	<i>Pagrus caeruleostictus</i>	Intero
MS20	GDO	Pagro	<i>Pagrus caeruleostictus</i>	Intero
MS21	GDO	Salpa	<i>Sarpa salpa</i>	Intero
MS22	GDO	Salpa	<i>Sarpa salpa</i>	Intero
MS23	GDO	Salpa	<i>Sarpa salpa</i>	Intero
MS24	GDO	Orata	<i>Sparus aurata</i>	Filletti
MS25	VD	Orata	<i>Sparus aurata</i>	Filletti
MS26	GDO	Orata	<i>Sparus aurata</i>	Filletti
MS27	GDO	Orata	<i>Sparus aurata</i>	Filletti
MS28	VD	Tanuta	<i>Spondylisoma cantharus</i>	Intero
MS29	GDO	Pagro	NR	Intero
MS30	GDO	Pagro	NR	Intero
MS31	GDO	Pagro	NR	Intero
MS32	GDO	Pagro rosa indo pacifico	<i>Pagrus auratus</i>	Intero
MS33	GDO	Pagro rosa indo pacifico	<i>Pagrus auratus</i>	Intero
MS34	GDO	Dentice rosa*	<i>Cheimerius nufar</i>	Intero
MS35	GDO	Dentice rosa*	<i>Cheimerius nufar</i>	Intero
MS36	GDO	Pagro reale	NR	Intero
MS37	GDO	Pagro	NR	Filetti
MS38	GDO	Sarago sparaglione	<i>Diplodus annularis</i>	Intero
MS39	GDO	Pagello	NR	Intero
MS40	GDO	Pagello	NR	Intero
MS41	GDO	Pagello	NR	Intero
MS42	GDO	Pagello	NR	Intero
MS43	GDO	Pagro	NR	Intero
MS44	GDO	Pagro	NR	Intero
MS45	GDO	Pagro	NR	Intero
MS46	Ristorazione	Dentice	NR	Intero
MS47	Ristorazione	Pagro	NR	Intero
MS48	Ristorazione	Pagello	NR	Intero
MS49	Ristorazione	Pagello	NR	Intero
MS50	Ristorazione	Orata	NR	Intero

MS51	Ristorazione	Sarago pizzuto	NR	Intero
MS52	Ristorazione	Sarago pizzuto	NR	Intero
MS53	Ristorazione	Salpa	NR	Intero
MS54	Ristorazione	Occhiata	NR	Intero
MS55	Ristorazione	Boga	NR	Intero

Tabella 5.2. Campioni commerciali.

* Sinonimo di Dentale indiano (nome valido).

GDO = Grande Distribuzione Organizzata; VD = Vendita al Dettaglio

Denominazione primer	Sequenza	Posizione	Lunghezza amplicone (pb)	Ref.
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	4417-4441	708	Folmer, 1994
HC02198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	5100-5125		
FishF1	TCAACCAACCACAAGACATTGGCAC	4419-4444	703/706	Ward, 2005
FishF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	4419-4444		
FishR1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	5100-5125		
FishR2	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	5097-5122		
COIF-ALT	ACAAATCAYAARGAYATYGG	4422-4441	698	Mikkelsen, 2006
COIR-ALT	TTCAGGRTGNCCRAARAAYCA	5100-5120		
FF2d	TTCTCCACCAACCACAARGAYATYGG	4416-4441	707	Ivanova, 2007
FR1d	CACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	5097-5123		
FISH-BCL	TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC	4419-4444	706	Baldwin, 2009
FISH-BCH	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	5100-5125		
COI-Fish-F	TTCTCAACTAACCAYAAAGAYATYGG	4416-4441	709	Kochzius, 2010
COI-Fish-R	TAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA	5100-5125		
FISHCOILBC_ts	CTCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC	4418-4444	705	Handy, 2011
FISHCOIHBC_ts	ACTTCYGGGTGRCCRAARAATCA	5100-5123		
SPACOIREV	ACTTCYGGGTGNCCRAARAATCA	5100-5123	705*	This study
REVshort1	GGYATNACTATRAAGAAAATTATTAC	4584-4610	192*	This study
M13F	CACGACGTTGTAAAACGA	-	-	Steffen, 1993
M13R	GGATAACAATTTACACAGG	-	-	

Tabella 5.3. Primers universali per l'amplificazione del gene COI da tessuto di pesce.

La posizione dei primers è stata calcolata sulla sequenza del *Pagrus auriga* (GenBank Accession Number AB124801). * La lunghezza si riferisce all'amplicone generato usando il primer forward FISHCOILBC_ts.

CAPITOLO 6

RISULTATI E DISCUSSIONI

6.1. RACCOLTA DEI CAMPIONI

Con l'obiettivo di creare un database di sequenze sufficientemente ampio e rappresentativo della Famiglia Sparidae, le specie da analizzare sono state selezionate in accordo con gli elenchi delle denominazioni commerciali dei seguenti Paesi: Italia, Regno Unito, Francia, Spagna, Germania, USA ed Australia. Nonostante in questi elenchi siano riportate 85 specie differenti è stato difficile reperire dei campioni freschi dal mercato. Quindi, per la maggior parte di esse sono stati utilizzati campioni di tessuto conservati in etanolo.

Per la realizzazione di un progetto su BOLD, le sequenze *COI* devono essere ottenute a partire da campioni prelevati da specie la cui collocazione tassonomica sia validata (esemplari di riferimento). In questo studio, grazie alla collaborazione tra Istituti di Ricerca, Associazioni, Musei (Tabella 5.1), sono stati raccolti 296 campioni di tessuto a partire da specie di riferimento appartenenti a 21 generi differenti. In totale, sono state recuperate 64 specie con un numero medio di 5 campioni per ogni specie, ad eccezione di *Calamus brachysomus*, *C. pennatula*, *Chrysoblephus puniceus*, *Dentex congoensis*, *D. gibbosus*, *Diplodus argenteus*, *Pagellus bellottii*, *Pagrus africanus* e *Rhabdosargus haffara* per i quali è stato recuperato solo un campione (Tabella 5.1). Infine, alcune specie come *Acanthopagrus pacificus*, *A. schlegelii*, *A. sivicolus*, *Evynnis cardinalis*, *Rhabdosargus haffara*, e *Virididentex acromegalus*, pur non considerate negli elenchi ufficiali, sono state comunque incluse nello studio.

6.2. VALUTAZIONE DEL LIVELLO DI DEGRADAZIONE DEL DNA MEDIANTE ELETTROFORESI SU GEL

6.2.1. Campioni cotti

L'elettroforesi ha mostrato che, in generale, i campioni cotti presentavano un maggiore grado di degradazione rispetto a quelli freschi. La degradazione del DNA è risultata estremamente variabile tra i campioni che, in alcuni casi, hanno mostrato dei frammenti non più lunghi di 300 pb. In particolare, è stato visto che il livello di degradazione era più accentuato nei campioni di DNA ottenuto da specie di dimensioni più piccole come

P. erythrinus e *B. boops* rispetto a quelli di dimensioni maggiori come *P. bogaraveo* e *P. caereulostictus*. Infine, non sono state osservate differenze marcate tra i vari processi di cottura.

6.2.2. Campioni conservati in etanolo

A causa della quantità ridotta di DNA disponibile (in genere dai musei è stato fornito soltanto qualche mg di tessuto) l'elettroforesi del DNA totale è stata effettuata soltanto su un ridotto numero di campioni ottenuti da tessuto conservato in etanolo. Il livello di degradazione si è rivelato estremamente variabile (da 100 a 1kpb) anche nell'ambito dei campioni provenienti dallo stesso museo.

6.3. AMPLIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEL GENE *COI*

L'obiettivo del BOLD è quello di creare un sistema di identificazione basato soltanto sulla prima parte del gene *COI*. Quindi, a causa del fatto che il sequenziamento non permette di ottenere le regioni di *annealing* dei primers, tutte le sequenze depositate hanno la lunghezza di circa 600 pb o anche meno. La mancata disponibilità della sequenza completa del gene *COI* può rappresentare un limite soprattutto nel caso in cui i primers debbano essere modificati per migliorare l'efficienza dell'amplificazione (Armani *et al.*, 2012a). In questo studio, per esempio, le sequenze *COI* complete erano disponibili solo per 9 specie sulle 133 specie totali della famiglia Sparidae.

Considerando che prima di cominciare un progetto di DNA *barcoding* su un nuovo gruppo tassonomico è consigliabile testare l'efficienza dei primers sul DNA estratto da campioni freschi di specie del gruppo target, i primers selezionati (FISHCOILBC_ts e SPACOIREV) (Tabella 5.3) sono stati prima testati sul DNA estratto da esemplari freschi, appartenenti a 19 specie, e poi impiegati per l'amplificazione del DNA ottenuto dai campioni freschi, cotti e conservati in etanolo.

6.3.1. Performances di amplificazione

La diversa origine e modalità di conservazione dei campioni di tessuto potrebbe influire sulla capacità di amplificazione dei primers. Per questo motivo la specificità e la percentuale di successo dell'amplificazione non è stata calcolata sulla totalità dei campioni analizzati ma rispetto al numero delle specie raccolte.

La specificità dei primers è definita come la frequenza con cui si verifica un appaiamento errato: primers con bassa specificità tendono a produrre ampliconi

indesiderati (Dieffenbach *et al.*, 1993). I primers utilizzati in questo lavoro hanno mostrato una specificità del 100% per la regione target, infatti non sono stati rilevati ampliconi aspecifici. Complessivamente, il tasso di successo dell'amplificazione è stato del 95%. In particolare, ha raggiunto il 100% (è stato amplificato almeno un campione di DNA per ogni specie) nel caso del DNA estratto dai campioni freschi.

6.3.2. Amplificabilità del DNA

Il grado di amplificabilità del DNA su tutti i campioni analizzati è stato, complessivamente, del 78%.

Campioni freschi e cotti: il DNA ottenuto dai campioni freschi è stato amplificato con successo nell'82,5% dei casi mentre, la percentuale di ampliconi recuperati è diminuita drasticamente dopo la cottura: soltanto il 50% dei campioni di DNA hanno dato l'amplicone previsto. Nel caso dell'Occhiata (*Oblada melanura*), nonostante siano stati utilizzati campioni freschi, sono stati amplificati soltanto 2 DNA *barcodes* completi su 10 campioni analizzati. Non considerando questa specie, il tasso di amplificabilità del DNA è aumentato fino al 90%.

La mancata amplificazione del DNA estratto dai campioni freschi non può essere dovuta ad un *annealing* errato dei primers (dal momento che altri campioni di DNA della stessa specie sono stati amplificati con successo con gli stessi primers) ma potrebbe essere correlata al grado di degradazione del DNA indotto da fenomeni autolitici che si sono verificati nei campioni non correttamente conservati. Infatti, come riportato da Rodriguez-Ezpeleta *et al.*, 2013, c'è una correlazione tra il momento in cui il tessuto viene prelevato dopo che il pesce è morto e l'integrità del DNA. In alcuni casi, anche il DNA estratto da tessuto prelevato da campioni conservati per più di 5 giorni a 4°C potrebbe essere completamente degradato.

La ridotta amplificabilità del DNA estratto dai prodotti cotti concorda con il livello di degradazione osservato durante l'elettroforesi su gel. Infatti, i trattamenti termici, gli additivi, gli ingredienti, le condizioni di conservazione possono provocare la degradazione del DNA e impedire l'amplificazione del frammento target (Armani *et al.*, 2012b; Armani *et al.*, 2013; Rodriguez-Ezpeleta *et al.* 2013). Anche se le tecniche di cottura utilizzate in questo studio non hanno prodotto una degradazione simile a quella ottenuta nella trasformazione conserviera (frammenti più piccoli di 200 pb) (Pardo & PerezVillarel, 2004), la possibilità di ottenere l'amplicone atteso è stata fortemente influenzata. I risultati di questo studio, coincidono con quelli ottenuti da Wong, 2008;

Cawthorn, 2012 che nel loro lavoro non sono stati in grado di produrre una sequenza completa di 700 pb da prodotti affumicati, in salamoia e in scatola. La ridotta amplificazione causata dalla degradazione del DNA rappresenta il principale ostacolo per l'applicazione del metodo classico del DNA *barcoding* per l'analisi dei prodotti ittici trasformati e potrebbe spiegare perché nei suddetti studi sono stati raccolti ed analizzati soltanto una piccola percentuale di prodotti trasformati rispetto a quelli freschi. Per questo motivo lo sviluppo di primers universali per l'amplificazione di un ipotetico *mini barcoding*, potrebbe costituire l'espedito necessario per recuperare un'informazione genetica anche da prodotti sottoposti a trattamenti che provocano una frammentazione del DNA. Recenti studi hanno infatti dimostrato che frammenti corti del gene *COI* presentano un potere discriminante che, in alcuni casi, risulta paragonabile a quello del frammento completo (Hajibabaei *et al.*, 2006).

Campioni conservati in etanolo: è spesso difficile riuscire a recuperare la sequenza completa del *barcode* dai campioni conservati in etanolo provenienti da musei, dal momento che il loro DNA può essere degradato (Whitfield 1999; Hajibabaei *et al.*, 2005). Infatti, lo stoccaggio in etanolo, il congelamento o altri metodi di conservazione utilizzati per lunghi periodi possono danneggiare l'integrità del DNA.

A dimostrazione di quanto detto, l'amplificabilità dei campioni di DNA estratti da tessuto conservati in etanolo è risultata inferiore (63%) rispetto a quella del DNA estratto da tessuto fresco (82.5%). Questa minore efficienza potrebbe essere spiegata considerando il fatto che alcuni campioni, come l'*Acanthopagrus bifasciatus*, erano stati precedentemente conservati anche in formalina e altri in etanolo per più di 100 anni. Diversi studi hanno dimostrato che la formaldeide provoca la degradazione del DNA (Diaz-Cano, 1997) e che, sebbene i reagenti alcolici inducano una minore degradazione perché quando il DNA denaturato viene reidratato c'è un sostanziale ritorno alla forma originale (Srinivasan, 2002), l'integrità del DNA può essere inficiata dalla conservazione per un periodo di tempo prolungato. In alcuni casi anche la conservazione per un breve periodo può incidere sull'integrità del DNA. Rodriguez-Ezpeleta *et al.*, 2013 hanno dimostrato che il tessuto di pesce stoccato per 120 giorni ha mostrato una significativa diminuzione dell'integrità del DNA rispetto a quello conservato solo per 30 giorni. Per tale motivo risulta auspicabile raccogliere diversi campioni per ogni specie allo scopo di ottenere almeno tre sequenze di riferimento.

6.4. ANALISI DELLE SEQUENZE E CONFRONTO CON I DATABASE

Con il sequenziamento sono state ottenute 255 sequenze COI complete (199 dai campioni di riferimento e 55 dai campioni commerciali) con una lunghezza media di 652pb (da 520 a 655), senza codoni di stop, inserzioni e delezioni. Delle 64 specie raccolte è stato ottenuto almeno un *barcode* completo per 57 specie con un numero medio di *barcodes* per specie di 3.4. Non sono state ottenuti *barcode* per le seguenti specie *Acanthopagrus bifasciatus*, *Calamus pennatula*, *Dentex congoensis*, *Diplodus argenteus*, *D. bellotii*, *D. cervinus* e *Pagrus africanus*. Le sequenze appartenenti alle seguenti specie *Calamus arctifrons*, *C. bajonado*, *C. proridens*, *Dentex canariensis*, *D. gibbosus*, *D. maroccanus*, *Diplodus noct*, sono state ottenute in questo studio per la prima volta.

6.4.1. Risultati IDs e rapporto di discordanza BIN BOLD e BLAST NCBI

Il DNA *barcoding* può essere d'ausilio nell'identificazione di specie ittiche, in particolare, nel caso di specie per le quali non sia possibile effettuare un'identificazione morfologica, per l'identificazione di esemplari giovani, o nel caso in cui non sia disponibile una descrizione adeguata (Costa *et al.*, 2007; Kochzius *et al.*, 2010). Nel 2005, in seguito al crescente impiego del DNA *barcoding* per l'identificazione di specie, comprese quelle ittiche (Ward *et al.*, 2005; Wong & Hanner, 2008), è stato creato un database chiamato BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007) con l'obiettivo di facilitare non soltanto l'identificazione di specie sconosciute ma anche di risolvere i problemi relativi alla tracciabilità, alla pesca illegale ed alle frodi (Costa *et al.*, 2007).

Il *Barcode of Life Data System* (BOLD) comprende uno strumento, l'*Identification System* (IDs), per la caratterizzazione delle specie basato sull'analisi della sequenza *barcode* (<http://www.barcodinglife.org/views/idrequest.php>). Tale strumento si basa sul principio che, in generale, la variabilità intraspecifica (fra sequenze appartenenti ad esemplari della stessa specie) è minore di quella interspecifica (fra sequenze appartenenti ad esemplari della di specie diverse) (Hebert *et al.* 2003). L'IDs consente l'identificazione della specie solo se la sequenza richiesta mostra una stretta corrispondenza, con una divergenza inferiore all'1%, rispetto alla sequenza di riferimento. Quando due o più taxa hanno delle sequenze con una divergenza superiore all'1%, tutte le possibili assegnazioni di specie vengono segnalate (Hebert, 2007). Inoltre, l'analisi delle sequenze è resa possibile anche dall'analisi del BIN (*Barcode Index Number*), disponibile nella console utente di un progetto BOLD che, dopo aver

analizzato le sequenze le assegna ad un BIN già esistente o ne crea uno nuovo. In questo modo si ottiene un raggruppamento in OTUs (Operational Taxonomic Unit) delle sequenze con una lunghezza superiore a 500 pb indipendentemente dalla loro precedente collocazione tassonomica. Quest'analisi consente in pratica di confermare la corrispondenza tra le sequenze raggruppate e la specie di provenienza sulla base di un confronto effettuato con tutte le altre sequenze disponibili appartenenti allo stesso BIN. I risultati dell'identificazione (IDs) e del BIN sono riportati rispettivamente nelle tabelle (Tab. 6.1) e (Tab. 6.2).

L'utilizzo dell'IDs e dell'analisi BLAST hanno restituito valori di identità compresi tra il 98 ed il 100% per 176 sequenze (87.5%). Al contrario, per alcune sequenze delle seguenti specie: *A. pacificus*, *A. spinifer*, *C. arctifrons*, *C. leuscosteus*, *C. proridens*, *D. angolensis*, *D. canariensis*, *D. gibbosus*, *D. macrophthalmus*, *O.melanura* e *V. acromegalus* sono state riscontrati valori di identità più bassi in almeno uno dei due databases (90-97%). Ad eccezione di *A. spinifer*, *D. macrophthalmus* e *O.melanura* questi risultati sono dovuti all'assenza di sequenze di riferimento in uno o in entrambi i databases. Infine, per le sequenze relative a *C. bajonado*, è stata ottenuta un'identità del 99% con *Calamus* spp.

Nel complesso, il metodo d'identificazione basato sui risultati dell'IDs di BOLD considerando un valore d'identità superiore al 98% è risultato coerente con l'approccio morfologico per 114 sequenze su 199 (57.3%), relative a 30 specie su 57 (52.6%). Le restanti sequenze sono costituite da 72 sequenze (36.2%) appartenenti a 20 specie (35.1%) con identificazione problematica e da 13 sequenze (6.5%) appartenenti a 7 specie (12.3%) non identificabili a causa dell'assenza di esemplari di riferimento identificati.

Considerando le 20 specie problematiche, per le quali non è stato ottenuto un valore di identità sufficientemente elevato tale da poter identificare univocamente il campione, in alcuni casi (34 sequenze relative a 9 specie) è stato osservato che anche quando una sequenza mostra un valore di identità superiore al 98% con più di una specie, il valore più alto è stato in genere ottenuto con la specie identificata sulla base della preventiva analisi morfologica (Tab. 6.1). Considerando questo fatto, le sequenze correttamente identificate con IDs di BOLD sono 161 (81%) relative a 43 specie (75,.4%).

Infatti, anche se è stato visto che una divergenza del 2% fra le sequenze dovrebbe essere sufficiente per differenziare specie diverse, nel caso dei campioni analizzati questo non è sempre stato confermato (Tab. 6.1).

È comunque stato notato che le inconsistenze, le incertezze tra le specie e i casi di identificazione dubbia sono stati confermati nella maggior parte dei casi dal rapporto di discordanza BIN (Tab. 6.2).

Per quanto riguarda quest'analisi complessivamente 92 sequenze (46.2%) tra le 199 depositate, si sono dimostrate discordanti. In particolare 37 sequenze (18.6%) a livello di genere e 55 (27.6%) a livello di specie. Per quanto riguarda i BINs, invece, 21 (37.5%) risultavano discordanti mentre 32 (57%) corrispondenti. Infine, 3 sequenze sono risultate singole (non associabili a nessun BINs presente nel sistema).

Tuttavia a livello di genere le discordanze con le sequenze di *Boops boops*, *Pagellus acarne*, *Pagellus erythrinus* e *Pagrus pagrus* erano correlate con alcune sequenze di *Oblada melanura*. Questo problema non può essere spiegato anche tenendo in considerazione l'alta variabilità intraspecifica all'interno di quest'ultima specie. Problemi con le sequenze di *O. melanura* sono stati riportati anche da Keskin *et al* 2013. Anche le altre discrepanze a livello di genere riguardanti *Cheimereus nufar*, *Rhabdosargus haffara* e *Sarpa salpa* sono dovute ad una singola sequenza di specie differenti (Tab. 6.2).

