

Dottorato in Biologia Ambientale e Biodiversità  
Dipartimento STEBICEF  
Settore Scientifico Disciplinare BIO/05

**“DNA *Barcoding* come strumento a supporto  
della tassonomia zoologica per pesci ossei e crostacei del Canale di  
Sicilia  
e  
dell’identificazione univoca di specie eduli marine di interesse  
commerciale”**

DOTTORE

**Girolama Biondo**

COORDINATORE

**Prof. Marco Arculeo**

TUTOR

**Prof. Marco Arculeo**

CO TUTOR

**Dott.ssa Angela Cuttitta**

CICLO XXIX

ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2017



# Sommario

Riassunto .....	5
1.Introduzione.....	7
1.1 Cenni sulla fauna del Mar Mediterraneo .....	9
1.1.1 Pesci ossei.....	10
1.1.2 Crostacei .....	11
1.2 DNA- <i>Barcoding</i> .....	13
1.2.1 <i>Barcode Data Standard</i> .....	16
1.2.2 <i>Partner</i> fondamentali del DNA <i>Barcoding</i> .....	18
1.2.3 FISH-BOL .....	22
1.3 DNA <i>Barcoding</i> e frodi alimentari.....	24
1.3.1 Sviluppo di un veloce metodo di estrazione del DNA per l' identificazione di prodotti ittici e specie marine.....	28
1.3.2 <i>FishProfiler DNA kit</i> .....	30
2. Materiali e metodi.....	32
2.1 Campionamento.....	32
2.1.1 Campagne di raccolta dati .....	33
2.2. Analisi genetiche .....	38
2.3 Messa a punto del metodo veloce di estrazione del DNA per l' identificazione di prodotti ittici e specie marine.....	44
2.4 Realizzazione del <i>FishProfiler DNA Kit</i> .....	46
3. Risultati.....	51
3.1 Variabilità genetica nei crostacei.....	51
3.1.1 Crostacei: Confronto con le sequenze nucleotidiche del <i>database GenBank</i> <sup>®</sup> .....	60
3.2 Variabilità genetica nei Pesci Ossei.....	66
3.2.1 Pesci ossei: Confronto con le sequenze nucleotidiche (Atlantico) del <i>database GenBank</i> <sup>®</sup> .....	74
3.3 Messa a punto dell' utilizzo di un lisato grezzo di DNA (Tagliavia et. al, 2016) per le reazioni di PCR. ....	80
3.4 Realizzazione del <i>FishProfiler DNA kit</i> .....	83
4. Discussioni .....	87
5. Conclusioni.....	93
Bibliografia.....	96
<i>Ringraziamenti</i> .....	108



## Riassunto

La metodica molecolare del DNA *Barcoding* consente l'identificazione a livello di specie su scala globale utilizzando un approccio basato sul DNA standardizzato e autentificato.

Le biblioteche di riferimento che contengono i *Barcode* validati (COI) costituiscono robusti *set* di dati per la verifica delle sequenze di *query*, fornendo notevole utilità per identificare i pesci marini, crostacei e altri organismi. In questo studio è stata analizzata la possibilità di utilizzare il DNA *Barcode* per assegnare ai campioni analizzati le specie di provenienza, pesci e crostacei, raccolti nel mar Mediterraneo centrale ed è stata sequenziata per la prima volta la regione COI nelle specie di crostacei *Alpheus glaber* e *Pisa nodipes* e nelle specie di pesci ossei *Benthocometes robustus* e *Parophidion vassali*.

E' importante sottolineare che le altre specie di crostacei, appartenenti all'ordine *Decapoda*, *Euphausiacea*, *Calanoida* e *Stomatopoda* analizzate nello studio, fin ora erano presenti nel *database* GenBank® solo per individui di provenienza atlantica e del Mare del Nord.

Come per i crostacei analizzati in questo studio, anche per gli individui di pesci ossei, è stato importantissimo risalire alle sequenze nucleotidiche relative alla regione COI per alcune specie mediterranee, in quanto per la maggioranza delle specie trattate, queste non erano presenti.

La procedura di estrazione del DNA totale (come lisato grezzo), testata in questo studio è rapida, economica, semplice e affidabile ed è molto efficace nelle analisi dei campioni, indipendentemente dalle condizioni di conservazione (congelamento, affumicatura, fissazione

fisica o chimica), dal tipo di tessuto. Inoltre coniugando la procedura di estrazione del DNA totale (come lisato grezzo) con lo strumento DNA *Barcode* e l'utilizzo di *primer* specie-specifici, è stato realizzato un *kit* per l'identificazione rapida di 10 specie di pregio commerciale selezionate (*Xiphias gladius*, *Sardina pilchardus*, *Scombers scombrus*, *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Sepia officinalis*, *Loligo vulgaris*, *Todarodes sagittatus*, *Palinurus elephas* e *Aristaeomorpha foliacea*). Tale *kit* rappresenta un punto di partenza cruciale nella certificazione del prodotto ittico su scala economico-commerciale.

## 1.Introduzione

I traguardi raggiunti dalle moderne biotecnologie molecolari, le rendono un nuovo ed efficace strumento a supporto della tassonomia tradizionale; esse di fatto puntano a colmare la carenza di adeguate conoscenze in campo tassonomico, l'insufficienza di tassonomi esperti e la conseguente incapacità di valutare la biodiversità.

Mediante l'approccio molecolare è infatti possibile individuare specie criptiche, stabilire rapporti di parentela tra le specie e la loro appartenenza a categorie tassonomiche, oltre che ricostruire la storia evolutiva di un *taxon*.

Le frodi alimentari, dovute alla sostituzione delle specie, rappresentano un rischio emergente relativamente alla salute dei consumatori a causa della catena di approvvigionamento alimentare sempre più globale che prevede l'arrivo di specie che rispondono a normative di controllo e tracciabilità diverse da quelle europee. Peraltro un gran numero di specie ittiche viene commercializzato in prodotti trasformati (cotti, affumicati, sfilettati, congelati e decapitati) e quindi non è possibile risalire con certezza alle specie di provenienza in quanto i caratteri morfologici, essenziali per il riconoscimento tassonomico, vengono asportati durante i processi di trasformazione. In questo scenario, è diventato essenziale identificare in modo univoco le specie ittiche di interesse commerciale, attraverso tecniche biomolecolari.

All'interno del mio lavoro di dottorato, nell'ambito del Progetto "Nuove Rotte: Blue Economy" (Piano Sviluppo di Filiera PO FESR Sicilia 2007/2013 – Obiettivo Operativo 5.1.1, Linea d'intervento TUTELA E VALORIZZAZIONE DEI PRODOTTI ITTICI

FRESCHI, DI ALLEVAMENTO E TRASFORMATI 5.1.1.2), al fine di conferire alle specie ittiche del mercato locale un valore commerciale maggiore garantendone la tracciabilità molecolare, è stato allestito il *FishProfiler* DNA Kit.

Il *kit* è stato ideato a supporto delle piccole e medie imprese della pesca che vogliono certificare la tracciabilità molecolare e l'autenticità del prodotto commercializzato auspicando un incremento del guadagno economico alle stesse garantito dalla certificazione della risorsa alieutica commercializzata, oltreché a supporto degli organi di controllo.

Contestualmente e sinergicamente alla messa a punto del *kit* ho contribuito all'ottimizzazione di una nuova tecnica di estrazione del DNA, un metodo di lisi molto semplice e veloce, in grado di funzionare bene sia su campioni di pesce fresco che conservato (congelato o conservato in alcol etilico) o trasformato, consentendo l'utilizzo di lisati grezzi per una PCR diretta, inoltre tutte le analisi svolte durante il mio dottorato si sono avvalse della tecnica molecolare del DNA *Barcoding* come strumento di identificazione univoco di specie animali.

Il mio lavoro di ricerca si è proposto dunque di fornire le informazioni opportune al fine di conoscere (supporto tassonomico), proteggere, tutelare e promuovere (supporto commerciale) le risorse alieutiche mediterranee nonché di dotare i produttori di strumenti opportuni per garantire la tracciabilità molecolare delle specie che commercializzano nel più nobile obiettivo di promuovere la tutela dei consumatori dagli innumerevoli tentativi di frodi commerciali a cui ogni giorno vengono esposti, inserendomi nel più ampio obiettivo che mira a definire in maggior dettaglio la biodiversità animale della fauna del mar



Mediterraneo ed una caratterizzazione inequivocabile delle specie ittiche di interesse economico. Infatti grazie a questo lavoro è stato possibile arricchire i database fruibili *online* di informazioni sulla fauna ittica del Mar Mediterraneo, ponendo particolare attenzione alle specie di pesci ossei e crostacei.

## **1.1 Cenni sulla fauna del Mar Mediterraneo**

Il Mar Mediterraneo copre lo 0,82% della superficie terrestre, con un volume di massa d'acqua pari allo 0,32% del volume totale delle acque oceaniche (Bianchi e Morri, 2000) e non costituisce da solo una unità biogeografica (Ekman, 1953; Bianchi e Morri, 2007), in quanto la sua fauna si estende con caratteristiche fondamentali invariate dall'Atlantico orientale attraverso lo Stretto di Gibilterra che non segna quindi un confine ben definito; la regione mediterranea deve quindi intendersi come comprendente la zona Mauritanica, (che da Gibilterra si estende lungo le coste africane fino a Capo Bianco e al Senegal) e la zona Lusitanica (che si estende a nord fino all'ingresso della Manica). e dunque gli areali delle specie ittiche mediterranee includono in tutto o in parte queste zone.

All'interno del bacino Mediterraneo, il Canale di Sicilia si inserisce quale punto di separazione tra il sotto-bacino occidentale e quello orientale, nei quali la fauna presenta variazioni in termini di composizione specifica in relazione alla latitudine e alla longitudine e manifestando un processo di "tropicalizzazione" dove specie provenienti dall'Atlantico, specie provenienti dal Mar Rosso e specie introdotte dall'uomo combinate con i cambiamenti climatici hanno

favorito lo stabilizzarsi di biota marini tropicali in modo permanente in Mediterraneo.

In particolare si può ipotizzare che con il passare del tempo, la porzione più meridionale del Mediterraneo sarà occupata dalle specie esotiche, la porzione più settentrionale sarà invasa dalle specie native ad affinità calda, mentre le specie native ad affinità fredda confinate nella zona settentrionale andranno perse (Bianchi et al., 2007).

### 1.1.1 Pesci ossei

La composizione della fauna ittica mediterranea è fortemente influenzata dal numero di specie che giunge in Mediterraneo dall'Oceano Atlantico attraverso lo stretto di Gibilterra, dal Mar Rosso e dall'Oceano Indiano attraverso il Canale di Suez, dal Mar di Marmara e dal Mar Nero attraverso lo Stretto dei Dardanelli. L'elevato numero di specie proveniente dalle aree limitrofe in Mediterraneo contribuisce ad arricchire la complessità della biodiversità marina di questo bacino caratterizzata da una cospicua e peculiare ricchezza di specie, tra cui alcuni endemismi (Coll et al., 2010; Azzurro et al., 2011; Lo Brutto et al., 2011).

Ospitando il 7% della fauna ittica marina globale (Bianchi & Morri, 2000) il Mar Mediterraneo è un ricco e affascinante *hotspot* di biodiversità (FAO 2003a; FAO 2003b), che ha catturato l'interesse di numerosi scienziati marini fin dai tempi più antichi (Coll et al., 2010).

Per risalire al genere e alla specie di un pesce osseo è possibile avvalersi delle chiavi morfologiche che permettono l'identificazione tassonomica prendendo in esame alcune caratteristiche, quali:

- a) misure: lunghezza *standard*, altezza massima del corpo, lunghezza del capo, diametro oculare, lunghezza del muso, larghezza interorbitale, peso totale;
- b) proporzioni: rapporto tra lunghezza *standard* ed altezza, fra lunghezza *standard* e lunghezza del capo, fra lunghezza del capo e diametro dell'occhio, lunghezza totale e peso totale;
- c) caratteri del capo: forma e dimensione degli occhi, presenza e numero dei denti, narici, membrane branchiosteghe, branchiospine, spine cutanee, tentacoli e raggi spinosi;
- d) caratteri della pelle: presenza o assenza di placche ossee o di squame; natura cicloide o ctenoide delle squame; numero di squame contate in serie longitudinale (lungo la linea laterale se questa esiste) e trasversale (obliqua), distinguendo quelle che stanno al di sopra e al di sotto della linea laterale, presenza ed eventuale numero di melanofori e fotofori;
- e) caratteri delle pinne: numero, grandezza, posizione, forma, numero dei raggi molli, presenza e numero dei raggi spinosi;
- f) colore: necessario carattere identificabile solo in vivo o su individui freschi.

### 1.1.2 Crostacei

Il subphylum dei Crostacei comprende circa 52.000 specie descritte, suddivise in 849 famiglie, 48 ordini e 6 classi, ma questa è una stima ed i valori reali sono molto più elevati (Martin e Davis, 2001). Non c'è una conformità generale sulla sistematica dei crostacei ai più alti

livelli di classificazione (come la Classe) (Boxshall, 2007) e di recente, la filogenesi molecolare ha apportato cambiamenti a livello di genere e di famiglia (Inglese et al., 2003; Browne et al., 2007; Hou et al., 2007).

L'identificazione morfologica dei crostacei è molto difficile, in quanto non esistono delle chiavi tassonomiche di identificazione specifiche delle specie mediterranee e in tal senso l'uso del DNA *Barcoding* rappresenta uno strumento necessario per l'identificazione di crostacei sia marini che di acqua dolce (Bucklin et al., 2007;. Costa et al., 2007).

Molti studi condotti finora riguardano lo sviluppo di complete librerie *Barcode* (ad esempio Dincă et al., 2010; Baird et al., 2011; Zhou et al., 2011; Raupach et al., 2014; Rougerie et al., 2014) ed il loro utilizzo per identificare campioni sconosciuti (ad es. Holmes et al., 2009; Strutzenberger et al., 2011; Shen et al., 2013; Knebelsberger et al., 2014) e negli ultimi anni sembrano aver raggiunto un *plateau* di circa 30 pubblicazioni all'anno (Raupach e Radulovici, 2015).

L'ordine dei Decapodi è costituito da circa 15.000 specie racchiusi in 2700 generi, con 3300 specie fossili (De Grave et al., 2009), di cui soltanto il 16,4% possiede una sequenza relativa alla regione COI (DNA *Barcode*).

Rimane quindi una sfida, compilare *database* che descrivano e analizzino la composizione della biodiversità dei Decapodi a scala regionale, al fine di costruire un modello di distribuzione della diversità decapode in tutto il mondo (Matzen da Silva et al. 2011).

Gli Eufasiacei sono crostacei pelagici filtratori, come i Decapodi appartenenti alla classe Malacostraca, essi sono ampiamente

conosciuti come *krill*, sono un'abbondante componente dell'ecosistema pelagico in tutti gli oceani. Il *krill* mostra una considerevole variabilità nello spazio e nel tempo dovuta al suo comportamento gregario pertanto presenta una distribuzione con forte discontinuità come risultato della loro tendenza a formare densi banchi (Mauchline e Fisher,1969). Al fine di discriminare la differenziazione genetica del *krill*, tra le diverse regioni geografiche e i banchi, dovrebbero essere svolte diverse indagini per confrontare le differenze genetiche, tra le aree di distribuzione ed all'interno delle stesse ma anche tra i banchi ed all'interno di ognuno di esso (Jarman et al., 2002).

## 1.2 DNA-Barcoding

Paul Hebert et al., nel 2003, individuano nel gene mitocondriale citocromo ossidasi subunità I (COI) il sistema bioidentificativo utile al riconoscimento tassonomico di tutte le specie animali.

In tutte le cellule eucariotiche, oltre al genoma nucleare è presente anche un genoma mitocondriale, il mtDNA (Fig. 1).

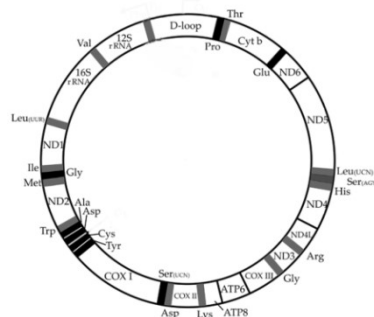


Figura 1: DNA mitocondriale.

Costituito da circa 16000 paia di basi (bp), il genoma mitocondriale è formato da una singola molecola circolare, estremamente compatto, e costituito principalmente da regioni codificanti prive di introni e non separate tra loro da sequenze interposte.

Il mtDNA è più esposto a mutazione rispetto al genoma nucleare a causa del fatto che nel mitocondrio si svolge la fosforilazione ossidativa e quindi esso è esposto ai radicali liberi dell'ossigeno generati durante le reazioni coinvolte nella respirazione cellulare (Avisé, 2000). Il DNA mitocondriale non è in grado di autoripararsi, come invece accade per il DNA nucleare, dal momento che la DNA-polimerasi mitocondriale non possiede l'attività esonucleasica 3'-5'; quindi andando incontro ad un elevato numero di cicli di replicazione, esso ha più probabilità di accumulare errori nei processi di duplicazione, stimata da tre a cinque ordini di grandezza superiore rispetto alla DNA polimerasi nucleare (Cooper et al., 1995). Il genoma mitocondriale, meno esteso di quello nucleare, figura con migliaia di copie di mtDNA e possiede un elevato indice di conservazione, pertanto anche se la mutazione insorge in una singola molecola di mtDNA la probabilità che essa sia fissata è molto elevata in quanto viene selezionata solo una parte delle molecole di mtDNA per la successiva duplicazione (Lightowers et al., 1997). La combinazione tra instabilità del mtDNA e l'elevato indice di conservazione fa sì che il tasso di mutazione nel mtDNA sia circa dieci volte maggiore di quello riscontrabile in sequenze equivalenti del genoma nucleare (Brown et al., 1979). Il differente tasso di mutazione delle varie regioni permette di usare il mtDNA per l'analisi della diversità genetica sia a livello intra che inter-specifico (Procaccini e Maltagliati, 2003).

Grazie alle caratteristiche appena descritte, il mtDNA è di norma utilizzato come *marker* molecolare nel regno animale negli studi di genetica di popolazione, filogeografia e filogenesi ai vari livelli tassonomici (Wilson et al., 1985; Moore, 1995; Avise, 2000).

Gli studi svolti per testare la robustezza del DNA *Barcode* in diversi gruppi animali sia terrestri che marini, distribuiti su scala globale, hanno dimostrato che la regione COI mtDNA, usata per il DNA *Barcode*, identifica il 98% delle specie precedentemente riconosciute grazie alle chiavi di identificazione tassonomiche. Nel restante 2% ricadono i casi in cui si ha a che fare con specie strettamente imparentate, linee di discendenza la cui divergenza è molto recente, o specie che si ibridano regolarmente tra loro (Stoeckle e Hebert, 2008). Grazie al DNA *Barcode*, tale concetto è estendibile a tutto il regno animale (Hebert et al., 2003).

L'obiettivo ultimo del DNA *Barcoding* è quello di allestire un *database* con i codice a barre di tutte le specie di esseri viventi al fine di consentire l'identificazione inequivocabile degli esemplari raccolti.

Affinchè il lavoro venisse svolto in maniera precisa ed accurata e soprattutto coordinata tra i vari gruppi di ricerca che decidessero di cimentarsi in questo ambizioso progetto di “*barcodizzare*” la vita, grazie ad Hanner nel 2009 nasce il *Barcode Data Standard*, con lo scopo di fornire le direttive generali per catalogare i campioni *Barcode* usando il codice che presenta le abbreviazioni di Istituzione, collezione e numero di catalogo, *Darwin Core triplet* (Steinke e Hanner, 2011).

### 1.2.1 Barcode Data Standard

Il *Barcode Data Standard* delinea un insieme minimo di informazioni richiesto per depositare una sequenza nucleotidica "BARCODE" nel *database* GenBank<sup>®</sup>.

La piattaforma digitale BOLD supporta il *Barcode Data Standard* e fornisce campi da compilare per tutti gli elementi necessari a GenBank<sup>®</sup>, come la *Darwin Core triplet*, le sequenze nucleotidiche, le tracce digitali ad esse associate, nonché i *primer* utilizzati per ottenerle.

Di seguito sono riportate le informazioni aggiuntive che si raccomanda di inserire nella piattaforma informatica BOLD (<http://v2.boldsystems.org/docs/handbook.php?page=>):

- campionatori;
- data del campionamento (gg/mm/aa);
- località (latitudine e longitudine);
- altezza / profondità in metri;
- se possibile, attrezzi di raccolta (metodo di campionamento / sforzo), nave (nel campo *Notes*);
- informazioni sull'habitat, microhabitat e associazioni (nel campo *Notes*);
- sesso del campione;
- stadio di vita del campione (adulto, giovanile, larva);
- informazioni complete sull'Istituzione dove gli esemplari sono stati catalogati con ID *voucher*;



- ID *voucher*;
- Nome e qualifica della persona che effettua l'identificazione del campione.

Inoltre sia BOLD che FISH-BOL incoraggiano nella sottomissione di immagini digitali a corredo di tutte le informazioni relative ad un campione; ciò torna utile nell'eliminazione delle identificazioni errate e dovrebbe essere inserito quando possibile, soprattutto per i grandi o piccoli esemplari che non sono facilmente catalogabili morfologicamente. Visto che i colori brillanti della livrea svaniscono rapidamente dopo la morte, le fotografie devono essere prese al più presto dopo il campionamento e prima della fissazione in etanolo, se possibile (Steinke & Hanner, 2011).

Attualmente il miglior modo per preservare le risorse genetiche dei campioni si avvale di un sistema di ridondanza: in condizioni ideali, due campioni di tessuto di buona qualità vanno prelevati da ciascun campione; uno viene congelato per conservare la più ampia gamma di caratteri molecolari possibili e l'altro conservato in un fluido preservante, come l'etanolo, e questo funge da riserva nel momento in cui il primo si degradi o vada smarrito.

I protocolli di laboratorio per il DNA *Barcoding* di solito prevedono semplici metodi di estrazione del DNA, come una digestione con la

proteinasasi K e/o estrazione con il Chelex<sup>®</sup>, soprattutto quando si lavora con di campioni freschi, questi due metodi però spesso forniscono estratti di DNA di scarsa qualità.

Sul mercato sono disponibili anche vari *kit* commerciali, utilizzati con un buon successo, purtroppo però essi hanno un costo elevato e ciò rappresenta un problema nel momento in cui si affrontano analisi su grandi numeri. Le reazioni di PCR per l'amplificazione della regione COI sono allestite con l'utilizzo di *primer* specifici, i prodotti di PCR visualizzati su gel d'agarosio agli U.V., e le bande visualizzate sono isolate e per il sequenziamento (per la descrizione di: estrazione del DNA, amplificazione COI tramite PCR, etc., si rimanda alla sezione "2.Materiali e metodi di seguito riportata").

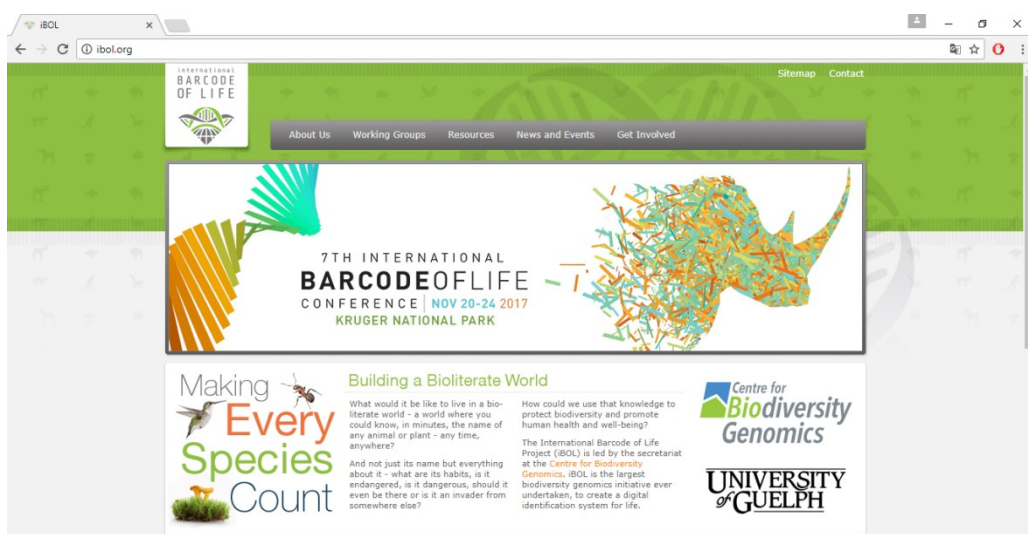
### 1.2.2 *Partner* fondamentali del DNA *Barcoding*

*Partner* fondamentali del DNA *Barcoding* sono (<http://www.barcodeoflife.org/content/partners>):

- *International Barcode of Life project* (iBOL), il più grande consorzio di progetti, laboratori e *networks* (Fig. 2),
- *Barcode of Life Data Systems* (BOLD), la piattaforma globale per l'assemblaggio, l'analisi e la raccolta dei dati *Barcoding* (Fig. 3);

- *Consortium for the Barcode of Life (CBOL)*, l'iniziativa globale per promuovere il *Barcoding* (Fig. 4);
- GenBank<sup>®</sup> (Fig. 5) la banca dati di archiviazione pubblica per *Barcode*;

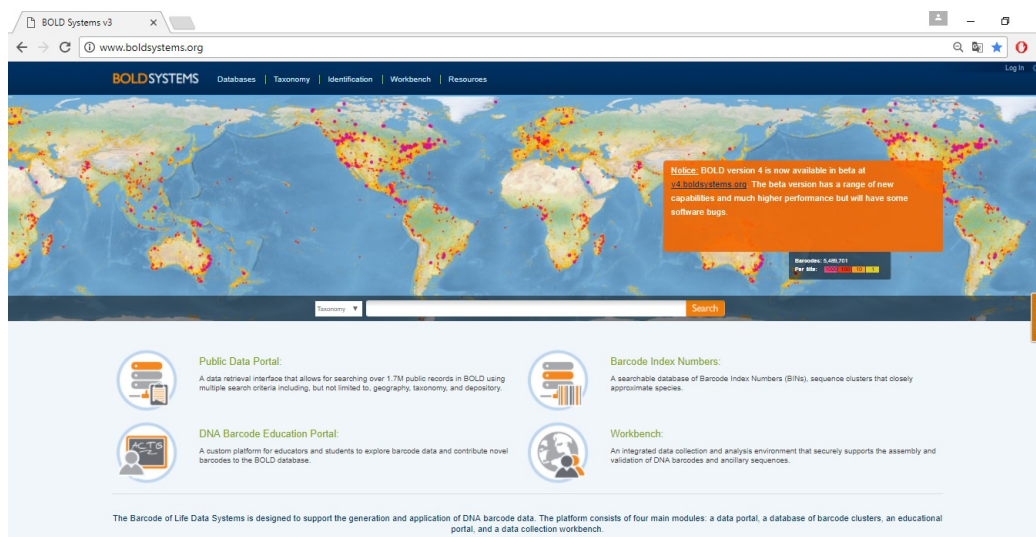
iBOL (<http://ibol.org/>) ha un obiettivo principale: assemblare la libreria di sequenze e fornire la necessaria tecnologia per identificare gli organismi in modo rapido ed economico. Questo obiettivo è raggiunto grazie all'analisi della variabilità delle sequenze relative alla breve e standardizzata regione del gene COI (*DNA Barcode*), ciò consente sia l'identificazione di specie note che la scoperta di nuove. Costruendo un sistema di identificazione basato sulle sequenze digitali del DNA piuttosto che sui caratteri morfologici, il *DNA Barcode* fa sperare in un robusto miglioramento della capacità della comunità scientifica di monitorare e gestire la biodiversità con profondi effetti sociali ed economici.



