

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI PRODOTTI DELLA PESCA D'IMPORTAZIONE CINESE (PESCE GHIACCIO)

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CHINESE IMPORTED FISH (ICEFISH)

Armani A., Castigliero L., Guidi A., Tinacci L., Gianfaldoni D.
Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Università di Pisa

SUMMARY

Neosalanx spp and *Protosalanx spp* are two genres belonging to the fish family of *Salangidae* that are caught in China and commercialised abroad with the name of Ice fish or silver fish. Because of their morphological resemblance to some valuable fish products sold on our national market (know as Bianchetto and Rossetto), the Icefish is sometimes involved in commercial frauds. The number of species of the aforesaid genres are several and sometimes difficult to identify. However, the deep exploitation of the Salangids in China brought to a sharp prevalence of the specie *Neosalanx taihuensis* on the others, which should be the main if not the only specie imported in Italy. In this work, we analysed the DNA sequences of the cytochrome b of a number of Icefish samples collected both in Italy and in China, to evaluate the species which are actually imported, in order to develop, in the future, a single step molecular analysis for the identification of substitution frauds."

KEYWORDS

fish species identification, sequencing, cytochrome b, *Neosalanx spp*.

INTRODUZIONE

La presenza di un elenco ufficiale relativo alle denominazioni commerciali in lingua italiana per i prodotti della pesca costituisce uno strumento utile e necessario per facilitare la trasparenza nelle transazioni commerciali dalla produzione primaria fino al consumatore finale, rappresentando un elemento fondamentale nella tracciabilità di tali prodotti (Reg. (CE) n. 2065/2001)(1); infatti, questo settore, a causa di numerosi fattori, primo fra tutti la globalizzazione dei mercati, si differenzia dagli altri comparti alimentari per il crescente numero di specie commercializzate e relative denominazioni commerciali. L'ultimo elenco ufficiale, emanato con il Decreto 31 gennaio 2008 del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (MIPAAF) (2) ne riporta più di 800, senza considerare le numerose denominazioni provvisorie che, ai sensi dell'articolo 3 del Decreto 27 marzo 2002 del

MIPAF (3), vengono costantemente associate a nuovi prodotti che arrivano sul territorio nazionale. Nel corso degli anni sono state adottate denominazioni distinte per specie estremamente simili da un punto di vista morfologico, tali da renderne difficile, o addirittura impossibile nel caso di lavorazione, il riconoscimento. Altre volte, invece, la stessa denominazione è stata prescelta per indicare un intero Genere. Quanto detto può rappresentare un elemento di confusione per l'operatore del settore alimentare, che deve obbligatoriamente indicare denominazione commerciale e/o scientifica sul prodotto. Allo stesso modo, l'autorità sanitaria può incorrere in difficoltà identificative di fronte a prodotti diversamente lavorati o poco conosciuti provenienti da Paesi Terzi; tali difficoltà, inoltre, possono venire sfruttate per realizzare frodi per sostituzione, dove prodotti pregiati vengono scambiati con altri di valore commerciale inferiore. Una delle frodi commerciali conseguente

all'importazione di pesce dalla Cina, riscontrata nel nostro territorio, è quella legata alla sostituzione di specie nazionali come il Bianchetto ed il Rossetto con il Pesce ghiaccio o *Icefish*, Salangide d'acqua dolce venduto come prodotto congelato al prezzo di pochi euro al chilo. Pesce ghiaccio, in base a quanto stabilito dal Decreto MIPAAF 31 gennaio 2008, è la denominazione commerciale che può essere utilizzata esclusivamente per i due generi *Protosalanx spp.* e *Neosalanx spp.*; si tratta di specie originarie del Mar Giallo, distribuitesi successivamente nell'Asia orientale che, nonostante le piccole dimensioni, presentano un interesse commerciale elevato e sono da tempo sfruttate in Cina. Nel fiume Yangtze sono pescate a partire dagli inizi del '900 ed il suo bacino costituisce uno dei luoghi in cui si concentrano ben 9 delle 20 specie esistenti. Oltre che nel fiume Yangtze i Salangidi si ritrovano in numerosi laghi come il Dianchi, il Poyang, lo Hangzhou e il Taihu. Si riscontrano, inoltre, in zone salmastre come il mare di Bohai nel quale si apre la foce del Fiume Giallo (4, 5, 6, 7, 8, 9,). A causa della notevole somiglianza è praticamente impossibile identificare le 20 specie di Pesce Ghiaccio attualmente descritte su Fishbase (10) in modo da differenziare i generi *Neosalanx* e *Protosalanx* previsti dal Decreto, da *Hemisananx*, *Salanx*, e *Salangichthys*. Inoltre, il quadro è ulteriormente complicato dal fatto che l'utilizzo di caratteri morfologici come il numero di vertebre o dei raggi delle pinne non è sempre attuabile, considerando le piccole dimensioni di queste specie e l'instabilità di tali caratteri. Infine, tutte le specie assumono la stessa colorazione bianco latte in seguito al congelamento. Quando l'esame morfologico, macro o microscopico, di un prodotto della pesca non permette di risalire alla specie di appartenenza, l'approccio molecolare è quello maggiormente utilizzato ed, in particolare, l'analisi di alcune sequenze del DNA mitocondriale, come *citocromo b* (*cyt b*) o la subunità 16s dell'RNA ribosomiale; tale strumento è altamente efficace nel riconoscimento di specie e ne permette l'identificazione anche se estremamente vicine da un punto di vista filogenetico e, molto spesso, morfologico.