La distanza K2p calcolata per le sequenze di *Evynnis cardinalis* e *Parargyrops edita* è risultata del 2.5%, mostrando quindi che il limite di specie del 2% è stato superato. Pertanto, anche in questo caso, le due sequenze di *Parargyrops* spp. responsabili della mancata corrispondenza possono essere considerate mal classificate. Restano quindi disponibili sul database e, se mal ponderate, soprattutto in assenza di un numero significativo di sequenze corrette di riferimento, possono portare ad errori di identificazione. A tale riguardo è doveroso ricordare che, anche se il DNA *barcoding* è uno strumento utile per l'identificazione di specie, sono stati riportati diversi casi di risultati ambigui (Barbutto *et al.*, 2010; Ward *et al.*, 2005) giustificati come errata identificazione di specie (specie difficilmente riconoscibili, tassonomia incerta), etichettatura sbagliata o errori durante l'invio delle sequenze. In generale questi tipi di errori sono di facile rilevamento nel momento in cui vengono raggruppati campioni di ordini o di famiglie diverse (Costa, 2012). Più difficile è mettere in evidenza e supportare le *mis-identification* a livello di genere e specie. A questo proposito vanno citate ad esempio le specie appartenenti al genere *Acanthopagrus*, pesci importanti dal punto di vista commerciale, ampiamente distribuite dall'Africa meridionale e orientale all'Australia (Iwatsuki *et al.*, 2006; Iwatsuki & Heemstra, 2010), che sono molto simili sia da un punto di vista genetico che morfologico (Jean *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 2002;

Kume & Yoshino, 2008). Ci sono state diverse re-descrizioni all'interno del genere *Acanthopagrus* (Iwatsuki & Carpenter, 2009; Iwatsuki & Heemstra, 2010; Iwatsuki et al., 2010) e 15 specie e 2 sottospecie appartenenti alla specie *A. schlegelii* (*A. schlegelii czerskii* e *A. schlegelii schlegelii*) sono attualmente riconosciuti. Nel caso dell'*A. pacificus*, 2 sequenze dell'*A. berda* sono responsabili della mancata corrispondenza rispetto all'identificazione morfologica a livello di specie. Questo potrebbe essere dovuto ad una errata identificazione dei campioni o a una identificazione basata su una precedente classificazione, considerando che l'*A. pacificus* è stato recentemente re-descritto come nuova specie e che questa specie è molto simile all'*A. berda* (Iwatsuki et al. 2010).

Allo stesso modo l'analisi delle sequenze del gene *COI* non è stata in grado di distinguere *A. schlegelii*, *A. schlegelii schlegelii* e *A. sivicolus*. L'impossibilità di riconoscere queste specie da un punto di vista genetico era già stata riportata da Hsu 2011 in seguito all'analisi molecolare basata sul *Cyt b*.

La ragione per cui il DNA *barcoding* non è stato in grado di differenziare il *P. major* dal *P. auratus*, potrebbe essere dovuta al fatto che anche se FishBase considera queste specie come distinte e separate, Tabata e Tanigucci, 2010, basandosi su studi genetici, hanno riportato che la relazione tra queste specie è a livello di sub specie, proponendo così di rinominarli come *P. auratus major* e *P. auratus auratus*.

È interessante notare che le sequenze ottenute dal *D. macrophthalmus* (che su BOLD hanno mostrato una corrispondenza del 99.8% con il *D. macrophthalmus*) hanno ottenuto un valore più basso su GenBank (89-90%) rispetto all'identità mostrata dalle sequenze del *D. maroccanus* (identità del 99-100% con *D. macrophthalmus* sia su BOLD che su Genbank). Anche se al momento le due specie non sono distinguibili il problema potrebbe essere dovuto alla presenza di qualche sequenza erroneamente identificata.

Il genere *Diplodus* è quello più numeroso all'interno della famiglia degli sparidi. In particolare il *D. sargus* comprende le seguenti sottospecie: *D. sargus ascensionis*, *D. sargus cadenati*, *D. sargus helenae*, *D. sargus kotschyi*, *Diplodus sargus lineatus*, *D. sargus sargus*. Il *D. cervinus* presenta tre sottospecie: *D. cervinus cervinus*, *cervinus hottentotus*, *cervinus omanensis* e *D. argenteus* due *D. argenteus argenteus*, *D. argenteus caudimacula*.

Le analisi molecolari dimostrano chiaramente che *D. capensis*, *D. noct*, *D. argenteus*, *D. hoolbrooki* e *D. bermudensis* fanno parte di un unico gruppo e che la filogenesi di questo genere non può essere completamente risolta in relazione alla giovane età

evolutiva di questo gruppo ed alla rapidità della loro diversificazione (Summerer *et al.*, 2001).

Sulla base di quanto detto e delle correzioni apportate ai risultati ottenuti dalle precedenti analisi il numero delle sequenze correttamente identificate dal BIN si eleva a 168 (83.6%) e quello dei BIN concordanti a 43 (76.8%).

Utilizzando l'analisi BLAST su NCBI sono state inequivocabilmente identificate 101 sequenze su 199 (50.7%) relative a 25 specie su 57 (43.8%). Le restanti sequenze sono costituite da 62 sequenze appartenenti a 17 specie con identificazione problematica e da 36 sequenze appartenenti a 15 specie non identificabili a causa dell'assenza di esemplari di riferimento non identificati. Anche in questo caso spesso si è potuto osservare che, nonostante la presenza di sequenze problematiche, il valore d'identità massima più elevato corrispondeva alla specie identificata su base morfologica. Inoltre, sono stati osservati alcuni possibili errori d'identificazione in sequenze depositate (*Dicentrarchus labrax* e *Oblada melanura*). Pertanto considerati questi fattori le sequenze correttamente identificate dal BLAST sono state 134 (67.3%) relative a 34 specie (59.6%).

6.5. MISLABELING DEI CAMPIONI COMMERCIALI

Anche se l'elenco ufficiale in lingua italiana riporta 28 denominazioni commerciali per 35 differenti specie risulta chiaro che il numero di quelle commercializzate sul territorio nazionale è inferiore. In questo lavoro infatti sono stati raccolti 55 campioni commerciali in Italia, appartenenti a 19 specie. Le sequenze complete che sono state ottenute (con una lunghezza media di 653 pb) sono state confrontate con i databases. Sulla base dell'identificazione ottenuta ed analizzando le sequenze complete, tenendo in considerazione i fattori di correzione sopra citati, sono stati identificati a livello di specie 49 campioni su BOLD e 43 campioni su GenBank. Tuttavia i campioni rimanenti (ad eccezione di uno) sono stati identificati a livello di genere. Le analisi hanno messo in evidenza che su 55 campioni commerciali, 18, corrispondenti al 33% sono risultati *mislabelled* (Tab. 6.3). Questo dato concorda con quanto riscontrato recentemente da un'indagine effettuata dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie nel periodo 2009-2011 per verificare quanti campioni venduti al dettaglio risultano etichettati in modo errato. I risultati, abbastanza allarmanti, hanno visto che su 200 campioni prelevati in modo casuale nei supermercati del Nord Italia, 64 (pari al 32%) appartenevano a una specie differente rispetto a quella dichiarata. (<http://www.ilfattoalimentare.it>)

Tra i campioni che presentavano non conformità per quanto riguarda la denominazione scientifica (15 interi e 3 sfilettati) 14 campioni sono stati acquistati nella GDO e 4 nella ristorazione. Un campione venduto come dentice non è stato identificato su BOLD mentre su Genbank è stato identificato come dentice rosa (*Cheimerius nufar*); un campione venduto come sarago sparaglione (*Diplodus annularis*) è stato identificato a livello di genere come (*Diplodus spp.*) ma non a livello di specie; 3 campioni venduti come occhiata sono stati identificati come *Diplodus*; 3 campioni venduti come pagro sono stati identificati come dentice rosa (*Cheimerius nufar*); 2 campioni venduti come pagro rosa indo pacifico (*Pagrus auratus*) sono stati identificati come pagro reale (*Argyrops spinifer*); 6 campioni venduti come pagelli sono stati identificati come pagello fragolino (*Pagellus erythrinus*).

Due campioni identificati morfologicamente, uno come salpa e uno come boga, con l'analisi su BOLD e GenBank sono stati identificati come *Spicara mena*, specie appartenente alla famiglia Centracanthidae e non alla famiglia Sparidae.

Molto probabilmente i campioni di *Cheimerius nufar* sono stati classificati male a causa dell'utilizzo della vecchia denominazione "Dentice rosa" invece che "Dentale indiano" e per aumentare l'interesse dei consumatori italiani. Infatti, queste specie sono state recentemente aggiunte all'elenco ufficiale (Decreto MIPAF 31 gennaio 2008).

Infine, per quanto riguarda la sostituzione di *S. mena* con *S. salpa* avrebbe consentito la commercializzazione di specie di scarso valore non appartenenti alla famiglia degli sparidi.

Le specie appartenenti alla famiglia Sparidae sono apprezzate a livello internazionale per la qualità delle loro carni. Mentre in passato venivano commercializzate prevalentemente sotto forma di prodotto intero, ad oggi, è possibile ritrovarle in forma di preparati, soprattutto filetti, presso la GDO. Allo stesso modo, anche presso la ristorazione collettiva, queste specie vengono sfilettate prima di essere servite. Per tale motivo, l'identificazione sulla base delle caratteristiche morfologiche, già complicata dalla somiglianza fra le varie specie, come dimostrato dai risultati ottenuti in questo lavoro, risulta impossibile a causa della scomparsa dei caratteri diagnostici come la dentatura.

Species name (morphological identification)	BOLD	NCBI	COI bp	Species identification (BLAST)			
				BOLD Species Level Barcode Records	Max id.	GenBank	Max id.
<i>Acanthopagrus berda</i>	SPA003-13.COI-5P SPA002-13.COI-5P SPA004-13.COI-5P SPA203-13.COI-5P	KJ012251 KJ012252 KJ012253 KJ012254	655	<i>A. berda</i>	100	<i>A. berda</i>	98
<i>Acanthopagrus butcheri</i>	SPA208-13.COI-5P SPA207-13.COI-5P SPA206-13.COI-5P SPA205-13.COI-5P SPA211-13.COI-5P SPA210-13.COI-5P SPA209-13.COI-5P	KJ012255 KJ012256 KJ012257 KJ012258 KJ012259 KJ012260 KJ012261	655	<i>A. butcheri</i>	100	<i>A. butcheri</i>	100
<i>Acanthopagrus latus</i>	SPA006-13.COI-5P SPA005-13.COI-5P SPA008-13.COI-5P SPA007-13.COI-5P SPA009-13.COI-5P SPA010-13.COI-5P	KJ012262 KJ012263 KJ012264 KJ012265 KJ012266 KJ012267	655	<i>A. latus</i>	100	<i>A. latus</i>	99-100
<i>Acanthopagrus pacificus^b</i>	SPA189-13.COI-5P	KJ012269	583	<i>A. pacificus</i> <i>A. berda</i> (1 seq.)	99.83 99.83	<i>A. berda</i>	97
	SPA022-13.COI-5P	KJ012268	655	<i>A. pacificus</i> <i>A. berda</i> (1 seq.)	100 100	<i>A. berda</i>	97
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	SPA024-13.COI-5P	KJ012273	655	<i>A. schlegelii</i> <i>A. schlegelii schlegelii</i> <i>A. sivicolus</i>	100 99.85 99.85	<i>A. schlegelii</i> <i>A. schlegelii</i> <i>schlegelii</i>	100 99
	SPA029-13.COI-5P SPA027-13.COI-5P SPA025-13.COI-5P SPA028-13.COI-5P	KJ012270 KJ012271 KJ012272 KJ012274	655	<i>A. schlegelii</i> <i>A. schlegelii schlegelii</i> <i>A. sivicolus</i>	100 100 100	<i>A. schlegelii</i> <i>A. schlegelii</i> <i>schlegelii</i>	100 100
	SPA032-13.COI-5P SPA031-13.COI-5P SPA030-13.COI-5P	KJ012275 KJ012276 KJ012277	655	<i>A. sivicolus</i> <i>A. schlegelii</i> <i>A. schlegelii schlegelii</i>	100 99.85-100 99.85-100	<i>A. schlegelii</i> <i>A. schlegelii</i> <i>schlegelii</i>	99-100 99-100
	SPA011-13.COI-5P SPA012-13.COI-5P SPA013-13.COI-5P SPA014-13.COI-5P	KJ012278 KJ012279 KJ012280 KJ012281	655	<i>A. probatocephalus</i>	100	<i>A. probatocephalus</i>	99-100
<i>Archosargus rhomboidalis</i>	SPA023-13.COI-5P	KJ012282	655	<i>A. rhomboidalis</i>	100	<i>A. rhomboidalis</i>	100
<i>Argyrops bleekeri^b</i>	SPA016-13.COI-5P SPA018-13.COI-5P SPA204-13.COI-5P SPA017-13.COI-5P	KJ012283 KJ012284 KJ012285 KJ012286	655	<i>A. bleekeri</i> <i>A. spinifer</i>	100 99.38-99.69	<i>A. spinifer</i>	99; 100
	SPA019-13.COI-5P SPA020-13.COI-5P	KJ012287 KJ012288	655	<i>A. filamentosus</i>	100	<i>A. filamentosus</i>	100
<i>Argyrops spinifer</i>	SPA035-13.COI-5P SPA033-13.COI-5P SPA034-13.COI-5P	KJ012289 KJ012290 KJ012293	645- 655	<i>A. spinifer</i>	100	<i>A. spinifer</i>	100
	SPA191-13.COI-5P SPA190-13.COI-5P	KJ012291 KJ012292	655	<i>A. spinifer</i>	99.69; 99.85	<i>A. filamentosus</i>	96
<i>Boops boops</i>	SPA036-13.COI-5P SPA119-13.COI-5P SPA037-13.COI-5P SPA038-13.COI-5P	KJ012294 KJ012295 KJ012296 KJ012297	654- 655	<i>B. boops</i> <i>O. melanura</i>	100 99.67-99.84	<i>B. boops</i> <i>O. melanura</i> (2 seq.)	100 99
<i>Calamus arctifrons^a</i>	SPA041-13.COI-5P SPA039-13.COI-5P SPA232-13.COI-5P	KJ012298 KJ012299 KJ012300	655	No match		<i>C. brachysomus</i> <i>C.penna</i>	93 93
	SPA043-13.COI-5P SPA042-13.COI-5P SPA044-13.COI-5P	KJ012301 KJ012302 KJ012303	655	No match		<i>Calamus</i> spp.	99
<i>Calamus brachysomus</i>	SPA045-13.COI-5P	KJ012304	654	<i>C. brachysomus</i>	100	<i>C. brachysomus</i>	100
<i>Calamus calamus</i>	SPA046-13.COI-5P SPA047-13.COI-5P SPA048-13.COI-5P	KJ012305 KJ012306 KJ012307	655	<i>C. calamus</i>	100	<i>C. calamus</i>	100
<i>Calamus</i>	SPA049-13.COI-5P	KJ012308	655	<i>C. leucosteus</i>	100	<i>C. brachysomus</i>	94

<i>leucosteus</i> ^b	SPA050-13.COL-5P SPA051-13.COL-5P	KJ012309 KJ012310					
<i>Calamus nodosus</i> ^b	SPA056-13.COL-5P SPA055-13.COL-5P SPA054-13.COL-5P	KJ012311 KJ012312 KJ012313	655	<i>C. nodosus</i>	100	<i>Actinopterygii</i> spp. <i>Calamus</i> spp. <i>C. calamus</i>	99 98 98
<i>Calamus penna</i>	SPA053-13.COL-5P	KJ012314	655	<i>C. penna</i>	99.54	<i>C. penna</i>	99
<i>Calamus proridens</i> ^a	SPA058-13.COL-5P	KJ012315	655	<i>C. leucosteus</i>	99.23	<i>Actinopterygii</i> spp.	97
<i>Cheimerius nufar</i>	SPA062-13.COL-5P SPA060-13.COL-5P SPA064-13.COL-5P SPA061-13.COL-5P	KJ012316 KJ012317 KJ012318 KJ012319	655	<i>C. nufar</i>	100	<i>C. nufar</i>	100
<i>Chrysoblephus puniceus</i>	SPA065-13.COL-5P	KJ012320	655	<i>C. puniceus</i>	100	<i>C. puniceus</i>	99
<i>Dentex angolensis</i> ^b	SPA067-13.COL-5P SPA192-13.COL-5P SPA193-13.COL-5P	KJ012321 KJ012323 KJ012324	655	<i>D. angolensis</i> <i>D. macrophthalmus</i> <i>D. maroccanus</i>	100 99.84 99.84	<i>D. macrophthalmus</i>	98
	SPA066-13.COL-5P	KJ012322	630	<i>D. angolensis</i>	100	<i>D. macrophthalmus</i>	95
<i>Dentex canariensis</i> ^a	SPA120-13.COL-5P	KJ012325	655	<i>D. angolensis</i>	97.6	<i>D. macrophthalmus</i>	95
<i>Dentex dentex</i>	SPA123-13.COL-5P SPA194-13.COL-5P SPA124-13.COL-5P SPA126-13.COL-5P	KJ012326 KJ012327 KJ012328 KJ012329	655	<i>D. dentex</i>	98.85; 100	<i>D. dentex</i>	99
<i>Dentex gibbosus</i> ^a	SPA222-13.COL-5P	KJ012330	655	No match		<i>P. caerulosticus</i>	93
<i>Dentex macrophthalmus</i>	SPA069-13.COL-5P SPA071-13.COL-5P SPA070-13.COL-5P	KJ012331 KJ012332 KJ012333	655	<i>D. macrophthalmus</i>	99.69; 99.84	<i>D. tumifrons</i> <i>D. macrophthalmus</i>	90 89; 90
<i>Dentex maroccanus</i> ^a	SPA132-13.COL-5P SPA131-13.COL-5P	KJ012334 KJ012335	655	<i>D. macrophthalmus</i> <i>D. angolensis</i>	99.84; 100 99.69; 99.84	<i>D. macrophthalmus</i>	98
<i>Diplodus annularis</i>	SPA076-13.COL-5P SPA078-13.COL-5P SPA196-13.COL-5P SPA195-13.COL-5P SPA077-13.COL-5P	KJ012336 KJ012337 KJ012338 KJ012339 KJ012340	655	<i>D. annularis</i>	99.53 – 100	<i>D. annularis</i>	99
<i>Diplodus cervinus hottentotus</i>	SPA130-13.COL-5P SPA129-13.COL-5P	KJ012341 KJ012342	655	<i>D. cervinus</i> <i>D. fasciatus</i> <i>D. cervinus hottentotus</i>	100 99.54; 99.69 99.54	<i>D. cervinus</i>	99; 100
<i>Diplodus holbrookii</i>	SPA128-13.COL-5P SPA127-13.COL-5P	KJ012343 KJ012344	655	<i>D. holbrookii</i>	99.02; 98.86	<i>D. holbrookii</i>	99
				<i>Haemulon aurolineatum</i>	98.46; 98.77	<i>D. argenteus</i>	98; 99
				<i>D. argenteus</i>	98.62; 98.46	<i>D. sargus</i>	98
<i>Diplodus noct</i> ^d	SPA133-13.COL-5P SPA134-13.COL-5P	KJ012345 KJ012346	655	<i>D. sargus</i> subspecies	98.62-99.69	<i>D. sargus</i> subspecies	99
				<i>T. amphycephalum</i>	99.54	<i>D. holbrookii</i>	98
				<i>D. holbrookii</i>	98.46	<i>D. argenteus</i>	98
				<i>D. argenteus</i>	98.16		
<i>Diplodus puntazzo</i>	SPA108-13.COL-5P SPA111-13.COL-5P SPA110-13.COL-5P SPA009-13.COL-5P	KJ012347 KJ012348 KJ012349 KJ012350	655	<i>D. puntazzo</i>	98.52-98.92	<i>Dicentrarchus labrax</i> <i>D. puntazzo</i>	99 99
<i>Diplodus sargus</i> (<i>sargus</i>)	SPA114-13.COL-5P SPA113-13.COL-5P SPA117-13.COL-5P SPA116-13.COL-5P	KJ012351 KJ012352 KJ012353 KJ012354	655	<i>D. sargus</i> subspecies	98.46-100	<i>D. sargus</i> subspecies <i>D. holbrookii</i> <i>D. argenteus</i>	99-100 98 98
<i>Diplodus vulgaris</i>	SPA138-13.COL-5P SPA140-13.COL-5P SPA135-13.COL-5P SPA136-13.COL-5P SPA139-13.COL-5P	KJ012355 KJ012356 KJ012357 KJ012358 KJ012360	655	<i>D. vulgaris</i> <i>D. sargus</i> <i>D. prayensis</i> <i>D. fasciatus</i>	99.84; 100 99.69; 100 98.73; 98.92 98.62; 98.92	<i>D. sargus</i> <i>D. vulgaris</i>	99; 100 99
	SPA137-13.COL-5P	KJ012359	655	<i>D. sargus</i> <i>D. vulgaris</i>	99.37 99.23	<i>D. sargus</i> <i>D. vulgaris</i>	99 99
<i>Evygnis cardinalis</i>	SPA144-13.COL-5P SPA145-13.COL-5P	KJ012361 KJ012362	655	<i>E. cardinalis</i>	100	<i>E. cardinalis</i>	100
				<i>E. tumifrons</i>	100	<i>E. japonica</i>	99
				<i>P. edita</i>	99.69	<i>P. edita</i>	99
<i>Evygnis tumifrons</i> ^b	SPA146-13.COL-5P	KJ012364	583	<i>E. tumifrons</i>	100	<i>E. tumifrons</i>	99
	SPA150-13.COL-5P SPA147-13.COL-5P	KJ012363 KJ012365	655	<i>E. tumifrons</i>	99.69; 100	<i>Dentex tumifrons</i>	99