**Figura 2:** *Homepage* dell' iBOL (<http://ibol.org/>) il cui obiettivo principale è quello di assemblare la libreria di sequenze e fornire la necessaria tecnologia per identificare gli organismi in modo rapido ed economico.

BOLD (<http://www.boldsystems.org/>) è una piattaforma informatica finalizzata all'acquisizione, archiviazione, analisi e pubblicazione delle sequenze DNA *Barcode*.

BOLD è liberamente a disposizione di qualsiasi ricercatore che sia interessato al DNA *Barcode*. Esso fornisce servizi specializzati, supporta nell'assemblaggio delle sequenze che soddisfano i requisiti necessari ad ottenere la designazione *Barcode* nelle banche dati di sequenze globali. Grazie alla fruibilità *online* e alla sicurezza dei dati, BOLD è in grado di sostenere progetti che coinvolgano ampie collaborazioni di ricerca.



**Figura 3:** Homepage del BOLD, piattaforma informatica finalizzata all'acquisizione, archiviazione, analisi e pubblicazione delle sequenze DNA *Barcode*.

Per coordinare gli enormi sforzi necessari a costruire una biblioteca del genere, è stato istituito il *Consortium for the Barcode of life*.

CBOL (<http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-cbol>) è un'iniziativa internazionale dedicata allo sviluppo del DNA *Barcode* come *standard* globale per l'identificazione delle specie biologiche. Fondata nel 2004 con il sostegno della Fondazione

Alfred P. Sloan, CBOL promuove il *Barcoding* attraverso gruppi di lavoro, *network*, *workshop*, conferenze, *stage* e formazione. CBOL dispone di 200 Organizzazioni Membri provenienti da 50 Paesi e opera presso un ufficio di Segreteria situato nel Museo Nazionale di Storia Naturale dell'Istituto Smithsonian a Washington, DC.



**Figura 4:** Logo del *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL), l'iniziativa globale nata nel 2004 per promuovere il DNA *Barcoding*.

GenBank<sup>®</sup> (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) è il *database* disponibile *online* in cui sono archiviate tutte le sequenze di DNA pubblicamente disponibili. GenBank<sup>®</sup> fa parte dell'*International Nucleotide Sequence Database Collaboration* che comprende il DNA *DataBank* del Giappone (DDBJ), l'*European Nucleotide Archive* (ENA) e GenBank<sup>®</sup> del *National Center for Biotechnology* (NCBI) in U.S.A.

Queste tre organizzazioni scambiano i dati giornalmente.

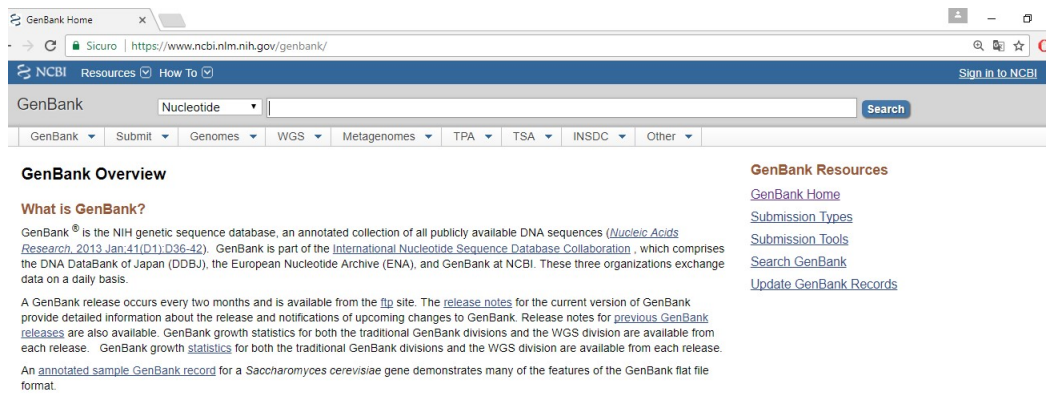


Figura 5: Homepage del GenBank® il database disponibile online in cui sono archiviate tutte le sequenze di DNA pubblicamente disponibili.

### 1.2.3 FISH-BOL

Il *Fish Barcode Of Life initiative*, FISH-BOL, (Fig. 6) è uno sforzo globale nato con lo scopo di assemblare una biblioteca di sequenze di riferimento *standardizzate* per tutte le specie di pesci, a partire da esemplari con affidabile identificazione tassonomica (Ward et al., 2009).

I vantaggi di ottenere sequenze *Barcode* dai pesci includono facilitare l'identificazione delle specie per tutti i potenziali utenti, compresi i tassonomi; attenzionare i campioni che rappresentano varietà di specie conosciute; scoprire nuove specie; e, forse l'obiettivo più importante, è quello di consentire l'identificazione delle specie nel momento in cui i metodi di riconoscimento tradizionali, basati sull'utilizzo dei caratteri morfologici, non sono applicabili. Il lavoro principale della campagna FISH-BOL è di coordinare su scala globale i gruppi di ricerca che hanno la responsabilità di supervisionare le collezioni, le identificazioni e il *Barcoding* delle fauna ittica nella loro regione.

La campagna FISH-BOL ha adottato il FishBase ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org); Froese e Pauly, 2010) come attuale guida tassonomica su scala globale.

FISH-BOL utilizza il BOLD come piattaforma digitale per la coordinazione dei singoli progetti (Ratnasingham e Hebert, 2007). Al fine di aiutare le attività tassonomiche e facilitare la collaborazione, BOLD offre un *browser* tassonomico pubblicamente disponibile ([http://www.colbank.uoguelph.ca/views/taxbrowser\\_root.php](http://www.colbank.uoguelph.ca/views/taxbrowser_root.php)).

Visto che lo scopo del FISH-BOL è quello di fornire sequenze nucleotidiche referenziate a partire da campioni etichettati (*ID-voucher*) identificati da esperti, la catalogazione dei campioni deve sempre essere accompagnata da una documentazione approfondita completa ed approfondita.

Le moderne iniziative bioinformatiche sono in grado di collegare i dati di raccolta, di tessuti e campioni, con citazioni bibliografiche, informazioni di riferimento geospaziale e dati di sequenze nucleotidiche. FishBOL è legato al *Barcode Data Standard* (Hanner, 2009), che si prefigge di catalogare i campioni *Barcode* usando il codice suggerito da Steinke e Hanner (2011).



**Figura 6:** *Homepage* del FISHBOL , il suo scopo è quello di assemblare una biblioteca di sequenze di riferimento *standardizzate* per tutte le specie di pesci

### 1.3 DNA *Barcoding* e frodi alimentari

L'errata etichettatura dei prodotti alimentari e le sostituzioni di ingredienti rappresentano problematiche emergenti in materia di qualità nutrizionale e sicurezza alimentare (Cawthorn et al., 2013; Everstine et al., 2013; Wong e Hanner, 2008).

Il pesce e i suoi derivati costituiscono una delle principali categorie alimentari associata a frodi alimentari (Johnson, 2014), per cui si può sostenere che i prodotti ittici presentano un notevole tasso di errori nell'etichettatura.

Molte specie ittiche presentano consistenza simile, così la certificazione di prodotti ittici è particolarmente importante quando i pesci hanno subito procedure che influenzano la struttura anatomica generale, come decapitazione, affettatura o sfilettatura (Marko et al., 2004). L'assenza di tratti morfologici, di solito utilizzate per



identificare le specie animali, non rendono possibile il tradizionale riconoscimento tassonomico, per cui sono necessari metodi di identificazione molecolari. Tra questi, per l'autenticazione del cibo, sono frequentemente impiegati i metodi basati sul DNA (Lockley e Bardsley, 2000).

Tra tutte le metodiche molecolari il DNA *Barcoding* è quella che meglio si presta per valutare l'identità reale e/o di provenienza dei prodotti commercializzati, così come per smascherare carenze di etichettatura e fraudolente sostituzioni, difficili da rilevare soprattutto nel pesce trasformato (Barbuto et al., 2010; Galimberti et al., 2013; Filonzi et al., 2010).

Il DNA *Barcoding* si è dimostrato particolarmente efficace per la tracciabilità dei frutti di mare (Becker et al., 2011).

Tra essi rientrano pesci, molluschi, crostacei ed echinodermi, che sono disponibili sul mercato come organismi interi o come prodotti trasformati.

L'aumento della richiesta di frutti di mare e la globalizzazione del mercato, ha reso il controllo delle vie commerciali e dell'industria di trasformazione (cioè sistemi di stoccaggio, congelamento, asciugatura) più difficili. Sul mercato, poi, sono state introdotte diverse nuove specie. Talvolta questi "nuovi pesci" hanno lo stesso nome commerciale di organismi precedentemente presenti sul mercato, ma non corrispondono alla stessa specie; potrebbero anche avere diversi valori nutrizionali e/o essere potenziali antigeni (Barbuto et al., 2010).

Il DNA *Barcoding* ha successo quando viene utilizzato per i frutti di mare perché:

(1) rispetto ad altre fonti animali (ad esempio bovini, pecore, caprini, cavallo) il numero di specie è più alto, in modo che l'efficacia di questa tecnica risulta migliorata; (2) approcci di identificazione classica non sono utili in molti casi, soprattutto quando si ha a che fare con i prodotti trasformati; (3) nei frutti di mare, più che in altri gruppi di esseri viventi, l'identificazione molecolare può andare oltre il livello delle specie, consentendo in molti casi la identificazione delle varietà locali e quindi identificazione dell'origine di un certo prodotto Becker et al., 2011.

Molti ricercatori hanno discusso il potenziale del DNA *Barcoding* come strumento legale per la tracciabilità dei pesci commestibili (Barbuto et al., 2010; Smith et al., 2008; Yancy et al., 2008). La regione COI, utilizza dal DNA *Barcoding*, ha mostrato un buon potere discriminatorio nell'identificazione delle specie ittiche (il 98% delle specie marine ed il 93% delle specie d'acqua dolce testate, sono state identificate con successo (Ward et al., 2009). I risultati di successo, sono stati ottenuti partendo da una piccola porzione di materiale fresco o lavorato utilizzando poche combinazioni di *primer* universali (vedi Steinke e Hanner, 2011).

Visto che la richiesta di questo tipo di analisi dovrebbe aumentare nei prossimi anni, sono auspicabili, protocolli di estrazione del DNA affidabili, rapidi ed a basso costo (Ming et al., 2010).

Le analisi del DNA su prodotti ittici elaborati potrebbero essere difficoltose per la degradazione del DNA dovuta ai processi di trasformazione (affumicatura, cottura, salagione), che causano danni chimici e/o degradazione del DNA (Bauer et al., 2003). Inoltre, la presenza di inibitori della PCR durante l'estrazione del DNA potrebbe compromettere le successive analisi. Solitamente, sono impiegati

protocolli che prevedono fasi di incubazione lunghi, con proteinasi K, detergenti, prodotti chimici caotropici, resine ed estrazioni organiche (Smith et al., 2008) per migliorare la qualità del DNA da campioni alimentari. Però tutto ciò può comportare basse rese di DNA amplificabile dai prodotti alimentari. Inoltre sono state proposte procedure più brevi (Li et al., 2013; Yue e Orban, 2001) per una rapida estrazione del DNA dai tessuti dei pesci (muscolo, pinne, scaglie o sangue) per diverse applicazioni basate sulla PCR. Tutti questi protocolli richiedono la purificazione del DNA, in quanto il trasporto di alcune sostanze chimiche impiegate nei primi passaggi possono causare una inibizione della PCR (Weyant et al., 1990). Sul mercato sono disponibili parecchie opzioni commerciali per l'estrazione del DNA da campioni freschi; tuttavia, il loro utilizzo aumenterebbe drammaticamente il costo dei progetti di caratterizzazione e genotipizzazione.

La maggior parte delle analisi condotte attraverso DNA *Barcoding* riguarda la determinazione di campioni sia di esemplari adulti che larve (soprattutto ai fini della genetica di popolazione). Spesso tali campioni non possono essere analizzati subito dopo il recupero, tanto che in genere sono conservati in frigorifero o congelati, ad eccezione per le larve, che vengono fissate in etanolo (Cuttitta et al, 2015; Hubert et al., 2010 ). Diversi studi hanno inoltre riportato l'uso della tecnologia DNA *barcoding* per l'analisi delle interazioni preda-predatore e nello specifico l'identificazione delle prede consumate (Durbin, et al., 2012; Riemann et al, 2010; Winnepeninckx, et al., 1993). In questo contesto, i contenuti stomacali contenenti componenti digerite o residui, come squame, pelle, sangue o ossa di prede ingerite possono essere sottoposti ad estrazione del DNA.

In questo scenario, durante il mio lavoro di dottorato ho contribuito allo sviluppo di un veloce metodo di estrazione del DNA per l'identificazione di prodotti ittici e frutti di mare (Tagliavia et al. 2016) a basso costo ed alla realizzazione del “*FishProfiler DNA Kit*” per garantire la tracciabilità molecolare di alcune specie ittiche, crostacei e molluschi su cui verte l'economia locale.

### **1.3.1 Sviluppo di un veloce metodo di estrazione del DNA per l' identificazione di prodotti ittici e specie marine**

Nell'ambito della mia tesi, ho contribuito a sviluppare insieme a Tagliavia et al. (2016) un protocollo di estrazione del DNA per l'identificazione di prodotti ittici e specie marine; questo protocollo è la rielaborazione di un protocollo già esistente (Rudbeck e Dissing, 1998) proposto per la lisi delle cellule del sangue, tamponi buccali e campioni simili. Nell'ambito del lavoro della mia tesi di dottorato esso è stato messo a punto per consentire la dissoluzione efficace di qualsiasi esemplare giovane o adulto, così come tessuti freschi che conservati in etanolo o prodotti ittici, riducendo al minimo qualsiasi effetto inibitorio per la PCR. In questo modo, sono state realizzate una efficace e robusta amplificazione PCR ed il sequenziamento del DNA in un tempo più breve e con costi ridottissimi.

Un sistema in grado di effettuare una lisi tissutale completa e, quindi, un efficiente rilascio di DNA è essenziale per ottenere robuste ed affidabili analisi PCR. Inoltre, l'assenza di composti potenzialmente inibitori nel *buffer* così come la possibilità di utilizzare quantità variabili di lisato grezzo senza compromettere la PCR, sono basilari. Il trattamento alcalino è stato utilizzato con successo per ottenere sia la

lisi cellulare (Rudbeck & Dissing, 1998) che per inattivare gli inibitori della PCR (Bourke, Scherczinger, Ladd, e Lee, 1999), ciò rende il metodo di lisi di elezione quando si devono processare un gran numero di campioni per analisi di *routine*. Infatti, tale sistema permette la lisi veloce, la denaturazione proteica (comprese le nucleasi, rendendo i campioni abbastanza stabili anche dopo neutralizzazione), l'idrolisi dell'RNA e la rimozione di alcuni inibitori della PCR. Dati precedenti hanno riportato l'uso di NaOH per il trattamento alcalino, questo metodo porta alla generazione di NaCl dopo la neutralizzazione. Il NaCl esercita un effetto concentrazione-dipendente inibitorio nella reazione di PCR, che può causare il fallimento dell'amplificazione di alcune sequenze. Di contro, il KCl è ben noto per coadiuvare l'attività della DNA Taq polimerasi su larga scala, tanto è vero che esso è comunemente incluso come componente della maggior parte dei *buffer* per le reazioni di PCR. Solo il suo eccesso (concentrazioni superiori a 75 mM) è indicato (da alcuni produttori di DNA polimerasi termostabile) provocare una certa inibizione nella *performance* della PCR. Questo ci ha spinto a modificare il metodo basato sull'utilizzo del NaOH, sostituendo NaOH con la base altrettanto forte KOH, che viene convertito in KCl dopo la neutralizzazione. Inoltre, abbiamo incluso nella soluzione del Triton X-100, un detergente non ionico relativamente mite spesso presente in diversi PCR-*buffer*, la cui concentrazione nella soluzione di lisi è sufficiente a migliorare la lisi dei tessuti. Così, la soluzione di lisi si trasforma, dopo neutralizzazione con Tris-HCl, in un tampone contenente Tris-HCl, KCl e Triton X-100, tutte componenti comunemente inclusi nella maggior parte dei PCR-*buffer*. In questo modo, quantità variabili di lisato grezzo sono ben tollerate, senza alcun effetto inibitorio sulla DNA polimerasi, garantendo una robusta

amplificazione. È risaputo che l'EDTA è una componente in grado di inibire la PCR e questa è presente nella soluzione di lisi. Tuttavia, una concentrazione bassa pari a circa 36  $\mu\text{M}$  viene raggiunta nella miscela di reazione PCR quando il lisato grezzo rappresenta circa il 20% del volume di reazione PCR, apportando un effetto inibitorio completamente diverso. Ad oggi, non sono stati osservati né è stato necessario regolare la quantità di  $\text{Mg}^{++}$  neanche quando è stato utilizzato un volume maggiore di lisato come DNA stampo.

### 1.3.2 *FishProfiler* DNA kit

Al fine di conferire ad alle specie ittiche del mercato locale un valore commerciale maggiore garantendone la tracciabilità molecolare, usufruendo dei risultati ottenuti nello sviluppo del metodo di estrazione rapida, è stato allestito il *FishProfiler* DNA Kit. Il kit è stato ideato a supporto delle piccole e medie imprese della pesca che vogliono certificare la tracciabilità molecolare e l'autenticità del prodotto commercializzato auspicando un incremento del guadagno economico alle stesse garantito dalla certificazione della risorsa alieutica commercializzata. A tal fine, sono state selezionate tra tutte le specie commercializzate, 10 specie di elevato interesse economico; 5 specie ittiche, 3 molluschi e 2 crostacei. Le specie selezionate tra quelle ritenute di maggiore impatto economico sono risultate le seguenti:

- orata (*Sparus aurata*, 1782),
- pesce spada (*Xiphias gladius*, Linnaeus 1758 ),
- sardina (*Sardina pilchardus*, Walbaum 1792),

- sgombro (*Scomber scombrus*, Linnaeus 1758),
- spigola (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758),
- aragosta (*Palinurus elephas*, Fabricius, 1787),
- gambero rosso (*Aristaeomorpha foliacea*; Risso 1827).
- calamaro (*Loligo vulgaris*, Lamarck, 1798),
- seppia (*Sepia officinalis*, Linnaeus 1758),
- totano (*Todarodes sagittatus*, Lamarck, 1798),

## 2. Materiali e metodi

### 2.1 Campionamento

I campioni oggetto di studio della mia tesi provengono dal Canale di Sicilia (GSA FAO 16) e sono stati raccolti negli anni 2015 e 2016. In particolare essi provengono dalle campagne scientifiche MEDITS e CAMPBIOL 2015 (IAMC CNR UOS di Mazara del Vallo) e dalla campagna oceanografica BANSIC 2016 (IAMC CNR S.S. di Capo Granitola). Il reperimento dei campioni è stato condotto tramite la mia partecipazione attiva alle campagne o il *sorting* in laboratorio dello scarto delle specie bersaglio pescate durante le stesse.

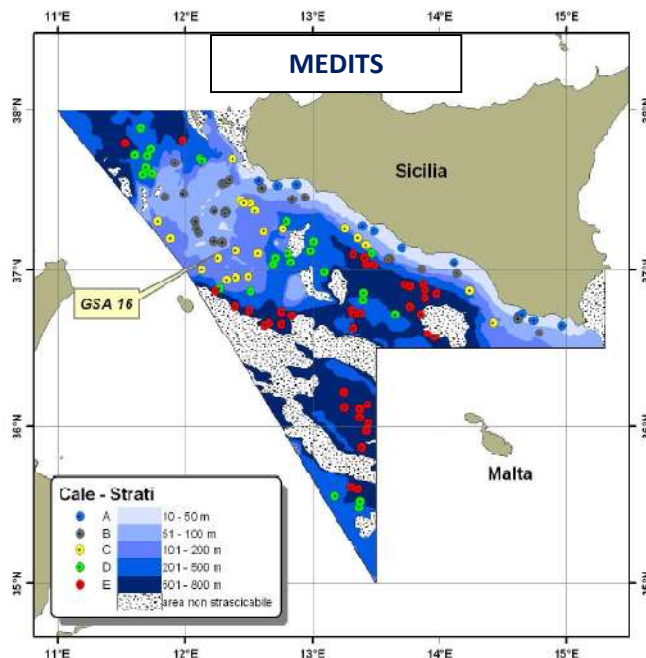
Il campioni prelevati durante le pescate scientifiche nell'ambito delle campagne oceanografiche MEDITS e CAMPBIOL sono stati congelati a bordo per cala, e analizzati nei mesi successivi presso i locali dell'IAMC CNR S.S. di Mazara del Vallo.

I campioni di crostacei provenienti dalla campagna oceanografica BANSIC 2016, sono stati prelevati attraverso il BONGO 40 inglobati all'interno di un eterogeneo campione di zooplacton e conservati in alcol al 70%, per poi essere separati dal resto del campione di zooplacton mediante *sorting* al microscopio ottico binoculare.



## 2.1.1 Campagne di raccolta dati

La campagna scientifica **Medits**, condotta tra i mesi di Giugno-Luglio del 2015 (nell'ambito della Sezione G del Programma Nazionale Italiano per la Raccolta dei Dati Alieutici, Reg. Ce. N°199/2008; N°665/2008 e decisione della commissione N°949/2008), ha avuto l'obiettivo generale di valutare la distribuzione, l'abbondanza e la composizione per taglia delle specie oggetto di pesca presenti nei mari Italiani. La campagna ha interessato lo Stretto di Sicilia nell'area FAO GSA 16, (sub-area geografica compresa tra le coste meridionali siciliane ed approssimativamente la linea di "mezzeria" con Tunisia e Malta Fig.: 7), per un'area complessiva di 31386 km<sup>2</sup>, ed è stata utilizzata la rete *standard* MEDITS GOC 73 (Anon., 2007).



**Figura 7:** Area di studio Medits nello stretto di Sicilia (GSA16), sono riportate le posizioni delle cale valide.

**La Campagna annuale di raccolta dati CAMBIOL 2015** ( rivolta al campionamento biologico delle catture/sbarcati commerciali, sezione C – Relative al mestiere ed E – Relative agli *stock*, nell’ambito del Programma Nazionale per la Raccolta Dati Alieutici -PNDA- Reg. Ce. N°199/2008; N°665/2008 e decisione della commissione N°949/2008) ha avuto l’obiettivo di valutare la composizione in taglia e/o età del pescato ed ottenere altre informazioni sulla biologia delle specie bersaglio, quali la relazione età/lunghezza, la relazione lunghezza/peso, i parametri di crescita, la composizione in sesso e le condizioni di maturità sessuale nell’area di studio Sub-area Geografica GSA16 – Stretto di Sicilia.

La campagna scientifica Medits e la campagna annuale di raccolta dati CAMBIOL 2015 mi hanno permesso di raccogliere i campioni di pesci ossei e crostacei del macrozoobenthos e macrozooplankton.

**La campagna oceanografica BANSIC 2016**, è stata condotta dal 30/06/2016 al 14/07/2016 nell’ambito delle attività previste dal WP3 del progetto SSD-Pesca, finanziato dal MIUR su fondi MISE, a supporto della pesca italiana nelle Regioni Obiettivo 1, e del progetto bandiera RITMARE (SP2\_WP1\_AZ1\_UO01 e UO04). La campagna oceanografica è stata svolta a bordo della N/O Minerva UNO di proprietà della So.Pro.Mar. Spa e noleggiata annualmente dall’IAMC-CNR S.S. di Capo Granitola. Obiettivi generali della campagna sono stati lo studio delle relazioni tra le strutture oceanografiche a mesoscala (vortici verticali ed orizzontali, *upwelling*, ecc.) e le strutture spaziali dei fenomeni biologici relativi ai primi anelli della catena trofica, queste misure interdisciplinari sono state condotte sulla

piattaforma continentale lungo la costa meridionale della Sicilia, da Mazara del Vallo a oltre Capo Passero (Fig.: 8).