Lo scopo di questo lavoro, attraverso il sequenziamento di un frammento di 472 pb e la successiva analisi di un frammento di 371 pb del *cytb*, è stato quello di effettuare una caratterizzazione molecolare dei prodotti a base di Pesce ghiaccio presenti sul territorio italiano per valutare le specie di Salangidi

effettivamente importate. Infatti, nonostante a livello ufficiale siano stati inseriti i due generi, le fonti bibliografiche riportano il genere *Neosalanx spp* come l'unico da sempre sfruttato per fini economici in Cina. Risulta inoltre che il *Neosalanx taihuensis* (Chen, 1956) sia la specie più abbondante e allevata per scopi commerciali. La possibilità di dimostrare la presenza di un'unica specie sui nostri mercati permetterebbe di sviluppare una metodica molecolare a singolo step (multiplex PCR) da utilizzare per individuare eventuali sostituzioni fraudolente in prodotti a base di specie autoctone molto più pregiate.

MATERIALI E METODI

Nel presente lavoro sono stati analizzati centodieci esemplari di Pesce ghiaccio provenienti da campioni diversi per origine e tipologia: quindici prodotti congelati di provenienza cinese acquistati in punti vendita distribuiti sul territorio italiano o pervenuti presso Posti d'Ispezione Frontaliera. Sei campioni di pesce ghiaccio essiccato reperiti direttamente in Cina: Shangai (1), Hong Kong (2), Nanning (1), Isola di Hainan (2). Un campione di esemplari freschi di *N. taihuensis* prelevati presso il lago Taihu nella provincia di Jiangsu (Wuxi). Tutti i campioni sono stati conservati a -20°C fino al momento del loro utilizzo. Il DNA totale è stato estratto da 5 esemplari per ogni campione scelti in maniera casuale nel caso in cui i prodotti si presentassero simili per taglia, o scegliendo soggetti con taglie differenti nel caso di prodotti disomogenei. L'estrazione del DNA è stata effettuata apportando alcune modifiche al protocollo proposto da Ikeda *et. al* 2004 (12). Il DNA ottenuto è stato poi valutato qualitativamente e quantitativamente tramite spettrofotometro NanoDrop® ND-1000. Per l'amplificazione della sequenza mitocondriale del *cytb* sono stati scelti due primers universali disponibili in bibliografia. Come Forward è stato scelto il primer L14321 (5'-CCAGTGACTTGAAAAACCACCG-3') progettato da Zhang *et al.* (2007) (8) per l'amplificazione di 15 differenti specie appartenenti alla Fam. *Salangidae*. Il primers Reverse, denominato RevSAL (5'-CCTCAGAAAGACATTTGTCCTCA-3'), è stato invece disegnato, analizzando le sequenze attualmente depositate, sulla base del primer universale elaborato da Kocher *et al.* (1989) (12) ed utilizzato da Fu *et al.* nel 2005 (7) per amplificare 6 specie di Pesce ghiaccio. I primers utilizzati amplificano una regione di 472pb di cui 47pb relative alla regione che codifica per il