	SPA148-13.COL-5P SPA149-13.COL-5P	KJ012366 KJ012367					(syn. <i>E. tumifrons</i>)	
<i>Lagodon rhomboides</i>	SPA155-13.COL-5P SPA152-13.COL-5P SPA153-13.COL-5P	KJ012368 KJ012370 KJ012371	655	<i>L. rhomboids</i>		100	<i>L. rhomboides</i>	100
	SPA156-13.COL-5P SPA154-13.COL-5P	KJ012369 KJ012372	520; 540	<i>L. rhomboids</i>		100	<i>L. rhomboides</i>	100
<i>Lithognathus mormyrus</i>	SPA221-13.COL-5P SPA220-13.COL-5P SPA079-13.COL-5P SPA151-13.COL-5P SPA197-13.COL-5P SPA219-13.COL-5P	KJ012373 KJ012374 KJ012375 KJ012376 KJ012377 KJ012378	655	<i>L. mormyrus</i>		99.65; 99.85; 100	<i>L. mormyrus</i>	99;100
<i>Oblada melanura</i>	SPA157-13.COL-5P	KJ012379	655	<i>O. melanura</i>		99.52	<i>O. melanura</i>	95
	SPA198-13.COL-5P	KJ012380	655	<i>O. melanura</i>		99.69	<i>O. melanura</i>	95
<i>Pagellus acarne</i>	SPA159-13.COL-5P SPA082-13.COL-5P SPA080-13.COL-5P	KJ012382 KJ012383 KJ012385	601; 655	<i>P. acarne</i> <i>Oblada melanura</i> (2 seq.)		100 98.84; 99.68	<i>P. acarne</i> <i>Oblada melanura</i> (2 seq.)	99 99
	SPA083-13.COL-5P SPA081-13.COL-5P	KJ012381 KJ012384	655	<i>P. acarne</i> <i>Oblada melanura</i> (1 seq.)		99.45; 100 99.36; 99.19	<i>P. acarne</i>	99; 100
<i>Pagellus bellottii</i>	SPA162-13.COL-5P	KJ012386	655	<i>P. bellottii</i>		99.84	<i>P. bellottii</i> <i>P. natalensis</i>	99 99
				<i>P. pagrus</i>		99.53		
				<i>P. natalensis</i>		99.21		
<i>Pagellus bogaraveo</i>	SPA225-13.COL-5P SPA166-13.COL-5P SPA223-13.COL-5P SPA164-13.COL-5P SPA224-13.COL-5P SPA163-13.COL-5P	KJ012387 KJ012388 KJ012390 KJ012391 KJ012392 KJ012393	655	<i>P. bogaraveo</i>		99.85; 100	<i>P. bogaraveo</i>	99; 100
	SPA165-13.COL-5P	KJ012389	557	<i>P. bogaraveo</i>		99.82	<i>P. bogaraveo</i>	99
<i>Pagellus erythrinus</i>	SPA176-13.COL-5P SPA177-13.COL-5P SPA174-13.COL-5P SPA175-13.COL-5P	KJ012394 KJ012395 KJ012396 KJ012397	655	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i>		99.85; 100 99.19; 99.17	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i>	99; 100 99
<i>Pagrus auratus</i>	SPA212-13.COL-5P	KJ012398	655	<i>P. auratus</i> <i>P. major</i>		99.85; 100 99.54	<i>P. auratus</i> <i>P. major</i>	99 ; 100 99
	SPA218-13.COL-5P	KJ012399						
	SPA217-13.COL-5P	KJ012400						
	SPA216-13.COL-5P	KJ012401						
	SPA215-13.COL-5P	KJ012402						
	SPA213-13.COL-5P SPA214-13.COL-5P	KJ012403 KJ012404						
<i>Pagrus auriga</i>	SPA161-13.COL-5P SPA226-13.COL-5P	KJ012405 KJ012406	655	<i>P. auriga</i>		99.85	<i>P. auriga</i>	99
	SPA167-13.COL-5P SPA171-13.COL-5P SPA172-13.COL-5P SPA168-13.COL-5P SPA170-13.COL-5P	KJ012407 KJ012408 KJ012409 KJ012410 KJ012411	655	<i>P. caeruleostictus</i>		99.82; 99.83; 99.84; 100	<i>P. caeruleostictus</i>	99; 100
<i>Pagrus major</i>	SPA181-13.COL-5P	KJ012412	655	<i>P. major</i> <i>P. auratus</i>		100 100	<i>P. major</i> <i>C. auratus</i>	99; 100 99
	SPA183-13.COL-5P	KJ012413						
	SPA178-13.COL-5P SPA179-13.COL-5P	KJ012414 KJ012415						
	SPA182-13.COL-5P	KJ012416						
<i>Pagrus pagrus</i>	SPA101-13.COL-5P SPA102-13.COL-5P SPA103-13.COL-5P SPA104-13.COL-5P SPA106-13.COL-5P	KJ012417 KJ012418 KJ012419 KJ012420 KJ012421	655	<i>P. erythrinus</i> <i>P. pagrus</i> <i>O. melanura</i>		99.84; 100 99.84; 100 99.84; 100	<i>O. melanura</i> <i>P. erythrinus</i> <i>C. auratus</i> <i>P. pagrus</i>	100 99 99 99
	SPA227-13.COL-5P	KJ012422	655	<i>R. haffara</i> <i>S. aurata</i> (1 seq.)		99.82 99.85	<i>R. haffara</i>	99
	SPA186-13.COL-5P SPA233-13.COL-5P	KJ012423 KJ012424	655	<i>R. sarba</i>		99.85; 100	<i>R. sarba</i>	99; 100
	SPA085-13.COL-5P SPA084-13.COL-5P SPA199-13.COL-5P SPA087-13.COL-5P SPA086-13.COL-5P	KJ012425 KJ012426 KJ012427 KJ012428 KJ012429	655	<i>S. salpa</i>		99.85; 100	<i>S. salpa</i>	99

<i>Sparus aurata</i>	SPA074-13.COI-5P SPA200-13.COI-5P SPA072-13.COI-5P SPA075-13.COI-5P SPA073-13.COI-5P	KJ012430 KJ012431 KJ012432 KJ012433 KJ012434	655	<i>S. aurata</i>	100	<i>S. aurata</i>	100
<i>Spondylisoma cantharus</i>	SPA099-13.COI-5P SPA201-13.COI-5P SPA097-13.COI-5P	KJ012435 KJ012436 KJ012438	569; 643; 655	<i>S. cantharus</i>	100	<i>S. cantharus</i>	99
	SPA096-13.COI-5P	KJ012439	655	<i>S. cantharus</i>	100	<i>S. cantharus</i> <i>S. emarginatum</i>	100 98
	SPA098-13.COI-5P	KJ012437	546	<i>S. cantharus</i>	100	<i>S. cantharus</i>	99
<i>Stenotomus caprinus</i> ^b	SPA090-13.COI-5P SPA089-13.COI-5P SPA088-13.COI-5P	KJ012440 KJ012441 KJ012442	655	<i>S. caprinus</i> <i>S. chrysops</i>	99.69-100 99.85; 100	<i>S. chrysops</i> <i>C. penna</i> (1 seq.)	99; 100 99
<i>Stenotomus chrysops</i>	SPA095-13.COI-5P SPA234-13.COI-5P SPA091-13.COI-5P SPA092-13.COI-5P SPA093-13.COI-5P SPA094-13.COI-5P	KJ012443 KJ012444 KJ012445 KJ012446 KJ012447 KJ012448	655	<i>S. chrysops</i> <i>S. caprinus</i>	100 99.69	<i>C. penna</i> (1 seq.) <i>S. chrysops</i>	100 99
<i>Virididentex acromegalus</i> ^b	SPA187-13.COI-5P	KJ012449	655	<i>V. acromegalus</i> ; <i>P. acarne</i> (4 seq.)	100 100	<i>P. auriga</i>	92

Tabella 6.1. Risultati ottenuti con l' IDs BOLD e l'analisi BLAST (NCBI) effettuata sui campioni di riferimento

^a assenza di sequenze di riferimento per questa specie nei databases consultati; ^b assenza di sequenze di riferimento per questa specie in GenBank NCBI. Le specie non riportate in grassetto sono sequenze "problematiche". *D. sargus* subspecies: *D. sargus ascensionis*, *D. sargus capensis*, *D. sargus helenae*; *D. sargus kotschy*, *D. sargus lineatus*, *D. sargus sargus*

Identification	Conflicting Taxon in BIN	Rank of Conflict	BIN Total Members	BIN TaxVariation	Possible explanation
<i>Boops boops</i>	<i>Boops</i>	Genus	59	<i>Boops</i> [78], <i>Oblada</i> [2]	Sequence mislabeling
<i>Cheimerius nufar</i>	<i>Cheimerius</i>	Genus	24	<i>Cheimerius</i> [23], <i>Pagrus</i> [1]	Sequence mislabeling
<i>Evyinnis cardinalis</i>	<i>Evyinnis</i>	Genus	22	<i>Evyinnis</i> [19], <i>Parargyrops</i> [3]	Sequence mislabeling
<i>Evyinnis tumifrons</i>	<i>Evyinnis</i>	Genus	11	<i>Evyinnis</i> [9], <i>Dentex</i> [2]	?
<i>Pagellus acarne</i>	<i>Pagellus</i>	Genus	35	<i>Pagellus</i> [45], <i>Oblada</i> [2]	Sequence mislabeling
<i>Pagellus bellottii</i>	<i>Pagellus</i>	Genus	8	<i>Pagellus</i> [5], <i>Pagrus</i> [3]	?
<i>Pagellus erythrinus</i>	<i>Pagellus</i>	Genus	39	<i>Pagellus</i> [52], <i>Oblada</i> [2]	Sequence mislabeling
<i>Pagrus pagrus</i>	<i>Pagrus</i>	Genus	58	<i>Pagrus</i> [50], <i>Pagellus</i> [6], <i>Oblada</i> [4]	Sequence mislabeling
<i>Rhabdosargus haffara</i>	<i>Rhabdosargus</i>	Genus	3	<i>Rhabdosargus</i> [2], <i>Sparus</i> [1]	?
<i>Sarpa salpa</i>	<i>Sarpa</i>	Genus	41	<i>Sarpa</i> [41], <i>Boops</i> [1]	Sequence mislabeling
<i>Virididentex acromegalus</i>	<i>Virididentex</i>	Genus	8	<i>Pagellus</i> [5], <i>Virididentex</i> [3]	?
<i>Acanthopagrus pacificus</i>	<i>Acanthopagrus pacificus</i>	Species	7	<i>Acanthopagrus pacificus</i> [5], <i>A. berda</i> [2]	Misidentification of specimen
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	Species	29	<i>Acanthopagrus schlegelii</i> [14], <i>A. schlegelii schlegelii</i> [11], <i>A. sivicolus</i> [3]	Sub-species relationship
<i>Acanthopagrus sivicolus</i>	<i>Acanthopagrus sivicolus</i>				
<i>Argyrops bleekeri</i>	<i>Argyrops bleekeri</i>	Species	12	<i>Argyrops bleekeri</i> [12], <i>A. spinifer</i> [1]	Sequence mislabeling
<i>Calamus proridens</i>	<i>Calamus proridens</i>	Species	3	<i>Calamus leucosteus</i> [2], <i>C. proridens</i> [1]	?
<i>Dentex angolensis</i>	<i>Dentex angolensis</i>	Species	10	<i>Dentex macrophthalmus</i> [5], <i>D. angolensis</i> [3], <i>D. maroccanus</i> [2]	Sequence mislabeling
<i>Dentex maroccanus</i>	<i>Dentex maroccanus</i>				
<i>Diplodus cervinus hottentotus</i>	<i>Diplodus cervinus hottentotus</i>	Species	34	<i>Diplodus cervinus</i> [26], <i>D. fasciatus</i> [5], <i>D. cervinus hottentotus</i> [3]	Subspecies
<i>Diplodus noct</i>	<i>Diplodus noct</i>	Species	62	<i>Diplodus sargus</i>	Subspecies

<i>Diplodus sargus</i>	<i>Diplodus sargus</i>			[42], D. capensis [11], D. sargus helenae [2], D. sargus ascensionensis [2], D. noct [2], D. sargus sargus [1], D. kotschy [1]	
<i>Diplodus vulgaris</i>	<i>Diplodus vulgaris</i>	Species	47	Diplodus vulgaris [60], D prayensis [6], D. sargus [2], D. fasciatus [1]	Subspecies
<i>Pagrus major</i>	<i>Pagrus major</i>	Species	36	Pagrus major [21], Pagrus auratus [12]	Tabata, 2000
<i>Pagrus auratus</i>	<i>Pagrus auratus</i>				
<i>Stenotomus caprinus</i>	<i>Stenotomus caprinus</i>	Species	29	Stenotomus chrysops [24], S. caprinus [4]	Misidentification of specimen
<i>Stenotomus chrysops</i>	<i>Stenotomus chrysops</i>				

Tabella 6.2. Risultati BIN Discordance Report BOLD

Codice	Origine	Informazione sull'etichetta		Prodotto	COI bp	Identificazione di specie			
		Denom. Commerciale	Denom. scientifica			BOLD Species Level Barcode Records	MI	GenBank	MI
MS1	GDO	Pagello	NR	Intero	655	<i>P. acarne</i> <i>O. melanura</i>	100	<i>P. acarne</i> <i>O. melanura</i>	99
MS2	GDO	Dentale indiano	<i>Cheimerius nufar</i>	Intero	655	<i>P. pagrus</i> (1 seq.) <i>C. nufar</i>	99.69 99.54	<i>C. nufar</i>	99
MS3	GDO	Dentice atlantico	<i>Dentex angolensis</i>	Filletti	655	<i>D. angolensis</i> <i>D. macrophthalmus</i> <i>D. maroccanus</i>	100 99.84 99.84	<i>D. macrophthalmus</i>	98
MS4	GDO	Dentice atlantico	<i>Dentex angolensis</i>	Filletti	655	<i>D. angolensis</i> <i>D. macrophthalmus</i> <i>D. maroccanus</i>	100 99.84 99.84	<i>D. macrophthalmus</i>	98
MS5	GDO	Dentice atlantico	<i>Dentex canariensis</i>	Intero	655	<i>D. canariensis</i>	100	No match	
MS6	GDO	Dentice	<i>Dentex dentex</i>	Intero	655	No match		<i>Cheimerius nufar</i>	95
MS7	VD	Sarago sparaglione	<i>Diplodus annularis</i>	Intero	655	<i>D. annularis</i>	100	<i>D. annularis</i>	99
MS8	GDO	Sarago sparaglione	<i>Diplodus annularis</i>	Intero	655	<i>D. vulgaris</i> <i>D. sargus</i> <i>D. prayensis</i> <i>D. fasciatus</i>	99.67 99.53 98.75 98.75	<i>D. sargus</i> <i>D. vulgaris</i>	99 99
MS9	VD	Sarago pizzuto	<i>Diplodus puntazzo</i>	Intero	655	<i>D. puntazzo</i> <i>Dicentrarchus labrax</i>	100 99.54	<i>D. labrax</i> <i>D. puntazzo</i>	99 96
MS10	GDO	Sarago	<i>Diplodus sargus</i>	Intero	655	<i>D. sargus</i> <i>D. capensis</i> <i>T. amblycephalum</i> <i>D. sargus</i> subspecies <i>D. noct</i> <i>D. holbrookii</i> <i>D. argenteus</i>	100 99.55 99.39 99.39- 98.46 99.23 98.16 98.16	<i>D. sargus</i> <i>D. holbrookii</i> <i>D. argenteus</i>	100 98 98
MS11	VD	Sarago	<i>Diplodus vulgaris</i>	Intero	655	<i>D. vulgaris</i> <i>D. sargus</i> <i>D. prayensis</i> <i>D. fasciatus</i>	100 100 98.92 98.92	<i>D. sargus</i> <i>D. vulgaris</i>	100 99
MS12	VD	Mormora	<i>Lithognathus mormyrus</i>	Intero	606	<i>L. mormyrus</i>	100	<i>L. mormyrus</i>	100
MS13	GDO	Occhiata	<i>Oblada melanura</i>	Filletti	655	<i>D. sargus</i> <i>D. capensis</i> <i>T. amblycephalum</i> <i>D. sargus</i> subspecies <i>D. argenteus</i> <i>D. holbrookii</i>	100 99.54 99.39 99.39 -98.46 98.16 98.15	<i>D. sargus</i> <i>D. sargus</i> <i>kotschyi</i> <i>D. holbrookii</i> <i>D. argenteus</i>	100 99 98 98
MS14	GDO	Occhiata	NR	Filletti	655	<i>D. vulgaris</i> <i>D. sargus</i> <i>D. prayensis</i> <i>D. fasciatus</i>	100 99.69 98.73 98.62	<i>D. sargus</i> <i>D. vulgaris</i>	99 99
MS15	GDO	Occhiata	NR	Filletti	655	<i>D. vulgaris</i> <i>D. sargus</i> <i>D. prayensis</i> <i>D. fasciatus</i>	100 99.69 98.73 98.62	<i>D. sargus</i> <i>D. vulgaris</i>	99 99
MS16	VD	Pagello atlantico	<i>Pagellus bellotii</i>	Intero	655	<i>P. bellotii</i> <i>P. pagrus</i> (3 seq.) <i>P. natalensis</i>	100 99.53 99.21	<i>P. bellotii</i> <i>P. natalensis</i>	99 99
MS17	VD	Pagello fragolino	<i>Pagellus erythrinus</i>	Intero	655	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i> (2 seq.)	100 99.19	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i>	100 99
MS18	GDO	Pagro	<i>Pagrus auriga</i>	Intero	655	<i>P. auriga</i>	100	<i>P. auriga</i>	100
MS19	GDO	Pagro	<i>Pagrus caeruleostictus</i>	Intero	655	<i>P. caeruleostictus</i>	100	<i>P. caeruleostictus</i>	100
MS20	GDO	Pagro	<i>Pagrus caeruleostictus</i>	Intero	655	<i>P. caeruleostictus</i>	100	<i>P. caeruleostictus</i>	100
MS21	GDO	Salpa	<i>Sarpa salpa</i>	Intero	655	<i>S. salpa</i>	100	<i>S. salpa</i>	100
MS22	GDO	Salpa	<i>Sarpa salpa</i>	Intero	655	<i>S. salpa</i>	100	<i>S. salpa</i>	100
MS23	GDO	Salpa	<i>Sarpa salpa</i>	Intero	655	<i>S. salpa</i>	100	<i>S. salpa</i>	100
MS24	GDO	Orata	<i>Sparus aurata</i>	Filletti	655	<i>S. aurata</i>	100	<i>S. aurata</i>	100

