

SEQUENZIAMENTO DEL CITOCROMO B MITOCONDRIALE DI *LOPHIUS VOMERINUS* (Valenciennes, 1837)

MITOCHONDRIAL CYTOCHROME B SEQUENCING OF *LOPHIUS VOMERINUS* (Valenciennes, 1837)

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

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

² Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione degli Alimenti, Università Federico II Napoli

³ Ministero della Salute, PIF Bologna

⁴ Direttore del Dipartimento di Prevenzione Veterinaria, ASL Lecco

SUMMARY

The Genus *Lophius*, belonging to the *Lophiidae* Family and commercially called anglerfish, has an important commercial value in the national and international markets. The seven species of the Genus are very similar and it is difficult to identify them by means of the traditional taxonomic methods also because fish are often commercialized decapitated. DNA analysis is one of the most useful tools for identifying animal species. In this work, in order to provide some more information on the DNA sequence of the aforesaid species, we use some universal primers to amplify the mitochondrial cytochrome b gene of *Lophius vomerinus* (Valenciennes, 1837) and obtained the complete sequence by sequencing of PCR products.

Key words

Lophius vomerinus, , fish species identification. Sequence analysis.

INTRODUZIONE

La Famiglia *Lophiidae* indicata anche come *monkfish*, *goosefish* e *anglerfish*, comprende 4 Generi dei quali *Lophius* è l'unico di interesse commerciale (1). Le specie appartenenti a questo Genere sono conosciute come rana pescatrice e si trovano spesso sui nostri mercati sottoforma di preparati, denominati code (2). In passato le specie di maggiore interesse commerciale erano il *Lophius piscatorius* (Linnaeus, 1758) ed il *Lophius budegassa* (Spinola, 1807), per le quali era prevista la denominazione italiana commerciale di rospo o rana pescatrice (3). Nel corso degli anni il mercato nazionale ha favorito l'importazione di nuove specie appartenenti al Genere *Lophius*, provenienti da aree geografiche differenti. Il Genere comprende infatti altre 5 specie oltre le due precedentemente menzionate: *Lophius americanus* (Valenciennes, 1837), *L. gastrophisus*

(Miranda Ribeiro, 1915), *L. litulon* (Jordan, 1902), *L. vaillanti* (Regan, 1903) e *L. vomerinus* (Valenciennes, 1837) (1). Quest'ultima, che rappresenta una delle principali specie catturate in Namibia, ha acquisito importanza tale da ricevere la denominazione commerciale esclusiva di rana pescatrice sudafricana (4). Il più recente Decreto MIPAAF del 31 Gennaio 2008, che sostituisce il precedente, prevede la denominazione di rana pescatrice americana per il *Lophius americanus*, e di rana pescatrice orientale per il *Lophius litulon*, portando a 5 il numero delle specie appartenenti al Genere *Lophius* nell'elenco ufficiale (5).

La commercializzazione delle code, costituisce un ostacolo all'identificazione di specie poiché vi è la perdita della gran parte dei caratteri morfologici (6,7). Nonostante si tratti di specie di elevato pregio e ampiamente commercializzate sono relativamente pochi gli studi di identificazione di specie in bibli-

ografia e spesso riguardano solo le specie *L. budegassa* e *piscatorius* (8,9,10,11).

Scopo di questo lavoro è stato quello di ottenere la sequenza nucleotidica completa relativa alla porzione di DNA mitocondriale che codifica per il citocromo b della specie *Lophius vomerinus* e di confrontarla con le sequenze delle altre specie di interesse commerciale al fine di valutare la reale distanza filogenetica.