tRNA^{Glu} e 425 relative alla prima parte della regione codificante il *cytb*. Tutti i prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica (30 min a 250 V su gel di agarosio all'1,5%). Quelli che hanno evidenziato la banda specifica sono stati purificati utilizzando il kit EuroGold Cycle-Pure (Euroclone, Wetherby, UK) e spediti ad un laboratorio esterno per il sequenziamento. Le sequenze ottenute sono state visualizzate, analizzate e corrette manualmente utilizzando il programma Software BioEdit (version 5.0.6). Successivamente sequenze di 427pb sono state confrontate con le sequenze depositate in GenBank, utilizzando il programma BLASTn. L'allineamento delle sequenze destinate all'analisi filogenetica è stato effettuato con il programma ClustalW (Software BioEdit version 5.0.6). Per l'analisi filogenetica sono state utilizzate le sequenze ottenute in questo lavoro e 16 sequenze relative alla Famiglia *Salangidae*, attualmente depositate in banca dati, per la specie *N. taihuensis* quelle relative a tre differenti aplotipi (H36-H33 e H27). Tutte le sequenze sono state tagliate a 371pb, che corrisponde alla lunghezza dell'unica sequenza disponibile per la specie *Leucosoma reveesii* (Gray, 1831). L'analisi filogenetica è stata effettuata mediante il metodo *Neighbour-Joining* (NJ) utilizzando il programma TREECON. Le distanze per l'albero NJ sono state calcolate con il modello Kimura, dove il valore del rapporto transizioni/trasversioni è stato impostato a 2. L'albero ottenuto è stato disegnato tramite TREECON. La confidenza dei singoli rami del dendrogramma è stata valutata avvalendosi di un "bootstrap" di 1000 ricampionamenti. La sequenza relativa all'*Osmerus mordax* (Mitchill, 1814) (AB114911) è stata utilizzata come *outgroup*.

RISULTATI

La metodica di estrazione utilizzata ha permesso di ottenere un DNA totale di buona qualità da ogni tipologia di prodotto analizzato ed i primers scelti hanno amplificato il frammento atteso di 472 bp in tutti i campioni. Il sequenziamento ha permesso di ottenere le sequenze relative a tutti gli esemplari che sono stati analizzati. L'allineamento delle sequenze con quelle depositate in database relative alla sequenza del *cytb* ha evidenziato un'omologia variabile fra il 98 ed il 100% con quella relativa alla specie *N. taihuensis*, del 99% con quelle relative alla specie *N. pseudotaihuensis* (Zhang, 1987) e del 100% con l'unica relativa alla specie *N. tangkahkeii* (Wu, 1931). Per quanto riguarda la specie *N. taihuensis*, l'allineamento ha messo

in evidenza l'esistenza di aplotipi differenti fra i nostri esemplari, anche se una differenziazione completa non è ottenibile in assenza della sequenza completa relativa al *cytb*. L'albero ottenuto (Fig. 1) ha permesso di confermare l'appartenenza alla specie identificata su base morfologica per gli esemplari di *N. taihuensis* provenienti dal lago Taihu, e di identificare tutti gli altri prodotti raccolti sul territorio italiano e cinese come appartenenti alla medesima specie. Nell'ambito dello stesso *cluster* relativo alla specie *N. taihuensis* sono state evidenziate delle piccole differenze per quanto riguarda le sequenze relative al prodotto identificato con la sigla MN.

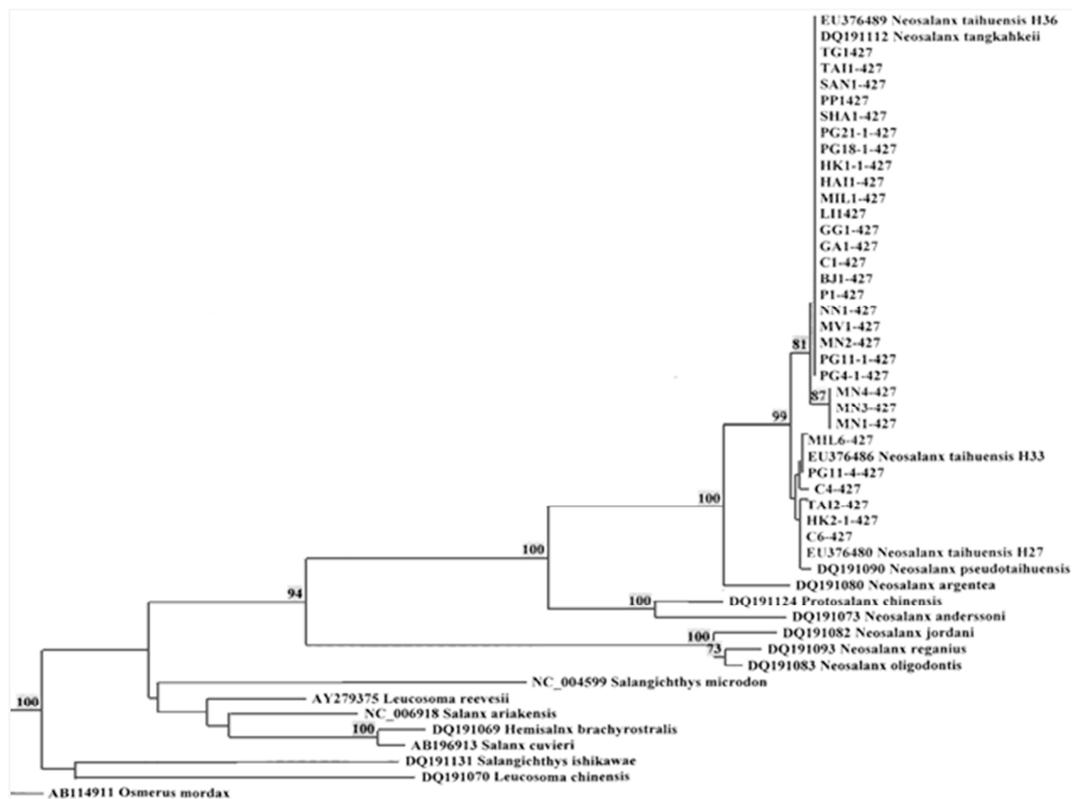
CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