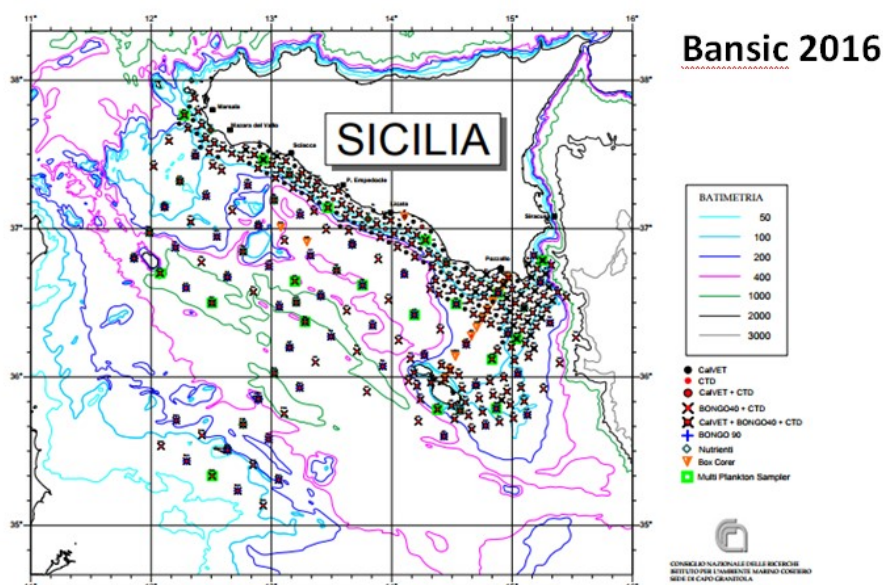


Figura 8: Posizioni delle stazioni e operazioni effettuate nel corso della campagna BANSIC 2016

Durante questa campagna lo *zooplancton* è stato campionato attraverso lo strumento Bongo 40, esso è composto da due cilindri chiamati “bocche” in acciaio *inox*, di diametro 40 cm ciascuna, tenute insieme e parallele tra loro da un “ponte” cilindrico *inox*. In ognuna delle bocche (bocca 1 e bocca 2) è montato un retino conico lungo circa 2,5 m con maglia da 200  $\mu$ . All’estremità inferiore di questo retino è inserito un cilindro in *plexiglass* chiamato “bicchiere” che serve da supporto per il montaggio di un piccolo spezzone di maglia sempre da 200  $\mu$  nel quale si raccoglie il campione di plancton (Fig. 9). Nella parte centrale di ogni bocca è montato un “flussimetro” della General Oceanics che serve a misurare il volume d’acqua filtrato. Il “depressore” è una grossa deriva idrodinamica in acciaio *inox* dal peso di circa 25 kg; è fissata sotto l’insieme delle bocche/retini per mezzo di una catena da 1 m e serve a stabilizzare il movimento dell’intero strumento durante il campionamento e a conferirgli la giusta spinta

verso il basso affinché lo stesso possa agevolmente raggiungere la profondità desiderata (Fig. 10).



**Figura 9:** Bongo 40 (nel cerchietto rosso il "bicchiere")



**Figura 10:** Depressore

La struttura così composta è stata trainata dal lato dritto della nave a una velocità di 2 nodi e velocità di discesa pari a 0,75 m/s e di risalita a 0,33 m/s. Le cale Bongo 40 sono oblique e vengono effettuate dai 100 m di profondità alla superficie. Il cavo in acciaio che sostiene tutta la struttura deve mantenere sempre un angolo ideale con la superficie del mare di 45°. Rispettando tale angolo, che viene misurato ad ogni 20 m di cavo rilasciato e con l'utilizzo di un goniometro, è possibile calcolare con buona approssimazione la profondità a cui arriverà lo strumento. E' stata cura dell'operatore regolare momento per momento la lunghezza del cavo rilasciato in base alla profondità desiderata anche per evitare la prossimità o il contatto col fondo. Al termine della discesa sono stati rispettati 30 secondi di tempo di "stabilizzazione" che servono allo strumento per mettersi nella giusta posizione e alla giusta profondità. I campioni così prelevati sono stati conservati a bordo, in alcool al 98%, per preservare i tessuti per le successive analisi genetiche.

I campioni utilizzati per la messa a punto del metodo veloce di estrazione del DNA per l' identificazione di prodotti ittici e specie marine e per la realizzazione del *FishProfiler* DNA kit hanno avuto provenienze differenti. In particolare ho lavorato su esemplari di *Engraulis encrasicolus*, allo stadio larvale, raccolti durante la campagna oceanografica condotta dalla nave di ricerca Urania del CNR (2015) e conservati in etanolo assoluto a temperatura ambiente. Gli individui adulti di *Xiphias gladius* sono stati reperiti nelle pescherie locali, conservati a -20° C o analizzati immediatamente dopo la raccolta. I campioni di *Xiphias gladius* affumicato, *Salmo salar* e *Thunnus albacares* così come *Thunnus albacares* ed *Engraulis encrasicolus* sott'olio provengono dal mercato locale. Allo stesso modo, i campioni di molluschi come *Loligo vulgaris* e *Sepia officinalis* e crostacei come *Palinurus elephas*, *Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris* e *Nephrops norvegicus* provengono dal mercato locale, così *Sparus aurata*, *Sardina pilchardus*, *Scomber scombrus*, *Dicentrarchus labrax*, *Palinurus elephas*, *Aristaeomorpha foliacea*, *Loligo vulgaris*, *Sepia officinalis*, *Todarodes sagittatus*.

## 2.2. Analisi genetiche

L' amplificazione del DNA, per condurre le analisi genetiche prevede tre passaggi: 1) una fase pre-PCR, in cui ho effettuato la preparazione del campione, l'estrazione del DNA e l'inizio della reazione di amplificazione; 2) la reazione di amplificazione PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sul DNA totale per amplificare il frammento relativo alla regione COI (*Barcode*); e 3) la post-PCR, con la verifica dei prodotti di amplificazione su gel d'agarosio.

La fase pre-PCR si è articolata nello scongelamento dei campioni e nel *sorting* dei campioni di pesci ossei e crostacei provenienti dalle campagne scientifiche Medits 2015 e CAMBIOL 2015. Nella fase di smistamento del campione ho scelto di includere nel mio studio tutti i crostacei rilevati; dei pesci ossei invece ho scelto di inserire soltanto quelli che non ho in passato processato durante il mio lavoro di tesi specialistica (Tutor: Prof. M. Arculeo, Co-tutor S. Lo Brutto), condotto presso l'Università degli Studi di Palermo che ha contribuito alla pubblicazione dell'articolo "*DNA Barcoding for Species Assignment: The Case of Mediterranean Marine Fishes*" (Landi et al., 2014) nello specifico avevo definito il *Barcode* delle specie ittiche commerciali e di scarto mediterranee provenienti dal canale di Sicilia e dallo stretto di Messina.

Tutti i campioni di crostacei e pesci ossei provenienti dalle campagne scientifiche Medits 2015 e CAMBIOL 2015, sono stati insigniti di ID *voucher* e archiviati secondo protocollo *Barcode Data Standard*; da essi l'estrazione dell'acido nucleico è stata condotta mediante *QUIAquick DNeasy tissue and blood extraction kit* (Quiagen<sup>®</sup>); tale *kit* prevede l'utilizzo di colonnine dotate di una membrana al gel di silice ad alta affinità per il DNA, grazie alla quale è possibile estrarre

efficientemente l'acido nucleico (DNA totale) dal tessuto, senza estrazioni organiche o precipitati di etanolo. Il *kit* è dotato di un sistema di *buffer* che consentono la lisi cellulare ed il legame selettivo del DNA alla membrana. L'estrazione del DNA totale da tessuto è stata condotta seguendo il protocollo, fornito a supporto del *kit*. Una quantità di tessuto di circa 35 mg è stata allocata in una colonnina e ricoperta da 20 µl di Proteinasi K, la colonnina così allestita è stata alloggiata su un agitatore meccanico termostato alla temperatura di 37° C, fino a che tutto il tessuto non apparisse digerito. Il tessuto lisato ha subito successivi lavaggi con differenti *buffer*; infine il DNA è stato sospeso in una soluzione di acqua distillata sterile e conservato a -20° C per essere utilizzato per le successive analisi genetiche.

Per quanto riguarda i campioni di crostacei prelevati durante la campagna oceanografica BANSIC 2016 attraverso il BONGO 40 e conservati in alcol al 70% insieme a tutto lo zooplancton, sono stati separati dal resto del campione mediante osservazione al microscopio ottico binoculare. Ogni campione di crostaceo, con dimensioni approssimative inferiore ad 1 mg, è stato prelevato con l'ausilio di ago e/o pipetta Pasteur, posto in provetta da 1,5 ml, facendo attenzione a rimuovere l'alcol trasportato nel trasferimento in provetta, in quanto avrebbe potuto interferire con le successive analisi genetiche. Ogni campione è stato reidratato in acqua bidistillata per 5 minuti prima di procedere all'estrazione del DNA totale utilizzando il metodo di estrazione semplice e veloce per l'estrazione del DNA descritto in Tagliavia et al (2016), messo a punto e testato in questo studio, per l'identificazione dei prodotti ittici trasformati industrialmente e non (vedi dettaglio paragrafo successivo 2.3).

Portata a termine la fase pre-PCR, si è proceduto all'amplificazione della regione COI utilizzando per i pesci ossei la coppia di *primer* FishF1 e FishR1 (Ward et al., 2005); nei campioni di crostacei invece la regione COI è stata amplificata, utilizzando la coppia di *primer* LCOI490 e HCO2198 (Folmer et al., 1994).

Le sequenze nucleotidiche delle due coppie di *primer* sono riportate di seguito (Tab. I) :

**Tabella I:** Elenco dei *primer* utilizzati per l'amplificazione della regione COI mediante PCR, nei pesci e nei crostacei.

	<i>Primer</i>	Sequenza oligonucleotidica (5'-3')	Autori
Pesci	FishF1 FishR1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCACA <sup>a</sup> TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA <sup>b</sup>	Ward et al., 2005
Crostacei	LCOI490 HCO2198	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG <sup>a</sup> TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA <sup>b</sup>	Folmer et al. 1994

<sup>a</sup>Forward primer <sup>b</sup>Reverse primer

La miscela per la reazione di PCR è stata allestita in 25 µl, utilizzando 1 µl di DNA, 0,3 µl di *Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific)* in tamponelx, 0,2 mM dNTP (Euroclone), 0,5µM di ogni *primer* (nei campioni di pesci FishF1 e FishR1, Ward et al., 2005; nei campioni di crostacei LCOI490 e HCO2198, Folmer et al. 1994 ), acqua distillata fino a raggiungere il volume di 25 µl.

L'amplificazione è stata condotta mediante Perkin-Elmer<sup>®</sup> PCR *termocycler*.

Il profilo di reazione PCR utilizzato per i campioni analizzati sono descritti nella tabelle (II e III) riportata di seguito:



**Tabella II:**

Profilo di reazione PCR per i Pesci

<i>Denaturazione iniziale</i> 98° C per 15 secondi
40 cicli del seguente profilo 98° C per 10 secondi 55 ° C per 10 secondi 72 ° C per 15 secondi
<i>Estensione finale</i> 72C° per 1 minuto

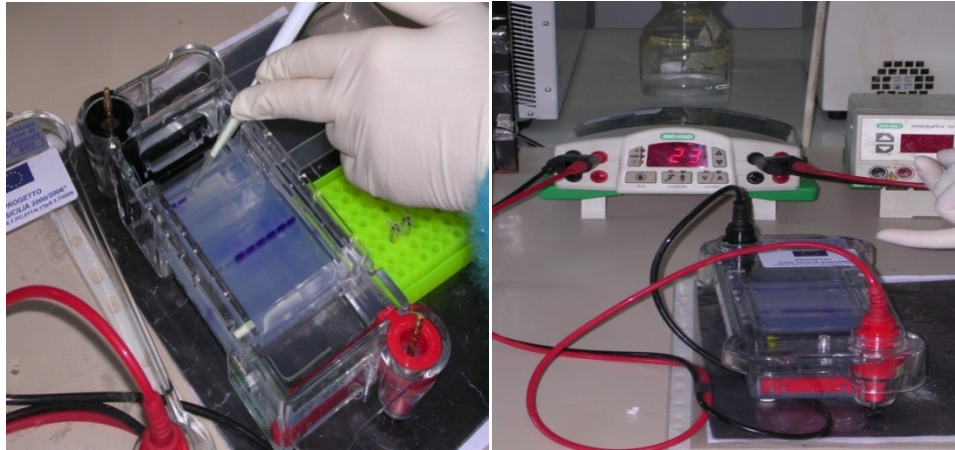
**Tabella III:**

Profilo di reazione per i Crostacei

<i>Denaturazione iniziale</i> 98° C per 15 secondi
40 cicli del seguente profilo 98° C per 10 secondi 45 ° C per 10 secondi 72 ° C per 15 secondi
<i>Estensione finale</i> 72C° per 1 minuto

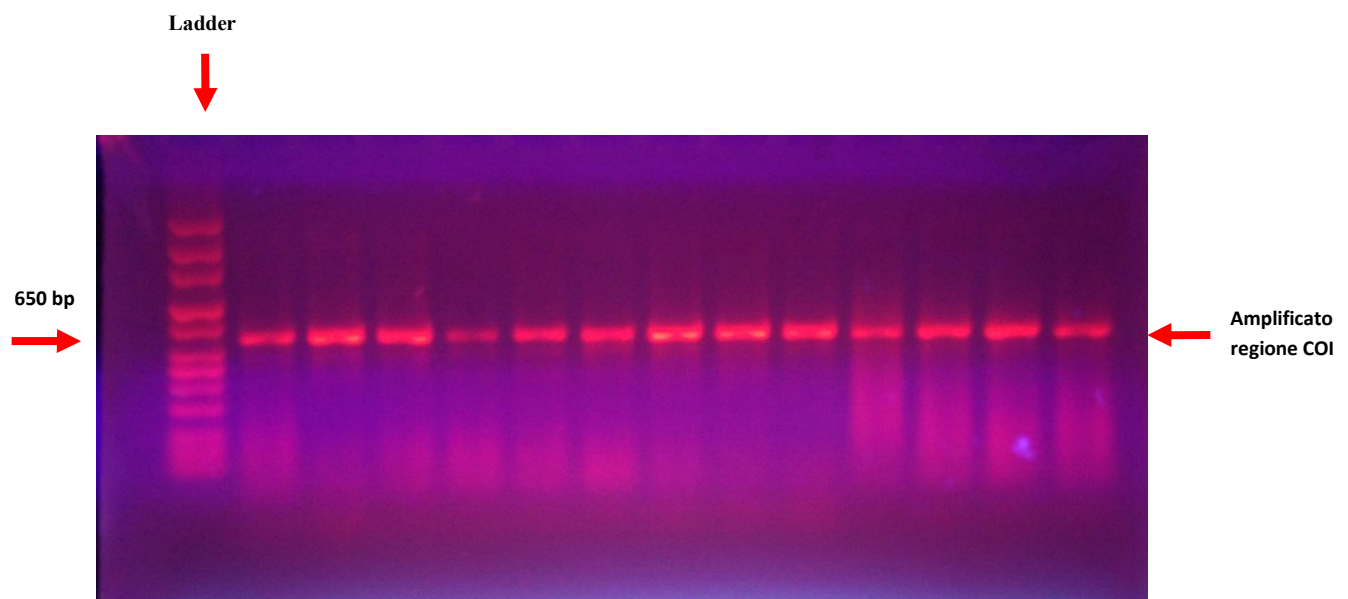
I prodotti di PCR sono stati verificati attraverso corsa elettroforetica con un opportuno *ladder* di riferimento 100 bp DNA *Ladder* Invitrogen<sup>TM</sup> (ovvero il campione di frammenti di DNA di peso molecolare noto) su gel d'agarosio al 1,2% preparato ponendo 0,6 grammi di agarosio in 50 ml di una soluzione TAE 1x a cui è stato aggiunto 1 µl di GelRed<sup>TM</sup> della Biotium.

La corsa elettroforetica effettuata con le normali apparecchiature disponibili allo scopo (Fig.11), è stata condotta a 50 volts per 1 ora e 30 minuti.



**Figura 11:** A sinistra: caricamento dei campioni di prodotto di PCR nei pozzetti del gel d'agarosio; a destra: corsa elettroforetica.

Una volta terminata la corsa elettroforetica, il gel è stato osservato al transilluminatore a raggi UV. Le bande, relative alla regione della COI amplificata mediante PCR dopo corsa elettroforetica, hanno rivelato una dimensione pari a circa 650 bp (Fig. 12).



**Figura 12:** Fotografia del gel d'agarosio (2 %) osservato al transilluminatore UV relativa alla regione COI. In tutti i campioni caricati, in seguito a corsa elettroforetica si è evidenziata una banda netta di circa 650 bp.

Le bande relative alla regione COI amplificata, sono state tagliate dal gel con l'ausilio di un bisturi e delle pinzette; il prodotto di PCR è stato purificato mediante *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen); il DNA estratto dalla banda è risospeso in acqua sterile ed una aliquota di esso è stato allestito per essere inviato al servizio di sequenziamento automatizzato affidato alla MACROGEN<sup>®</sup> in Olanda.

### 2.3 Messa a punto del metodo veloce di estrazione del DNA per l' identificazione di prodotti ittici e specie marine

Come esposto in Tagliavia et al., 2016, frammenti di tessuto di circa 2-20 mg da ogni singolo campione, o singole scaglie sono stati incubati in 100  $\mu$ l di soluzione di lisi (200 mM KOH, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0,2% TritonX-100) a 60° C per 15 minuti o fin tanto che tutto il campione fosse dissolto. Una volta che ogni singolo campione si è completamente dissolto, dopo averlo mescolato, sono stati aggiunti 3 volumi di Tris-HCl 100 mM ed il campione posto in agitatore per alcuni secondi. L'utilizzo di una temperatura di incubazione più elevata (fino a 85 C°) ha permesso una migliore lisi dei campioni più difficili da digerire, come le scaglie. Le larve fissate in etanolo sono state reidratate in H<sub>2</sub>O bidistillata per 5 minuti a temperatura ambiente prima di procedere alla lisi.

L'omogeneizzazione dei campioni di muscolo, con un puntale o un micro-pestello permette di ridurre il tempo di incubazione di almeno 2-5 minuti, mentre la lisi delle cellule del sangue avviene in pochi secondi. 1-5  $\mu$ l di lisato grezzo neutralizzato è stato utilizzato come stampo per la reazione di amplificazione per la regione COI mediante PCR. Le reazioni sono state allestite in un volume totale di 25  $\mu$ l utilizzando 0,3  $\mu$ l di *Phire Hot Start II DNA Polymerase* (*Thermo Scientific*) in tampone 1x, 0,2 mM dNTP (Euroclone), BSA (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l; New England Biolabs), 0,5  $\mu$ M di ogni *primer* (nei campioni di pesci FishF1 e FishR1, Ward et al., 2005; nei campioni di crostacei LCOI490 e HCO2198, Folmer et al., 1994 ); Le condizioni di PCR sono state le seguenti: per i pesci (muscolo, scaglie e pelle) 98° C per 15 s, seguiti da 40 cicli di denaturazione a 98° C per 10 s, 55° C per 10 s, 72° C per 15 s, e 1 min di estensione finale a 72°C e per i

crostacei 98° C per 15 s, seguita da 40 cicli di denaturazione a 98° C per 10s , 48°C per 10s, 72° C per 15 s, e 1 min di estensione finale a 72°C.

Il metodo è stato inizialmente utilizzato per l'analisi dei campioni congelati. In particolare, i campioni muscolari di acciughe, pesce spada e salmone, sono stati lisati come precedentemente descritto e analizzati attraverso PCR. Anche le larve di acciughe fissate in etanolo sono state trattate allo stesso modo.

## 2.4 Realizzazione del *FishProfiler* DNA Kit

Al fine di individuare regioni specifiche e univocamente identificative della specie, per ognuna delle 10 specie di interesse economico selezionate, ho elaborato degli MSA (Allineamenti Multipli di Sequenze) mediante algoritmi della serie CLUSTAL 2.1 e visualizzate attraverso il programma ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) relativamente ad alcune regioni nucleotidiche mitocondriali quali COI e Cyt-b di ognuna delle specie con specie simili (di valore economico inferiore, di importazione, etc).

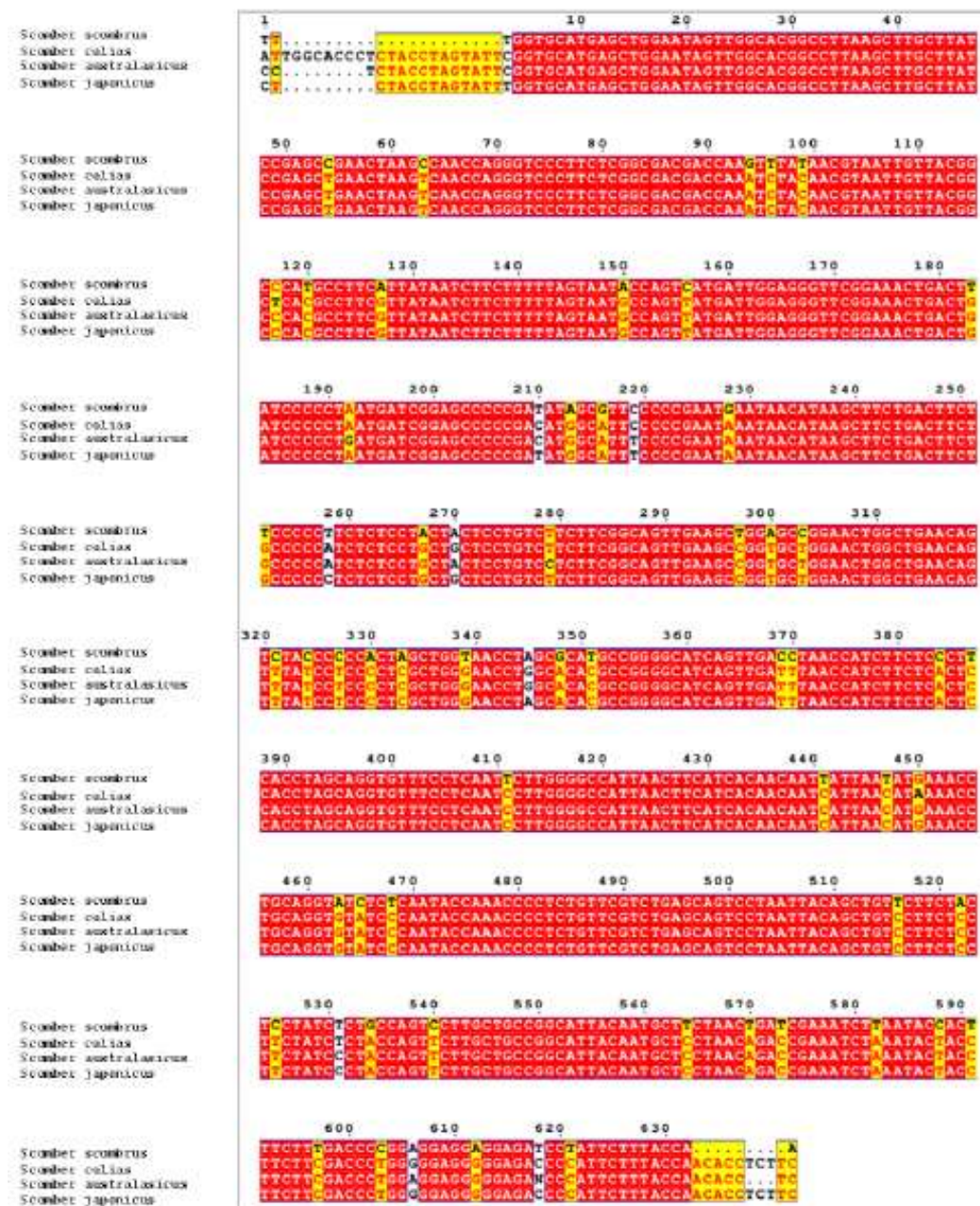
In tutte le specie analizzate è stata identificata una “regione altamente specifica”, tale da consentirne l'uso per l'identificazione univoca della specie.

A seguire è riportato un'immagine (Fig.:14) prodotta attraverso il programma ESPript relativo, a titolo di esempio, ad una delle specie analizzate. Il *file* è corredato da una matrice di identità prodotta dal programma Clustal 2.1 (Fig.: 13), calcolata a coppie, che precede l'immagine digitale in cui: le posizioni dove la percentuale di identità è pari al 100% sono evidenziate in rosso; le posizioni conservate con percentuale di identità compresa tra il 75 ed il 99,9% sono evidenziate in giallo; le posizioni con identità inferiore al 75% non sono evidenziate.