MATERIALI E METODI

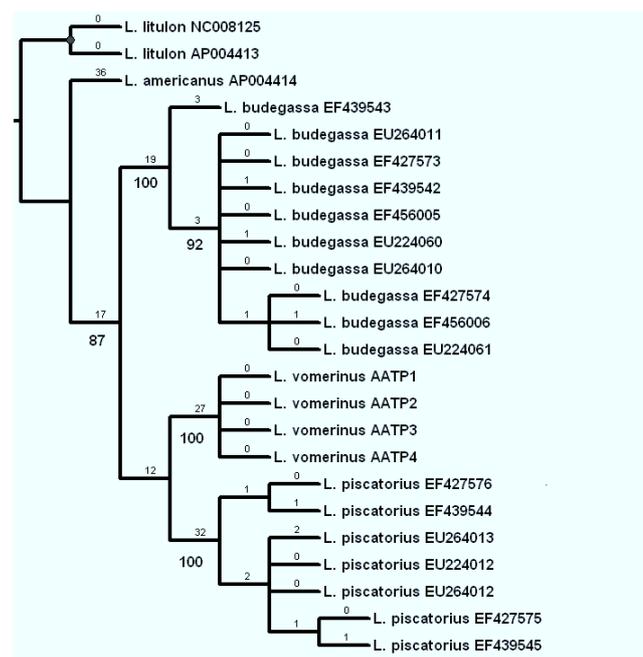
Sono stati esaminati n. 4 esemplari integri di *Lophius vomerinus*, identificati sulla base dei caratteri morfologici dall'autorità competente del Paese Terzo speditore (*Ministry of Trade and Industry – Republic of Namibia*), a livello nazionale sono stati sottoposti ad un ulteriore controllo di specie da parte del Servizio Sanitario Nazionale. L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire da 50 mg di tessuto muscolare, prelevato in condizioni sterili, utilizzando il Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Dopo quantificazione del DNA mediante analisi spettrofotometrica si è proceduto ad amplificare il gene che codifica per il citocromo b mitocondriale utilizzando due coppie di primers universali (*GluFish-F/CytBI-4R*) e (*THR-Fish-R/CytBI-7F*) (Sevilla R. *et al* 2007), che amplificano due frammenti di DNA, rispettivamente di 900bp e di 700bp, collocati alle due estremità del gene mitocondriale. I due ampliconi presentano una zona di sovrapposizione interna di circa 200 bp, che permette di ricostruire l'intera sequenza del *cytb*. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.7% a 100V e visualizzati mediante transilluminatore UV previa colorazione con bromuro di etidio. I prodotti di amplificazione sono stati sequenziati mediante sequenziatore automatico ABI PRISM 310 Applied-Biosystem. Le sequenze ottenute sono state allineate utilizzando il programma ClustalW e confrontate con le sequenze depositate in GenBank utilizzando il programma BLASTn (Software BioEdit version 5.0.6). Il grado di omologia tra la specie *L. vomerinus* e le altre specie appartenenti al genere *Lophius* è stata valutata mediante analisi cladistica utilizzando il Software Winclada (13).

RISULTATI

La tecnica utilizzata ha consentito di estrarre il DNA e di ottenere due frammenti del gene *cytb* mi-

tocondriale, rispettivamente di circa 700 e 900 bp da tutti gli esemplari esaminati. Lo studio delle sequenze dei frammenti ottenuti ha permesso di ricostruire la sequenza completa del gene mitocondriale (circa 1400 pb) dei quattro esemplari di *Lophius vomerinus*, evidenziando per tutte le sequenze un'omologia del 100%. Le sequenze sono state successivamente confrontate con tutte quelle appartenenti al Genere *Lophius*, depositate in GenBank, per le specie per le quali è prevista dalla normativa vigente una denominazione commerciale. Dal confronto diretto delle sequenze è emerso un grado di similarità variabile, in particolare: 92% con *L. budegassa* e *L. piscatorius*; 88% con *L. americanus* e 77% con *L. litulon*. Il cladogramma è stato costruito utilizzando la specie *L. litulon* come out-group in relazione alla sua bassa omologia con tutte le altre specie in esame. Le sequenze appartenenti alla specie *L. vomerinus* formano un unico clado in stretta relazione con quelli delle sequenze appartenenti alle specie *L. piscatorius* e *budegassa*. Minore è la relazione esistente con il clado della sequenza di *L. americanus* (Figura 1).

Figura 1. Analisi cladistica con il metodo della Massima Parsimonia su sequenze complete del gene *cyt b* mitocondriale delle specie *L. litulon*, *L. americanus*, *L. budegassa*, *L. piscatorius* (numero di riferimento di GenBank) e *L. litulon*. Sono stati riportati ai nodi i valori di Bootstrap superiori a 70.



CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

L'identificazione di specie attraverso l'analisi del gene *cytb* mitocondriale rappresenta senza dubbio l'approccio maggiormente utilizzato dai ricercatori. In questo lavoro sono state utilizzate due diverse coppie di primers che hanno permesso di ottenere la sequenza completa del citocromo b mitocondriale di *Lophius vomerinus* (Valenciennes, 1837). La sequenza completa del gene rappresenta una condizione indispensabile ogni qualvolta sia necessario discriminare tra specie strettamente correlate poiché la variabilità interspecie è definita da un numero ridotto di polimorfismi.