La tecnica di sequenziamento conosciuta come *Forensically Informative Nucleotide Sequencing* (FINS) (Bartlett *et al.*, 1992) (13), fornisce l'esatta successione nucleotidica relativa al frammento d'interesse e rappresenta un valido ausilio diagnostico per evidenziare frodi commerciali, permettendo l'identificazione di quelle specie che, per le loro piccole dimensioni, non sempre si prestano ad un riconoscimento mediante l'utilizzo di chiavi tassonomiche. L'identificazione è ottenuta dal confronto con le sequenze già depositate nelle banche dati utilizzando software in grado di analizzare le omologie fra le sequenze nucleotidiche. Quanto detto risulta ancora più vantaggioso nel caso del *cytb*, in quanto uno fra i geni maggiormente sequenziati fra i vertebrati. Nel presente lavoro, un frammento di DNA di 472pb del *cytb* è stato amplificato e sequenziato e successivamente utilizzato per l'analisi filogenetica. Dall'analisi dell'albero è stato possibile identificare tutti gli esemplari analizzati, infatti tutte le sequenze ricadono all'interno dello stesso ramo che sostiene la specie *N. taihuensis*. L'albero ottenuto presenta numerose similitudini con quello di Zhang *et al.* del 2007 (8) e permette di spiegare il motivo per cui anche le sequenze di *N. pseudotaihuensis* e *N. tangkahkeii* siano raggruppate insieme a quella di *N. taihuensis*. Secondo questi autori i tre termini sono fra loro sinonimi e si riferiscono ad una sola specie che dovrebbe essere riferita come *N. tangkahkeii*. La caratterizzazione molecolare di prodotti a base di Pesce ghiaccio ottenuta in questo lavoro trova piena corrispondenza con le fonti bibliografiche consultate. Infatti, delle 20 specie attualmente descritte soltanto alcune hanno costituito una fonte di reddito per l'economia della Cina. Ad esempio, delle 5 specie presenti

nella foce del fiume Yangtze soltanto l'*Hemisalanx prognathus* (*Salanx prognathus*) (Regan, 1908) è stato sfruttato prima del 1987,

mentre tutte le altre specie sono da sempre presenti in concentrazione troppo bassa per essere utilizzate ai fini della pesca commerciale.

Figura 1. Analisi filogenetica NJ di esemplari Pesce ghiaccio e delle specie appartenenti alla Fam. *Salangidae*. L'analisi è stata ottenuta dall'allineamento di 129 sequenze di un frammento di 371 pb. Le sequenze prive di codice GeneBank sono state ottenute nel seguente lavoro. I valori di bootstrap (1000 repliche) sono mostrati ai nodi per valori superiori al 70%. Le sequenze ridondanti sono state eliminate.



Per quanto riguarda invece le zone intermedie del fiume, 4 specie hanno rivestito un interesse economico notevole, ma *N. taihuensis* è sempre stata la specie più abbondante, mentre le altre tre, *P. hyalocranius*, *N. oligodontis* e *H. brachyrostralis*, hanno costituito una più piccola proporzione dei quantitativi di Pesce ghiaccio pescati annualmente. Studi condotti nel 2005 hanno confermato come il genere *Neosalanx* sia ancora quello più abbondante, costituendo il 98,4 % delle specie di Pesce ghiaccio presenti, rispetto all'1% del *Protosalanx* e allo 0,6% dell'*Hemisalanx*. Il *N. taihuensis* è la specie principale del lago Taihu, e, proprio in relazione al suo alto valore commerciale, è stato introdotto nei corsi d'acqua di altre 20 Province della Cina diventando quella maggiormente sfruttata (14, 9, 15). Questo è dimostrato anche dal fatto che tutti i prodotti commercializzati essiccati reperiti sul territorio cinese appartengono sempre alla stessa specie. L'identificazione della provenienza geografica dei prodotti commercializzati sul territorio