MS25	VD	Orata	<i>Sparus aurata</i>	Filletti	655	<i>S. aurata</i>	100	<i>S. aurata</i>	100
MS26	GDO	Orata	<i>Sparus aurata</i>	Filletti	655	<i>S. aurata</i>	100	<i>S. aurata</i>	100
MS27	GDO	Orata	<i>Sparus aurata</i>	Filletti	655	<i>S. aurata</i>	100	<i>S. aurata</i>	100
MS28	VD	Tanuta	<i>Spondylisoma cantharus</i>	Intero	655	<i>S. cantharus</i>	99.84	<i>S. cantharus</i>	99
MS29	GDO	Pagro	NR	Intero	655	<i>P. pagrus</i> (1seq.) <i>C. nufar</i>	100 99.23	<i>C. nufar</i>	99
MS30	GDO	Pagro	NR	Intero	655	<i>P. pagrus</i> (1seq.) <i>C. nufar</i>	99.85 99.08	<i>C. nufar</i>	99
MS31	GDO	Pagro	NR	Intero	655	<i>P. pagrus</i> (1seq.) <i>C. nufar</i>	99.69 98.92	<i>C. nufar</i>	99
MS32	GDO	Pagro rosa indo pacifico	<i>Pagrus auratus</i>	Intero	655	<i>A. spinifer</i>	100	<i>A. spinifer</i>	100
MS33	GDO	Pagro rosa indo pacifico	<i>Pagrus auratus</i>	Intero	655	<i>A. spinifer</i>	100	<i>A. spinifer</i>	100
MS34	GDO	Dentice rosa*	<i>Cheimerius nufar</i>	Intero	655	<i>P. pagrus</i> (1 seq.) <i>C. nufar</i>	99.85 99.08	<i>C. nufar</i>	99
MS35	GDO	Dentice rosa*	<i>Cheimerius nufar</i>	Intero	592	<i>P. pagrus</i> (1 seq.) <i>C. nufar</i>	99.11 98.22	<i>C. nufar</i>	99
MS36	GDO	Pagro reale	NR	Intero	655	<i>A. spinifer</i>	100	<i>A. spinifer</i>	100
MS37	GDO	Pagro	NR	Filletti	655	<i>P. caeruleostictus</i>	100	<i>P. caeruleostictus</i>	99
MS38	GDO	Sarago sparaglione	<i>Diplodus annularis</i>	Intero	655	<i>D. annularis</i>	100	<i>D. annularis</i>	99
MS39	GDO	Pagello	NR	Intero	655	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i> (2 seq.)	99.85 99.19	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i> (2 seq.)	99 99
MS40	GDO	Pagello	NR	Intero	655	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i> (2 seq.)	99.85 99.19	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i> (2 seq.)	99 99
MS41	GDO	Pagello	NR	Intero	655	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i> (2 seq.)	99.85 99.03	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i> (2 seq.)	99 99
MS42	GDO	Pagello	NR	Intero	655	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i> (2 seq.)	99.85 99.03	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i> (2 seq.)	99 99
MS43	GDO	Pagro	NR	Intero	655	<i>P. caeruleostictus</i>	100	<i>P. caeruleostictus</i>	100
MS44	GDO	Pagro	NR	Intero	655	<i>P. caeruleostictus</i>	100	<i>P. caeruleostictus</i>	100
MS45	GDO	Pagro	NR	Intero	655	<i>P. caeruleostictus</i>	100	<i>P. caeruleostictus</i>	100
MS46	Ristorazi one	Dentice	NR	Intero		<i>D. dentex</i>	100	<i>D. dentex</i>	99
MS47	Ristorazi one	Pagro	NR	Intero	655	<i>P. caeruleostictus</i>	100	<i>P. caeruleostictus</i>	100
MS48	Ristorazi one	Pagello	NR	Intero	655	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i>	100 99.19	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i>	100 99
MS49	Ristorazi one	Pagello	NR	Intero	655	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i>	99.85 99.19	<i>P. erythrinus</i> <i>O. melanura</i>	99 99
MS50	Ristorazi one	Orata	NR	Intero	655	<i>S. aurata</i>	99.85	<i>S. aurata</i>	99
MS51	Ristorazi one	Sarago pizzuto	NR	Intero	654	<i>D. puntazzo</i> <i>D. labrax</i> (1 seq.)	100 99.83	<i>D. labrax</i> <i>D. puntazzo</i>	99 96
MS52	Ristorazi one	Sarago pizzuto	NR	Intero	655	<i>D. puntazzo</i> <i>D. labrax</i> (1 seq.)	100 99.83	<i>D. labrax</i> <i>D. puntazzo</i>	99 96
MS53	Ristorazi one	Salpa	NR	Intero	655	<i>Spicara mena</i>	100	<i>Spicara mena</i>	100
MS54	Ristorazi one	Occhiata	NR	Intero	655	<i>O. melanura</i>	99.69	<i>O. melanura</i>	95
MS55	Ristorazi one	Boga	NR	Intero		<i>Spicara mena</i> <i>Spicara flexousa</i> (1 seq.)	100 99.84	<i>Spicara mena</i>	100

Tabella 6.3 Risultati analisi IDs BOLD e BLAST (NCBI) condotte sui campioni commerciali. MI: Max Identity; ^bSpecie non depositata in Genbank

CAPITOLO 7

CONCLUSIONI

La metodica del DNA *barcoding* utilizzata in questo lavoro si è rivelata uno strumento capace di discriminare la maggior parte delle specie analizzate supportando l'identificazione effettuata sulla base delle caratteristiche morfologiche. Inoltre, la creazione di un ampio dataset di riferimento ha incrementato il numero di sequenze disponibili sul BOLD migliorando il potere discriminante del sistema. Infatti, è stato possibile mettere in luce, nel 33% dei campioni commerciali analizzati, l'utilizzo di una specie non corrispondente a quella riportata in etichetta.

La principale limitazione alla metodica utilizzata è rappresentata dalla degradazione del DNA che si verifica, con grado differente, durante la cottura del prodotto. Per tale motivo, al fine di sviluppare una tecnica applicabile anche ai prodotti trasformati sarebbe auspicabile lo sviluppo di nuovi primers per l'amplificazione di un frammento più corto del gene *COI* (c.d. mini DNA barcoding).

Comunque, la possibilità di utilizzare questo metodo di analisi a supporto dell'ispezione visiva, soprattutto in prodotti preparati, rappresenta un sistema capace di garantire il rispetto della normativa sulla tracciabilità e la sostenibilità della filiera.

BIBLIOGRAFIA

- Abdulmawjood A, Bulte M., 2001. Snail species identification by RFLP PCR and designing of species-specific oligonucleotide primers. *Journal of Food Science*; 66, 1287–93.
- Allison, E.H., Bell, J.D., Franz, N., Fuentevilla, C., McConney, P., Robinson, J., Westlund, L. and Willmann, R. 2012. Blending green and blue economics: sustainability transitions in the fisheries and aquaculture sector of small island developing States.
- Akasaki T, Yanagimoto T, Yamakami K, Tomonaga H, Sato S. 2006. Species identification and PCR-RFLP analysis of cytochrome *b* gene in cod fish (order Gadiformes) products. *J Food Sci* 71(3), 190–5.
- Akazaki, M. (1962) *Studies on Sparform Fishes-Anatomy, Phylogeny, Ecology and Taxonomy*, p.8. Kosugi Co. Ltd, Osaka, Japan.
- Akimoto S, Kinoshita S, Sezaki K, Mitani I., 2002. Identification of Alfonso and related fish species belonging to the genus *Beryx* with mitochondrial *16S rRNA* gene and its application on their pelagic eggs. *Fisheries Science*; 68, 1242–9.
- Apte A, Daniel S., 2003. PCR primer design. In: Dieffenbach CW, Dveksler GS, editors. *PCR primer: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor. p 61–74.
- Aranishi F, Okimoto T., 2004. PCR-based detection of allergenic mackerel ingredients in seafood. *J Genet* 83(2), 193–5.
- Aranishi F., 2005. Rapid PCR-RFLP method for discrimination of imported and domestic mackerel. *Mar Biotech* 7(6), 571–5.
- Aranishi F, Okimoto T, Ohkubo M, Izumi S., 2005. Molecular identification of commercial spiny pollack roe products by PCR-RFLP analysis. *J Food Sci* 70(4), 235–8.
- Aranishi F, Okimoto T, Izumi S., 2005. Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by PCR-RFLP analysis. *J Appl Genet* 46(1), 69–73.
- Aranishi F, Okimoto T, Ohkubo M., 2006., A short-cut DNA extraction from cod caviar. *J Sci Food Agric* 86, 425–8.

- Ardura, A., Pola, I.G., Ginuino, I., Gomes, V. and Garcia- Vazquez, E. 2010 Application of barcoding to Amazonian commercial fish labelling. *Food Research International* 43, 1549–1552.
- Armani, A., Castigliero, L., Tinacci, L., Gianfaldoni, D. and Guidi, A.,2010. Molecular characterization of icefish, (Salangidae family), using direct sequencing of mitochondrial *cytochrome b* gene. *Food Control* 22, 888–895.
- Armani A, Castigliero L, Tinacci L, Gandini G, Gianfaldoni D, Guidi A., 2012. A rapid PCR–RFLP method for the identification of *Lophius* species. *European Food Research and Technology*; 235, 253–63.
- Armani, A., Castigliero, L., & Guidi, A.,2012a. Fish frauds: the DNA challenge. *Animal Science Reviews*, 227.
- Armani, A., Castigliero, L., Tinacci, L., Gianfaldoni, D., & Guidi, A., 2012b. Multiplex conventional and real-time PCR for fish species identification of Bianchetto (juvenile form of *Sardina pilchardus*), Rossetto (*Aphia minuta*), and Icefish in fresh, marinated and cooked products. *Food Chemistry*, 133(1), 184-192.
- Armani A, D’Amico P, Castigliero L, Sheng G, Gianfaldoni D, Guidi A., 2012. Mislabeling of an ‘unlabelable’ seafood sold on the European market: the jellyfish. *Food Control*, 26, 247–51.
- Armani, A., Tinacci, L., Giusti, A., Castigliero, L., Gianfaldoni, D., & Guidi, A., 2013. What is inside the jar? Forensically informative nucleotide sequencing (FINS) of a short mitochondrial COI gene fragment reveals a high percentage of mislabeling in jellyfish food products. *Food Research International*, 54(2), 1383-1393.
- Armani A., Tinacci L., Xiong X. & Titarenko E., Guidi A.,Castigliero L., 2014. Development of a Simple and Cost-Effective Bead-Milling Method for DNA Extraction from Fish Muscles. *Food Anal. Methods*.
- Asensio L, Gonzalez I, Fernandez A, Cespedes A, Rodriguez MA, Hernandez PE, Garcia T, Martin R., 2001. Identification of Nile perch (*Lates niloticus*), grouper (*Epinephelus guaza*), and wreck fish (*Polyprion americanus*) fillets by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *JAOAC Int* 84 (3), 777–81.
- Asensio L, Gonzalez I, Rodriguez MA, Mayoral B, Lopez-Calleja I, Hernandez PE, Garcia T, Martin R., 2003. Identification of grouper (*Epinephelus guaza*),

wreck fish (*Polyprion americanus*), and Nile perch (*Lates niloticus*) fillets by polyclonal antibody-based enzymelinked immunosorbent assay. *J Agric Food Chem* 51 (5), 1169–72.

- Asensio L., 2007. Application of multiplex PCR for the identification of grouper meals in the restaurant industry. *Food Control*. doi:10.1016/j.foodcont.2007.11.002.
- Atkins H., 2010. You could be eating shark meat and not even know it. Cape Time. Available from: <http://www.iol.co.za/news/south-africa/you-could-be-eating-sharkmeat-1.483896>.
- Baldwin CC, Julie HM, Smith DG, Weigt' LA., 2009. Genetic identification and color descriptions of early life-history stages of Belizean *Phaeoptyx* and *Astrapogon* (Teleostei: Apogonidae) with Comments on identification of adult *Phaeoptyx*. *Zootaxa* ; 2008, 1–22.
- Barbuto, M., Galimberti, A., Ferri, E. et al., 2010. DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: the Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). *Food Research International* 43, 376–381.
- Barlett SE, Davidson WS., 1992. FINS (forensically informative nucleotide sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Bio Tech* 12 (3), 408–11.
- Bauchot, M.L. & Hureau, J.C., 1986. Sparidae. In: *Fishes of the Northern-Eastern Atlantic and the Mediterranean*, Vol. 2 (eds. P.J.P. Whitehead, M.L. Bauchot, J.C. Hureau, J. Nielsen, & Tortonese), pp 883-907. United Nations Educational Scientific and Cultural Organization (UNESCO), Paris.
- Bauchot, M.L. & Hureau, J.C., 1990. Sparidae. In: *Checklist of the Fisher of the Eastern Tropical Atlantic- Catalogue des Poissons de l'Atlantic Tropical Oriental*, Vol 3 (eds J.C. Hureau, C. Karrer, A.Post, & L. Saldhana), pp 790-812. UNESCO, Paris.
- Baker CS, Lento GM, Cipriano F, Palumbi SR. 2000. Predicted decline of Mprotected whales based on molecular genetic monitoring of Japanese and Korean markets. *Proc R Soc Lond B*, 267(1449), 1191–9.
- Bensasson, D, Zhang D, Hartl DL, Hewitt GM., 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology and Evolution*; 16, 314–21.

- Bonaparte C.L.J.L., 1831. Saggio di una distribuzione metodica degli animali vertebrati. *Giornale Arcadico di Scienze Lettere ed Arti*, 49, 1-77.
- Borgo R, Souty Grosset C, Bouchon D, Gomot L., 1996. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. *Journal of Food Science*; 61, 1–4.
- Bossier P. 1999. Authentication of seafood products by DNA patterns. *J Food Sci* 64(2), 189–93.
- Bronwyn H. Holmesa, Dirk Steinkeb, Robert D.Warda, 2009. Identification of shark and ray fins using DNA *barcoding*. *Fisheries Research* 95, 280–288.
- Brown Jr, PB, Kenny J, Ashley C, Rubio A, Juszczak G, Conde D, et al., 2009. Annual Report on the United States Seafood Industry. 16th edn. Urner Barry, New Jersey.
- Brzezinski JL, Detection of crustacean DNA and species identification using a PCR-restriction fragment length polymorphism method. *Journal of Food Protein*; 68 (9), 1866–73.
- Buhay JE., 2009. ‘Coi-like’ sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustacean Biology*; 29 (1), 96–110.
- Buxton, C.D. & Garrat, P.A.,1990. Alternative reproductive styles in seabreams (Pisces: Sapradae). *Environmental Biology of Fishes*, 28, 113-124.
- Calo-Mata P, Sotelo CG, Perez-Martin RI, Rehbein H, Hold GL, Russell VJ, Pryde S, Quinteiro J, Rey-Mendez M, Rosa C, Santos AT., 2003. Identification of gadoid fish species using DNAbased techniques. *Eur Food Res Technol* 217, 259–64.
- Carrera E, Garcia T, Cespedes A, Gonzalez I, Sanz B, Hernandez P, Martin R., 1997. Immunostick colorimetric ELISA assay for the identification of smoked salmon (*Salmo salar*), trout (*Oncorhynchus mykiss*) and bream (*Brama raii*). *J Sci Food Agric* 74, 547–50.
- Carrera E, Garcia T, Cespedes A, Gonzalez I, Fernandez A, Hernandez PE, Martin R., 1999. Salmon and trout analysis by PCR-RFLP for identity authentication. *J Food Sci* 64(3), 410–3.
- Carrera E, Garcia T, Cespedes A, Gonzalez I, Fernandez A, Asensio LM, Hernandez PE, Martin R., 2000. Differentiation of smoked *Salmo salar*,

Oncorhynchus mykiss and *Brama raii* using the nuclear marker 5S rDNA. *Int J Food Sci Technol* 35, 401–6.

- Carpenter, K.E. & Niem, V.H. (eds), 2001. *FAO Species Identification Guide for Fishery Purpose. The Living Marine Resources of the Western Central Pacific*, Vol. 5, ppg 2791-3380. Bony fishes part 3 (Menidae to Pomacentridae), Rome, FAO.
- Carpenter, K.E. & Johnson, G.D., 2002. A phylogeny of sparoid fishes (Perciformes:Percoidei), based on Morphology. *Ichthyological Research*, 49, 114-127.
- Carvalho D.C., Danilo A.P. Neto, Bruno S.A.F. Brasil & Denise A. A. Oliveira, 2011. DNA *barcoding* unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*; 22, 97–105.
- Cawthorn DM, Steinman HA, Corli Witthuhn R., 2012. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. *Food Research International*, 46, 30–40.
- Cebrian, J. Duarte, C.M., Marba, N., 1996. Herbivory on *Posidonia oceanica*: magnitude and variability in the Spanish Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series*, 30, 147-155.
- Cervigòn, F., 1993. *Los Peces marinos de Venezuela*. Vol. 2. Fundación Científica Los Roques, Caracas Venezuela.
- Cespedes, A., Garcia, T., Carrera, E., Gonzalez, I., Sanz, B., Hernandez, P. and Martin, R., 1998. Identification of flatfish species using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction analysis of the *cytochrome b* gene. *Journal of Food Science*, 63, 206–209.
- Cespedes, A., Garcia, T., Carrera, E., Gonzalez, I., Fernandez, I., Asensio, L., Hernandez, P.E. and Martin, R., 1999. Genetic discrimination among *Solea solea* and *Microchirus azevia* by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA fragments. *Archiv fur Lebensmittelhygiene*, 50, 49–72.
- Cespedes A, Garcia T, Carrera E, Gonzalez I, Fernandez A, Hernandez PE, Martin R., 1999. Identification of sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *J Agric Food Chem* 47(3), 1046–50.

- Chapela MJ, Sotelo CG, Calo-Mata P, Perez-Martin RI, Rehbein H, Hold GL, Quinteiro J, Rey-Mendez M, Rosa C, Santos AT., 2002. Identification of cephalopod species (Ommastrephidae and Loliginidae) in seafood products by forensically informative nucleotide sequencing (FINS). *J Food Sci* 67(5), 1672–6.
- Chapela MJ, Sotelo CG, Perez-Martin RI. 2003. Molecular identification of cephalopod species by FINS and PCR-RFLP of a *cytochrome b* gene fragment. *Eur Food Res Technol* 217, 524–9.
- Chiba, S.N., Iwatsuki, Y., Yoshino, T., & Hanzawa, N., 2009. Comprehensive phylogeny of the family Sparidae (Perciformes: Teleostei) inferred from mitochondrial gene analyses. *Genes and Genetic Systems*, 84, 153-170.
- Choat J.H. & Robertson D.R. (1975) Protogynous hermaphroditism in fishes of the family Scaridae. In: *Intersexuality in the Animal Kingdom* (ed. R. Reinboth), pp 263-283. Springer-Verlag, New York.
- Chow S, Nohara K, Tanabe T, Itoh T, Tsuji S, Nishikawa Y, Uyeyanagi S, Uchikawa K., 2003. Genetic and morphological identification of larval and small juvenile tunas (Pisces: Scombridae) caught by a mid-water trawl in the western Pacific. *Bull Fish Res Agen* 8, 1–14.
- Civera, T., 2003. Species Identification and Safety of Fish Products. *Veterinary Research Communication*, 27 (Suppl.1), 481-489.
- Clarke SC, Magnussen JE, Abercrombie DL, McAllister MK, Shivji MS, 2006. Identification of shark species composition and proportion in the Hong Kong shark fin market based on molecular genetics and trade records. *Conserv Biol* 20(1), 201–11.
- Cocolin, L., D'Agaro, E., Manzano, M., Lanari, D. and Comi, G., 2000. Rapid PCR-RFLP method for the identification of marine fish fillets (seabass, seabream, umbrine, and dentex). *Journal of Food Science*, 65, 1315–1317.
- Cohen, N.J., Deeds, J.R., Wong, E.S. et al., 2009. Public health response to puffer fish (tetrodotoxin) poisoning from mislabeled product. *Journal of Food Protection* 72, 810–817.
- Colavita G., Meazza M., Rea S., Nasali M., 2012. Frodi alimentari, tecniche ispettive, aspetti tecnici e giuridici. *Le Point Vétérinaire Italie srl*, Milano.

- Colombo, M.M., Colombo, F., Biondi, P.A., Malandra, R. and Renon, P., 2000. Substitution of fish species detected by thin-layer isoelectric focusing and a computer-assisted method for the evaluation of gels. *Journal of Chromatography A*, 880, 303–309.
- Comesana AS, Abella P, Sanjuan A., 2003. Molecular identification of five commercial flatfish species by PCR-RFLP analysis of a *12S* rRNA gene fragment. *J Sci Food Agric* 83, 752–9.
- Cooper, A. and Wayne, R., 1998. New uses for old DNA. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 49–53.
- Costa FO, Carvalho GR., 2007. The Barcode of Life Initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA *barcoding* of fish. *Genomics, Society and Policy*, 3, 29–40.
- Costa FO, Landi M, Martins R, Costa MH, Costa ME, Carneiro M, Alves MJ, Steinke D, Carvalho GR., 2012. A ranking system for reference libraries of DNA barcodes: application to marine fish species from Portugal. *PLoS ONE*, Volume 7, Issue 4.
- Cunningham, E.P. and Meghen, C.M., 2001. Biological identification systems: genetic markers. *Rev. Sci. Tech.* 20, 491–499.
- Day, J.J., 2000. Comparative morphology and evolutionary relationship of the Sparidae (Teleostei: Percoidei). Phd thesis, University of London.
- Day, J.J., 2002. Phylogenetics relationships of the Sparidae (Teleostei: Percoidei) and implication for convergent trophic evolution. *Biological Journal of the Linnean Society*, 76, 269-301.
- Delgado CL, Wada N, Rosegrant MW, Meijer S, Ahmed M., 2003. Outlook for Fish to 2020: Meeting Global Demand. International Food Policy Research Institute and The World Fish Center;. Available from: <http://www.ifpri.org/sites/default/files/pubs/pubs/fpr/pr15.pdf>.
- Di Pinto A., Di Pinto P., Terio V., Bozzo G., Elisabetta E., Ceci E., Tantillo G., 2013. DNA barcoding for detecting market substitution in salted cod fillets and battered cod chunks. *Food Chemistry* 141, 1757–1762.
- Dooley JJ, Sage HD, Brown HM, Garrett SD, 2005. Improved fish species identification by use of lab-on-a-chip technology. *Food Control* 16, 601–7.