**Figura 13:** Matrice di percentuale di identità creata attraverso Clustal 2.1 per la regione COI di *Scomber scombrus*, *S. japonicus*, *S. colias*, *S. australasicus*

	1: <i>Scomber scombrus</i>	2: <i>Scomber colias</i>	3 <i>Scomber australasicus</i>	4: <i>Scomber japonicus</i>
1: <i>Scomber scombrus</i>	100.00	90.52	91.00	90.52
2: <i>Scomber colias</i>	90.52	100.00	98.78	98.62
3 <i>Scomber australasicus</i>	91.00	98.78	100.00	98.62
4: <i>Scomber japonicus</i>	90.52	98.62	98.62	100.00

**Figura 14:** Allineamento Multipla di Sequenze mediante algoritmi della serie CLUSTAL 2.1 e visualizzate attraverso il programma ESPrnt 3.0 (<http://esprnt.ibcp.fr/ESPrnt/ESPrnt/>) relativamente alla regione COI di *Scomber scombrus*



Attraverso il *software* Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) sono state progettate coppie di oligonucleotidi (Tab.: IV) con perfetta complementarità alle regioni sotto-specie-specifiche, e quindi in grado di consentire l'amplificazione di ogni regione identificativa esclusivamente nelle specie di interesse.

**Tabella IV:** Elenco dei *primer* disegnati per ogni singola specie mediante il *software* Primer3Plus.

Specie	Primer	ID, Primer mix	Sequenza oligonucleotidica (5'-3')
orata	<i>S.aurata_Fw</i>	ID <sub>1</sub>	ATCTTTCCCTTCATTTA <sup>5</sup>
	<i>S.aurata_Rv</i>		ACGAATAGTGGTGTGG <sup>3</sup>
pesce spada	<i>X.gladus_Fw</i>	ID <sub>2</sub>	ATCTGTTGACCTTACCATC <sup>5</sup>
	<i>X.gladus_Rv</i>		AATTACGGTCTGTAAAGAG <sup>3</sup>
sardina	<i>S.pilchardus_Fw</i>	ID <sub>3</sub>	ACCTAGCTGGTATCTCCTCA <sup>5</sup>
sgombro	<i>S.scombrus_Fw</i>	ID <sub>4</sub>	CAGTCTACCCCCACTA <sup>5</sup>
	<i>S.scombrus_Rv</i>		GGTATTAAGATTTCGATCA <sup>3</sup>
spigola	<i>D.labrax_Fw</i>	ID <sub>5</sub>	AACATCGGGGTAATCCTT <sup>5</sup>
	<i>D.labrax_Rv</i>		ATGAAGAAAAAGGAGGTAGTATT <sup>3</sup>
aragosta	<i>P.elephas_Fw</i>	ID <sub>6</sub>	CTTGGAAATCTTTCATCTC <sup>5</sup>
	<i>P.elephas_Rv</i>		GTCGAAGGTTATACCAGT <sup>3</sup>
gambero rosso	<i>A.foliacea_Fw</i>	ID <sub>8</sub>	GTTATTGTAACGGCTCAC <sup>5</sup>
	<i>A.foliacea_Rv</i>		TGTTATACCTGTTCTTCG <sup>3</sup>
calamaro	<i>Loligo_Fw</i>	ID <sub>9</sub>	GCTCGTGGTATTTATTACA <sup>5</sup>
	<i>Loligo_Rv</i>		AAACAACATATCTCACCAAC <sup>3</sup>
seppia	<i>Sepia_Rv</i>	ID <sub>7</sub>	GAGAAGATAGCTAAATCTACTG <sup>3</sup>
totano	<i>Todarodes_Fw</i>	ID <sub>10</sub>	TTTATTATGGTTCITATATAATG <sup>5</sup>
	<i>Todarodes_Rv</i>		GGATTATTCTTCCTGTC <sup>3</sup>

<sup>5</sup>Forward Primer; <sup>3</sup>Reverse Primer

Il DNA totale è stato estratto da tutti i campioni utilizzando, per l'appunto, il metodo di estrazione semplice e veloce per il DNA descritto in Tagliavia et al. (2016), messo a punto per l'identificazione dei prodotti ittici trasformati industrialmente e non.

Ogni campione, delle 10 specie selezionate, è stato testato attraverso l'amplificazione di sequenze di DNA universali (COI) in vitro (approccio *Barcoding*), con *primers* universali per i pesci (Ward et al., 2005) e *primer* universali per gli invertebrati (Folmer et al., 1994). La corretta amplificazione della regione COI rappresenta il "necessario



controllo di qualità" del campione biologico e la sua idoneità per effettuare *test* molecolari e viene utilizzato come "controllo interno". Parallelamente alla regione del "controllo interno" (COI) per ogni campione è stata amplificata una sequenza specifica per la specie che ne ha consentito l'identificazione a livello specifico.

Ogni campione è stato sottoposto contemporaneamente a due PCR, una reazione con i *primer* specifici "ID<sub>n</sub>" e una seconda con i *primer* universali "U<sub>n</sub>" (Tab.: V). I *primer* U<sub>1</sub> (Ward et al., 2005) rappresentano il "controllo interno" per i campioni di pesce. I *primer* U<sub>2</sub> (Folmer et al., 1994) rappresentano il "controllo interno" per le reazioni specifiche di molluschi e crostacei.

La PCR condotta con due coppie di *primer* ha permesso l'amplificazione simultanea di un amplicone che serve come una reazione di "controllo interno" per confermare che si tratta di pesce o invertebrato (crostaceo mollusco), e un secondo amplicone specie-specifico la cui presenza conferma l'appartenenza del campione ad una determinata specie.

**Tabella V:** *Primer* mix di controllo per pesci e molluschi e invertebrati.

CONTROLLI	Sequenza oligonucleotidica (5'-3')	Autori
U <sub>1</sub> per pesci	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCACA <sup>a</sup> TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA <sup>b</sup>	Ward et al. 2005
U <sub>2</sub> per crostacei e molluschi	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG <sup>a</sup> TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA <sup>b</sup>	Folmer et al. 1994

<sup>a</sup>Forward primer <sup>b</sup>Reverse primer

Le reazioni sono state allestite in un volume totale di 25 µl utilizzando 0,5 µl di *Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific)* in tampone 1x (Reaction buffer), 0,2 mM dNTP, 0,5 µM di ogni  $U_n$  primer mix ,(U1 o U2) e 0,5 µM di uno degli  $ID_n$  primer mix e  $H_2O$  fino a raggiungere 25 µl.

L'amplificazione è stata condotta mediante Perkin-Elmer® PCR *termocycler*. I profili di reazione PCR utilizzati per i campioni da analizzare sono descritti nella tabella (Tab.:VI) riportata di seguito:

**Tabella VI:** profili di reazione PCR utilizzati per i campioni testati per la realizzazione del *FishProfiler DNA kit*.

Campioni	Profilo di reazione
	<i>Denaturazione iniziale</i>
<i>Xiphias gladius</i>	98° C per 15 secondi
<i>Sardina pilchardus</i>	40 cicli del seguente profilo
<i>Dicentrarchus labrax</i>	98° C per 10 secondi
<i>Scomber scombrus</i>	55 ° C per 10 secondi
<i>Sparus aurata</i>	72 ° C per 15 secondi
	<i>Estensione finale</i>
	72C° per 1 minuto
	<i>Denaturazione iniziale</i>
<i>Palinurus elephas</i>	98° C per 15 secondi
<i>Aristaeomorpha foliacea</i>	40 cicli del seguente profilo
<i>Sepia officinalis</i>	98° C per 10 secondi
<i>Todarodes sagittatus</i>	48 ° C per 15 secondi
<i>Loligo vulgaris</i>	72 ° C per 20 secondi
	<i>Estensione finale</i>
	72C° per 1 minuto

### 3. Risultati

#### 3.1 Variabilità genetica nei crostacei

88 campioni appartenenti al subphylum dei *Crustacea* sono stati analizzati. Essi erano rappresentativi di:

4 Ordini: *Calanoida*, *Decapoda*, *Euphausiacea*, *Stomatopoda*.

16 Famiglie: *Alpheidae*, *Calappidae*, *Dorippidae*, *Epiplatidae*, *Eriphiidae*, *Eumunididae*, *Euphausiidae*, *Hippolytidae*, *Luciferidae*, *Paguridae*, *Pandalidae*, *Pasiphaeidae*, *Squillidae*, *Temoridae*, *Thoridae*, *Upogebiidae*;

18 Generi: *Alpheus*, *Calappa*, *Dardanus*, *Eriphia*, *Eumunida*, *Hippolyte*, *Lucifer*, *Medorippe*, *Meganyctiphanes*, *Pagurus*, *Pasiphaea*, *Pisa*, *Plesionika*, *Rissoides*, *Temora*, *Thoralus*, *Thysanoessa*, *Upogebia*;

18 Specie: *Alpheus* spp., *Calappa granulata*, *Dardanus arrosor*, *Eriphia verrucosa*, *Eumunida picta*, *Hippolyte inermis*, *Lucifer typus*, *Medorippe lanata*, *Meganyctiphanes norvegica*, *Pagurus minutus*, *Pasiphaea sivado*, *Pisa nodipes*, *Plesionika heterocarpus*, *Rissoides desmaresti*, *Temora stylifera*, *Thoralus cranchii*, *Thysanoessa gregaria*, *Upogebia pusilla*.

Di seguito è riportata la tabella riassuntiva (Tab. VII) di tutti i campioni.

**TabellaVII:** Elenco dettagliato degli individui appartenenti al subphylum dei Crustacea analizzati nello studio

ID campione	Specie	Genere	Famiglia	Ordine
COM_65	<i>Alpheus spp.*</i>	<i>Alpheus spp.</i>	<i>Alpheidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_140	<i>Alpheus spp.*</i>	<i>Alpheus spp.</i>	<i>Alpheidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_141	<i>Alpheus spp.*</i>	<i>Alpheus spp.</i>	<i>Alpheidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_142	<i>Alpheus spp.*</i>	<i>Alpheus spp.</i>	<i>Alpheidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_143	<i>Alpheus spp.*</i>	<i>Alpheus spp.</i>	<i>Alpheidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_57	<i>Calappa granulata</i>	<i>Calappa</i>	<i>Calappidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_90	<i>Calappa granulata</i>	<i>Calappa</i>	<i>Calappidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_91	<i>Calappa granulata</i>	<i>Calappa</i>	<i>Calappidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_92	<i>Calappa granulata</i>	<i>Calappa</i>	<i>Calappidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_93	<i>Calappa granulata</i>	<i>Calappa</i>	<i>Calappidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_51	<i>Dardanus arrosor</i>	<i>Dardanus</i>	<i>Diogenidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_50	<i>Dardanus arrosor</i>	<i>Dardanus</i>	<i>Diogenidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_130	<i>Dardanus arrosor</i>	<i>Dardanus</i>	<i>Diogenidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_131	<i>Dardanus arrosor</i>	<i>Dardanus</i>	<i>Diogenidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_132	<i>Dardanus arrosor</i>	<i>Dardanus</i>	<i>Diogenidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_60	<i>Eriphia verrucosa</i>	<i>Eriphia</i>	<i>Eriphiidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_100	<i>Eriphia verrucosa</i>	<i>Eriphia</i>	<i>Eriphiidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_101	<i>Eriphia verrucosa</i>	<i>Eriphia</i>	<i>Eriphiidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_102	<i>Eriphia verrucosa</i>	<i>Eriphia</i>	<i>Eriphiidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_103	<i>Eriphia verrucosa</i>	<i>Eriphia</i>	<i>Eriphiidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_5	<i>Eumunida spp.**</i>	<i>Eumunida</i>	<i>Eumunididae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_2	<i>Eumunida spp.**</i>	<i>Eumunida</i>	<i>Eumunididae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_85	<i>Eumunida spp.**</i>	<i>Eumunida</i>	<i>Eumunididae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_86	<i>Eumunida spp.**</i>	<i>Eumunida</i>	<i>Eumunididae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_87	<i>Eumunida spp.**</i>	<i>Eumunida</i>	<i>Eumunididae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_64	<i>Hippolyte inermis*</i>	<i>Hippolyte</i>	<i>Hippolytidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_135	<i>Hippolyte inermis*</i>	<i>Hippolyte</i>	<i>Hippolytidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_136	<i>Hippolyte inermis*</i>	<i>Hippolyte</i>	<i>Hippolytidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_137	<i>Hippolyte inermis*</i>	<i>Hippolyte</i>	<i>Hippolytidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_138	<i>Hippolyte inermis*</i>	<i>Hippolyte</i>	<i>Hippolytidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_72	<i>Lucifer typus*</i>	<i>Lucifer</i>	<i>Luciferidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_155	<i>Lucifer typus*</i>	<i>Lucifer</i>	<i>Luciferidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_156	<i>Lucifer typus*</i>	<i>Lucifer</i>	<i>Luciferidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_157	<i>Lucifer typus*</i>	<i>Lucifer</i>	<i>Luciferidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_158	<i>Lucifer typus*</i>	<i>Lucifer</i>	<i>Luciferidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_58	<i>Medorippe lanata**</i>	<i>Medorippe</i>	<i>Dorippidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_95	<i>Medorippe lanata**</i>	<i>Medorippe</i>	<i>Dorippidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_96	<i>Medorippe lanata**</i>	<i>Medorippe</i>	<i>Dorippidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_97	<i>Medorippe lanata**</i>	<i>Medorippe</i>	<i>Dorippidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_98	<i>Medorippe lanata**</i>	<i>Medorippe</i>	<i>Dorippidae</i>	<i>Decapoda</i>

ID campione	Specie	Genere	Famiglia	Ordine
COM_66	<i>Meganyctiphanes norvegica</i> *	<i>Meganyctiphanes</i>	<i>Euphausiidae</i>	<i>Euphausiacea</i>
COM_67	<i>Meganyctiphanes norvegica</i> *	<i>Meganyctiphanes</i>	<i>Euphausiidae</i>	<i>Euphausiacea</i>
COM_68	<i>Meganyctiphanes norvegica</i> *	<i>Meganyctiphanes</i>	<i>Euphausiidae</i>	<i>Euphausiacea</i>
COM_145	<i>Meganyctiphanes norvegica</i> *	<i>Meganyctiphanes</i>	<i>Euphausiidae</i>	<i>Euphausiacea</i>
COM_146	<i>Meganyctiphanes norvegica</i> *	<i>Meganyctiphanes</i>	<i>Euphausiidae</i>	<i>Euphausiacea</i>
COM_147	<i>Meganyctiphanes norvegica</i> *	<i>Meganyctiphanes</i>	<i>Euphausiidae</i>	<i>Euphausiacea</i>
COM_73	<i>Pagurus minutus</i> **	<i>Pagurus</i>	<i>Paguridae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_160	<i>Pagurus minutus</i> **	<i>Pagurus</i>	<i>Paguridae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_161	<i>Pagurus minutus</i> **	<i>Pagurus</i>	<i>Paguridae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_162	<i>Pagurus minutus</i> **	<i>Pagurus</i>	<i>Paguridae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_163	<i>Pagurus minutus</i> **	<i>Pagurus</i>	<i>Paguridae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_22	<i>Pasiphaea sivado</i> **	<i>Pasiphaea</i>	<i>Pasiphaeidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_80	<i>Pasiphaea sivado</i> **	<i>Pasiphaea</i>	<i>Pasiphaeidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_81	<i>Pasiphaea sivado</i> **	<i>Pasiphaea</i>	<i>Pasiphaeidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_82	<i>Pasiphaea sivado</i> **	<i>Pasiphaea</i>	<i>Pasiphaeidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_23	<i>Pasiphaea sivado</i> **	<i>Pasiphaea</i>	<i>Pasiphaeidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_1	<i>Pisa nopides</i> **	<i>Pisa</i>	<i>Epialtidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_120	<i>Pisa nopides</i> **	<i>Pisa</i>	<i>Epialtidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_121	<i>Pisa nopides</i> **	<i>Pisa</i>	<i>Epialtidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_122	<i>Pisa nopides</i> **	<i>Pisa</i>	<i>Epialtidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_123	<i>Pisa nopides</i> **	<i>Pisa</i>	<i>Epialtidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_12	<i>Plesionika heterocarpus</i> *	<i>Plesionika</i>	<i>Pandalidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_115	<i>Plesionika heterocarpus</i> *	<i>Plesionika</i>	<i>Pandalidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_116	<i>Plesionika heterocarpus</i> *	<i>Plesionika</i>	<i>Pandalidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_117	<i>Plesionika heterocarpus</i> *	<i>Plesionika</i>	<i>Pandalidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_118	<i>Plesionika heterocarpus</i> *	<i>Plesionika</i>	<i>Pandalidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_35	<i>Rissoides desmaresti</i> **	<i>Rissoides</i>	<i>Squillidae</i>	<i>Stomatopoda</i>
COM_36	<i>Rissoides desmaresti</i> **	<i>Rissoides</i>	<i>Squillidae</i>	<i>Stomatopoda</i>
COM_38	<i>Rissoides desmaresti</i> **	<i>Rissoides</i>	<i>Squillidae</i>	<i>Stomatopoda</i>
COM_125	<i>Rissoides desmaresti</i> **	<i>Rissoides</i>	<i>Squillidae</i>	<i>Stomatopoda</i>
COM_126	<i>Rissoides desmaresti</i> **	<i>Rissoides</i>	<i>Squillidae</i>	<i>Stomatopoda</i>
COM_31	<i>Temora stylifera</i> *	<i>Temora</i>	<i>Temoridae</i>	<i>Calanoida</i>
COM_32	<i>Temora stylifera</i> *	<i>Temora</i>	<i>Temoridae</i>	<i>Calanoida</i>
COM_33	<i>Temora stylifera</i> *	<i>Temora</i>	<i>Temoridae</i>	<i>Calanoida</i>
COM_34	<i>Temora stylifera</i> *	<i>Temora</i>	<i>Temoridae</i>	<i>Calanoida</i>
COM_35	<i>Temora stylifera</i> *	<i>Temora</i>	<i>Temoridae</i>	<i>Calanoida</i>
COM_62	<i>Thoralus cranchii</i> *	<i>Thoralus</i>	<i>Thoridae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_110	<i>Thoralus cranchii</i> *	<i>Thoralus</i>	<i>Thoridae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_111	<i>Thoralus cranchii</i> *	<i>Thoralus</i>	<i>Thoridae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_112	<i>Thoralus cranchii</i> *	<i>Thoralus</i>	<i>Thoridae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_63	<i>Thoralus cranchii</i> *	<i>Thoralus</i>	<i>Thoridae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_69	<i>Thysanoessa gregaria</i> *	<i>Thysanoessa</i>	<i>Euphausiidae</i>	<i>Euphausiacea</i>
COM_70	<i>Thysanoessa gregaria</i> *	<i>Thysanoessa</i>	<i>Euphausiidae</i>	<i>Euphausiacea</i>

ID campione	Specie	Genere	Famiglia	Ordine
COM_71	<i>Thysanoessa gregaria</i> *	<i>Thysanoessa</i>	<i>Euphausiidae</i>	<i>Euphausiacea</i>
COM_150	<i>Thysanoessa gregaria</i> *	<i>Thysanoessa</i>	<i>Euphausiidae</i>	<i>Euphausiacea</i>
COM_151	<i>Thysanoessa gregaria</i> *	<i>Thysanoessa</i>	<i>Euphausiidae</i>	<i>Euphausiacea</i>
COM_74	<i>Upogebia pusilla</i> **	<i>Upogebia</i>	<i>Upogebiidae</i>	<i>Decapoda</i>
COM_165	<i>Upogebia pusilla</i> **	<i>Upogebia</i>	<i>Upogebiidae</i>	<i>Decapoda</i>

\*: campioni provenienti dalla campagna oceanografica BANSIC 2016.

\*\* : campioni provenienti dalla campagna oceanografica CAMPBIOL 2015.

A partire da differenti esemplari appartenenti al subphylum dei Crostacei, una regione di circa 700 bp corrispondente alla subunità I della citocromo ossidasi mitocondriale (COI) è stata isolata mediante amplificazione PCR e successivamente sottoposta a sequenziamento.

Il sequenziamento automatizzato ha fornito sequenze lunghe circa 610 bp. Analizzando le sequenze nucleotidiche precedentemente ottenute attraverso metodiche MSA (*Multiple Sequence Alignment*), sono state ottenute informazioni relative al grado di similarità tra le sequenze omologhe e relazioni filogenetiche tra le specie.

Al fine di valutare la distanza evolutiva ed il posizionamento filogenetico tra gli esemplari sottoposti ad analisi DNA *Barcode*, le sequenze isolate sono state esaminate attraverso programmi bioinformatici.

Le analisi evolutive che seguono sono state condotte attraverso il *software* MEGA.7 (Kumar et al., 2016), applicando la tecnica statistica del *bootstrap* con 1000 repliche, il modello utilizzato è stato il Kimura 2-parametri (il quale corregge tenendo conto del tasso di sostituzione delle transizioni e delle transvezioni mentre assume che la frequenza dei quattro nucleotidi è la stessa e che il tasso di sostituzione non vari tra i siti).

Per i crostacei sono state ottenute sequenze lunghe 590 bp con composizione nucleotidica media di 35,6% per T(U), 18,3% per C, 26,3% per A, 19,8% per G.

Sul *set* di sequenze dei campioni è stata calcolata la distanza genetica a coppie, che risulta assumere valori compresi tra 0 e 0,477, con valore medio di 0,297.

All'interno dell'ordine dei Decapodi, la distanza genetica, risulta assumere valori tra 0 e 0,357, con valore di distanza nucleotidica media 0,281.

All'interno dell'ordine degli *Euphausiacei*, invece la distanza genetica, assume valori tra 0 e 0,314, assumendo un valore medio di 0,194.

E' stata calcolata la distanza genetica tra gli ordini appartenenti al subphylum dei Crostacei ed i valori sono riportati nella tabella a seguire (Tab. VIII):

**Tabella VIII:** Distanza genetica tra gli ordini appartenenti al subphylum dei Crostacei analizzati nello studio.

<b>Ordine</b>	<b>Ordine</b>	<b>Distanza genetica</b>	<b>Errore <i>standard</i></b>
<i>Decapoda</i>	<i>Stomatopoda</i>	0,283	0,017
<i>Decapoda</i>	<i>Euphausiacea</i>	0,315	0,019
<i>Stomatopoda</i>	<i>Euphausiacea</i>	0,286	0,021
<i>Decapoda</i>	<i>Calanoida</i>	0,403	0,026
<i>Stomatopoda</i>	<i>Calanoida</i>	0,366	0,032
<i>Euphausiacea</i>	<i>Calanoida</i>	0,389	0,030

E' stata anche realizzata una matrice a coppie per comparare la variabilità interspecifica tra le specie appartenenti al subphylum dei Crostacei riportata a seguire (Tab.: IX)

**Tabella IX:** Variabilità interspecifica a coppie realizzata per comparare tra loro le specie appartenenti al subphylum dei Crostacei.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 : <i>Pisa_nodipes</i>																	
2 : <i>Eriphia_verrucosa</i>	0,202																
3 : <i>Thoralus_cranchii</i>	0,263	0,255															
4 : <i>Plesionika_heterocarpus</i>	0,284	0,239	0,274														
5 : <i>Rissoides_desmaresti</i>	0,227	0,283	0,302	0,321													
6 : <i>Dardanus_arrosor</i>	0,261	0,265	0,306	0,368	0,255												
7 : <i>Hippolyte_inermis</i>	0,311	0,290	0,325	0,315	0,329	0,365											
8 : <i>Alpheidae_spp.</i>	0,320	0,337	0,319	0,339	0,358	0,393	0,399										
9 : <i>Meganyctiphanes_norvegica</i>	0,351	0,319	0,351	0,370	0,324	0,315	0,376	0,388									
10 : <i>Thysanoessa_gregaria</i>	0,223	0,267	0,266	0,313	0,241	0,291	0,327	0,331	0,281								
11 : <i>Lucifer_typus</i>	0,343	0,337	0,340	0,346	0,328	0,339	0,402	0,375	0,387	0,323							
12 : <i>Pagurus_minutus</i>	0,222	0,255	0,255	0,286	0,262	0,260	0,321	0,339	0,315	0,231	0,307						
13 : <i>Upogebia_pusilla</i>	0,222	0,247	0,244	0,279	0,247	0,245	0,325	0,349	0,338	0,242	0,330	0,184					
14 : <i>Eumunida_spp.</i>	0,243	0,250	0,289	0,329	0,255	0,213	0,386	0,380	0,290	0,252	0,318	0,231	0,246				
15 : <i>Temora_stylifera</i>	0,356	0,373	0,426	0,469	0,366	0,422	0,477	0,467	0,415	0,358	0,391	0,340	0,369	0,340			
16 : <i>Pasiphaea_sivado</i>	0,266	0,319	0,304	0,311	0,287	0,293	0,340	0,411	0,364	0,312	0,374	0,281	0,299	0,308	0,435		
17 : <i>Calappa_granulata</i>	0,225	0,236	0,284	0,333	0,254	0,283	0,312	0,396	0,330	0,281	0,310	0,264	0,267	0,268	0,353	0,353	
18 : <i>Medorippe_lanata</i>	0,229	0,245	0,312	0,300	0,280	0,273	0,343	0,384	0,348	0,267	0,354	0,267	0,239	0,282	0,423	0,309	0,295

La variabilità intraspecifica ha assunto valori nulli per la maggior parte delle specie tranne che per quelle riportate nella tabella a seguire (Tab.: X)

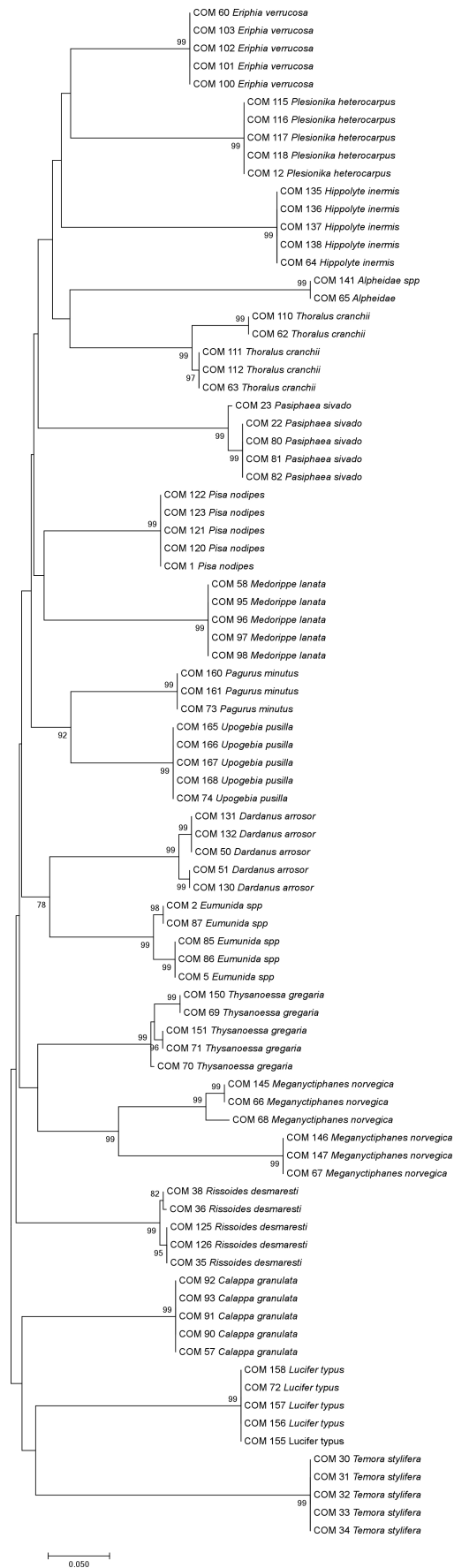
**Tabella X:** valori di variabilità intraspecifica per le specie che la presentano riportati come valore minimo ( $V_{\min}$ ) e valore massimo ( $V_{\max}$ ).