Scopo dello studio era quello di ottenere la sequenza completa del *cytb* mitocondriale di *Lophius vomerinus* e di valutarne il grado di omologia con le sequenze di altri lofidi di interesse commerciale al fine di valutare la possibilità di poterlo differenziare. Tale studio è finalizzato al controllo delle frodi alimentari per sostituzione di specie in prodotti che durante le fasi di lavorazione perdono i caratteri morfologici necessari per il loro riconoscimento. È questo il caso della rana pescatrice (*Lophius spp.*) commercializzata come prodotto preparato, comunemente indicato "coda di rospo", molto simile a quello ottenuti dalla lavorazione di specie tossiche quali pesci palla. In accordo con il Regolamento CE n. 178/2002, relativo al regime di controllo della rintracciabilità dei prodotti alimentari, discriminare tra le specie è di fondamentale importanza per la tutela sanitaria e commerciale del consumatore. Lo studio di tratti caratteristici del DNA rende inoltre più certe ed incisive le attività degli organi di controllo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Maartens L, Booth A. J and Hecht T., (1999) "The growth of monkfish *Lophius vomerinus* in Namibian waters, with a comparison of otolith and illicia methods of ageing", Fisheries Research, 44, 139-148
- 2) Lucchetti A. (2006), "La rana pescatrice-*Lophius piscatorius* (Linnaeus, 1758) *Lophius budegassa* (Spinola, 1807)", Il Pesce, 4, 97-101.
- 3) Decreto 27 Marzo 2002 del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, dal titolo "Etichettatura dei prodotti ittici e sistema di controllo", GU n. 84 del 10 aprile 2002.
- 4) Decreto 25 Luglio 2005 del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, dal titolo "Modifiche ed integrazioni all'elenco delle denominazioni commerciali dei prodotti ittici, allegato al decreto ministeriale 14 gennaio 2005", GU n. 181 del 5 Agosto 2005.
- 5) Decreto 31 gennaio 2008 del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, dal titolo "Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale - Modifiche ed integrazioni dell'elenco di cui al decreto 25 luglio 2005" GU n. 45 del 22 Febbraio 2008.
- 6) Leslie R. W and Grant W.S., (1991) "Redescription of the Southern African Anglerfish *Lophius vomerinus* Valenciennes, 1837 (Lophiiformes: Lophiidae)", Copeia, 3, 787-800.
- 7) Leslie R. W and Grant W.S., (1994) "Meristic and morphometric variation among anglerfish of the genus *Lophius* (Lophiiformes)", Journal of Zoology London, 232, 565-584.
- 8) Charrier G., Chenel T., Durand . D. et al. (2006) "Differences in phylogeographical patterns of two European anglerfishes (*Lophius budegassa* and *Lophius piscatorius*)", Molecular Phylogenetics and Evolution, 38, 742-754.
- 9) Vicari N., Maniero S., Arcangeli G et al., (2001) "Identificazione di rana pescatrice (*Lophius budegassa* e *Lophius piscatorius*) gallinella (*Trigla lucerna*), pesce preste (*Uranoscopus scaber*) e pesce palla (*Arothron nigropunctatus*) mediante analisi di restrizione di prodotti di PCR", Ingegneria Alimentare, 5, 24-27.
- 10) Sanjuan A., raposo-Guillan j an Come sana A. S, (2002) "Genetic Identification of *Lophius budegassa* and *L. piscatorius* by PCR-RFLP Analysis of a Mitochondrial tRNA^{Glu}/Cytochrome bSegment", Food Chemistry and Toxicology, 67 (7), 2644-2648).
- 11) Ramella M. S., Kroth M. A. Tagliari C et al., (2005) "Optimization of random amplified polymorphic DNA protocol for molecular identification of *Lophius gastrophisus*", Ciencia e Tecnologia de Alimentos, 25(4), 733-735.
- 12) Sevilla Rafael G, Diez Amalia, Noren Michael et al., (2007) "Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes", Molecular Ecology Notes, 7, 730-734.
- 13) Nixon K. C. (1999). Winclada (beta) ver. 0.9.9. Published by the author, Ithaca, NY.