- Emre Keskin, Hasan H. Atar, 2013. DNA *barcoding* commercially important fish species of Turkey. *Molecular Ecology Resources*, 13 (5), 788–797.
- Esteve-Romero, J., Ynam, U.M., Bossi, A. and Righetti, P.G., 1996. Fish species identification by isoelectric focusing of parvalbumins in immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 17, 1380–1385.
- Etienne, M., Jerome, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kundiger, R., Malmhedem-Yman, I., Ferm, M., Craig, A., Mackie, I., Jessen, F., Smelt, A. and Luten, J., 1999. A standardized method of identification of raw and heat-processed fish by urea isoelectric-focusing: a collaborative study. *Electrophoresis*, 20, 1923–1933.
- Eugene H.-K. Wong, Robert H. Hanner, 2008. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International* 41, 828–837.
- European Commission. Facts and Figures on the Common Fisheries Policy. Basic Statistical Data Publications Office of the European Union; 2010. Available from: http://ec.europa.eu/fisheries/documentation/publications/pcp_en.pdf.
- FAO 2005–2012. International Plan of Action to Prevent, Deter, and Eliminate Illegal, Unreported and Unregulated Fishing – Web site. Illegal, Unreported and Unregulated (IUU) fishing. FI Institutional Websites. Text by David J. Doullman. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. FAO, Rome, Updated 20 June 2011. Available from URL: <http://www.fao.org/fishery/topic/3195/en>
- FAO- Fish-StatPlus, 2008. FAO's Fisheries and Aquaculture Department. Statistical Collections. Capture Production and Aquaculture production datasets 1950-2006. (Release date: march 2008).
- FAO, 2012. Estimated Total International Trade in Fishery Commodities. Available from: URL: <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/a2ybc.pdf>.
- Fernandez A, Garcia T, Gonzalez I, Asensio L, Rodriguez MA, Hernandez PE, Martin R., 2002. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a16S rRNA gene fragment for authentication of four clam species. *J Food Protect* 65 (4), 692–5.
- Ferri, E., Barbuto, M., Bain, O., Galimberti, A., Uni, S., & Guerriero, R., 2009. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA *barcoding* for the

identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology* 6.

- Filonzi, L., Chiesa, S., Vaghi, M. and Marzano, F.N., 2010. Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. *Food Research International* 43, 1383–1388.
- Frezza, D., 2003. A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal. *J. Food Prot.* 66, 103–109.
- Frimodt, C., 1995. Multilingual Illustrated Guide to the World's Commercial Warmwater Fish. *Fishing News Books*, Osney Mead, Oxford, England.
- Froese R, Pauly D., 2012. FishBase. World Wide Web electronic publication. Available from: URL: <http://www.fishbase.org> version.
- Garcia-Vazquez, E., Perez, J., Martinez, J.L. et al., 2011. High level of mislabeling in Spanish and Greek hake markets suggests the fraudulent introduction of African species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 475–480.
- Garibaldi L, Busilacchi S. ASFIS List of Species for Fishery Statistics Purposes. Aquatic Sciences and Fisheries Information System 2002, Reference Series No. 15. Available from: URL: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y7527t/y7527t00.pdf>.
- Garibaldi, L., 2012. The FAO global capture production database: a six-decade effort to catch the trend. *Marine Policy*, 36(3): 760–768.
- Garret, P.A. 1986. Protogynous hermaphroditism in the slinger *Chrysoblephus puniceus* (Gilchrist & Thompson, 1908) (Teleostei: Sparidae). *Journal of Fish Biology*, 28, 297-306.
- Ghiselin M.T., 1969 The evolution of hermaphroditism among animals. *Quarterly Review of Biology*, 44, 189-208.
- Gil LA, 2007. PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends Food Sci Technol* 18, 558–66.
- Golan E, Krissoff B, Kuchler F, Calvin E, Nelson K, Price G., 2004. Traceability in the U.S. Food Supply: Economic Theory and Industry Studies. *Agricultural Economic Report No. (AER-830)*, pp. 56.

- Gongora, J. et al., 2004. Phylogenetic relationships of Australian and New Zealand feral pigs assessed by mitochondrial control region sequence and nuclear GPII genotype. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33, 339–348.
- Goossens, B. et al., 1998. Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. *Mol. Ecol.* 7, 1237–1241.
- Greig C, Robertson JM, Banks MA, 2002. Rapid PCR-based species tests for threatened sympatric salmonids. *Conserv Gen* 3, 83–6.
- Hajipieris P., 2009. Recent Development in the Branding and Marketing of Fish Products. Proceedings of the OECD/FAO Roundtable on EcoLabelling and Certification in Fisheries, The Hague, Netherlands. Available from: URL: <http://www.oecd.org/dataoecd/38/57/42719002.pdf>.
- Hajibabaei M, deWaard JR, Ivanova NV et al., 2005. Critical factors for the high volume assembly of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360, 1959–1967.
- Hajibabaei M, Smith A, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Hebert PD., 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*; 6, 959–64.
- Hanel, R. & Sturmbauer, C., 2000. Multiple recurrent evolution of trophic types in northeastern Atlantic Mediterranean seabreams (Sparidae, Percoidae). *Journal of Molecular Evolution*, 50, 276-283.
- Harmelin-Vivien, M.L., Harmelin, J.G., & Lebourllex, V., 1995. Microhabitat requirements for settlement of juvenile sparids fishes on Mediterranean rocky shores. *Hydrobiologia*, 300-301, 309-320.
- Havelange, S., Lepoint, G., Dauby, P., 1997. Feeding of the sparid fish *Sarpa salpa* in seagrass ecosystem: diet and carbon flux. *Marine Ecology*, 18, 287-297.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR , 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 270, 313–321
- Hebert PD, Ratnasingham S, DeWaard JR, 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society of London. *Series B, Biological Sciences*; 270 (Suppl. 1), 96–9.

- Hebert P.D.N., Ratnasingham S., 2007. BOLD : The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7, 355–364.
- Henson S, Mitullah W., 2004. Kenya Exports of Nile Perch: Impact of Food Safety Standards on an Export-Oriented Supply Chain. *World Bank Working Paper*, Washington, DC.
- Herrero B., Vieites JM, Espineira M., 2012. Fast real-time PCR for the detection of crustacean allergen in foods. *Journal of Agriculture And Food Chemistry*; 60, 1893–7.
- Hird HJ, Hold GL, Chisholm J, Reece P, Russell VJ, Brown J, Goodier R, MacArthur R., 2005. Development of a method for the quantification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) in commercial products using real-time PCR. *Eur Food Res Technol* 220, 633–7.
- Horstkotte B, Rehbein H., 2003. Fish species identification by means of restriction fragment length polymorphism and high-performance liquid chromatography. *J Food Sci* 68 (9), 2658–66.
- Hsieh HS, Chai TJ, Hwang DF., 2007. Using the PCR-RFLP method to identify the species of different processed products of billfish meats. *Food Control* 18, 369–74.
- Hsieh, Y.-H.P., Woodward, B.B. and Blanco, A.W., 2007. Species substitution of retail snapper fillets. *Journal of Food Quality* 18, 131–140.
- Hwang, D.F, Yu-Wen, H., Shiu, Y.C., Chen, S.K. and Cheng, C.A., 2002. Identification of tetrodotoxin and fish species in a dried dressed fish fillet implicated in food poisoning. *Journal of Food Protection*, 65, 389–392
- Ivanova NV, Zemplak TS, Hanner RH, Hebert PDN., 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*;7, 544–8.
- Jacquet JL, Pauly D., 2007. The rise of seafood awareness campaigns in an era of collapsing fisheries. *Marine Policy*, 31, 308–13.
- Jadot, C., Donnay, A., Acolas, M.L., 2006. Activity patterns, home range size, and habitat utilization of *Sarpa salpa* (Teleostei: Sparidae) in the Mediterranean Sea. *ICES Journal of Marine Science*, (1), 128-139.
- Jaffee S, Henson S., 2004. Food exports from developing countries: the challenges posed by standards In: Aksoy MA, Beghin JC, editors. *Global Agricultural Trade and Developing Countries*. Oxford University Press, Oxford.

- Jaquet J.L., Pauly D., 2008. Trade Secrets: Renaming and mislabeling of seafood. *Marine policy*, 32, 309-318.
- Jerome M, Lemaire C, Bautista JM, Fleurence JL, Etienne M., 2003. Molecular phylogeny and species identification of sardines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 51, 43–50.
- Jerome M, Lemaire C, Verrez-Bagnis V, Etienne M., 2003. Direct sequencing method for species identification of canned sardine and sardine-type products. *J Agric Food Chem* 51(25), 7326–32.
- Johnson , G.D., 1993. Percomorph phylogeny: progress and problem. *Bulletin of Marine Science*, 52, 1-28.
- Jordan, D.S. & Felser, 1893. A Review of the Sparoid fishes of America and Europe, pp. 421-544. Report of U.S. Commercial Fisheries 1889-91.
- Kelleher K., 2005. Discards in the world's marine fisheries: an update. FAO Fisheries Technical Paper, 470, 131.
- Kirby MX., 2004. Fishing down the coast: historical expansion and collapse of oyster fisheries along continental margins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*; 101 (35), 13096–9.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X. and Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 86, 6196–6200.
- Kochzius M, Nolte M, Weber H, Silkenbeumer N, Hjørleifsdóttir S, Hreggvidsson GO., 2008. DNA microarrays for identifying fishes. *Marine Biotechnology*, 10, 207–17.
- Kochzius M, Seidel C, Antoniou A, Botla SK, Campo D, et al., 2010. Identifying Fishes through DNA Barcodes and Microarrays. *PLoS ONE* 5, e12620.
- Kyle CJ, Wilson CC. 2007. Mitochondrial DNA identification of game and harvested freshwater fish species. *Forensic Sci Int* 166 (1), 68–76.
- Laube I, Zagon J, Broll H., 2007. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. *Int J Food Sci Technol* 42, 336–41.
- Leis J.M., Trnski, T., & Beckley, L.E., 2002. Larval development of *Pagellus natalensis* and what larval morphology indicates about relationships in the

perciform fish family Sparidae (Teleostei). *Marine and Freshwater Research*. 53, 367-376.

- Lenstra JA., 2003. DNA methods for identifying plant and animal species in food. In: Lees M, editor. Food authenticity and traceability. Cambridge, U.K.: Woodhead Publishing Ltd. P 34–53.
- Lin WF, Hwang DF., 2007. Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. *Food Control* 18, 1050–7.
- Ling, K.H., Nichols, P.D. and But, P.P.-H., 2009. Fish- Induced Keriorrhea. *Advances in Food and Nutrition Research* 57, 1–52.
- Lin YS, Poh YP, Lin SM, Tzeng CS., 2002. Molecular techniques to identify freshwater eels: RFLP analyses of PCR-amplified DNA fragments and allele-specific PCR from mitochondrial DNA. *Zool Stud* 41(4), 421–30.
- Liu ZJ, Cordes JF., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1–37.
- Lo Galbo, A.M., Carpenter, K.E., & Reed, D.L., 2002. Evolution of trophy types in emperor fishes (*Lethrinus*, Lethrinidae, Percoidae) based on cytochrome *b* gene sequence variation. *Journal of Molecular Evolution*, 54, 754-762.
- Lockley, A.K. and Bardsley, R.G., 2000. DNA based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 67–77
- Logan, C.A., Alter, S.E., Haupt, A.J., Tomalty, K. and Palumbi, S.R., 2008. An impediment to consumer choice: overfished species are sold as Pacific red snapper. *Biological Conservation* 141, 1591–1599.
- Lopez B, Karaïskou N. et al., 2011. High level of mislabeling in Spanish and Greek hake markets suggests the fraudulent introduction of African species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2), 475–80.
- Lovejoy H., 2007. Making the seafood industry more sustainable: creating production chain transparency and accountability. *Journal of Cleaner Production*, 15, 577–89.
- Lowenstein, J.H., Amato, G. and Kolokotronis, S.O., 2009. The real maccoyii: identifying tuna sushi with DNA barcodes-contrasting characteristic attributes and genetic distances. *PLoS ONE* 4.

- Lowenstein, J.H., Burger, J., Jeitner, C.W., Amato, G., Kolokotronis, S.-O. and Gochfeld, M., 2010. DNA barcodes reveal species-specific mercury levels in tuna sushi that pose a health risk to consumers. *Biology Letters*, 6, 692–695.
- Machado-Schiaffino, G., Martinez, J.L. and Garcia-Vazquez, E., 2008. Detection of mislabeling in hake seafood employing mtSNPs-based methodology with identification of eleven hake species of the genus *Merluccius*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 56, 5091–5095.
- Mackie IM, Pryde SE, Gonzales-Sotelo C, Medina I, Perez-Martin RI, Quinteiro J, Rey-Mendez M, Rehbein H., 1999. Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends Food Sci Technol* , 10, 9–14.
- Mafra I, Ferreira IM, Oliveira MB., 2007. Food authentication by PCR-based methods. *Eur Food Res Technol*, published online: 30 October 2007.
- Mafra Ferreira MPLVO, Beatriz MBPP., 2008. Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227, 649–65.
- Magnusson J, Safina C, Sissenwine M., 2001. Whose fish are they anyway? *Science*, 293:1267–8.
- Magnussen JE, Pikitch EK, Clarke SC, Nicholson C, Hoelzel AR, Shivji MS, 2007. Genetic tracking of basking shark products in international trade. *Anim Conserv* 10,199–207.
- Malandra R., Pagani E., 2007. Riconoscimento degli sparidi attraverso la dentatura, *Il pesce*, num. 2.
- Mansfield B., 2003. Spatializing globalization: ‘A geography of quality’ in the seafood industry. *Journal of Economic Geography*, 79, 1–16.
- Manzoni P., Trepedino V., 2008. Grande enciclopedia illustrate dei pesci. Guida al riconoscimento di oltre 600 specie presenti nelle acqua d’Europa o importate sui mercati europei. *Eurofishmarket S.r.l.*
- Marko, P.B., Lee, S.C., Rice, A.M. et al., 2004. Mislabelling of a depleted reef fish. *Nature*, 430, 309–310.
- Marmiroli N, Peano C, Maestri E., 2003. Advanced PCR techniques in identifying food components. In: Lees M, editor. Food authenticity and traceability. Cambridge, U.K.:Woodhead Publishing Ltd. p 3–33.

- Marras SA, Tyagi S, Kramer FR., 2006. Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Clinica Chimica Acta* 363 (1–2), 48–60.
- Martinez Ortiz J., 2005. White Fish Handbook of Ecuador: 45 species of commercial interest. Quito: Asoexpebla.
- Martinez I, James D, Loreal H., 2005. Application of modern analytical techniques to ensure seafood safety and authenticity. *FAO fisheries technical paper* nr 455. Rome, Italy: FAO.73 p.
- Michail A. Pavlidis and Costantinos C. Mylonas, 2011. Sparidae. Biology and aquaculture of gilted sea bream and other species. *Wiley-Blackwell*.
- Michelini E, Cevenini L, Mezzanotte L, Simoni P, Baraldini M, De Laude L, et al., 2007. One-step triplex-polymerase chain reaction assay for the authentication of yellowfin (*Thunnus albacares*), bigeye (*Thunnus obesus*), and skipjack (*Katsuwonus pelamis*) tuna DNA from fresh, frozen, and canned tuna samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 55 (19), 7638–47.
- Miller, D.M. and Mariani, S., 2010. Smoke, mirrors and mislabelled cod: poor transparency in the European seafood industry. *Frontiers in Ecology and the Environment* ; 8, 517–521.
- Miller D., Jessel A., Mariani S., 2011. Seafood mislabelling: Comparisons of two western European case studies assist in defining influencing factors, mechanism and motives. *Fish and fisheries*, Vol. 13, 3, 345-358.
- Miller D.D., Clarke M., Mariani S., 2012. Mismatch between fish landings and market trends: A western European case study. *Fishery Research*, 121-122, 104-114.
- Moe T., 1988. Perspectives on traceability in food manufacture. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 211–4.
- Moran P, Garcia-Vazquez E., 2006. Identification of highly prized commercial fish using a PCR-based methodology. *Biochem Mol Biol Educat* , 34 (2), 121–4.
- Moretti VM, Turchini GM, Bellagamba F, Caprino F. 2003. Traceability issues in fishery and aquaculture products. *Vet Res Com* 27 (Suppl 1), 497–505.
- Munro, I.S.R. (1949) Revision of Australian silver breams *Mylio* and *Rhabdosargus*. *Memories of the Queensland museum*, 12 (4), 182-223.

- Nebola, M., Borilova, G. and Kasalova, J., 2010. PCR-RFLP analysis of DNA for the differentiation of fish species in seafood samples. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulwany* ; 54, 49–53.
- Nelson, J.S., 2006. *Fishes of the World*, 4th Ed., 601 p. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Ogden R., 2008. Fisheries forensics: the use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. *Fish and fisheries*, 9, 462-472.
- Ogden R., 2011. Fisheries forensics: the use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. *Fish and Fisheries*, 9, 462–72.
- Orlando, L., 2002. Ancient DNA and the population genetics of cave bears (*Ursus spelaeus*) through space and time. *Mol. Biol. Evol.* 19, 1920–1933.
- Orrell, T.M., Carpenter, K.E., Musick, J.A., 2002. A phylogenetic and biogeographic analysis of the Sparidae (Perciformes: Percoidae) based on cytochrome b sequences. *Copeia*, 3, 618-631.
- Orrell, T.M. & Carpenter, K.E., 2004. A phylogeny of the fish family Sparidae (Porgies) inferred from mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32, 425-434.
- Pamilo P, Viljakainen L, Vihavainen A., 2007. Exceptionally high density of NUMTs in the honeybee genome. *Molecular Biology and Evolution*; 24, 1340–6.
- Pascal, G. and Mahe, S., 2001. Identity, traceability, acceptability and substantial equivalence of food. *Cell Mol. Biol.* 47, 1329–1342.
- Pauly D, Maclean J., 2003. In *a Perfect Ocean: the State of Fisheries and Ecosystems in the North Atlantic Ocean*. Island Press, Washington, DC; . p. 178.
- Pepe T, Trotta M, di Marco I, Cennamo P, Anastasio A, Cortesi ML, 2005. Mitochondrial *cytochrome b* DNA sequence variations: an approach to fish species identification in processed fish products. *J Food Protect* 68(2), 421–5
- Perez M, Alvarez C, Balado M, Cabado AG, Vieites JM, Presa P., 2004. Identification of South Atlantic hakes (*Merluccius australis* and *Merluccius hubbsi*) in processed foods by PCR-RFLPs of cytochrome *b* gene. *J Aquat Food Prod Technol* 13(2), 59–67.

- Pilar A. Haye, Nicolás I. Segovia, Raúl Vera, María de los Ángeles Gallardo, Cristian Gallardo-Escárate. Authentication of commercialized crab-meat in Chile using DNA Barcoding. *Food Control*, 25, 239 e 244.
- Pineiro, C., Barros-Velazquez, J., Perez-Martin, R.I. and Gallardo, J.M., 2000. Specific enzyme detection following isoelectric focusing as a complementary tool for the differentiation of related Gadoid fishspecies. *Food Chemistry*, 70, 241–245.
- Pitcher T, Pauly D., 1998. Rebuilding ecosystems, not sustainability, as the proper goal of fishery management. In: Pitcher T, Hart P, Pauly D, editors. *Reinventing Fisheries Management*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; p. 311–29.
- Prado, M. et al., 2004. Application of a polymerase chain (PCR) method as a complementary tool to microscopic analysis for the detection of bones and other animal tissues in home-made animal meals. *J. Sci. Food Agric.* 84, 505–512.
- Quinteiro, J., Sotelo, C.G., Rehbein, H., Pryde, S.E., Medina, I., Perez-Martin, R.I., Rey-Mendez, M. and Mackie, I.M., 1998. Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCRrestrictionfragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1662–1669.
- Ram, J.L., Ram, M.L. and Baidoun, F.F., 1996. Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2460–2467.
- Ramella MS, Kroth MA, Tagliari C, Arisi ACM., 2005. Optimization of random amplified polymorphic DNA protocol for molecular identification of *Lophius gastrophysus*. *Cienc Tecnol Aliment Campinas* 25(4), 733–5.
- Rasmussen RS, Morrissey MT., 2008. DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Food Science and Food Safety*;7, 280–95.
- Rasmussen RS, Morrissey MT., 2009. Application of DNA-based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market. *Food Science and Food Safety*, 8, 118–54.

- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N., 2007. BOLD: The barcode of life data system. *Molecular Ecology Notes*, 7, 355–367. <www.barcodinglife.org>.
- Rego I, Martinez A, Gonzalez-Tizon A, Vieites J, Leira F, Mendez J., 2002. PCR technique for the identification of mussel species. *J Agric Food Chem* 50(7), 1780–4.
- Rehbein, H., 1990. Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung* 191, 1–10
- Rehbein, H., Etienne, M., Jerome, M., Hattula, T., Knudsen, L.B., Jessen, F., Lutén, J.B., Bouquet, W., Mackie, I.M., Ritchie, A.H., Martín, R. and Mendes, R., 1995. Influence of variation in methodology on the reliability of the isoelectric focusing method of fish species identification. *Food Chemistry*, 52, 193–197
- Rehbein, H., Mackie, I.M., Pryde, S., Gonzalez-Sotelo, C., Medina, I., Perez-Martin, R., Quinteiro, J. And Rey-Mendez, M., 1999. Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA patterns. *Food Chemistry*, 67, 333–339.
- Rehbein H, Horstkotte B., 2003. Determination of the composition of multi-species fishery products by PCR-based techniques. In Proceedings of the First Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference, Reykjavik, Iceland, 190–2.
- Richly, E, Leister D., 2004. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. *Molecular Biology and Evolution*; 21, 1081–4.
- Russell VJ, Hold GL, Pryde SE, Rehbein H, Quinteiro J, Rey-Mendez M, Sotelo CG, Perez- Martin RI, Santos AT, Rosa C., 2000. Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. *J Agric Food Chem* 48(6), 2184–8.
- Sanjuan, A. and Comesana, A., 2002. Molecular identification of nine commercial flatfish species by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of a segment of the cytochrome b region. *Journal of Food Protection*, 65, 1016–1023.
- Saitou N, Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4 (4), 406–25.