	$V_{\min}$	$V_{\max}$
<i>Thoralus_cranchii</i>	0,006	0,031
<i>Rissoides_desmaresti</i>	0,003	0,006
<i>Dardanus_arrosor</i>	0,004	0,011
<i>Meganyctiphanes_norvegica</i>	0,013	0,139
<i>Thysanoessa_gregaria</i>	0,005	0,019
<i>Pasiphaea_sivado</i>	0,002	0,006

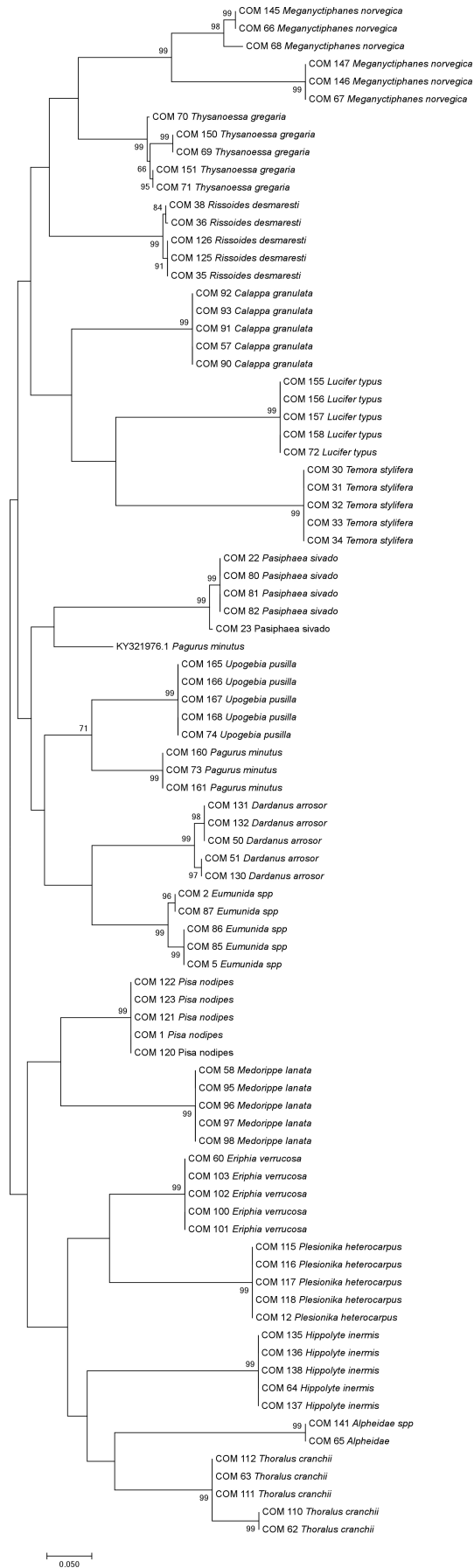


La ricostruzione filogenetica è stata condotta attraverso il metodo statistico di ricostruzione di alberi filogenetici del *Neighbor-joining* NJ (Fig.: 15) e del *Maximum Likelihood* ML (Fig.: 16).

La topologia dei due alberi filogenetici è congruente.



**Figura 15:** Albero *NeighborJoining* basato sul modello Kimura 2-parametri relativo alla sequenza di 610 bp della regione COI sequenziata negli individui appartenenti al subphylum dei Crostacei. Nei nodi sono indicati valori superiori al 70%.



**Figura 16:** Albero *Maximum Likelihood* basato sul modello Kimura 2-parametri relativo alla sequenza di 610 bp della regione COI sequenziata negli individui appartenenti al subphylum dei Crostacei. Nei nodi sono indicati valori superiori al 70%.

### 3.1.1 Crostacei: Confronto con le sequenze nucleotidiche del *database* GenBank®

È stata condotta una indagine comparativa tra le sequenze nucleotidiche ottenute per la regione COI mtDNA dei campioni appartenenti al subphylum dei *Crustacea*, reperiti durante i campionamenti nel canale di Sicilia, effettuando delle Query *on line* nel *database* GenBank® e nel BOLD *System* delle sequenze nucleotidiche ottenute per i diversi campioni.

Il *Blast* delle sequenze nucleotidiche ha permesso di verificarne la percentuale di identità con le sequenze presenti *on line* nelle due banche dati.

Di seguito è riportata la tabella (Tab.: XI ) in cui sono stati inseriti gli *Accession number* delle sequenze nucleotidiche utilizzate per la creazione dell'albero filogenetico per i crostacei con i riferimenti bibliografici e l'area geografica in cui è stato condotto lo studio.

**Tabella XI** :Elenco degli *Accession number* delle sequenze nucleotidiche relative alla regione COI, riferimenti bibliografici e aree in cui sono stati condotti gli studi, utilizzati per la costruzione degli alberi filogenetici di seguito riportati.

Specie	Sequenza nucleotidica su GenBank®/ BOLD	Autori	Area di studio
<i>Alpheus spp.</i>	KU496247.1	Al-Rshaidat et al., 2016	Mar Rosso
<i>Calappa granulata</i>	JQ306054.1/JSDAZ204-08.COI-5P	Matzen da Silva et al., 2011	Oceano Atlantico
<i>Dardanus arrosor</i>	JQ305898.1	Matzen da Silva et al., 2011	Oceano Atlantico
<i>Eriphia verrucosa</i>	KP136681.1/GBCMA10372-15.COI-5P	Kolukirik et al., 2015	Mar Nero
<i>Eumunida picta</i>	EU243558.1	Samadi et al., 2012	Oceano Atlantico
<i>Hippolyte inermis</i>	JF794739.1	Terossi e Mantelatto, 2012	Brasile e mar dei Caraibi
<i>Lucifer typus</i>	GU183792.1	Bucklin et al., 2010	Mar dei Sargassi
<i>Medorippe lanata</i>	JQ305917.1/JSDME012-08.COI-5P	Matzen da Silva et al., 2011	Oceano Atlantico
<i>Megamictiphanes norvegica</i>	FJ581753.1/WW533-08.COI-5P	Radulovici et al., 2009	Mare del Nord
<i>Pagurus minutus</i>	KY321976.1	Jung et al., 2017	Sud Corea
<i>Pasiphaea sivado</i>	JQ306265.1/FCDOP104-07.COI-5P	Matzen da Silva et al., 2011	Oceano Atlantico
<i>Pisa armata</i>	KT208450.1/BNSDE323-13.COI-5P	Raupach et al., 2015	Oceano Atlantico
<i>Plesionika heterocarpus</i>	JQ306277.1	Matzen da Silva et al., 2011	Oceano Atlantico
<i>Rissoides desmaresti</i>	KT208805/BNSC593-14.COI-5P	Raupach et al., 2015	Atlantico
<i>Temora stylifera</i>	KP861423.1	Kasapidis et al., 2017	Mar Mediterraneo
<i>Thorulus cranchii</i>	KJ841675.1	Bilgin et al., 2014	Mar di Turchia
<i>Thysanoessa gregaria</i>	GU183781.1/GBA14489-14.COI-5P	Bucklin et al., 2010	Mar dei Sargassi
<i>Upogebia pusilla</i>	KP136655.1	Kolukirik et al., 2015	Mar Nero

La sequenza nucleotidica di *Pisa nodipes* ottenuta per la prima volta in questo studio, è stata confrontata con quella di *Pisa armata* identificata nel 2015 da Raupach et al., nello studio condotto nella regione dei mari del Nord.

La ricostruzione filogenetica è stata condotta attraverso il metodo statistico di ricostruzione di alberi filogenetici del *Neighbor-joining* NJ (Fig.: 17) e del *Maximum Likelihood* ML (Fig.: 18).

La topologia dei due alberi filogenetici è congruente.

In entrambi gli alberi, NJ e ML, (Fig.17 e Fig. 18), tutti gli ordini appaiono non monofiletici; per nessuno di essi è ipotizzabile un antenato comune.

La variabilità intraspecifica calcolata per i crostacei analizzati nello studio ha assunto valori nulli per molte delle specie analizzate tranne che per *Thorulus cranchii*, *Rissoides desmaresti*, *Dardanus arrosor*, *Meganyctiphanes norvegica*, *Thysanoessa gregaria*, *Pasiphaea sivado*; tra queste *Meganyctiphanes norvegica* è la specie con range di variabilità intraspecifica più ampio ( $V_{\min}$ : 0,013;  $V_{\max}$ :0,139).

In entrambi gli alberi NJ e ML, (Fig.17 e Fig. 18), la sequenza nucleotidica per *Meganyctiphanes norvegica* reperita nel GenBank®/BOLD per effettuare il confronto con le sequenze ottenute in questo studio, clusterizza con le sequenze relative a *Thysanoessa gregaria* (compresa quella reperita nel GenBank®/BOLD con *Accession number* GU183781.1/GBA14489-14.COI-5P).

Un comportamento analogo a quello precedentemente descritto si osserva nell'albero NJ (Fig.17) per la sequenza di *Eumunida picta* (*Accession number* EU243558.1 GenBank®) usata per il confronto con le sequenze dei campioni di *Eumunida spp.* analizzati in questo studio, che clusterizza con le sequenze di *Medorippe lanata*, la medesima sequenza però, nell'albero ML (Fig. 18) clusterizza insieme alle

sequenze dei campioni di *Eumunida spp.* e *Dardanus arrosor* (compresa quella reperita nel GenBank<sup>®</sup>/BOLD con *Accession number* JQ305898.1).

Per quanto riguarda la sequenza di *Pagurus minutus* (*Accession number* KY321976.1 in GenBank<sup>®</sup>), in entrambi gli alberi NJ e ML, (Fig.17 e Fig. 18), *clusterizza* al di fuori delle sequenze relative ai campioni di *Pagurus minutus* ed *Upogebia pusilla* (comprese rispettivamente le sequenze per esse reperite nel GenBank<sup>®</sup> con *Accession number* KY321976.1 e KP136655.1).

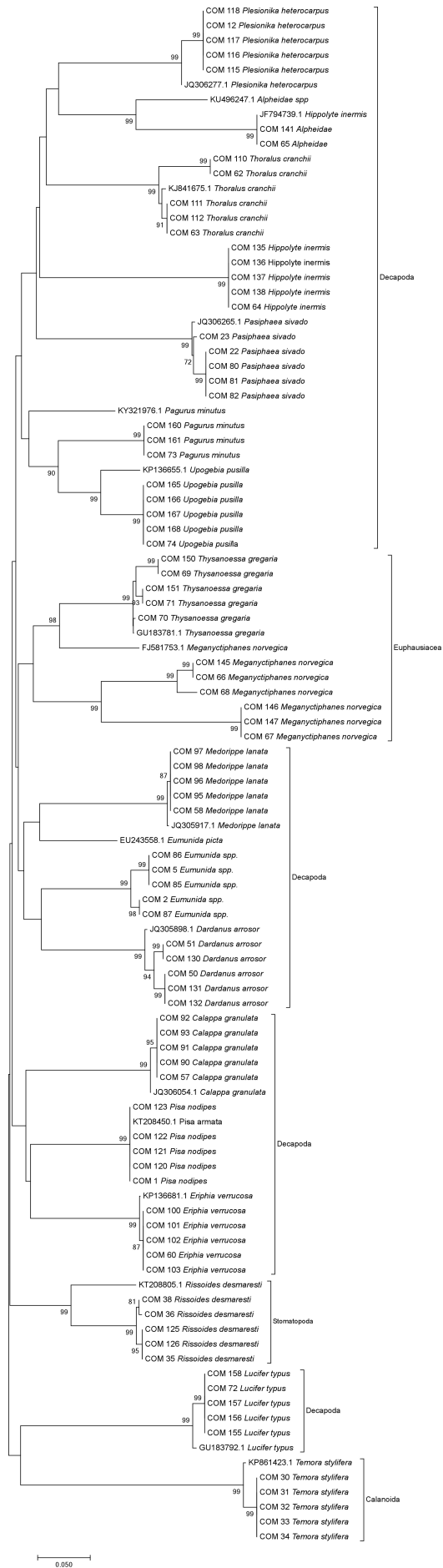
Infine la sequenza utilizzata per *Hippolyte inermis* JF794739.1 con *Accession number* nel GenBank<sup>®</sup> *clusterizza* con le sequenze relative ai campioni di *Alpheidae* analizzate nel mio lavoro di dottorato e con la sequenza di *Alpheus spp* con *Accession number* KU496247.1. nel GenBank<sup>®</sup>, separandosi nettamente dalle sequenze relative *Hippolyte inermis* ottenute in questo studio.

Per quanto riguarda i campioni di *Meganyctiphanes norvegica*, essendo stati analizzati stadi larvali, è possibile che siano stati misidentificati, il fatto però che la sequenza reperita in GenBank<sup>®</sup>/BOLD *clusterizzi* insieme a quelle di *Thysanoessa gregaria* lascia intendere che nell'ordine degli *Euphausiacea*, la regione COI non rappresenta un marcatore affidabile e robusto per la discriminazione tra le specie.

Per tutte le altre specie si evince un comportamento analogo, ovvero le sequenze ottenute per ogni singola specie si raggruppano insieme differenziandosi per poco (valore nodo: 99%) dalla/e sequenza/e reperite nel GenBank<sup>®</sup>/BOLD utilizzate per il confronto.

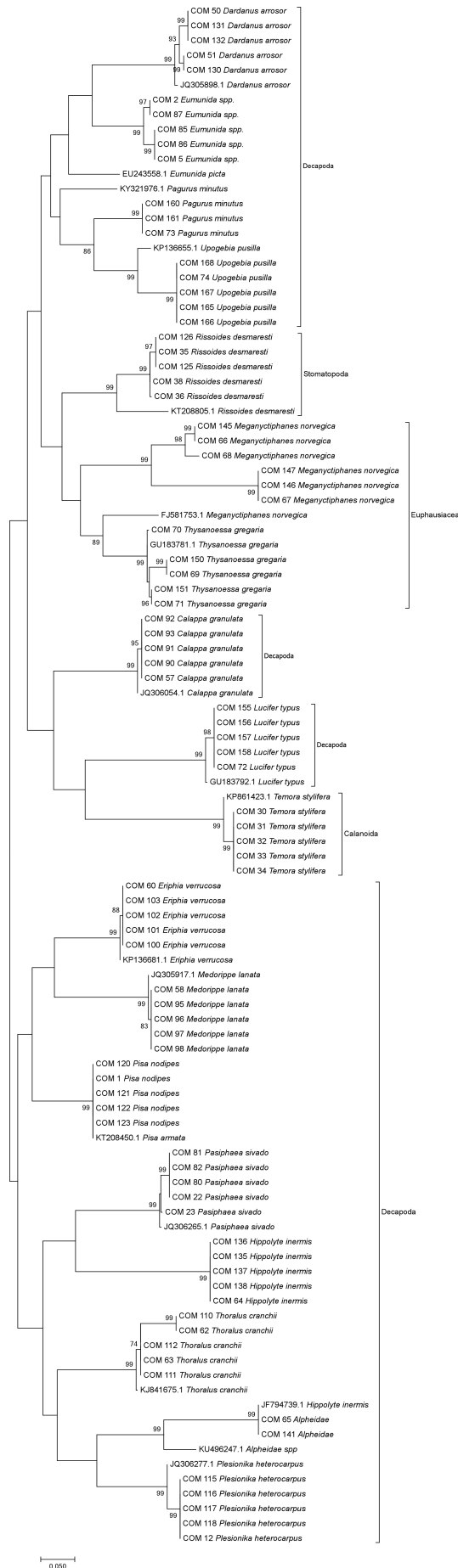
Essendo i crostacei trattati nello studio specie bentoniche e/o appartenenti al mesozooplankton mediterraneo, è lecito ipotizzare che non essendo soggette a grandi spostamenti, risultino geneticamente

differenti dalle sequenze delle specie con le quali sono state confrontate provenienti da Mar Rosso, Oceano Atlantico, Mar Nero, Brasile e mar dei Caraibi, Mar dei Sargassi, Mare del Nord, Sud Corea, Mar di Turchia, suggerendo la possibilità di essere in presenza di specie criptiche, separate geneticamente.



**Figura 17:** Albero *NeighborJoining* basato sul modello Kimura 2-parametri relativo alla sequenza di 610 bp della regione COI sequenziata negli individui appartenenti al subphylum dei Crostacei e delle sequenze nucleotidiche reperite nella banca dati GenBank<sup>®</sup>. Nei nodi sono indicati valori superiori al 70%.





**Figura 18:** Albero *Maximum Likelihood* basato sul modello Kimura 2-parametri relativo alla sequenza di 610 bp della regione COI sequenziata negli individui appartenenti al subphylum dei Crostacei e delle sequenze nucleotidiche reperite nella banca dati GenBank®. Nei nodi sono indicati valori superiori al 70%.

### 3.2 Variabilità genetica nei Pesci Ossei

Per quanto riguarda i campioni appartenenti alla Superclasse degli *Actinopterygii*, sono stati analizzati 41 esemplari rappresentativi di:

8 Ordini: *Anguilliformes*, *Aulopiformes*, *Clupeiformes*, *Gadiformes*, *Ophidiiformes*, *Perciformes*, *Pleuronectiformes*, *Scorpaeniformes*.

18 Famiglie: *Bothidae*, *Callionymidae*, *Carangidae*, *Carapidae*, *Centracanthidae*, *Cepolidae*, *Clupeidae*, *Dentex*, *Epigonidae*, *Labridae*, *Lotidae*, *Ophichthidae*, *Ophidiidae*, *Sciaenidae*, *Scorpaenidae*, *Soleidae*, *Trachinidae*, *Triglidae*.

17 Generi: *Arnoglossus*, *Benthocometes*, , *Carapus*, *Cepola*, *Dentex*, *Epigonus*, *Gaidropsarus*, *Gnathophis*, *Lepidotrigla*, *Microchirus*, *Parophidion*, *Sardinella*, *Sciaena*, *Spicara*, *Symphodus*, *Synapturichthys*, *Synchiropus*.

24 Specie: *Arnoglossus imperialis*, *Arnoglossus thori*, *Benthocometes robustus*, *Buglossidium luteum*, *Carapus acus*, *Centrachantus cirrus*, *Cepola rubescens*, *Dentex macrophthalmus*, *Epigonus denticulatus*, *Gnathophis mystax*, *Lepidotrigla dieuzeidei*, *Microchirus variegatus*, *Parophidion vassali*, *Sardinella aurita*, *Sciaena umbra*, *Solea spp.*, *Spicara flexuosa*, *Symphodus rostratus*, *Synaptura kleinii*, *Synchiropus phaeton*, *Trachinus draco*, *Trachinus radiatus*, *Trachurus mediterraneus*, *Trachurus picturatus*.

Un elenco dettagliato di tutti i campioni di pesci ossei provenienti dalla campagna oceanografica MEDITS 2015 è di seguito riportato (Tab. XII).

**Tabella XII:** Elenco dettagliato degli individui appartenenti alla Superclasse degli *Actinopterygii*

ID campione	Specie	Genere	Famiglia	Ordine
FOM046	<i>Arnoglossus imperialis</i>	<i>Arnoglossus</i>	<i>Bothidae</i>	<i>Pleuronectiformes</i>
FOM052	<i>Arnoglossus spp.</i>	<i>Arnoglossus</i>	<i>Bothidae</i>	<i>Pleuronectiformes</i>
FOM100	<i>Arnoglossus thori</i>	<i>Arnoglossus</i>	<i>Bothidae</i>	<i>Pleuronectiformes</i>
FOM101	<i>Arnoglossus thori</i>	<i>Arnoglossus</i>	<i>Bothidae</i>	<i>Pleuronectiformes</i>
FOM046	<i>Arnoglossus imperialis</i>	<i>Arnoglossus</i>	<i>Bothidae</i>	<i>Pleuronectiformes</i>
FOM122	<i>Benthocometes robustus</i>	<i>Benthocometes</i>	<i>Ophidiidae</i>	<i>Ophidiiformes</i>
FOM099	<i>Buglossidium luteum</i>	<i>Buglossidium</i>	<i>Soleidae</i>	<i>Pleuronectiformes</i>
FOM127	<i>Carapus acus</i>	<i>Carapus</i>	<i>Carapidae</i>	<i>Ophidiiformes</i>
FOM132	<i>Carapus acus</i>	<i>Carapus</i>	<i>Carapidae</i>	<i>Ophidiiformes</i>
FOM011	<i>Centrachantus cirrus</i>	<i>Spicara</i>	<i>Centranchidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM013	<i>Centrachantus cirrus</i>	<i>Spicara</i>	<i>Centranchidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM035	<i>Cepola rubescens</i>	<i>Cepola</i>	<i>Cepolidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM132	<i>Dentex macrophthalmus</i>	<i>Dentex</i>	<i>Sparidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM019	<i>Epigonus denticulatus</i>	<i>Epigonus</i>	<i>Epigonidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM022	<i>Gnathophis mystax</i>	<i>Gnathophis</i>	<i>Congridae</i>	<i>Anguilliformes</i>
FOM123	<i>Lepidotrigla dieuzeidei</i>	<i>Lepidotrigla</i>	<i>Triglidae</i>	<i>Scorpaeniformes</i>
FOM124	<i>Lepidotrigla dieuzeidei</i>	<i>Lepidotrigla</i>	<i>Triglidae</i>	<i>Scorpaeniformes</i>
FOM126	<i>Lepidotrigla dieuzeidei</i>	<i>Lepidotrigla</i>	<i>Triglidae</i>	<i>Scorpaeniformes</i>
FOM097	<i>Microchirus variegatus</i>	<i>Microchirus</i>	<i>Soleidae</i>	<i>Pleuronectiformes</i>
FOM095	<i>Parophidion vassali</i>	<i>Parophidion</i>	<i>Ophidiidae</i>	<i>Ophidiiformes</i>
FOM093	<i>Parophidion vassali</i>	<i>Parophidion</i>	<i>Ophidiidae</i>	<i>Ophidiiformes</i>
FOM015	<i>Sardinella aurita</i>	<i>Sardinella</i>	<i>Clupeidae</i>	<i>Clupeiformes</i>
FOM091	<i>Sciaena umbra</i>	<i>Sciaena</i>	<i>Sciaenidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM109	<i>Solea spp.</i>	<i>Solea</i>	<i>Soleidae</i>	<i>Pleuronectiformes</i>
FOM004	<i>Spicara flexuosa</i>	<i>Spicara</i>	<i>Centranchidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM006	<i>Spicara flexuosa</i>	<i>Spicara</i>	<i>Centranchidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM008	<i>Spicara flexuosa</i>	<i>Spicara</i>	<i>Centranchidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM098	<i>Symphodus rostratus</i>	<i>Symphodus</i>	<i>Labridae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM028	<i>Synapturichthys kleinii</i>	<i>Synapturichthys</i>	<i>Soleidae</i>	<i>Pleuronectiformes</i>
FOM130	<i>Synchiropus phaeton</i>	<i>Synchiropus</i>	<i>Callionymidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM085	<i>Trachinus draco</i>	<i>Trachinus</i>	<i>Trachinidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM088	<i>Trachinus draco</i>	<i>Trachinus</i>	<i>Trachinidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM096	<i>Trachinus draco</i>	<i>Trachinus</i>	<i>Trachinidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM001	<i>Trachinus radiatus</i>	<i>Trachinus</i>	<i>Trachinidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM002	<i>Trachinus radiatus</i>	<i>Trachinus</i>	<i>Trachinidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM003	<i>Trachinus radiatus</i>	<i>Trachinus</i>	<i>Trachinidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM107	<i>Trachurus mediterraneus</i>	<i>Trachinus</i>	<i>Trachinidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM144	<i>Trachurus picturatus</i>	<i>Trachurus</i>	<i>Carangidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM138	<i>Trachurus picturatus</i>	<i>Trachurus</i>	<i>Carangidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM140	<i>Trachurus picturatus</i>	<i>Trachurus</i>	<i>Carangidae</i>	<i>Perciformes</i>
FOM142	<i>Trachurus picturatus</i>	<i>Trachurus</i>	<i>Carangidae</i>	<i>Perciformes</i>

A partire da differenti esemplari appartenenti alla Superclasse degli *Actinopterygii*, una regione di circa 640 bp corrispondente alla subunità I della citocromo ossidasi mitocondriale (COI) è stata isolata mediante amplificazione PCR e successivamente sottoposta a sequenziamento.