italiano da noi analizzati, resa possibile grazie al numero dello stabilimento di produzione riportato sulla confezione, riconduce 8 prodotti a 3 differenti Province (Yunnan, Jiangsu, Hubei), localizzate sul percorso del fiume Yangtze, e un prodotto, pescato in Zona Oceano Pacifico, alla provincia dello Zhejiang, che si trova in vicinanza del delta dello stesso fiume. Per gli altri prodotti non è stato possibile risalire alla zona di produzione o perché riconfezionati in Italia o perché privi di etichetta. Infine, da mettere in evidenza come non conformità di etichettatura siano state rilevate soltanto in prodotti acquistati nel corso del 2007-2008 (1 prodotto venduto come bianchetto ed 1 come novellame di pesce azzurro) mentre siano assenti nei prodotti raccolti nel corso degli anni successivi. La denominazione scientifica riscontrata nella maggior parte dei prodotti è quella di *Neosalanx tangkahkeii taihuensis* (Chen, 1956). Questo lavoro, attraverso una caratterizzazione molecolare, ha dimostrato che delle 10 previste

dal decreto di riferimento, la sola specie presente sui nostri mercati è il *Neosalanx taihuensis*, che, viste le peculiari caratteristiche commerciali, sarebbe auspicabile ricevesse una specifica denominazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Regolamento (CE) N. 2065/2001 della Commissione del 22 ottobre 2001 che stabilisce le modalità di 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, G. U. delle Comunità europee n. L 278/6 del 23 ottobre 2001;
2. 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;
3. Decreto del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali del 27 marzo 2002, "Etichettatura dei prodotti ittici e sistema di controllo", G.U. n. 84 del 10 aprile 2002;
4. Shuozeng D., Dagang C., (1994) "Taxonomy, biology and abundance of icefishes, or noodlefishes (Salangidae), in the Yellow River estuary of the Bohai Sea, China" *Journal of Fish Biology* 45:737-748;
5. Liu Z., Herzig A., Schiemer F., (2000) "Growth of the icefish *Neosalanx pseudotaihuensis* (Salangidae) in Xujiuhe Reservoir, central China" *Environmental Biology of Fishes* 59:219-227;
6. Wang Z., Zhang F., Chun L. (2002) "Biodiversity of Chinese Icefishes (Salangidae) and their conserving strategies" *Biodiversity Science* 10(4):416-424;
7. Fu C., Luo J., Wu J., Lopez J., Zhong Y., Lei G., Chen J. (2005) "Phylogenetic relationships of salangid fishes (Osmeridae, Salanginae) with comments on phylogenetic placement of the salangids based on mitochondrial DNA sequences" *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35:76-84;
8. Zhang J., Li M., Xu M., Takita T., Wei F. (2007) "Molecular phylogeny of Icefish Salangidae based on complete mtDNA cytochrome b sequences, with comments on estuarine fish evolution" *Biological Journal of the Linnean Society* 91:325-340;
9. Wang Z., Shi J., Xu C., Lei G. (2008) "Degradation of icefishes (Salangidae) in the Yangtze River basin of China: threats and strategies" *Environmental Biology Fish* 86(1):109-117;
10. www.fishbase.org/Nomenclature/FamilySearchList.cfm
11. Ikeda S, Watanabe K. N., Minamisawa K. and Ytow Nozomi (2004) "Evaluation of soil DNA from Arable land in Japan using a modified direct-extraction method" *Microbes and Environments*, 19 (4):301-309;
12. Kocher T. D., Thomas W. K., Meyer A, Edwards S. V., Paabo S., Villablanca F. X. and Wilson A. (1989) "Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 6196-6200;
13. Bartlett S., Davidson W., (1991) "FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing): A Procedure of Identifying the Animal Origin of Biological Specimens" *Biotechnology* 12:408-411;
14. Wang Z., Lu C., Hu H., Zhou Y., Xu C., Lei G. (2005) "Freshwater Icefish (Salangidae) in the Yangtze Riverbasin of China: Spatial distribution patterns and environmental determinants" *Environmental Biology of Fishes* 73:253-262;
15. Gong W., Li H., Xie S.Q Liu J., Murphy B., Xie S.G. (2009) "Two spawning stocks of icefish *Neosalanx taihuensis* revealed from annual reproductive cycle analyses" *Fish Science* 75:1157-1165;