- Sanger F., Nicklen S., Coulson R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12), 5463-5467.
- Santaclara FJ, Cabado AG, Vieites JM., 2006. Development of a method for genetic identification of four species of anchovies: *E. encrasicolus*, *E. anchoita*, *E. ringens* and *E. japonicus*. *Eur Food Res Technol* 223, 609–14.
- Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R, 2005. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding.
- Scholz, M. et al., 1998. A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extract is determined as human collagen type I. *Anal. Biochem.* 259, 283–286.
- Scialpi, A. Mengoni, A., 2008. La PCR e le sue variant. Quaderno di laboratorio, Firenze University Press, 2008, Manuali Scienze,2.
- Shapiro, D.Y., 1987. Differentiation and evolution of sex change in fishes. *Bioscience*, 37, 490-496.
- Shivji M, Clarke S, Pank M, Natanson L, Kohler N, Stanhope M., 2002. Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conserv Biol* 16(4), 1036–47.
- Smith J.L.B. & Smith M.M: 1986 Family no. 183: Sparidae. In: *Smith's sea fishes* (eds. M.M. Smith & P.C. Heemstra), pp. 580-594. Macmillian, Joannesburg, South Africa.
- Smith, P.J. and Benson, P.G., 2001. Biochemical identification of shark fins and fillets from the coastal fisheries in New Zealand. *Fisheries Bulletin*, 99, 351–355.
- Song, H, Buhay JE, Whiting MF, Crandall KA., 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA; 105, 13486–91.
- Sotelo CG, Pineiro C, Gallardo JM, Perez-Martin RI. 1993. Fish species identification in seafood products. *Trends Food Sci Technol* 4, 395–401
- Stiles ML, Lahr H, Lahey W, Shaftel E, Bethel D, Falls J, et al., 2011. Bait and Switch: How Seafood Fraud Hurts our Oceans, our Wallets and our Health. Oceana; Available from: URL: <http://oceana.org/en/news->

media/publications/reports/baitand-switch-how-seafood-fraud-hurts-our-oceans-our-walletsand-our-health.

- Summerer, M., Hanel, R., & Sturmbauer, C., 2001. Mitochondrial phylogeny and biogeographic affinities of seabreams of the genus *Diplodus* (Sparidae). *Journal of fish biology*. 56 (6), 1638-1652.
- Swartz W, Sumaila UR, Watson R, Pauly D., 2010. Sourcing seafood for the three major markets: the EU, Japan and the USA. *Marine Policy*, 34, 1366–73. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological*
- Tamura K, Nei M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10 (3), 512–26.
- Taylor WW, Schechter MG, Wolfson LG., 2007. Globalization: Effects on Fisheries Resources. Cambridge University Press, Cambridge.
- Traceability Systems, Certification, Eco-labeling and Standards for Achieving Sustainable Seafood. Ecology Action Centre; 2009. Available from: URL: http://www.ecologyaction.ca/files/images/file/Marine/Seafood_Traceability_in_Canada.pdf.
- Teletchea F, Maudet C, Hanni C. 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol* 23 (7), 359–66.
- Teletchea F., 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Fish Biology and Fisheries*;19 (3), 265–93.
- Tennyson JM, Winters KS, Powell K., 1997. A fish by any other name: a report on species substitution. In Proceeding of the 22nd Annual Meeting of Seafood Science the Technology Society of the Americas, Biloxi, Mississippi. Available from: URL: <http://sst.ifas.ufl.edu/22ndAnn/file08.pdf>.
- Thalmann, O. et al., 2004. Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: a cautionary tale from analysis of humans and other great apes. *Mol. Ecol.* 13, 321–335.
- Tortonese, E., 1975. *Fauna de Italia "Osteichthyes."* "Pesci Ossei", Vol XI, pp.82-122. Calderini, Bologna.

- Tortonese, E., 1986. Centracanthidae. In: *Fishes of the North Eastern Atlantic and the Mediterranean* (eds. P.J.P. Whitehead, M.L. Bauchot, J. Hureau, & E. Tortonese), pp. 908-911. UNESCO, Paris.
- Triantafyllidis, A., Karaïskou, N., Perez, J. et al., 2010. Fish allergy risk derived from ambiguous vernacular fish names: Forensic DNA-based detection in Greek markets. *Food Research International* 43, 2214–2216.
- Vandewalle, P., Saintin, P., & Chardon, M., 1995. Structures and movements of the buccal and the pharyngeal jaws in relation to feeding in *Diplodus sargus*. *Journal of Fish Biology*, 46, 623-656.
- Von der Heyden, S., Barendse, J., Seebregts, A.J. and Matthee, C.A., 2010. Misleading the masses: detection of mislabelled and substituted frozen fish products in South Africa. *ICES Journal of Marine Science* 67, 176– 185.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360, 1847–1857.
- Wilson, D.T., Curtotti, R. and Begg, G.A., eds. 2010. Fishery status reports 2009: status of fish stocks and fisheries managed by the Australian Government. Canberra, Australian Bureau of Agricultural and Resource Economics – Bureau of Rural Sciences. 535 pp.
- Wolf, C., Burgener, M., Hubner, P. and Luthy, J., 2000. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 33, 144–150.
- Wong, E.H.-K. and Hanner, R.H., 2008. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International* 41, 828–837.
- Woolfe, M. and Primrose, S., 2004. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends Biotechnol.* 22, 222–226.
- www.ilfattoalimentare.it, 2012. Falsi filetti di cernia, pangasio venduto come halibut, polpo africano come italiano... ecco tutte le frodi in pescheria nelle analisi dell'IZSV pubblicate su Eurofishmarket

- Yukio Iwatsuki & Kent E. Carpenter, 2009. *Acanthopagrus randalli* (Perciformes: Sparidae), a new black seabream from the Persian Gulf. *Zootaxa* 2267, 43–54
- Yukio Iwatsuki & Phillip C. Heemstra, 2011. A review of the *Acanthopagrus bifasciatus* species complex (Pisces: Sparidae) from the Indian Ocean, with redescriptions of *A. bifasciatus* (Forsskål 1775) and *A. catenula* (Lacepède 1801), *Zootaxa* 3025, 38–50.

RIFERIMENTI NORMATIVI

- DECRETO LEGISLATIVO 27 gennaio 1992, n.109 Attuazione delle direttive n.89/395/CEE e n. 89/396/CEE concernenti l'etichettatura, la presentazione e la pubblicita' dei prodotti alimentari.
- DECRETO MIPAAF 25 LUGLIO 2013: modalità applicative di cui all'art. 59, commi 14 e 15 del D.L. 22 giugno 2012 n. 83, ai fini della definizione dell' attestazione di origine anche in relazione all'identificazione delle zone di cattura e/o di allevamento nonché alla conformità alle disposizioni al Reg. (CE) n. 2065/2001.
- DECRETO MIPAF 19 NOVEMBRE 2012 “Integrazione elenco decreto ministeriale del 31 gennaio 2008”.
- DECRETO MIPAF 12 AGOSTO 2011 “Attribuzione della denominazione in lingua italiana di alcune specie ittiche, che integra e modifica l’elenco allegato al DM del 31 gennaio 2008 e al DM del 23 dicembre 2010”.
- DECRETO MIPAF 23 DICEMBRE 2010 “Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale. Modifiche e integrazioni del DM del 31 gennaio 2008 successivamente modificato e integrato dal Dm del 5 marzo del 2010”.
- DECRETO MIPAF 5 MARZO 2010 “Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale. Modifiche e integrazioni dell’elenco allegato al decreto del 27 marzo 2002 e successive modifiche e integrazioni”.
- DECRETO MIPAF 31 GENNAIO 2008 “Denominazione in lingua italiana delle specie di interesse commerciale. Modifiche ed integrazioni dell’elenco di cui al decreto del 25 luglio del 2005”.
- DECRETO MIPAF 25 LUGLIO 2005 “Modifiche ed integrazioni all’elenco delle denominazioni commerciali dei prodotti ittici, allegati al decreto ministeriale del 14 gennaio 2005”.
- DECRETO MIPAF 14 GENNAIO 2005 “Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale ai sensi del Regolamento (CE) n. 2065/2001 della commissione del 22 ottobre del 2001”.
- DIRETTIVA 2006/142/CE DELLA COMMISSIONE del 22 dicembre 2006 che modifica l’allegato III bis della direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e

del Consiglio concernente l'elenco degli ingredienti che devono essere citati in ogni caso sull'etichettatura dei prodotti alimentari.

- DIRETTIVA 2003/89/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 10 novembre 2003 che modifica la direttiva 2000/13/CE per quanto riguarda l'indicazione degli ingredienti contenuti nei prodotti alimentari.
- DIRETTIVA 2000/13/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 20 marzo 2000 relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità.
- REGOLAMENTO (UE) N. 1379/2013 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO dell'11 dicembre 2013 relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura, recante modifica ai regolamenti (CE) n. 1184/2006 e (CE) n. 1224/2009 del Consiglio e che abroga il regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio.
- REGOLAMENTO (UE) N. 1169/2011 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 25 ottobre 2011 relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, che modifica i regolamenti (CE) n. 1924/2006 e (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione.
- REGOLAMENTO (CE) N. 1224/2009 DEL CONSIGLIO del 20 novembre 2009 che istituisce un regime di controllo comunitario per garantire il rispetto delle norme della politica comune della pesca, che modifica i regolamenti (CE) n. 847/96, (CE) n. 2371/2002, (CE) n. 811/2004, (CE) n. 768/2005, (CE) n. 2115/2005, (CE) n. 2166/2005, (CE) n. 388/2006, (CE) n. 509/2007, (CE) n. 676/2007, (CE) n. 1098/2007, (CE) n. 1300/2008, (CE) n. 1342/2008 e che abroga i regolamenti (CEE) n. 2847/93, (CE) n. 1627/94 e (CE) n. 1966/2006.
- REGOLAMENTO (CE) N. 1010/2009 DELLA COMMISSIONE del 22 ottobre 2009 recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1005/2008 del Consiglio che istituisce un regime comunitario per prevenire, scoraggiare ed eliminare la pesca illegale, non dichiarata e non regolamentata.

- REGOLAMENTO (CE) n. 1005/2008 DEL CONSIGLIO del 29 settembre 2008 che istituisce un regime comunitario per prevenire, scoraggiare ed eliminare la pesca illegale, non dichiarata e non regolamentata, che modifica i regolamenti (CEE) n. 2847/93, (CE) n. 1936/2001 e (CE) n. 601/2004 e che abroga i regolamenti (CE) n. 1093/94 e (CE) n. 1447/1999.
- REGOLAMENTO (CE) N. 1184/2006 DEL CONSIGLIO del 24 luglio 2006 relativo all'applicazione di alcune regole di concorrenza alla produzione e al commercio dei prodotti agricoli.
- REGOLAMENTO (CE) N. 852/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari.
- REGOLAMENTO (CE) N. 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.
- REGOLAMENTO (CE) N. 854/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano.
- REGOLAMENTO (CE) N. 882/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali.
- REGOLAMENTO (CE) N. 2065/2001 DELLA COMMISSIONE del 22 ottobre 2001 che stabilisce le modalità d'applicazione del regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l'informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura.
- REGOLAMENTO (CE) N. 338/97 DEL CONSIGLIO del 9 dicembre 1996 relativo alla protezione di specie della flora e della fauna selvatiche mediante il controllo del loro commercio.

APPENDICE 1

ACANTHOPAGRUS BIFASCIATUS

NOME COMUNE: Pagro bifasciato;

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Pagro bifasciato

DENOMINAZIONE INGLESE: Twobar seabream

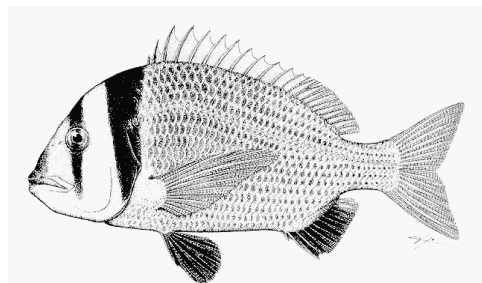
DISTRIBUZIONE: Oceano Indiano occidentale, dal Mar Rosso e dal Natal (Sud Africa) fino all'Indo-Malesia. È una specie tipica della barriera corallina

DESCRIZIONE: Colorazione argentea con due caratteristiche bande verticali nere sulla testa. Pettorali, dorsale, caudale e muso giallo canarino; anale e ventrale nerastrati

TAGLIA: Lunghezza massima 50 cm

PINNE: D XI-12/15. A III-10/12 (2° raggio più lungo del 3°). C.P.V. I-5

DENTI: Entrambe le mascelle provviste anteriormente di grossi denti caniniformi, 4 superiori e 6 inferiori, seguiti da denti molariformi sistemati in 4-6 file per ogni lato



ARGYROPS SPINIFER

NOME COMUNE: Pagro reale

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Pagro reale

DENOMINAZIONE INGLESE: King soldier bream

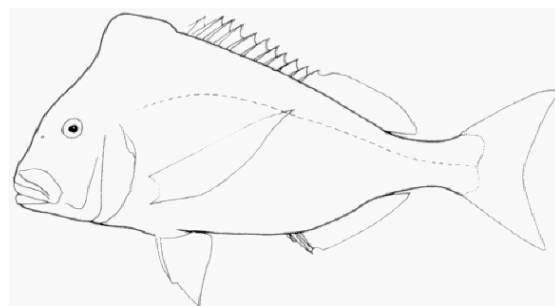
DISTRIBUZIONE: Indo-pacifico occidentale, dal Mar Rosso e dal Natal (Sud Africa) fino all'Indo-Malesia e all'Australia settentrionale

DESCRIZIONE: profilo del muso ripido; colorazione rosa argentea; pinne rossastre; presenza di fasce rosse verticali nei giovani

TAGLIA: lunghezza massima 70 cm

PINNE: D XI-XII- 10/11 (i primi due raggi cortissimi; 3°-4°-5°-talvolta fino al 7° appiattiti e lunghi, raggiungono la caudale nei giovani). A III-8/9 (2° e 3° raggio spiniformi subeguali). C.P.V. I-5

DENTI: entrambe le mascelle provviste anteriormente di grossi denti caniniformi, 4 superiori e 6 inferiori, seguite da due file di molariformi



BOOPS BOOPS

NOME COMUNE: Boga

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Boga

DENOMINAZIONE INGLESE: Bogue

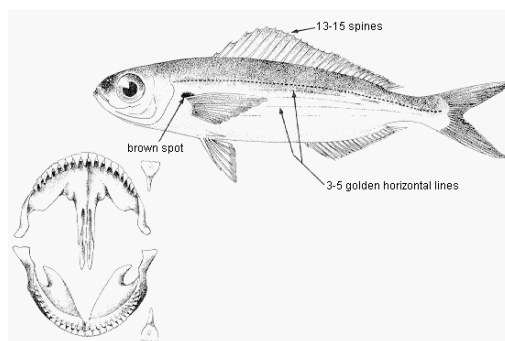
DISTRIBUZIONE: Atlantico orientale, dalla Norvegia all'Angola, comprese le isole Canarie, Capo Verde e le isole São Tomé e Príncipe. Comune dal Golfo di Biscaglia a Gibilterra; inoltre trovato nel Mar Mediterraneo e nel Mar Nero

DESCRIZIONE: Corpo fusiforme, oblungo. Bocca terminale, obliqua, con labbra molto sottili. Colorazione verde olivastro dorsalmente, fianchi con riflessi argentei o dorati con 3-5 linee longitudinali dorate, talvolta non evidenti; presenza di una macchietta nerastra all'ascella delle pettorali

TAGLIA: Lunghezza massima 36 cm

PINNE: D XIII-XV-12-16. A III-14/16. C 3-17-3. P 15 (non raggiungono l'ano). V I-5

DENTI: Mascelle provviste di una sola fila di denti incisiviformi con il bordo libero seghettato munito di 4 (denti superiori) o di 5 (denti inferiori) punte, di cui la centrale è più larga



DENTEX ANGOLENSIS

NOME COMUNE: Dentice atlantico

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Dentice atlantico

DENOMINAZIONE INGLESE: Angolan Dentex

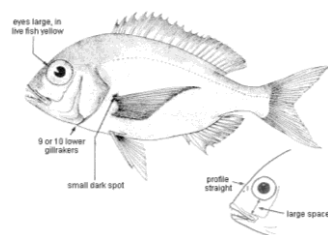
DISTRIBUZIONE: Atlantico orientale: specie comune, presente dal Marocco all'Angola

DESCRIZIONE: Profilo della testa diritto. Diametro oculare maggiore dello spazio interorbitale e dello spazio suborbitale che è pari ad un quinto o ad un sesto della lunghezza della testa. Colorazione rossa, tendente al vermiglio, con riflessi argentei; una piccola macchia scura al di sopra dell'inserzione delle pettorali; dorsale e anale rosse, eccetto che alla base; pettorali e caudale rossastre

TAGLIA: Lunghezza massima 35 cm

PINNE: D XII-9/10 (i raggi spiniformi aumentano in lunghezza dal 1° al 4°-5°, poi decrescono). A III-7/8. C. P 15/16. V I-5

DENTI: Presenza su ciascuna mascella di alcune file di caniniformi, di cui la più esterna è costituita da denti più robusti, con 4-6 grossi caniniformi in posizione frontale (quelli superiori sono visibili anche a bocca chiusa)



DENTEX BARNARDI

NOME COMUNE: Dentice atlantico

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Dentice atlantico

DENOMINAZIONE INGLESE: Barnard's dentex

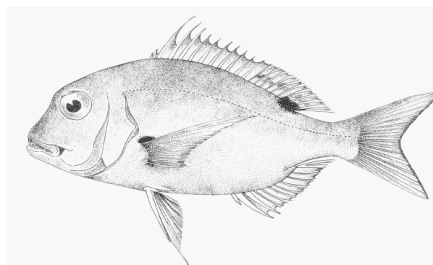
DISTRIBUZIONE: Atlantico orientale: specie comune presente dal Gabon all'Angola

DESCRIZIONE: Profilo della testa leggermente convesso con una piccola gobba sulla nuca. Diametro oculare maggiore dello spazio sub orbitale nei soggetti di piccole dimensioni. Colorazione rossa brillante con riflessi argentei; una grossa macchia rosso-brunastra sulla estremità posteriore della base della dorsale, ed una alla base delle pettorali; porzione molle della dorsale con macchiette scure più o meno allineate; coda rossastra con sottile orlo nero

TAGLIA: Lunghezza massima 40 cm

PINNE: D XII-9/10 (i primi due raggi spiniformi molto corti, i seguenti decrescono dal 3°-4° all'indietro; 3°-4°-5° lunghi, più o meno filamentosi, in particolare nei giovani). A III-8. C. P 15/16. V I-5

DENTI: Presenza su ciascuna mascella di alcune file di caniniformi, di cui la più esterna è costituita da denti più robusti, con 4-6 grossi caniniformi in posizione frontale



DENTEX CANARIENSIS

NOME COMUNE: Dentice Atlantico

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Dentice atlantico

DENOMINAZIONE INGLESE: Canary dentex

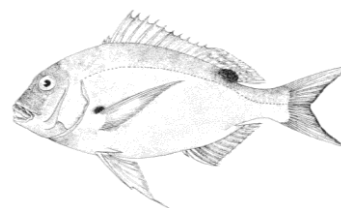
DISTRIBUZIONE: Atlantico orientale: specie presente da Cabo Bojador (Sahara occidentale) all'Angola; assente nelle acque delle Isole Canarie

DESCRIZIONE: Profilo della testa leggermente convesso, con una piccola gobba sulla nuca. Occhio piccolo con un diametro inferiore allo spazio suborbitale, che è largo. Colorazione rossastra con riflessi argentei; una macchia rosso brunastra sull'estremità posteriore della base dorsale (che si estende sulle squame sottostanti) ed una alla base delle pettorali. Caudale rosso-scura con sottile margine nerastro

TAGLIA: Lunghezza massima 100 cm

PINNE: **D** XII-9/10 (i primi 2 raggi spiniformi sono molto corti, i seguenti decrescono dal 3°; 3°-4° e 5° sono molto lunghi e filamentosi). **A** III-8/9. **C. P. V** I-5

DENTI: presenza su ciascuna mascella di alcune file di caniniformi, di cui la più esterna è costituita da denti più robusti, con 4-6 grossi caniniformi in posizione frontale



DENTEX DENTEX

NOME COMUNE: Dentice

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Dentice

DENOMINAZIONE INGLESE: Common dentex

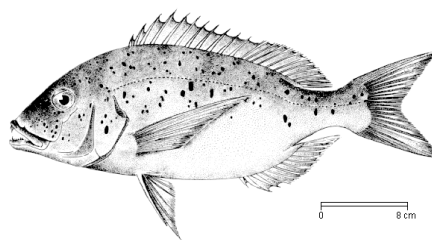
DISTRIBUZIONE: Atlantico orientale: dalle isole Britanniche a Capo Blanc, Mauritania; eccezionalmente ancora più a sud Senegal, attorno alle Isole Canarie e Madeira. Comune in Spagna, Nord Africa, Mediterraneo