Analizzando le sequenze nucleotidiche precedentemente ottenute attraverso MSA (*Multiple Sequence Alignment*), sono state ottenute informazioni relative al grado di similarità tra le sequenze omologhe e relazioni filogenetiche tra le specie.

Come per il *subphylum* dei Crostacei le analisi evolutive che seguono sono state condotte attraverso il *software* MEGA.7 (Kumar et al., 2016), applicando la tecnica statistica del *bootstrap* con 1000 repliche, il modello utilizzato è stato il Kimura 2-parametri (il quale corregge tenendo conto del tasso di sostituzione delle transizioni e delle transvezioni mentre assume che la frequenza dei quattro nucleotidi è la stessa e che il tasso di sostituzione non vari tra i siti).

Per i pesci ossei sono state ottenute sequenze lunghe 640 bp con composizione nucleotidica media di 35,6% per T(U), 18,3% per C, 26,3% per A, 19,8% per G.

Sul *set* di sequenze dei campioni è stata calcolata la distanza genetica a coppie, che risulta assumere valori compresi tra 0 e 0,359, con valore medio di 0,252.

E' stata calcolata la distanza genetica tra gli ordini appartenenti al Superclasse degli *Actinopterygii* ed i valori sono riportati nella tabella a seguire (Tab.: XIII) e (Tab.: XIV).

**Tabella XIII:** Distanza genetica tra gli ordini appartenenti alla Superclasse degli *Actinopterygii* analizzati nello studio.

	1	2	3	4	5
<b>1</b> : <i>Pleuronectiformes</i>					
<b>2</b> : <i>Perciformes</i>	0,268				
<b>3</b> : <i>Clupeiformes</i>	0,241	0,211			
<b>4</b> : <i>Ophidiiformes</i>	0,294	0,282	0,257		
<b>5</b> : <i>Scorpaeniformes</i>	0,304	0,299	0,280	0,323	
<b>6</b> : <i>Anguilliformes</i>	0,274	0,262	0,233	0,284	0,336

**Tabella XIV:** Distanza genetica media calcolata all'interno degli ordini della *Superclasse degli Actinopterygii* analizzati nello studio.

	Distanza genetica media	Errore standard
<i>Pleuronectiformes</i>	0,22	0,01
<i>Perciformes</i>	0,21	0,01
<i>Ophidiiformes</i>	0,22	0,01
<i>Scorpaeniformes</i>	0,05	0,01

E' stata anche realizzata una matrice a coppie per comparare la variabilità interspecifica tra le specie appartenenti alla Superclasse degli *Actinopterygii* riportata a seguire (Tab.: XV).

**Tabella XV:** Variabilità interspecifica calcolata tra le specie appartenenti alla Superclasse degli *Actinopterygii* analizzate nello studio.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 : <i>Arnoglossus</i>																			
2 : <i>Microchirus</i>	0,244																		
3 : <i>Solea</i>	0,270	0,266																	
4 : <i>Synapturichthys</i>	0,267	0,254	0,227																
5 : <i>Buglossidium</i>	0,268	0,266	0,003	0,223															
6 : <i>Trachinus draco</i>	0,289	0,293	0,298	0,286	0,298														
7 : <i>Trachinus radiatus</i>	0,257	0,232	0,259	0,252	0,261	0,115													
8 : <i>Trachurus picturatus</i>	0,260	0,246	0,283	0,271	0,283	0,268	0,249												
9 : <i>Trachurus mediterraneus</i>	0,251	0,237	0,287	0,267	0,287	0,266	0,236	0,034											
10 : <i>Spicara flexuosa</i>	0,279	0,232	0,267	0,264	0,267	0,264	0,224	0,260	0,242										
11 : <i>Sardinella aurita</i>	0,246	0,205	0,235	0,268	0,235	0,258	0,211	0,237	0,231	0,095									
12 : <i>Carapus acus</i>	0,295	0,284	0,302	0,314	0,307	0,287	0,279	0,307	0,307	0,308	0,271								
13 : <i>Centrarchantus cirrus</i>	0,248	0,228	0,284	0,274	0,279	0,257	0,233	0,222	0,217	0,211	0,177	0,310							
14 : <i>Epigonus denticulatus</i>	0,258	0,231	0,287	0,250	0,287	0,248	0,235	0,218	0,214	0,231	0,208	0,258	0,226						
15 : <i>Cepola rubescens</i>	0,266	0,267	0,306	0,320	0,306	0,276	0,251	0,281	0,271	0,260	0,252	0,273	0,256	0,228					
16 : <i>Sciaena umbra</i>	0,284	0,257	0,275	0,269	0,275	0,286	0,262	0,260	0,244	0,258	0,228	0,277	0,252	0,238	0,281				
17 : <i>Lepidotrigla deiuzedei</i>	0,292	0,298	0,332	0,299	0,334	0,262	0,286	0,317	0,321	0,304	0,280	0,319	0,298	0,270	0,287	0,326			
18 : <i>Gnatophis mystax</i>	0,264	0,288	0,287	0,271	0,287	0,301	0,274	0,234	0,234	0,261	0,233	0,279	0,283	0,246	0,286	0,258	0,336		
19 : <i>Synchiropus phaeton</i>	0,279	0,275	0,251	0,280	0,251	0,271	0,235	0,228	0,219	0,278	0,255	0,289	0,271	0,246	0,270	0,266	0,313	0,261	
20 : <i>Benthocometes robustus</i>	0,295	0,259	0,305	0,289	0,305	0,284	0,264	0,276	0,267	0,280	0,250	0,221	0,275	0,257	0,289	0,278	0,322	0,290	0,299

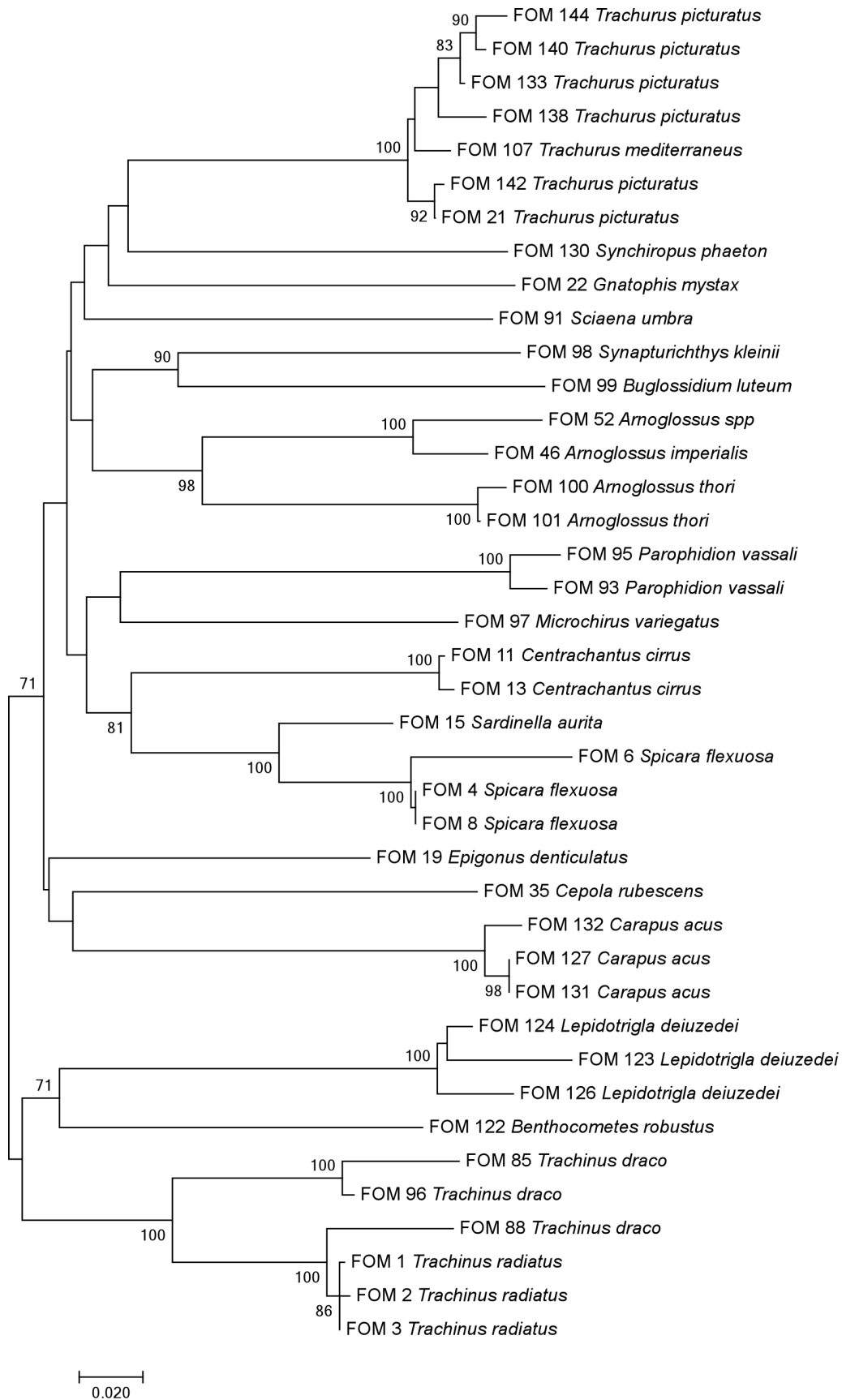
La variabilità intraspecifica ha assunto valori nulli per la maggior parte delle specie tranne che per quelle riportate nella tabella a seguire (Tab.: XVI).

**Tabella XVI:** Variabilità intraspecifica calcolata all'interno delle specie appartenenti alla Superclasse degli *Actinopterygii* analizzate nello studio.

	Variabilità intraspecifica	Errore standard
<i>Arnoglossus spp.</i>	0,14	0,01
<i>Trachinus draco</i>	0,11	0,01
<i>Trachinus radiatus</i>	0,00	0,00
<i>Trachurus picturatus</i>	0,02	0,00
<i>Spicara flexuosa</i>	0,03	0,01
<i>Centrarchantus cirrus</i>	0,01	0,00
<i>Lepidotrigla deiuzedei</i>	0,05	0,01
<i>Benthocometes robustus</i>	0,25	0,02

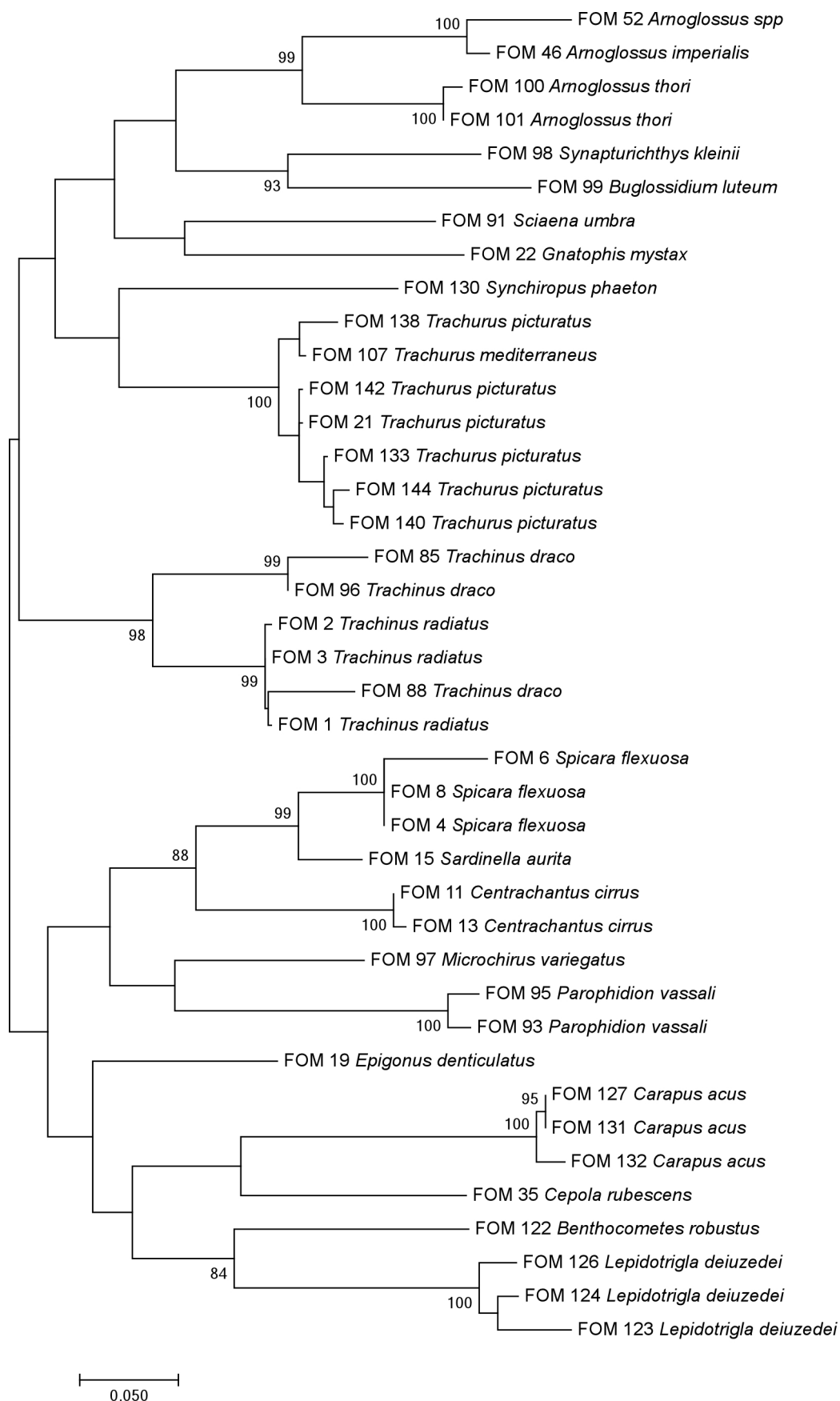
La ricostruzione filogenetica è stata condotta attraverso il metodo statistico di ricostruzione di alberi filogenetici del *Neighbor-joining* NJ (Fig.: 19) e del *Maximum Likelihood* ML (Fig.: 20).

La topologia dei due alberi filogenetici è congruente.



**Figura 19:** Albero *NeighborJoining* basato sul modello Kimura 2-parametri relativo alla sequenza di 640 bp della regione COI sequenziata negli individui appartenenti alla Superclasse degli *Actinopterygii*. Nei nodi sono indicati valori superiori al 70%.





**Figura 20:** Albero *Maximum Likelihood* basato sul modello Kimura 2-parametri relativo alla sequenza di 640 bp della regione COI sequenziata negli individui appartenenti alla Superclasse degli *Actinopterygii*. Nei nodi sono indicati valori superiori al 70%.

### 3.2.1 Pesci ossei: Confronto con le sequenze nucleotidiche (Atlantico) del *database GenBank*<sup>®</sup>

Anche per i campioni appartenenti alla Superclasse degli *Actinopterygii* è stata condotta una indagine comparativa confrontando le sequenze nucleotidiche ottenute per la regione COI mtDNA dei campioni analizzati provenienti dai campionamenti nel canale di Sicilia, con le corrispettive sequenze nucleotidiche presenti nel *database GenBank*<sup>®</sup>.

La scelta delle sequenze nel *database* ha prediletto quelle corrispondenti alle specie provenienti dall'Oceano Atlantico al fine di indagare su eventuali differenze significative, nel momento in cui ciò non è risultato possibile ci si è avvalsi delle sequenze del Mar Mediterraneo.

Le sequenze nucleotidiche relative ai pesci ossei atlantici, reperite nel *database GenBank*<sup>®</sup>, appartenenti all'ordine dei *Perciformes* relative a *Trachinus draco*, *Trachurus picturatus*, *Trachurus mediterraneus*, *Synchiropus phaeton* provengono dal lavoro condotto da Costa et al. nel 2012, così come la sequenza relativa a *Cepola macrophtalma* con la quale è stata confrontata la sequenza nucleotidica di *Cepola rubescens* per la prima volta ottenuta in questo studio.

La sequenza nucleotidica della specie *Sciaena umbra* atlantica è l'unica sequenza disponibile nel *database* per questa specie ed è relativa al lavoro condotto da Lo et al., nel 2015.

La sequenza nucleotidica per la specie atlantica di *Epigonus denticulatus* proviene dal lavoro condotto da Steinke et al., nel 2016.

Le sequenze nucleotidiche per *Trachinus radiatus* e *Trachurus mediterraneus*, ottenute dal *database GenBank*<sup>®</sup>, sono relative allo studio svolto da Landi et al., e pubblicato nel 2014, non essendo

disponibili per queste specie sequenze nucleotidiche di individui di provenienza atlantica. Analogamente la sequenze nucleotidiche di *Spicara flexuosa* e di *Centracanthus cirrus* ottenute in questo studio sono state comparate con le sequenze nucleotidiche provenienti dallo studio condotto da Cannas et al. nel 2012.

Non è stato possibile risalire, nel *database* GenBank<sup>®</sup>, a sequenze nucleotidiche di organismi atlantici per le specie appartenenti all'ordine degli *Ophidiiformes*. Le specie *Parophidion vassalli* e *Benthacometes robustus*, sono state sequenziale per la prima volta in questo studio. Per quanto riguarda *Parophidion vassalli* è stato possibile effettuare un confronto con le sequenze relative a *Parophidion schmidti* relative a due lavori, il primo condotto da Valdez-Moreno et al. 2009, il secondo da Weigt et al. nel 2012, rispettivamente nella barriera corallina dei Caraibi e nel Golfo del Messico.

Le sequenze nucleotidiche, presenti nel *database* GenBank<sup>®</sup> relativa a *Carapus acus*, provengono dallo studio condotto da Landi et al. nel 2014 in Mediterraneo.

Le sequenze nucleotidiche reperite nel *database* GenBank<sup>®</sup> per i corrispettivi individui atlantici dell'ordine *Pleuronectiformes*, analizzati in questo studio provengono dallo studio condotto da Espiñeira et al., nel 2008 nel caso delle specie *Arnoglossus imperialis*, *Arnoglossus thori*, *Synapturichthys kleinii*; dal lavoro pubblicato da Costa et al. (2012) per le sequenze atlantiche di *Arnoglossus imperialis* e *Microchirus variegatus*; dal recente lavoro pubblicato da Knelsberg et al., nel 2014 per le sequenze di *Microchirus variegatus* e *Buglossidium luteum*.

Sia per *Arnoglossus imperialis* che per *Microchirus variegatus*, sono presenti due sequenze atlantiche in quanto provenienti da lavori

differenti per indagare su eventuali differenze apprezzabili tra le sequenze.

La ricostruzione filogenetica è stata condotta attraverso il metodo statistico di ricostruzione di alberi filogenetici del *Neighbor-joining* NJ (Fig.: 21) e del *Maximum Likelihood* ML (Fig.: 22).

La topologia dei due alberi filogenetici è congruente.

In entrambi gli alberi, NJ e ML (Fig.21 e Fig. 22) tutti gli ordini appaiono non monofiletici; in quanto è palese che in nessuno di essi è ipotizzabile un antenato comune.

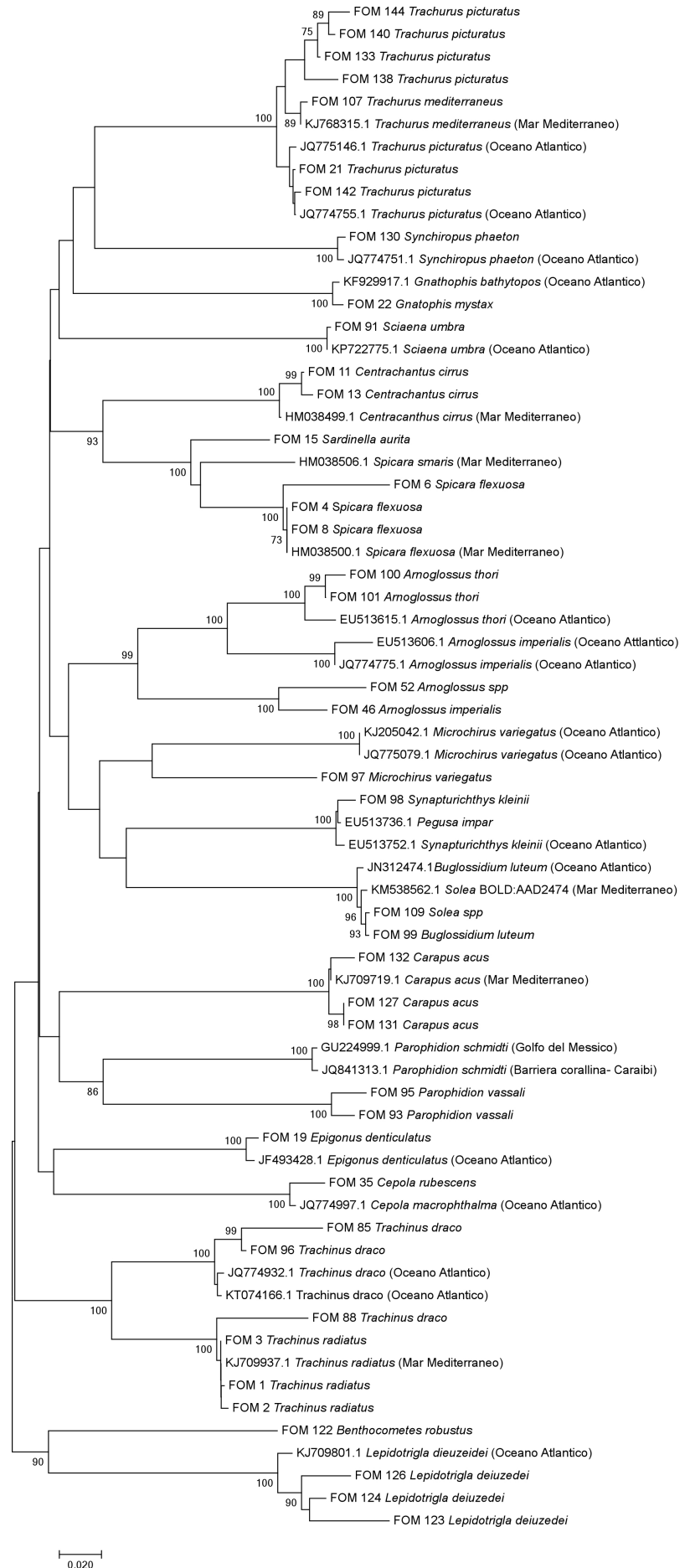
Sia in Fig.21 che in Fig. 22 l'ordine dei *Pleuronectiformes*, è l'unico tra tutti gli ordini di pesci ossei analizzati nello studio in cui le specie ad esso appartenenti *clusterizzano* tutte insieme.

Per l'ordine *Ophidiiformes*, in Fig. 21 (Albero NJ), le sequenze delle specie *Carapus acus* e *Parophidion vassali* si raggruppano insieme invece la specie *Benthocometes robustus* se ne distacca raggruppandosi con gli *Scorpaeniformes*; di contro lo stesso ordine (*Ophidiiformes*) in Fig. 22 (Albero ML) presenta le sequenze appartenenti alle tre specie (*Carapus acus*, *Parophidion vassali* e *Benthocometes robustus*) dislocate in posizioni diverse all'interno dell'albero pur mantenendo il raggruppamento per specie.

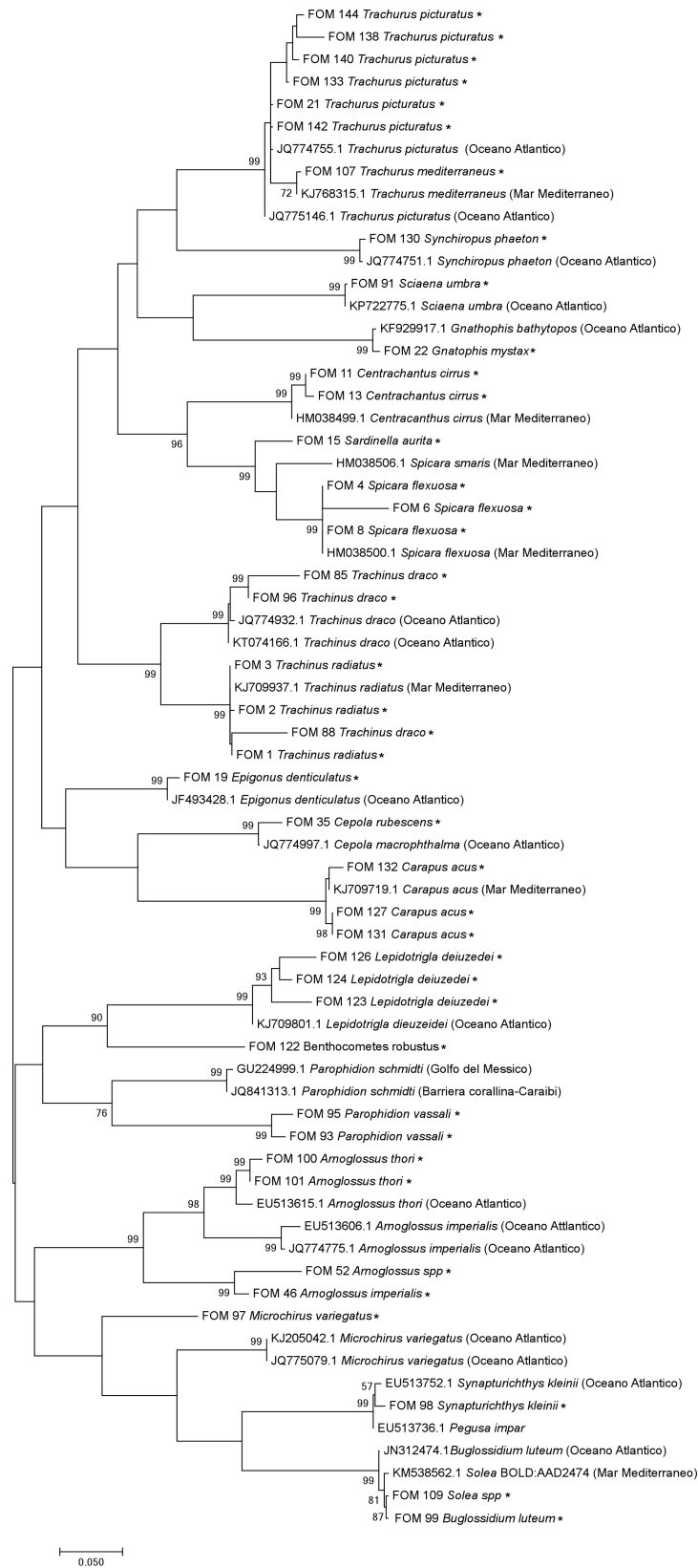
Per quanto riguarda l'ordine dei *Perciformes*, le sequenze dei campioni appartenenti alle specie *Centrarchantus cirrus*, *Epigonus denticulatus*, *Sciaena umbra*, *Spicara flexuosa*, *Synchiropus phaeton*, *Trachinus draco*, *Trachinus radiatus*, *Trachurus picturatus*, *Trachurus mediterraneus*, in entrambi gli alberi NJ ed ML (Fig.21 e Fig. 22) si trovano distanti l'una dall'altra, alternandosi alle sequenze delle specie appartenenti agli altri ordini analizzati nello studio.

Grazie al confronto delle sequenze ottenute per i pesci ossei con le sequenze nucleotidiche (Atlantico) reperite nel *database* GenBank<sup>®</sup>

è stato possibile mettere in risalto che per gli individui appartenenti alle specie *Arnoglossus imperialis*, *Arnoglossus thori*, *Buglossidium luteum*, *Trachinus draco*, *Trachinus radiatus*, *Trachurus mediterraneus*, *Trachurus picturatus*, vista l'elevata variabilità intraspecifica è possibile che si sia verificato qualche errore nella classificazione tassonomica basata sulle chiavi morfologiche di riconoscimento oppure che abbiamo a che fare con specie criptiche o con ibridi.



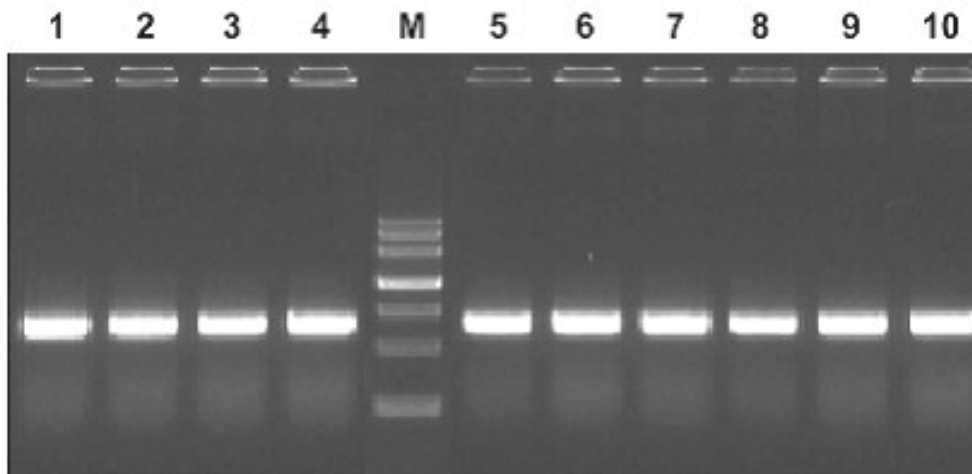
**Figura 21:** Albero *NeighborJoining* basato sul modello Kimura 2-parametri relativo alla sequenza di 640 bp della regione COI sequenziata negli individui appartenenti alla Superclasse degli *Actinopterygii* e alle sequenze nucleotidiche reperite nel GenBank®. Nei nodi sono indicati valori superiori al 70%.



**Figura 22:** Albero *Maximum Likelihood* basato sul modello Kimura 2-parametri relativo alla sequenza di 640 bp della regione COI sequenziata negli individui appartenenti alla Superclasse degli *Actinopterygii* e alle sequenze nucleotidiche reperite nel GenBank®. Nei nodi sono indicati valori superiori al 70%.

### 3.3 Messa a punto dell'utilizzo di un lisato grezzo di DNA (Tagliavia et. al, 2016) per le reazioni di PCR.

Come mostrato in Fig. 23, l'amplificazione PCR della regione "Barcode" COI da diversi esemplari di pesce (vedi la leggenda della figura per maggiori dettagli) ha prodotto una singola banda netta delle dimensioni molecolari previste, indicando che il lisato grezzo ottenuto con il metodo proposto non interferisce con attività della DNA polimerasi.

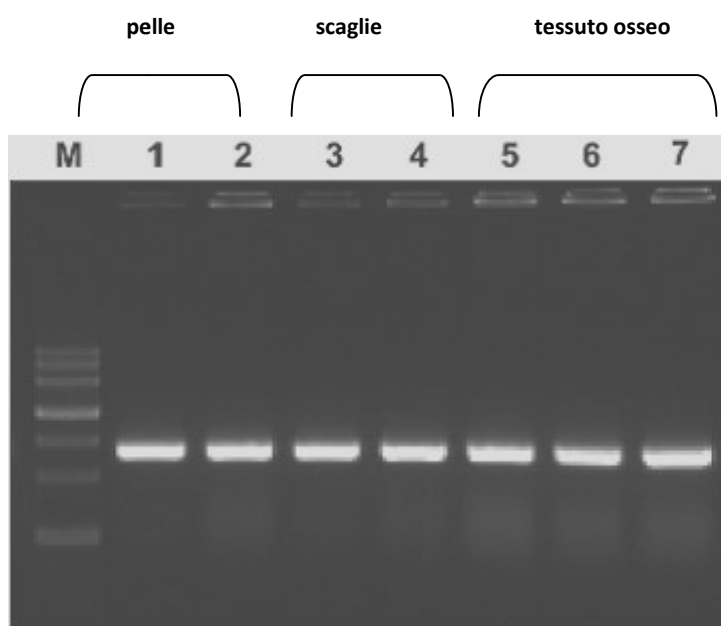


**Figura 23:** Risultati delle PCR da campioni di pesci diversi (Lanes 1-4), molluschi (lanes 5-6), e crostacei (lanes 7-10). M: GelPilot Wide Range Ladder (Qiagen); Lane 1: *Engraulis encrasicolus*, larva fissata in etanolo; Lane 2: *Engraulis encrasicolus*, tessuto muscolare; Lane 3: *Xiphias gladius*, tessuto muscolare; Lane 4: *Salmo salar*, tessuto muscolare; Lane 5: *Loligo vulgaris*, tentacolo; Lane 6: *Sepia officinalis*, tentacolo e Lane 7-10: tessuto muscolare da *Palinurus elephas*, *Parapenaeus longirostris*, *Aristeus antennatus* e *Nephrops norvegicus*.

Al fine di testare la versatilità di questa procedura, è stata effettuata l'estrazione del DNA da specie di molluschi e crostacei come seppie, calamari, gamberi, scampi e aragosta come descritto in precedenza. Nonostante la presenza di mucopolisaccaridi e proteine polifenoliche che si complessano con il DNA e interferiscono con l'elaborazione enzimatica dell'acido nucleico, è stato recuperato DNA amplificabile



ed i risultati sono riportati in Fig. 24. La procedura è stata applicata anche per la pelle, le scaglie, il sangue e le ossa, provenienti dalle prede digerite o dagli scarti dell'industria del pesce per validare l'efficienza di recupero di DNA amplificabile da differenti materiali di partenza. I campioni di acciughe, tonno e pesce spada sono stati trattati e analizzati con successo (Fig.25).

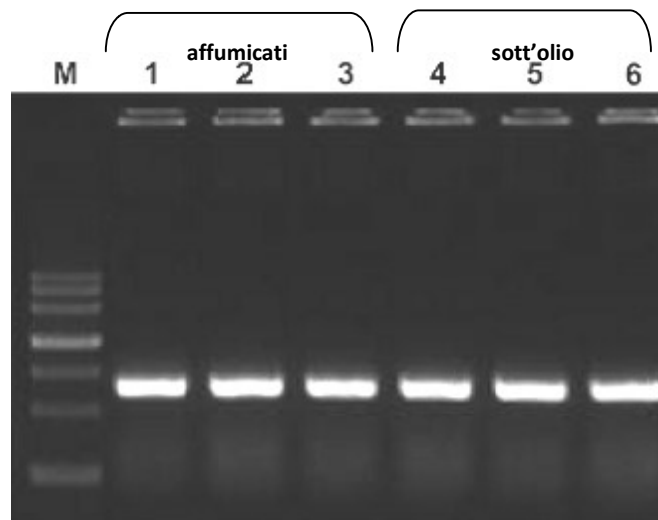


**Figura 24:** Risultati delle reazioni di PCR allestite utilizzando diversi materiali di partenza. M: *GelPilot Wide Range Ladder* (Qiagen); lane 1-2: pelle da *T. albacares* e *X. gladius*; lane 3-4: scaglie da *E. encrasicolus* e *S. salar*; lane 5-7: tessuto osseo da *X. gladius*, *T. thunnus* e *E. encrasicolus*.

La tecnica del DNA *Barcoding* è stato utilizzata con successo sia per l'autenticazione di diversi prodotti a base di pesce sia per rilevare la sostituzione fraudolenta degli ingredienti. Il recupero e l'analisi del DNA dal pesce trasformato e commercializzato possono risentire sia della degradazione che dalla presenza di inibitori di varia origine, a seconda del tipo di processamento che ha subito il pesce per la sua trasformazione. Nel pesce affumicato, categoria che racchiude prodotti di grande valore, il danno al DNA si ritiene sia abbastanza

limitato visto le basse temperature alle quali il prodotto viene lavorato, di contro i composti fenolici (essenziali per la conservazione degli alimenti), sono difficili da rimuovere e possono gravemente compromettere l'amplificazione PCR. Per valutare l'affidabilità della procedura qui proposta, sono state effettuate estrazioni di DNA e amplificazioni PCR da diversi prodotti ittici trasformati: salmone affumicato, tonno e pesce spada, oltre a tonno e le acciughe sottolio (dove il DNA si suppone ampiamente danneggiato per la lunga esposizione a temperature molto elevate, sia durante la cottura che durante la sterilizzazione dopo l'inscatolamento) sono stati sottoposti a lisi come descritto (Tagliavia et al., 2016).

I risultati ottenuti dalle amplificazioni PCR sono riportati in Figura 25.



**Figura 25:** Pannello rappresentativo dei risultati dei prodotti di PCR ottenuti da diversi prodotti ittici elaborati. *M:* *GelPilot Wide Range Ladder* (Qiagen); *Lanes 1-3:* *S. salar*, *T. thunnus* e *X. gladius*, affumicati; *Lanes 4-5:* *T. thunnus* ed *E. encrasicolus*, sottolio; *Lane 6:* controllo positivo, prodotto di PCR, a partire da DNA estratto mediante *QUIAquick DNeasy tissue and blood extraction kit* Quiagen®.

### 3.4 Realizzazione del *FishProfiler* DNA kit

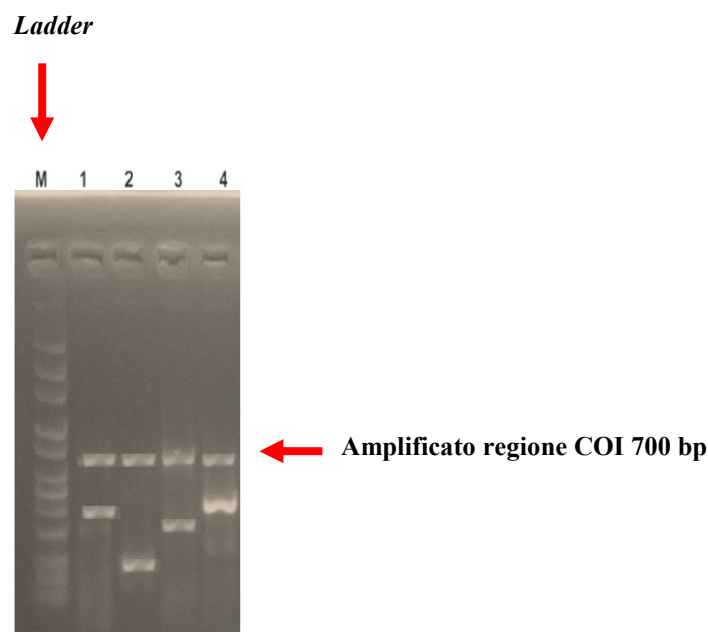
I prodotti di PCR sono stati verificati attraverso corsa elettroforetica con un opportuno *ladder* di riferimento (cioè un campione di frammenti di DNA di peso molecolare noto) su gel d'agarosio al 2% preparato ponendo 1 grammi di agarosio in 50 ml di una soluzione TAE 1x a cui è stato aggiunto 1 µl di GelRed™ (Biotium). Terminata la corsa elettroforetica il gel (Fig. 24) è stato osservato al transilluminatore a raggi UV. Le bande, relative alla regione della COI (controllo interno) amplificata mediante PCR dopo scorrimento elettroforetico, hanno rivelato una dimensione pari a circa 700 bp, le bande specie-specifiche hanno invece rilevato lunghezze (in bp) differenti, come atteso, come riportato nella tabella riportata di seguito (Tab. XV):

**Tabella XV:** Specie e lunghezza (in bp) della regione specie-specifica che garantisce il riconoscimento univoco della specie.

<i>Specie nome volgare</i>	<i>Specie binomio scientifico</i>	<i>Lunghezza in bp della regione specie-specifica</i>	<i>Gene in cui la regione specie-specifica è stata creata</i>
orata	<i>Sparus aurata</i>	280	COI
pesce spada	<i>Xiphias gladius</i>	400	COI
sardina	<i>Sardina pilchardus</i>	380	COI
sgombro	<i>Scomber scombrus</i>	370	COI
spigola	<i>Dicentrarchus labrax</i>	260	Cyt-b
aragosta	<i>Palinurus elephas</i>	460	COI
gambero rosso	<i>Aristaeomorpha foliacea</i>	370	COI
calamaro	<i>Loligo vulgaris</i>	200	Cyt-b
seppia	<i>Sepia officinalis</i>	450	COI
totano	<i>Todarodes sagittatus</i>	300	Cyt-b

<sup>a</sup>Forward Primer, <sup>b</sup>Reverse Primer

Di seguito (Fig.: 26) è riportata l'immagine di un gel relativo, alla messa a punto del *kit*.



**Figura 26** : Fotografia del gel d'agarosio (2 %) colorato con GelRed™ osservato al transilluminatore UV relativo alla amplificazione della regione COI (controllo interno) in tutti i campioni e della regione specie-specifica. M: 100 bp DNA Ladder Invitrogen™; Lane 1: *Todarodes sagittatus*; Lane 2 *Loligo vulgaris*; Lane 3 *Aristaeomorpha foliacea*; Lane 4 *Palinurus elephas*.

Le bande relative alla regioni specie-specifiche amplificate, sono state tagliate dal gel come bande discrete; il prodotto di PCR è stato purificato mediante *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen); il DNA estratto dalla banda e risospeso in acqua sterile ed una aliquota di esso è stato allestito per essere inviato al servizio di sequenziamento automatizzato affidato alla MACROGEN® in Olanda.

Dai cromatogrammi ricevuti, è stato possibile risalire alle sequenze nucleotide delle sequenze "specie-specifiche" che è stata amplificata per ognuna delle 10 specie. Le sequenze così ottenute sono state utilizzate per effettuare le *query online* nel database GenBank®.

Per tutte e 10 le *query* (le 10 specie selezionate con le quali è stato allestito il *kit*) sono state ottenute percentuali di identità pari al 100% per la specie processata per la quale sono stati creati i *primer* specie-specifici. Confermando l'efficacia identificativa del *kit FishProfiler DNA kit*.

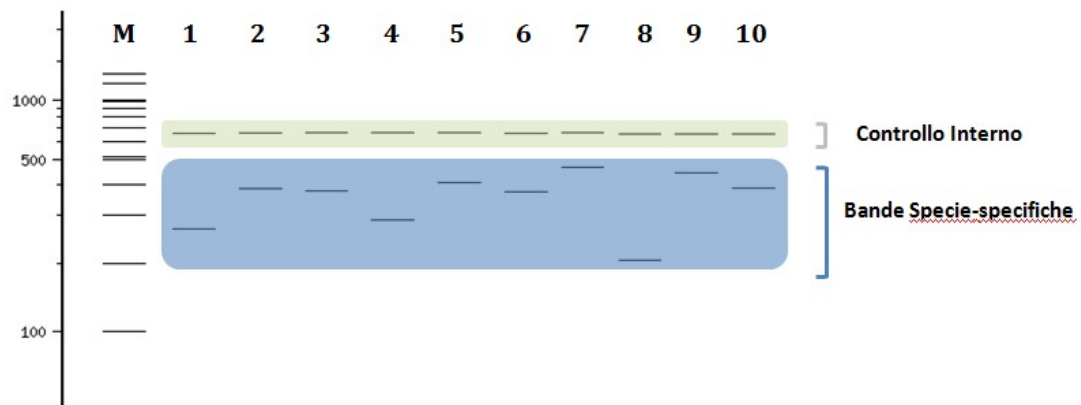
Il *FishProfiler DNA kit* è corredato di:

- Sol 1: 200 mM KOH, 2 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 0,2% Triton X-100;
- Sol 2: Tris-HCl 100 mM;
- *primer* mix U1\* 10 μM *primer* (Ward et al., 2005) rappresenta il controllo interno per i campioni di pesci
- *primer* mix U2\* :*primer* (Folmer et al., 1994) rappresenta il controllo interno per i campioni di crostacei
- *primer* ID<sub>1-10</sub>\* :*primer* specifici per ogni singola specie
- Protocollo di estrazione del DNA per l'identificazione di specie ittiche marine
- Preparazione della mix di reazione per l'amplificazione PCR\*\*
- Profilo di reazione PCR;
- Schema riassuntivo dei risultati attesi per le singole specie su gel d'agarosio al 2% dopo scorrimento elettroforetico riportato di seguito (Fig.: 27)

\* I primer devono essere risospesi in 125 μl di acqua distillata.

\*\* La DNA Polymerase (*Thermo Scientific*), il tampone 1x (*Reaction buffer*) ed i nucleotidi trifosfato non sono inclusi nel *kit*.

**Figura 27** :Schema riassuntivo dei risultati attesi per le singole specie su gel d'agarosio al 2% dopo corsa elettroforetica.; la banda corrispondente a 650 bp rappresenta il controllo interno, le altre bande rappresentano il controllo specie-specifico per ogni differente specie.



M: *ladder* di riferimento 100 bp DNA; Lane 1: *Dicentrarchus labrax*; Lane 2: *Sardina pilchardus*; Lane 3: *Scomber scombrus*  
 Lane 4: *Sparus aurata*; Lane 5: *Xiphias gladius*; Lane 6: *Aristaeomorpha foliacea*; Lane 7: *Palinurus elephas*; Lane 8: *Loligo vulgaris*  
 Lane 9: *Sepia officinalis*; Lane 10: *Todarodes sagittatus*.

## 4. Discussioni

In questo studio sono stati analizzati 88 campioni appartenenti al subphylum dei Crostacei. L'identificazione molecolare delle specie analizzate, è stata condotta effettuando un'analisi BLAST utilizzando il *database* GenBank<sup>®</sup> e il BOLD *Datasytem*.

La variabilità genetica intraspecifica è stata calcolata per tutte le specie di crostacei analizzati. Il valore di zero ottenuto per la maggior parte delle specie conferma che il gene COI è un marcatore molecolare informativo a diverse scale tassonomiche, ma soprattutto a livello di specie (Matzen da Silva, 2011). I risultati ottenuti relativi alla variabilità genetica intraspecifica per *Thoralus cranchii*, *Rissoides desmaresti*, *Dardanus arrosor*, *Meganyctiphanes norvegica*, *Thysanoessa gregaria* e *Pasiphaea sivado* evidenziano un *range* di variabilità intraspecifica; nel caso specifico delle sequenze ottenute per *Meganyctiphanes norvegica*, il *range* di variabilità intraspecifica assume un valore più ampio, in questa specie quindi la COI non rappresenta un buon *marker* molecolare per l'attribuzione della specie in quanto non è altamente conservato.

Come si evince dagli alberi filogenetici il gene COI è abbastanza affidabile come marcatore molecolare nell'identificazione molecolare delle specie. L'analisi filogenetica del set completo ha mostrato una separazione chiara e ben sostenuta a livello delle specie.

Il gene COI è un *locus* che non discrimina tra *Pisa nodipes* e *Pisa armata*, sebbene mantenga la sua valenza tra *Pisa hirticornis* e *Pisa tetraodon*; al fine di meglio discriminare la bassa divergenza tra *Pisa nodipes* e le altre specie del genere *Pisa* dovrebbero essere indagati altri marcatori quali 16S, Cyt-b, etc. prima di arrivare alla conclusione di aver sbagliato nell'identificazione attraverso le chiavi di

identificazione morfologica che aveva condotto all'identificazione di una nuova specie, lo stesso vale per la specie *Thoralus cranchii* i cui campioni analizzati nello studio presentano larga divergenza.

I valori calcolati per la composizione nucleotidica media della regione COI per i campioni di crostacei sono in accordo con quelli riportati in Jarman et al. (2001), dove le quattro basi azotate assumono i seguenti valori di media percentuale: A: 0,271, C: 0,213, G: 0,185, T: 0,331, Analogamente a quanto descritto in Jarman et al. (2001) tali valori sono ben diversi dal valore medio atteso di 0,25 per ognuno.

I 41 campioni di pesci ossei, sono stati reperiti tenendo conto del lavoro già svolto da Landi M. et al., nel 2014, puntando a coprire le informazioni per un maggior numero di specie mediterranee censite attraverso *Barcode*. Anche per i pesci l'identificazione molecolare delle specie analizzate, è stata condotta effettuando un'analisi BLAST utilizzando il *database* GenBank<sup>®</sup> e il BOLD *Datasystem*.

È stata pertanto verificata la possibilità di utilizzare la procedura del DNA *Barcoding* per identificare i campioni a livello di specie a partire dal tessuto di pesci catturati nel centro del Mar Mediterraneo, il quale contribuisce notevolmente alla biodiversità dell'ittiofauna marina europea. Il DNA *Barcoding* rappresenta uno strumento empirico per discriminare le specie strettamente correlate. La validità del DNA *Barcoding* sul nostro *dataset* regionale è simile a quello osservato per l'ittiofauna di altre regioni (Steinke et al., 2009; Ward et al., 2005).

Contrariamente a quanto osservato in Costa et al., 2012, i vari *taxa* all'interno degli alberi non si raggruppano in base alla loro gerarchia tassonomica in *cluster* monofiletici.



La distanza nucleotidica è stata calcolata all'interno di tutti gli ordini di pesci ossei ottenendo i seguenti valori: per gli *Ophidiiformes* 0,231, per i *Perciformes* 0,232, per i *Pleuronectiformes* 0,209 e per gli *Scorpaeniformes* 0,162.

Tali valori risultano maggiori o uguali al valore 0,16 ottenuto nel lavoro di Lakra et al., 2011.

Inoltre la variabilità intraspecifica ha assunto valori diversi di zero solo per le specie *Arnoglossus spp.*, *Trachinus draco*, *Trachinus radiatus*, *Trachurus picturatus*, *Spicara flexuosa*, *Centrachantus cirrus*, *Lepidotrigla deiuzedei*, *Benthocometes robustus*, avvalorando l'idea che il gene COI è in grado di discriminare tra alcune specie meno che tra altre appartenenti allo stesso genere.

Per esempio il gene COI discrimina bene nel genere *Trachinus* tra *Trachinus draco* e *Trachinus radiatus* ciò invece non accade per il genere *Trachurus*, infatti negli alberi filogenetici le specie *Trachurus mediterraneus* e *Trachurus picturatus* non segregano distintamente.

Quanto accade per i *Trachurus* non è in accordo con quanto descritto in Landi M. et al., nel 2014. In tale studio infatti si è visto che le tre specie congeneriche di *Trachurus* (specie *Trachurus mediterraneus*, *Trachurus picturatus* e *Trachurus trachurus*) pur esibendo una bassa media di distanza congenerica, formano braccia separate nell'albero (NJ). Ciò porta a pensare che i campioni analizzati nello studio presentano una distanza congenerica ancora più bassa di quella riscontrata in Landi et al., 2014.