DESCRIZIONE: Corpo robusto, ovale e compresso. Fronte, che con l'età, tende a diventare più prominente; coda ben forcuta, denti ben sviluppati in relazione alle abitudini predaci della specie. La colorazione varia di sfumature e di ombreggiature a seconda delle dimensioni : per lo più ha il dorso sull'azzurro e i fianchi argentei, magari con sfumature rosate, con macchiette nere o blu specialmente sul capo, ma gli esemplari più grossi possono avere una tinta rosa-rosso spento o color vinaccia. Pinne pettorali rosa, dorsali più vicine al giallo

TAGLIA: Lunghezza massima 100 cm

PINNE: D XI-XII, 11-12; A III, 7-9; C: 18; P:14-15;Pelviche I, 5. Raggi spiniformi della pinna dorsale aumentano in lunghezza dal 3° al 4°-5° poi decrescono

DENTI: Presenza su ciascuna mascella di alcune file di caniniformi, di cui la più esterna costituita da denti più robusti, con 4-6 grossi caniniformi in posizione frontale. Mancano i molariformi



DENTEX GIBBOSUS

NOME COMUNE: Dentice gibboso; Dentice corazziere

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Dentice gibboso

DENOMINAZIONE INGLESE: Pink dentex

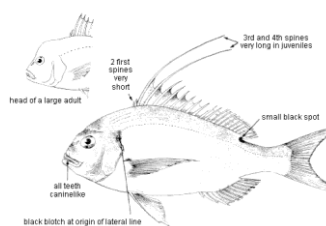
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie rara nei nostri mari, più frequente nel settore occidentale. Atlantico orientale: specie presente dal Portogallo all'Angola

DESCRIZIONE: Profilo della testa regolarmente incurvato nei giovani e con una notevole gobba frontale nei maschi adulti. Colorazione rossastra con riflessi metallici; una piccola macchia scura sul corpo, dietro l'estremità posteriore della dorsale; una macchia bruna alla base delle pettorali; un'area scura sull'angolo superiore dell'opercolo; 1-2 linee scure sulla parte molle della dorsale; coda rossastra orlata di nero

TAGLIA: Lunghezza massima 100 cm

PINNE : La pinna dorsale ha la prima parte con 12 raggi spinosi, di cui i primi due sono cortissimi, mentre il terzo, il quarto e il quinto sono molto lunghi e terminano con un filamento negli esemplari giovani; la seconda parte ha 10 raggi molli di altezza quasi costante e terminante in un lobo a punta. L'anale (3 raggi spinosi e 8 molli) è opposta alla parte molle della dorsale, a cui assomiglia ma è meno estesa. Le pettorali (14 raggi) sono lunghe e leggermente falciformi. Le ventrali hanno 1 raggio spinoso e 5 molli (di cui il primo nei giovani è prolungato in un filamento) sono larghe e lunghe all'incirca quanto le pettorali. La caudale è robusta e forcuta, con lobi appuntiti e separati

DENTI : La bocca è ampia ed è munita in ambedue le mascelle di denti esclusivamente conici, più o meno grandi, tra i quali si distinguono 4-5 più grandi e caniniformi, nella parte anteriore di ambedue le mascelle



DENTEX MACROPHthalmus

NOME COMUNE: Dentice occhione

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Dentice occhione

DENOMINAZIONE INGLESE: Large eye dentex

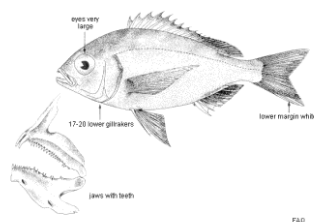
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: rara nelle nostre acque, abbondante nell' Egeo.
Atlantico orientale: specie comune presente dal Portogallo alla Namibia

DESCRIZIONE: Il corpo è ovale è corto. La testa relativamente breve e il corpo è circolare e molto grande. La colorazione è rosso intensa, specie nel dorso; ventralmente il colore schiarisce quasi fino all'argenteo. La pinna dorsale è rosacea col bordo superiore nerastro, l'anale ha una fascia centrale carminio e membrane azzurrastre. Le ventrali sono pure con membrana azzurrastra e raggi rossastri. L'iride è rossa

TAGLIA: Lunghezza massima 65 cm

PINNE: La pinna dorsale (12 raggi spinosi e 10 molli) è unica e di altezza uniforme nelle sue due parti; i primi due raggi spinosi non sono molto più corti degli altri, nè il terzo è più lungo. L'anale ha 3 raggi spinosi, di cui il secondo è più lungo e robusto degli altri, e 8 raggi molli. La caudale è bilobata, ma non molto forcuta. Le pettorali (16-17 raggi) sono allungate e appuntite superiormente. Le ventrali (1 raggio spinoso e 5 molli) sono ampie, ma meno lunghe delle pettorali

DENTI: La bocca è obliqua. Nella mascella superiore ha due denti caniniformi per lato ben sviluppati. Nella mandibola vi sono frontalmente due serie di cinque canini, una per lato, seguiti da un'unica serie di dentini conici. Non vi sono denti nè sul vomere nè sui palatini



DENTEX (Polysteganus) MAROCCANUS

NOME COMUNE: Dentice marocchino

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Dentice marocchino

DENOMINAZIONE INGLESE: Marocco dentex

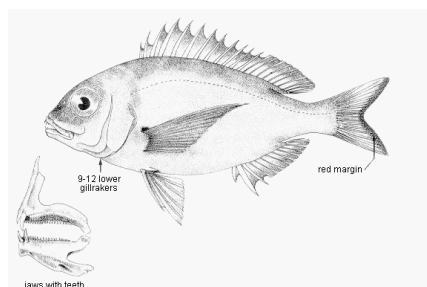
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie presente nei bacini meridionale ed orientale; assente nell' Adriatico. Atlantico orientale: specie comune presente dal Golfo di Biscaglia al Golfo di Guinea

DESCRIZIONE: Corpo ovaliforme, più arcuato sul dorso e più rettilineo sul ventre. La testa è alta, con profilo quasi rettilineo, tranne una lieve gibbosità davanti agli occhi. Quest'ultimi sono grandi e circolari, di diametro all'incirca uguale alla lunghezza del muso. La colorazione è rosso carminio, più scuro sul dorso, sul muso, nella regione interorbitaria e nei bordi della mascella superiore. Anche le pinne sono rosso carminio; orlo rosso alla forca della caudale. L'iride è rossa e gialla

TAGLIA: lunghezza massima 45 cm

PINNE: La pinna dorsale (12 raggi spinosi e 10-11 molli) è di altezza quasi uniforme per tutta la sua lunghezza, ad eccezione del primo raggio spinoso che è più corto. L'anale (3 raggi spinosi e 8-9 molli) è opposta alla parte molle della dorsale e ne riflette la forma. Le pettorali (16 raggi) sono lunghe e appuntite superiormente; reclinate indietro superano l'apertura anale. Le ventrali (1 raggio spinoso e 5 molli) sono più piccole delle pettorali. La caudale è robusta, molto incavata e a lobi appuntiti e separati

DENTI: Presenza su ciascuna mascella di alcune file di caniniformi, di cui la più esterna costituita da denti più robusti. 4-6 canini frontali su ciascuna mascella



CHEIMERIUS NUFAR

NOME COMUNE: Dentice rosa

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Dentice rosa

DENOMINAZIONE INGLESE: Santer seabream

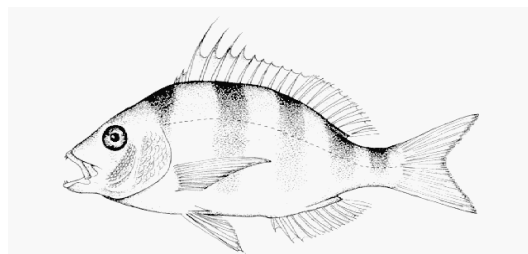
DISTRIBUZIONE: Indiano occidentale: specie diffusa dal Sud Africa al Mar Rosso, all'India e allo Sri Lanka. Atlantico orientale: la specie è presente nel Sud Africa

DESCRIZIONE: Profilo della testa convesso, regolarmente incurvato dall'apice del labbro superiore fino all'apice della pinna dorsale. Nei soggetti adulti si può sviluppare una gibbosità anteriormente agli occhi. Colorazione rosata dorsalmente e sui fianchi, argentea sul ventre (il colore diviene molto più scuro dopo la morte del soggetto); nei soggetti giovani sono presenti sulla testa e sul corpo sei fasce trasversali più scure del colore di fondo

TAGLIA: lunghezza massima 75 cm

PINNE: **D** XI/XII; 1° e 2° raggio spiniforme molto corti, il terzo è molto allungato e dal 3° al 7° diminuisce progressivamente la lunghezza dei raggi (negli adulti i raggi sono più corti). **A** III-8. **C** forcuta con lobi appuntiti. **P.** **V** I-5; il raggio spiniforme è allungato

DENTI: Presenza su entrambe le mascelle di una sottile banda di denti villiformi, con quelli delle serie più esterne più sviluppati; anteriormente sono presenti 4-6 grossi denti caniniformi su ciascuna mascella; assenza di denti molariformi



DIPLODUS ANNULARIS

NOME COMUNE: Sarago sparaglione

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Sarago sparaglione

DENOMINAZIONE INGLESE: Annular seabream

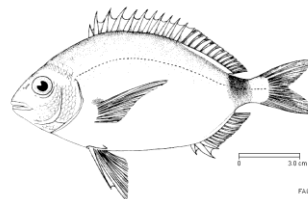
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie comune. Atlantico orientale: specie comune presente dal Golfo di Guascona fino al Senegal

DESCRIZIONE: Colorazione grigio-giallastra con riflessi argentei; una grande macchia nera sul peduncolo caudale, che scavalca il lato superiore ma non raggiunge quello inferiore; pinne giallastre

TAGLIA: Lunghezza massima 24 cm

PINNE: D XI-11/13. A III-11/12. C 6-17-5. P 14. V I-5

DENTI: 8 incisiviformi inclinati, su ciascuna mascella, seguiti superiormente da 2-4 file di molariformi, inferiormente da 2-3 file



DIPLODUS CERVINUS

NOME COMUNE: Sarago

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Sarago

DENOMINAZIONE INGLESE: Zebra seabream

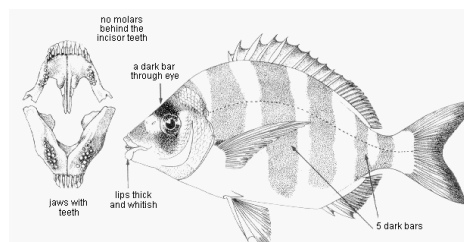
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie presente nella zone più meridionali (nelle nostre acque si trova solo in Sicilia). Atlantico orientale: specie comune presente da Gibilterra a Capo Verde e dall'Angola al Sud Africa

DESCRIZIONE: Muso appuntito, con bocca munita di labbra spesse. Colorazione: 5 larghe fasce bruno-nerastre su fondo argenteo; una banda scura sullo spazio interorbitale estesa fino agli occhi ed alle gote; punta del muso brunastra; macchia scura all'ascella delle pettorali

TAGLIA: Lunghezza massima 55 cm

PINNE: D XI-XII-11/14. A III-10/12. C 17/18. P 15. V I-5

DENTI: 10-12 incisiviformi, forti, lunghi ed obliqui, sulla mascella superiore, 8 su quella inferiore, seguiti da 1-3 (solitamente 2) file di piccoli molariformi



DIPLODUS PUNTAZZO

NOME COMUNE: Sarago pizzuto

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Sarago pizzuto

DENOMINAZIONE INGLESE: Sharpsnout seabream

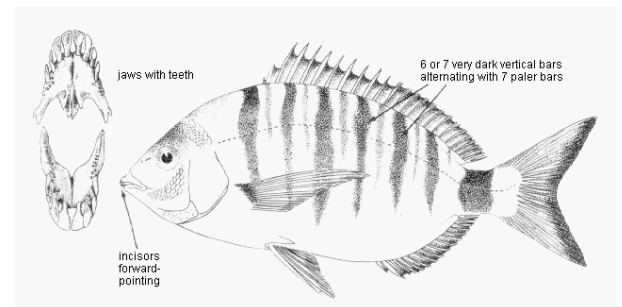
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: comune (specie eurialina che viene anche allevata).
Atlantico orientale: specie presente dal Golfo di Guascogna al Sud Africa

DESCRIZIONE: Profilo della testa concavo, occhio piccolo, muso lungo e appuntito, con mascelle prominenti e di uguale lunghezza. Colorazione grigio-argentea con 7/11 fasce verticali nere ed una grossa macchia sul peduncolo caudale. Una macchia scura all'ascella delle pettorali e sulla parte superiore della loro base. Pinne grigiastre orlate di nero, in particolare la caudale

TAGLIA: lunghezza massima 60 cm

PINNE: **D** X-XI-12/15 (primo raggio spiniforme corto). **A** III-11/13. **C** 17/19. **P** 15/16
V I-5

DENTI: 8 incisiviformi stretti e inclinati in avanti su ciascuna mascella, seguiti da una sola serie di molariformi piccoli, rudimentali



DIPLODUS SARGUS

NOME COMUNE: Sarago, Sarago maggiore

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Sarago

DENOMINAZIONE INGLESE: White seabream

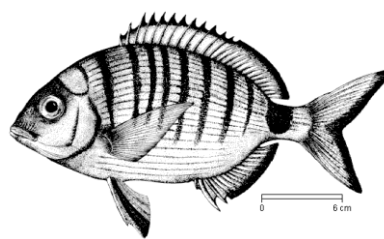
DISTRIBUZIONE: Atlantico orientale: Mediterraneo e mar Nero. Atlantico centro orientale: Madeira

DESCRIZIONE: Corpo alto e piatto, con dorso molto piu' bombato del ventre. Opercolo bordato da una membrana nera. Striature verticali scure (in genere 9 che possono svanire), su sfondo grigio argenteo. Le striature scompaiono negli adulti (a partire dai 20 ai 25 cm). Macchia nera sul peduncolo caudale in genere arrotondata o a forma di sella, ma non arriva mai al bordo inferiore. Colore essenzialmente argenteo, dorso beige grigiastro. Margine posteriore della coda scuro; pinne pelviche scure con bordo anteriore bianco. Macchia sul peduncolo caudale quasi rotonda. Presenza sul peduncolo caudale di una fascia nera che non raggiunge il margine inferiore del peduncolo stesso. Coda grigiastra orlata di nero. Margine dell' opercolo e ascella delle pettorali neri

TAGLIA: lunghezza massima 45 cm

PINNE: D XI-XII-12/15. A III-13/14. C 4/5-17/-5/4. P 15/17. V I-5

DENTI: 8 incisiviformi, quadrangolari, più o meno verticali, su ciascuna mascella, seguiti superiormente da 3 - 4 (eccezionalmente 5) file di molariformi, inferiormente da 2 - 3 file



DIPLODUS VULGARIS

NOME COMUNE: Sarago; Sarago testa nera; Sarago fasciato

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Sarago

DENOMINAZIONE INGLESE: Common two-banded seabream

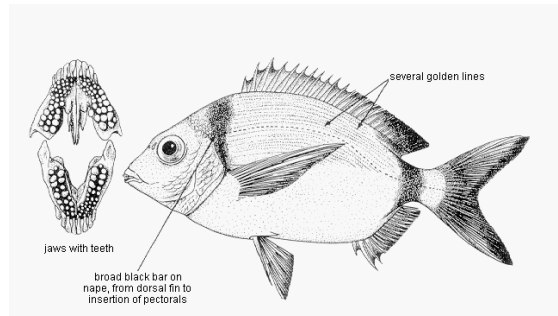
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie comune. Atlantico orientale: specie comune presente dal Golfo di Guascogna al Senegal, dall'Angola al Sud Africa

DESCRIZIONE: Colorazione bruno-olivacea sul dorso, argentea sui fianchi, con 7/9 linee longitudinali dorate sui fianchi; una larga fascia nera sulla nuca ed una fascia nera sul peduncolo caudale. Ventrali nere, le altre pinne grigiastre, con margine nerastro in quelle impari.

TAGLIA: Lunghezza massima 45 cm

PINNE: D XI-XII-13/16. A III-12/15. C 3-17-3. P 15. V I-5

DENTI: 8 stretti incisiviformi, leggermente inclinati, su ciascuna mascella, seguiti superiormente da 3 - 5 file di molariformi arrotondati, inferiormente da 2-4 file



LITHOGNATHUS MORMYRUS

NOME COMUNE: Mormora

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Mormora

DENOMINAZIONE INGLESE: Sand steenbras

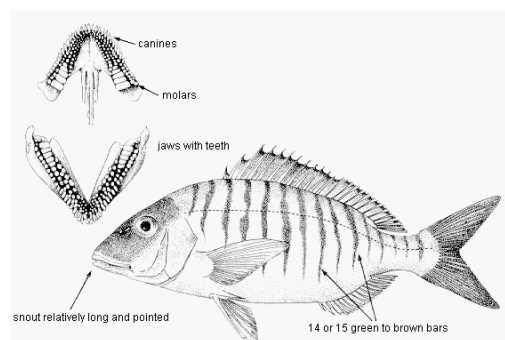
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie comune. Atlantico orientale e nord occidentale soprattutto coste spagnole e portoghesi. Dal Golfo di Guascogna al Capo di Buona Speranza. Indiano occidentale: dal Capo di Buona Speranza al Natal. Mar Rosso

DESCRIZIONE: Profilo della testa rettilineo, muso lungo e acuto. Bocca bassa, ,orizzontale, con labbra spesse. Narice anteriore rotonda, posteriore a forma di fessura obliqua

TAGLIA: Lunghezza massima 55 cm

PINNE: **D** XI-XII. **A** III-10/11. **C** 2-17/18-2. **P** 15/16 (non raggiungono l'ano). **V** I-5

DENTI: 4-5 file di denti piccoli e conici su ciascuna mascella, con quelli esterni più robusti, seguite da 3-6 file di molariformi su quella superiore e 2-4 file su quella inferiore



OBLADA MELANURA

NOME COMUNE: Occhiata

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Occhiata

DENOMINAZIONE INGLESE: Saddled seabream

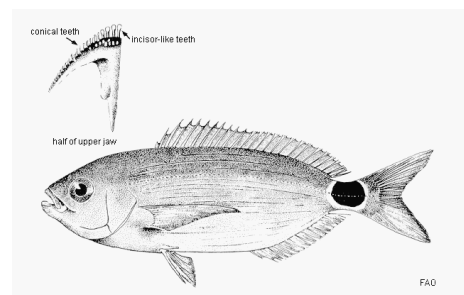
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie comune nei bacini occidentale e centrale. Atlantico orientale: specie comune, presente dal Mare del Nord al Senegal (rara in queste zone estreme).

DESCRIZIONE: Ventre ricurvo più o meno quanto il dorso. Corpo quasi simmetrico, bocca obliqua e rivolta verso l'alto (al contrario dei Saraghi) con mandibola leggermente prominente. Occhio piuttosto grande, il cui diametro è più o meno uguale allo spazio preorbitale ed è il doppio di quello suborbitale. Colorazione grigio-azzurrastra sul dorso, argentea con linee longitudinali più scure sui fianchi; una evidente macchia nera a forma di sella sul peduncolo caudale, tra dorsale e coda, non estesa fino al margine inferiore del medesimo.

TAGLIA: Lunghezza massima 30 cm

PINNE: D XI-13/14. A III-12/14. C 3-17-3. P 15. V I-5

DENTI: Anteriormente, su ciascuna mascella 8-10 incisiviformi più o meno bicuspidati seguiti lateralmente da piccoli denti conici uniseriati; dietro gli incisiviformi presenza di 1-2 file di dentini granuliformi



PAGELLUS ACARNE

NOME COMUNE: Pagello

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Pagello

DENOMINAZIONE INGLESE: Axillary seabream

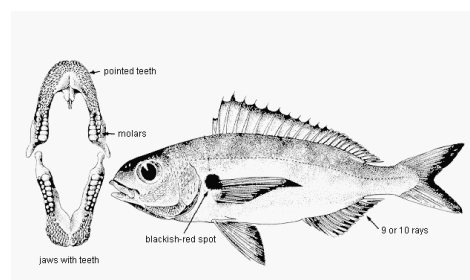
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie comune nei bacini occidentale e centrale. Atlantico orientale: specie comune presente dal Mare del Nord al Senegal (rara in queste zone estreme).

DESCRIZIONE: Corpo fusiforme, muso conico, uguale o più lungo del diametro dell'occhio. Muso nettamente arcuato. Occhio di taglia media (diametro inferiore alla lunghezza del muso). Corpo relativamente slanciato. Colorazione bruno-chiara sul dorso, argentea sul ventre; una caratteristica macchia bruno-nerastra all'ascella delle pettorali che si estende fino sulla parte superiore della base delle pinne; pinne rosee. Dorso da beige a grigiastro, schiarisce sui fianchi, più o meno argentei.

TAGLIA: Lunghezza massima 36 cm

PINNE: D XII-XIII-10/12. A III-9/10 (ultimo raggio molle della dorsale e della anale più grosso dei precedenti). C 17. P 15/16. V I-5

DENTI: Entrambe le mascelle provviste anteriormente di alcune serie di denti conici appuntiti, con quella più interna seguita da una banda di numerosi denti cardiformi leggermente più piccoli; posteriormente seguono denti molariformi biserati



PAGELLUS BELLOTTII

NOME COMUNE: Pagello atlantico

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Pagello atlantico

DENOMINAZIONE INGLESE: Red pandora

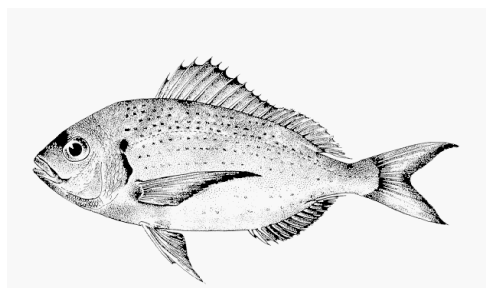
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie presente nel bacino sud-occidentale.
Atlantico orientale: specie presente da Gibilterra all'Angola e nelle acque delle Isole Canarie

DESCRIZIONE: Muso acuto di lunghezza pari o maggiore del diametro dell'occhio.
Colorazione: Rosa-argentea, più o meno intensa; presenza di macchiette azzurre sui fianchi, lungo le file di squame; una macchia rosso-scura all'inizio della linea laterale e sulla parte superiore del margine dell' opercolo; pinne da rosate a grigiastre; coda con margine rossastro; cavità boccale biancastra

TAGLIA: Lunghezza massima 42 cm

PINNE: D XII-9/11. A III-10 (base della pinna più lunga del muso). C. P. V I-5

DENTI: Entrambe le mascelle provviste di alcune serie di denti conici appuntiti, con quella più interna seguita da una banda di numerosi denti cardiformi leggermente più piccoli; posteriormente seguono 2 file di molariformi



PAGELLUS BOGARAVEO

NOME COMUNE: Pagello

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Pagello

DENOMINAZIONE INGLESE: Blackspot seabream

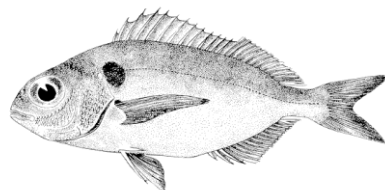
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie variamente frequente, limitata al bacino occidentale; rara nell'Adriatico, frequente nel Tirreno. Atlantico orientale: specie comune presente dalla Scandinavia (rara) a Capo Bianco

DESCRIZIONE: Occhio grande (piu' grande della lunghezza del muso). Corpo ovale. Colorazione grigio - rossastra, con sfumature argentee; una grossa macchia nera all'origine della linea laterale (*talvolta poco visibile nei giovani*); Assume una livrea rosata solo a partire da 25-30 cm . I giovani sono argentati , con il dorso da beige a grigio verdastro; una macchia scura all'ascella delle pettorali; cavità boccale e branchiali di colore rosso arancio; pinne rosee

TAGLIA: Lunghezza massima 70 cm

PINNE: D XII-XIII-11/14. A III-11/13 (ultimo raggio molle della dorsale e della anale più grosso dei precedenti e coperto in parte di squame). C 17. P 16/17 V I-5

DENTI: Entrambe le mascelle provviste anteriormente di alcune serie di denti conici appuntiti, con quella più interna seguita da una banda di numerosi denti cardiformi leggermente più piccoli; posteriormente seguono 2 - 3 file di molariformi



PAGELLUS ERYTHRINUS

NOME COMUNE: Pagello fragolino

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Pagello fragolino

DENOMINAZIONE INGLESE: Common pandora

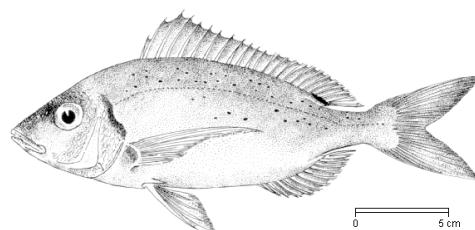
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie comune. Atlantico orientale: specie comune presente dalla Scandinavia (rara) all'Angola

DESCRIZIONE: Colorazione rosso-rosata con riflessi argentei, spesso con punti azzurri sulla parte superiore dei fianchi; bordo superiore dell'opercolo rosso carminio; base delle pettorali con una macchia rossastra. Cavità branchiali e boccale bruno-nerastre pinne rosate; caudale più scura

TAGLIA: Lunghezza massima 60 cm

PINNE: D XII-10/11. A III-8/9. C 17. P 15. V I-5

DENTI: Entrambe le mascelle provviste di alcune serie di denti conici appuntiti, con quella più interna seguita da una banda di numerosi denti cardiformi leggermente più piccoli; posteriormente seguono 2-3 file di molariformi sulla mascella superiore e 2 su quella inferiore.



PAGRUS AFRICANUS

NOME COMUNE: Pagro africano

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Pagro africano

DENOMINAZIONE INGLESE: Southern common seabream

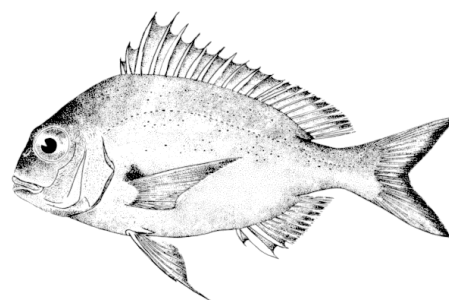
DISTRIBUZIONE: Atlantico orientale: specie presente dal Senegal all'Angola

DESCRIZIONE: Colorazione rosa con riflessi argentei, talvolta con macchiette azzurre sulla parte superiore dei fianchi, soprattutto nei giovani; presenza di una macchia rosso-brunastra all'ascella delle pettorali estendentesi fino sopra la base delle pinne; pinne impari rosate con margine aranciato

TAGLIA: Lunghezza massima 75 cm

PINNE: D XI-10/11 (primi due raggi ben sviluppati). A III-8/9. C. P. V I-5

DENTI: Entrambe le mascelle provviste anteriormente di grossi denti caniniformi, 4 superiori e 6 inferiori, seguiti da varie serie di denti conici più piccoli e più smussati che diventano progressivamente molariformi; le 2 serie più esterne hanno denti più robusti e sono fiancheggiate, nella parte anteriore ai molariformi, da diverse file di denti molto piccoli



PAGRUS AURATUS

NOME COMUNE: Pagro rosa indopacifico

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Pagro rosa indopacifico

DENOMINAZIONE INGLESE: Silver seabream

DISTRIBUZIONE: Pacifico orientale: specie presente nelle acque di Nuova Zelanda e Australia, dove viene anche allevata

DESCRIZIONE: Presenza nei soggetti adulti, maschi in particolare, di una evidente gobba nucale da iperostosi. Colorazione da rosa dorata a rossastra, fino a rosso-bronzo, con macchiette azzurre sulla parte superiore dei fianchi; margine caudale nerastro; coda con lobo inferiore con margine bianco nel terzo distale.

TAGLIA: Lunghezza massima 80 cm

PINNE: D: primi due raggi ben sviluppati, più corti dei seguenti, **A. C. P. V I-5**

DENTI: Entrambe le mascelle provviste anteriormente di grossi denti caniniformi seguiti da varie serie di molariformi



PAGRUS AURIGA

NOME COMUNE: Pagro

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Pagro

DENOMINAZIONE INGLESE: Redbanded seabream

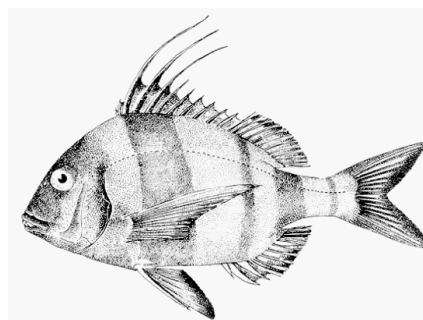
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie abbastanza comune nella parte sud-occidentale, rara sulle nostre coste. Atlantico orientale: dal Portogallo all'Angola

DESCRIZIONE: Rosa con riflessi argentei, con 4/5 fasce verticali rosso-violacee, alternativamente strette o larghe (negli adulti le fasce che tendono al rosso bruno hanno i bordi confusi e tendono a scomparire)

TAGLIA: Lunghezza massima 80 cm

PINNE: **D** XI-10/12 (primi 2 raggi cortissimi, 3°-4°-5° molto lunghi e filamentosi, in particolare nei giovani). **A** III-8/9. **C** 17. **P** 15/16. **V** I-5

DENTI: Entrambe le mascelle provviste anteriormente di grossi denti caniniformi, 4 superiori e 6 inferiori, seguiti da denti appuntiti che diventano progressivamente molariformi; posteriormente alla fila di grossi caniniformi vi sono alcuni denti più piccoli



PAGRUS CAERULEOSTICTUS

NOME COMUNE: Pagro

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Pagro

DENOMINAZIONE INGLESE: Bluespotted seabream

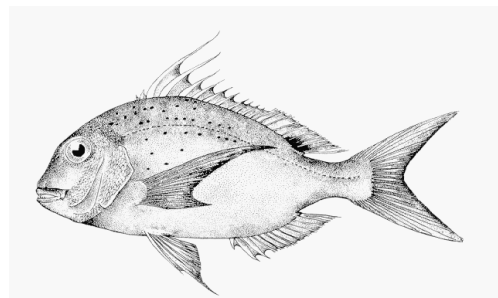
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: piuttosto raro, in particolare sulle nostre coste.
Atlantico orientale: dal Portogallo all'Angola

DESCRIZIONE: Rosa-violacea con riflessi argentei, con punti azzurri (labili) sopra e appena sotto la linea laterale; macchia scura alla base degli ultimi raggi della dorsale; caudale con margine nerastro. I maschi adulti nel periodo nuziale assumono una colorazione ocracea su muso testa e dorso.

TAGLIA: Lunghezza massima 90 cm

PINNE: D XI-XII- 9/12 (primi 2 raggi cortissimi; 3°-4° e 5° più lunghi, filamentosi nei giovani). A III-8/9. C 16. P 15. V I-5

DENTI: Entrambe le mascelle provviste anteriormente di grossi denti caniniformi, 4 superiori e 6 inferiori, seguiti da denti più appuntiti che diventano progressivamente molariformi e sono sistemati su 2-3 file per ogni lato



PAGRUS MAJOR

NOME COMUNE: Pagro del Giappone

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Pagro del Giappone

DENOMINAZIONE INGLESE: Red seabream

DISTRIBUZIONE: Pacifico occidentale: dal Giappone al Mar della Cina. È una specie che viene allevata, anche in Italia è presente in alcuni allevamenti

DESCRIZIONE: Colorazione rossastra, rosso grigiastra, con macchiette azzurre sui fianchi; margine caudale nerastro; coda con lobo inferiore con margine bianco nel terzo distale

TAGLIA: Lunghezza massima 100 cm

PINNE: D XII-10/12(primi 2 raggi ben sviluppati). A III-7/9. C. P. V I-5

DENTI: Entrambe le mascelle provviste anteriormente di grossi denti caniniformi seguiti da varie serie di molariformi



PAGRUS PAGRUS

NOME COMUNE: Pagro

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Pagro

DENOMINAZIONE INGLESE: Red porgy

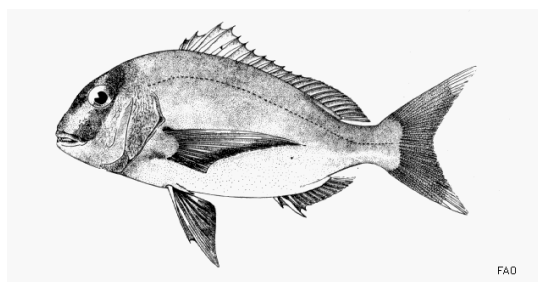
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie abbastanza comune, che viene anche allevata. Atlantico orientale: presente dall'Inghilterra all'Angola; Atlantico occidentale: dalla Carolina del Nord all'Argentina settentrionale.

DESCRIZIONE: Colorazione rosa con riflessi argentei, talvolta con macchiette azzurre al di sopra della linea laterale, soprattutto nei giovani; sovente presenza di una macchia rosso brunastra alla base dell'estremità posteriore della dorsale. Margine dell'opercolo scuro superiormente; coda rosa-scuro, con gli apici bianchi e l'orlo dell'incavo nerastro

TAGLIA: Lunghezza massima 75 cm

PINNE: D XII-9/12(primi 2 raggi spiniformi ben sviluppati; il 2° poco più breve del 3°). A III-8/9. C 23/27. P 15. V I-5

DENTI: Entrambe le mascelle provviste anteriormente di grossi denti caniniformi, 4 superiori, 4-6 inferiori, seguiti da varie serie di denti caniniformi più piccoli e più smussati che diventano progressivamente molariformi. Le 2 serie più esterne hanno denti più robusti e sono fiancheggiate, nella parte anteriore ai molariformi, da diverse file di denti molto piccoli.



RHABDOSARGUS SARBA

NOME COMUNE: Sarago dorato

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Sarago dorato

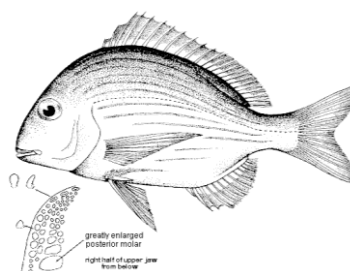
DENOMINAZIONE INGLESE: Goldlined seabream

DISTRIBUZIONE: Indo-Pacífico occidentale: dal Mar Rosso e Africa orientale al Giappone, Cina e Australia

DESCRIZIONE: Testa arrotondata; colore di fondo grigio con linee dorate sulla testa e sul corpo

TAGLIA: Lunghezza massima 80 cm

PINNE: D XI-12/13. A III-10/11



SARPA SALPA

NOME COMUNE: Salpa

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Salpa

DENOMINAZIONE INGLESE: Salema

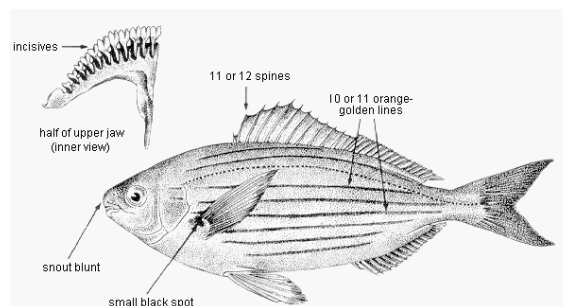
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie comune. Atlantico orientale: specie abbastanza comune, presente dal Golfo di Guascogna (rara) al Sud-Africa. Indiano occidentale: dal Sud - Africa al Natal.

DESCRIZIONE: Corpo ovale e bocca terminale con labbra spesse. Colorazione grigio - bluastra sul dorso, argentea, con 10/11 strisce longitudinali giallo-dorate sui fianchi; occhi gialli; linea laterale scura; macchia nera alla base delle pettorali; pinne chiare; caudale grigiastra

TAGLIA: Lunghezza massima 45 cm

PINNE: D XII-XII-14/17. A III-13/15. C. P 15(non raggiungono l'ano). V I-5

DENTI: Una sola fila di incisiviformi su ciascuna mascella, muniti di 2 cuspidi ottuse quelli superiori, e di una cuspidi acuta quelli inferiori



SPARUS AURATA

NOME COMUNE: Orata

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Orata

DENOMINAZIONE INGLESE: Gilthead seabream

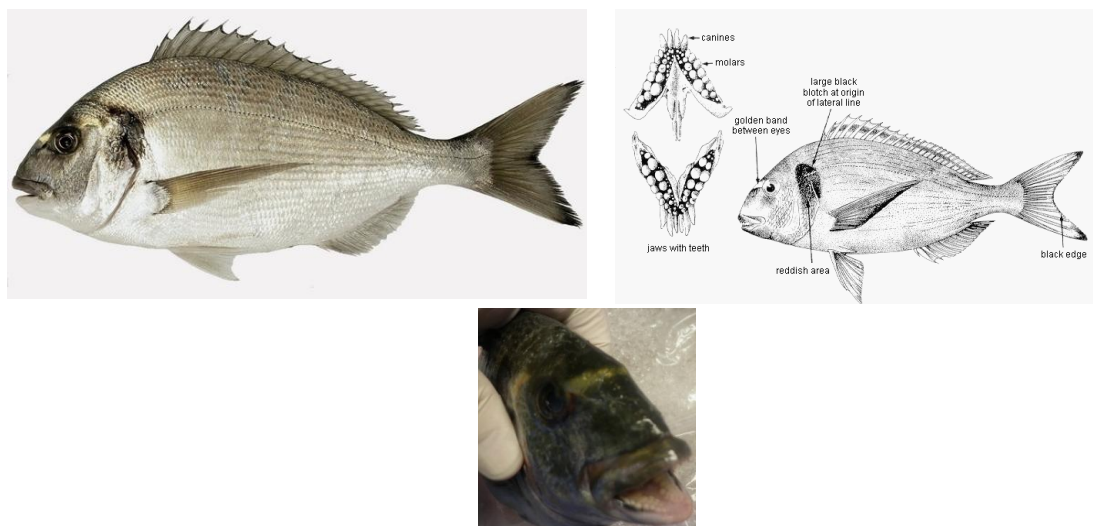
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie comune (è specie eurialina resistente a forti variazioni di salinità, presente anche in lagune salmastre, che viene allevata intensamente in tutto il bacino mediterraneo). Atlantico orientale: presente dal Senegal all'Inghilterra.

DESCRIZIONE: L'ambiente può influire decisamente sulla tonalità della colorazione. Colorazione azzurrognola-argentea con riflessi dorati dorsalmente, argentea con linee longitudinali sui fianchi; una caratteristica fascia dorata e una nera sullo spazio interorbitale; macchia nera all'origine della linea laterale ed una macchia rossastra sul margine superiore dell'opercolo; caudale con margine nerastro

TAGLIA: Lunghezza massima 70 cm

PINNE: D XI-13/14. A III-11/12. C 17. P 16. V I-5

DENTI: Bocca robusta con alcuni canini massicci. 4-6 denti caniniformi sulla parte anteriore di ogni mascella, seguiti da 2-4 serie di denti molariformi; quelli delle 2 serie più esterne sono più sviluppati



SPONDYLIOSOMA CANTHARUS

NOME COMUNE: Tanuta

DENOMINAZIONE COMMERCIALE: Tanuta

DENOMINAZIONE INGLESE: Black seabream

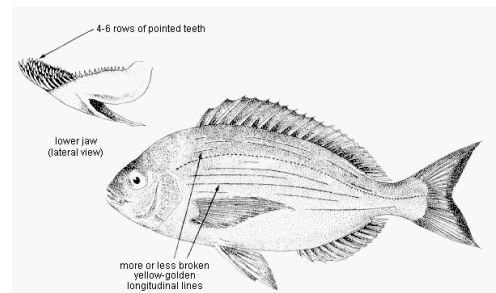
DISTRIBUZIONE: Mediterraneo: specie comune. Atlantico orientale: specie comune presente dalla Scandinavia (rara) all'Angola

DESCRIZIONE: Corpo ovale e piuttosto alto; profilo dorsale della testa concavo al di sopra degli occhi; muso concavo con bocca terminale e obliqua. Colorazione rigio argentea con riflessi azzurri, verdastri o rosati; 15/20 linee longitudinali dorate, piuttosto frammentate, sui fianchi; pinne impari nerastre.

TAGLIA: lunghezza massima 60 cm

PINNE: D XI-11/13. A III- 9/11. C 15-17. P 13/15 (raggiungono l'ano). V I-5

DENTI: 4 - 6 file di denti appuntiti su ciascuna mascella, con quelli della fila più esterna, soprattutto nella parte anteriore delle mascelle, più grandi degli altri



RINGRAZIAMENTI

In primo luogo desidero ringraziare le persone che mi hanno seguito e aiutato durante il periodo della mia tesi: il mio relatore, Prof.ssa Gianfaldoni, il mio correlatore, Dott. Andrea Armani e il mio controrelatore, Dott. Lorenzo Castiglione, che si sono dimostrati sempre molto disponibili.

In particolare voglio ringraziare il Dott. Armani per il suo supporto e la sua guida che sono stati determinanti per la stesura della mia tesi.

Un sincero ringraziamento va a Lisa, Lara, Priscilla, che in momenti diversi e in vari modi mi hanno prestato il loro aiuto e la loro assistenza nella realizzazione del mio lavoro.

Ringrazio anche i miei “compagni di tesi”, Filippo, Francesco, Alice, per i “momenti di laboratorio” trascorsi insieme e con i quali ho condiviso la stessa passione.

Il mio pensiero più grande va ai miei genitori, senza i quali non sarei mai potuto arrivare fino a questo punto. Grazie mamma, grazie papà, non soltanto per il sostegno economico, che sicuramente è stato indispensabile, ma soprattutto per il sostegno morale, per essermi sempre stati vicini, per avermi incoraggiato e sostenuto nelle mie scelte e per avermi aiutato a superare i numerosi ostacoli incontrati nel cammino della vita.

Un grazie direttamente dal mio cuore va a Gloria, la mia fidanzata, che mi è stata sempre vicina, in particolare nei momenti più difficili, spronandomi, incoraggiandomi e dicendomi sempre che potevo farcela. Grazie Amore.