Per quanto riguarda gli individui appartenenti alla specie *Arnoglossus imperialis*, considerata l'elevata distanza genetica con il raggruppamento degli individui in un braccio dell'albero a parte, separati anche dalla sequenza GenBank® alla specie relativa., è

possibile che si siano verificate delle classificazioni erranee avendo a che fare con “specie morfologicamente sorelle” ovvero specie criptiche. Le sequenze dei campioni FOM99 *Buglossidium luteum* e FOM109 *Solea spp* sia in Figura 21 che in Figura 22, segregano insieme *clusterizzando* con le sequenze GeneBank<sup>®</sup> relative sia a *Buglossidium luteum* che a *Solea spp.*. Trattandosi però di un solo individuo analizzato per specie, non è facile capire se si è incorsi in un errore di classificazione, inoltre la sequenza GeneBank<sup>®</sup> per *Solea spp.* è anchessa generica quindi non è possibile essere accurati nell'interpretazione del dato.

Nella maggior parte dei casi le analisi condotte attraverso DNA *Barcoding* è rivolta alla catalogazione di campioni sia di esemplari adulti che larve. Il fatto che spesso trascorra del tempo tra il campionamento e le analisi genetiche, prevede che essi vengano conservati in frigorifero o congelati o preservati in alcol. L'utilizzo di un lisato grezzo di DNA per il *Barcoding* dei campioni presenta vantaggi quali l'autenticazione di diversi prodotti a base di pesce e il rilevamento di sostituzione fraudolenta degli ingredienti. I risultati ottenuti nel recupero e nell'analisi del DNA dal pesce trasformato (congelato, affumicato e cotto) che può risentire sia della degradazione che della presenza di inibitori di varia origine, a seconda del tipo di processamento che ha subito il pesce per la sua trasformazione, fanno sì che il metodo di estrazione messo a punto rappresenti una valida alternativa ai *kit* commerciali per l'estrazione del DNA presenti sul mercato.

Il metodo precedentemente descritto, è una rivisitazione di quello utilizzato da Rudbeck & Dissing (1998), in cui l'uso di NaOH per il trattamento alcalino, necessario alla digestione del campione, si trasforma in NaCl dopo la neutralizzazione. Il NaCl esercita un effetto

concentrazione-dipendente inibitorio nella reazione di PCR, che può causare il fallimento dell'amplificazione di alcune sequenze. Di contro, il KCl è ben noto per coadiuvare l'attività della DNA Taq polimerasi su larga scala, tanto è vero che esso è comunemente incluso come componente della maggior parte dei *buffer* per le reazioni di PCR.

In ultima analisi, i costi irrisori dei reagenti utilizzati, rendono tale metodo appetibile nel momento in cui si debba processare un elevato numero di campioni come accade per le analisi di genetica di popolazione sulle larve di pesce.

La realizzazione del *FishProfiler DNA Kit*, rappresenta, nella sua semplicità di progettazione e di utilizzo il punto di partenza per l'utilizzo dei marcatori genetici per identificare le specie e/o varietà del pescato, e di fornire ai produttori uno strumento efficace di controllo della qualità di filiera nel rispetto della normativa vigente ed a basso costo.

In Galimberti et al. 2010, si riportano le motivazioni per cui in pochi anni il DNA *Barcoding* si sia guadagnato l'appellativo di strumento universale per la tracciabilità alimentare. Pur non essendo, da un punto di vista meramente tecnico, molto innovativo, in pochi anni è diventato ampiamente utilizzato. Tale successo è stato assicurato da una combinazione di fattori: la caduta del costo delle analisi molecolari; la crescente disponibilità di laboratori attrezzati e personale specializzato; la presenza di *database* di sequenze nucleotidiche liberamente fruibili *online*; la crescente quantità di consumatori informati che richiedono elevati *standard* di qualità nei prodotti alimentari. Questo scenario ha generato la richiesta di una

tecnica basata sulla molecolarizzazione, standardizzazione e informatizzazione.

Il lavoro condotto da Filonzi et al. 2010, ha previsto l'utilizzo del DNA *Barcoding* attraverso sequenziamento diretto di circa 900 bp relativi ai geni mitocondriali citocromo ossidasi subunità I (COI) e citocromo b (*Cyt b*) per rilevare attraverso *Barcoding* molecolare gli errori di etichettatura dei prodotti ittici commerciali in Italia.

In questo scenario la realizzazione del *FishProfiler* DNA Kit unifica la robustezza del gene COI, amplificato mediante PCR con i *primer* universali per i pesci (Ward et al. 2005) con l'amplificazione di regioni specie-specifiche, nella discriminazione della specie disegnati con *software* dedicati al livello della COI e del *Cyt b*. Il successo delle due amplificazioni PCR garantisce l'univocità dell'identificazione della specie certificando l'autenticità del prodotto commercializzato, senza ricorrere al costoso sequenziamento nucleotidico automatizzato.

## 5. Conclusioni

Lo studio condotto sui campioni appartenenti al subphylum dei *Crustacea* e alla Superclasse degli *Actinopterygii*, ha permesso, grazie ai dati molecolari ottenuti, di contribuire alla valutazione della biodiversità in Mediterraneo.

Per i crostacei sono state caratterizzate per la prima volta le sequenze nucleotidiche relative alla regione COI mtDNA per *Alphaeus glaber* e *Pisa nodipes*.

Le altre specie, appartenenti all'ordine *Decapoda*, *Euphausiacea*, *Calanoida* e *Stomatopoda* analizzate nello studio, fin ora erano presenti nel *database* GenBank<sup>®</sup> solo per individui di provenienza atlantica e del Mare del Nord.

Risulta quindi importantissimo avere per la prima volta sequenze nucleotidiche relative ad individui di origine mediterranea, visto che la determinazione della diversità genetica intraspecifica ha un ruolo fondamentale nella delimitazione dei confini delle specie.

Il DNA *Barcoding* non rappresenta, in questo contesto, solo uno strumento a supporto della Tassonomia tradizionale, ma il mezzo attraverso il quale arricchire i *dataset* di riferimento (GenBank<sup>®</sup> e BOLD) per i futuri studi di biomonitoraggio ambientale dove trovano applicazione anche le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS) attraverso approccio molecolare *metabarcoding*.

Per quanto riguarda i peci ossei, sono state ottenute per la prima volta in questo studio, le sequenze nucleotidiche relative alla regione COI mtDNA per le specie *Benthocometes robustus* e *Parophidion vassali*.

Anche per gli individui di pesci ossei, come per i crostacei analizzati in questo studio, è stato importantissimo risalire a sequenze nucleotidiche relative alla regione COI mtDNA per specie mediterranee in quanto per la maggioranza delle specie trattate queste non erano presenti.

Dallo studio condotto si sottolinea il potere discriminatorio del DNA *Barcoding* come strumento risolutivo a livello di specie a partire da sequenze di *query*. Esso permette di identificare le specie ittiche e di identificare in maniera univoca e precisa campioni di DNA in diversi contesti.

Il DNA *Barcoding* è veloce, economicamente efficiente e permette l'identificazione di specie da campioni biologici diversi.

In questo scenario, la procedura di estrazione del DNA totale (come lisato grezzo) metodo in questo studio messo a punto, dimostra di non essere soggetto a limitazioni, rivelandosi molto efficace nelle analisi dei campioni, indipendentemente dalle condizioni di conservazione (congelamento, affumicatura, fissazione fisica o chimica), dal tipo di tessuto e dalle tecniche di conservazione alimentari. La possibilità di utilizzare campioni come scaglie permette di analizzare sia pesci vivi che pesci freschi non processati, senza danneggiare gli animali o compromettere la qualità del prodotto. La procedura qui testata è rapida, economica, semplice e affidabile, fornendo un protocollo molto efficiente per una rapida determinazione della variabilità genetica per verificare l'identità delle specie.

Contestualmente alla messa a punto ed alla validazione del metodo di estrazione del DNA, l'attività condotta che ha consentito di realizzare un *kit* per l'identificazione rapida di 10 specie di pregio selezionate (*Xiphias gladius*, *Sardina pilchardus*, *Scombers scombrus*, *Sparus*

*aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Sepia officinalis*, *Loligo vulgaris*, *Todarodes sagittatus*, *Palinurus elephas* e *Aristaeomorpha foliacea*), rappresenta un punto di partenza cruciale nella certificazione del prodotto ittico su scala economico-commerciale, corredando il prodotto ittico di una certificato di autenticità permettendone una commercializzazione ad un costo adeguato.

La tipologia di analisi sviluppata, sfruttando l'efficacia e la robustezza dell'approccio *Barcode*, unendolo all'utilizzo di *primer* specie-specifici, consente l'identificazione rapida delle specie in oggetto, attraverso semplici reazioni di amplificazioni PCR di verifica, senza necessità di ricorrere al più lungo e costoso sequenziamento del DNA.

Il *kit* realizzato (IAMC-CNR Prot. N°0008428 del 18/07/2016) consente al contempo la rapida estrazione del materiale genetico e la sua analisi.

## Bibliografia

Ahyong, S.T., Lowry, J.K., Alonso, M., Bamber, R.N., Boxshall, G.A., Castro, P., Gerken, S., Karaman, G.S., Goy, J.W., Jones, D.S., Meland, K., Rogers, C.R., Svavarsson, J. (2011). Subphylum Crustacea Brünnich, 1772. In: Zhang Z-Q (Ed.) Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa* 3148: 165–191.

Al-Rshaidat, M. M.D., Snider, A., Rosebraugh, S., Devine, A. M., Devine, T. D., Plaisance, L., Knowlton, N., Leray, M. (2016). Deep COI sequencing of standardized benthic samples unveils overlooked diversity of Jordanian coral reefs in the northern Red Sea. *Genome* 59: 724–737 (2016) [dx.doi.org/10.1139/gen-2015-0208](https://doi.org/10.1139/gen-2015-0208).

Appeltans, W., Ahyong, S.T., Anderson, G., Angel, M.V., Artois, T., Bailly, N., Bamber, R., Barber, A., Bartsch, I., Berta, A., Blazewicz-Paszkowycz, M., Bock, P., Boxshall, G., Boyko, C.B., Brandão, S.N., Bray R.A., Bruce N.L., Cairns, S.D., Chan, T-Y., Cheng, L., Collins, A.G., Cribb, T., Curini-Galletti, M., Dahdouh-Guebas, F., Davie, P.J.F., Dawson, M.N., De Clerck, O., Decock, W., De Grave, S., de Voogd, N.J., Domning, D.P., Emig, C.C., Erseus, C., Eschmeyer, W.N., Fauchald, K., Fautin, D.G., Feist, S.W., Fransen, C.H.J.M., Furuya, H., Garcia-Alvarez, O., Gerken, S., Gibson, D., Gittenberger, A., Gofas, S., Gómez-Daglio, L., Gordon, D.P., Guiry, M.D., Hernandez, F., Hoeksema, B.W., Hopcroft, R.R., Jaume, D., Kirk, P., Koedam, N., Koenemann, S., Kolb, J.B., Kristensen, R.M., Kroh, A., Lambert, G., Lazarus, D.B., Lemaitre, R., Longshaw, M., Lowry, J.K., Macpherson, E., Madin, L.P., Mah, C., Mapstone, G., McLaughlin, P.A., Mees, J., Meland, K., Messing, C.G., Mills, C.E., Molodtsova, T.N., Mooi, R., Neuhaus, B., Ng, P.K.L., Nielsen, C., Norenburg, J.L., Opresko, D.M., Osawa, M., Paulay, G., Perrin, W., Pilger, J.F., Poore, G.C.B., Pugh, P., Read, G.B., Reimer, J.D., Rius, M., Rocha, R.M., Saiz-Salinas, J.I., Scarabino, V., Schierwater, B., Schmidt-Rhaesa, A., Schnabel, K.E., Schotte, M., Schuchert, P., Schwabe, E., Segers, H., Self-Sullivan, C., Shenkar, N., Siegel, V., Sterrer, W., Stöhr, S., Swalla, B.J., Tasker, M.L., Thuessen, E.V., Timm, T., Todaro, M.A., Turon, X., Tyler, S., Uetz, P., van der Land, J., Vanhoorne, B., van Ofwegen, L.P., van Soest, R.W.M., Vanaverbeke, J., Walker-Smith, G., Walter, T.C., Warren, A., Williams, G.C., Wilson, S.P., Costello, M.J. (2012). The magnitude of global marine species diversity. *Current Biology* 22: 2189–2202. doi: 10.1016/j.cub.2012.09.036.

Armstrong, K.F., Ball, S.L. (2005). DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philos T Roy Soc B* 360: 1813–1823.

Arroyave, J., & Stiassny, M. L. J. (2014). DNA barcoding reveals novel insights into pterygophagy and prey selection in distichodontid fishes (Characiformes: Distichodontidae). *Ecology and Evolution*, 4(23), 534–4542.

Azzurro, E., Moschella, P., Maynou, F. (2011). Tracking Signals of Change in



Mediterranean Fish Diversity Based on Local Ecological Knowledge. PLoS ONE 6: e24885.

Avice, J.C. (2000). Phylogeography, the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge (Massachusetts), London (England).

Baird, D.J., Pascoe, T.J., Zhou, X., Hajibabaei, M. (2011). Building freshwater macroinvertebrate DNA-barcode libraries from reference collection material: formalin preservation vs. specimen age. Journal of the North America Benthological Society 30: 125–130. doi: 10.1899/10-013.1.

Barbuto, M., Galimberti, A., Ferri, E., Labra, M., Malandra, R., Galli, P., 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.

Bauer, T., Weller, P., Hammes, W. P., & Hertel, C. (2003). The effect of processing parameters on DNA degradation in food. European Food Research Technology, 217, 1438–2377.

Becker, S., Hanner, R., & Steinke, D. (2011). Five years of FISH-BOL: Brief status report. Mitochondrial DNA, 22, 3–9.

Bergsten, J., Bilton, D.T., Fujisawa, T., Elliott, M., Monaghan, M.T., et al. (2012). The effect of Geographical Scale of Sampling on DNA Barcoding. Syst Biol 61: 1–19.

Bianchi, N. C. (2007). Biodiversity issues for the forthcoming tropical editerranean Sea, Hydrobiologia 580:7–21.

Bianchi, C.N., Morri, C. (2000). Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. Mar Pollut Bull 40: 367–376.

Bilgin, R. (2014). DNA barcoding of twelve shrimp species (Crustacea: Decapoda) from Turkish seas reveals cryptic diversity. Unpublished - Direct submission on *database* GenBank® by Institute of Environmental Sciences, Bogazici University, Rumelihisarustu, Istanbul, Bebek 34342, Turkey

Boxshall,G.A. (2007). Crustacean classification: on-going controversies and unresolved problems. Zootaxa, 1668, 313–325.

Brown, W.M.; George, M.J.R.; Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76, 1967-1971.

Bucklin, A., Ortman, B. D., Jennings, R. M., Nigro,L. M., Sweetman, C. J., Copley, N.

J., Sutton, T. Wiebe, P.H. (2010). A “Rosetta Stone” for metazoan zooplankton: DNA barcode analysis of species diversity of the Sargasso Sea (Northwest Atlantic Ocean). ELSEVIER Volume 57, Issues 24–26, December 2010, Pages 2234–2247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2010.09.025>.

Bucklin, A.C., Smolenack, S.B., Pierson, J.J. and Wiebe, P.H. (2001) Molecular systematic assessment of euphausiid species of eight genera using DNA sequences of mitochondrial COI and nuclear 18S rRNA. Unpublished - Direct Submission on *database* GENBANK by Ocean Process Analysis Laboratory, University of New Hampshire, 142 Morse Hall, Durham, NH 03824, USA.

Bucklin, A.C., Wiebe, P.H., Smolenack, S.B., Copley, N.J., Beaudet, J.G., Pierson, J.J. (2004). Comparative molecular and morphological assessment of 35 species and eight genera of euphausiids (Euphausiacea, Crustacea). Unpublished - Direct Submission on *database* GENBANK by Ocean Process Analysis Laboratory, University of New Hampshire, 142 Morse Hall, Durham, NH 03824, USA.

Cannas, R., Manunza, A., Sabatini, A. and Cau, A. (2012). Molecular evidence of the erroneous synonymization of *Spicara flexuosa* and *S. maena* as a single species and of the polyphyly of the *Centracanthidae* family. Unpublished - Direct submission on *database* GENBANK by Dip Biologia Animale ed Ecologia, Università di Cagliari, via T. Fiorelli, 1, Cagliari 09126, Italy.

Cawthorn, D. M., Steinman, H. A., & Hoffman, L. C. (2013). A high incidence of species substitution and mislabelling detected in meat products sold in South Africa. *Food Control*, 32(2), 440–449.

Cooper, D.N.; Krawczac, M.; Antonarakis, S.E. (1995). The nature and mechanism of human gene mutation. In: Scriver, C.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D.; *Metabolic and molecular basis of inherited diseases*. New York, 259-291.

Costa, F.O., Carvalho, G.R. (2007). The Barcode of Life Initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of fish. *Genomics, Society and Policy* 3: 29–40.

Costa, F.O., Carvalho, G.R. (2010). New insights into molecular evolution: prospects from the Barcode of Life Initiative (BOLI). *Theor Biosci* 129: 149–157.

Costa, F.O., deWaard, J.R., Boutillier, J. et al. (2007). Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64, 272–295.

Costa, F.O., Landi, M., Martins, R., Costa, M.H., Costa, M.E., et al. (2012). A ranking system for reference libraries of DNA barcodes: application to marine fish species from Portugal. *PLoS ONE* 7: e35858.

Sammy De Grave<sup>1</sup>, N. Dean Pentcheff<sup>2</sup>, Shane T. Ahyong<sup>3</sup>, Tin-Yam Chan<sup>4</sup>, Keith A. Crandall<sup>5</sup>, Peter C. Dworschak<sup>6</sup>, Darryl L. Felder<sup>7</sup>, Rodney M. Feldmann<sup>8</sup>, Charles H. J. M. Fransen<sup>9</sup>, Laura Y. D. Goulding<sup>1</sup>, Rafael Lemaitre<sup>10</sup>, Martyn E. Y. Low<sup>11</sup>, Joel W. Martin<sup>2</sup>, Peter K. L. Ng<sup>11</sup>, Carrie E. Schweitzer<sup>12</sup>, S. H. Tan<sup>11</sup>, Dale Tshudy<sup>13</sup>, Regina Wetzer<sup>2</sup>, (2009). A CLASSIFICATION OF LIVING AND FOSSIL GENERA OF DECAPOD CRUSTACEANS. RAFFLES BULLETIN OF ZOOLOGY 2009 Supplement No. 21: 1–109.

Dincă, V., Zakhharov, E.V., Hebert, P.D.N., Vila, R. (2010). Complete DNA barcode reference library for a country's butterfly fauna reveals high performance for temperate Europe. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 278: 347–355. doi: 10.1098/rspb.2010.1089.

Espiñeira, M., González-Lavín, N., Vieites, J.M., Santaclara, F.J. (2008). Development of a method for the genetic identification of flatfish species on the basis of mitochondrial DNA sequences. *J Agric Food Chem.*; 56(19):8954-61. doi: 10.1021/jf800570r.

Everstine, K., Spink, J., & Kennedy, S. (2013). Economically motivated adulteration (EMA) of food: Common characteristics of EMA incidents. *Journal of Food Protection*, 76(4), 723–735.

FAO (2003a). Trends in oceanic captures and clustering of large marine ecosystems - 2 studies based on the FAO capture database. FAO fisheries technical paper 435. 71 p.

FAO (2003b). Fisheries Management-2. The Ecosystem Approach to Fisheries.

FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries 4. 112 p.

Fevolden, S.E., Ayala, F.J. (1981). Enzyme polymorphism in Antarctic krill (*Euphausiacea*): genetic variation between populations and species. *Sarsia* 66: 167–181.

Filonzi, L., Chiesa, S., Vaghi, M., & Nonnis Marzano, F. (2010). Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. *Food Research International*, 43, 1383–1388.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., et Vrijenhoek (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.

Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., et al. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International.*, 50, 55-63.

Gancitano, V., Garofalo, G., Gristina, M., Ragonese, S., Giusto, G. B., Rizzo, P., Sinacori, G., Gancitano, S., Cusumano, S., Ingrande, G., Badalucco, C., Massi, D., Titone, A., Sieli, G., Rizzo, F., Campanella, N., Piazza, I., Milazzo, A., Fiorentino, F.F., (Resp.).(2014). Programma nazionale Italiano per la raccolta di dati alieutici 2011-2013. Campagne di ricerca in mare (Sezione G) nel 2013. Rapporto tecnico ed analisi finale, IAMC-CNR, Mazara del Vallo (TP), Italia, 80 pp.

Hajibabaei, M., Smith, M.A., Janzen, D.H., Rodriguez, J.J., Whitfield, J.B., et al. (2006). A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol Ecol Notes* 6: 959–964.

Handy, S. M. et al. (2011). A single laboratory validated method for the generation of DNA barcodes for the identification of fish for regulatory compliance. *J AOAC Int* 94, 201–210.

Hanner, R., 2009. Data standards for BARCODE records in INSDC (BRIs). Available at: [http://www.barcoding.si.edu/PDF/DWG\\_data\\_standards-Final.pdf](http://www.barcoding.si.edu/PDF/DWG_data_standards-Final.pdf)

Hanner, R., Becker, S., Ivanova, N.V., Steinke, D. (2011). FISH-BOL and seafood identification: Geographically dispersed case studies reveal systemic market substitution across Canada. *Mitochondrial DNA* 22: 106–122.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR (2003). Biological identification through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270: 313–322.

Holmes, B.H., Steinke, D., Ward, R.D. (2009). Identification of shark and fin rays using DNA barcoding. *Fisheries Research* 95: 280–288. doi: 10.1016/j.fishres.2008.09.036.

Hou Z, Fu J, Li S (2007). A molecular phylogeny of the genus *Gammarus* (Crustacea: Malacostraca) based on mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45, 596–611.

Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N.E., Taylor, E., et al. (2008). Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE* 3(6): e2490. doi:10.1371/journal.pone.0002490

Jarman, S.N., Elliott, N.G., Nicol, S., McMinn A (2002). Genetic differentiation in the Antarctic coastal krill *Euphausia crystallorophia*. *Heredity* **88**, 280–287. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800041.

Johnson, R. (2014). Food fraud and economically motivated adulteration of food and food ingredients. Washington, DC: Congressional Research Service.

Joly, S., Davies, T.J., Archambault, A., Bruneau, A., Derry, A., et al. (2014). Ecology in

the age of DNA barcoding: the resource, the promise and the challenges ahead. *MolEcol Res* 14: 221-232.

Kim, H., Shin, J.Y., Yang, N. and Jeong, J.-H.(2017). Revealing cryptic species from common intertidal hermit crab in South Korea, *Pagurus minutus* (Decapoda: Anomura: Paguridea). Unpublished. Sequenze nucleotidiche presenti su <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.

Kneibelsberger, T., Landi, M., Neumann, H., Kloppmann, M., Sell, A. F., Campbell, P. D., Laakmann, S., Raupach, M.J., Carvalho, G. R., Costa, F.O. (2014). A reliable DNA barcode reference library for the identification of the North European shelf fish fauna. *Mol Ecol Resour.*; 14(5):1060-71. doi: 10.1111/1755-0998.12238.

Knibb, W., Whatmore, P., Lamont, R., Quinn, J., Powell, D., Elizur, A., Anderson, T., Remilton, C., Hong Nguyen, N. (2014). Can genetic diversity be maintained in long term mass selected populations without pedigree information? - A case study using banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*. *Aquaculture*, 2014,428-429,71.

Kolukirik, M., Karahan, A. and Ozturk, D.I. (2015). Direct Submission on *database* GENBANK by Environmental Sciences, Bogazici University, Hisar Campus, Bebek, Istanbul 34342, Turkey.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*.

Landi, M., Dimech, M., Arculeo, M., **Biondo, G.**, Martins, R., et al. (2014). DNA Barcoding for Species Assignment: The Case of Mediterranean Marine Fishes. *PLoS ONE* 9(9): e106135. doi:10.1371/journal.pone.0106135

Lakra, W.S., Verma, M.S.,Goswami, M.,Lal, K.K.,Mohindra, V., Punia, P., Gopalakrishnan, A., Singh, K.V.,Ward, R.D., Hebert, P. (2001). DNA barcoding Indian marine fishes. *Mol Ecol Resour.*; 11(1):60-71. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02894.

Li, Y., Gul, Y., Gao, Z., Luo, W., & Wang, W. (2013). A simple and affordable method of DNA extraction from fish scales for polymerase chain reaction. *Biochemical Genetics*, 51, 1–6.

Lightowers, R.N.; Chinnery, P.F.; Turnbull, D.M.; Howell, N. (1997). Mammalian mitochondrial genetics: heredity, hetroplasmly and disease. *Trends in Genetics*, 13, 450-455.

Lo, P.C., Liu, S.H., Chao, N.L., Nunoo, F.K., Mok, H.K., Chen, W.J., ( 2015). A multi-gene dataset reveals a tropical New World origin and Early Miocene diversification of

- croakers (Perciformes: Sciaenidae). *Mol Phylogenet Evol.* ;88:132-43. doi: 10.1016/j.ympev.2015.03.025.
- Lo Brutto, S., Arculeo, M., Grant, W.S. (2011). Climate change and population genetic structure of marine species. *Chem Ecol* 27: 107–119.
- Lockley, A., & Bardsley, R. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 67–77.
- Loukovitis, D., Sarropoulou, E., Vogiatzi, E., Tsigenopoulos, C. S., Kotoulas, G., Magoulas, A. and Chatziplis, D. (2012). Genetic variation in farmed populations of the gilthead sea bream *Sparus aurata* in Greece using microsatellite DNA markers. *Aquaculture Research*, 43: 239-246. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02821.x
- Macdonald CM, Williams R, Adams M (1986). Genetic variation and population structure of krill (*Euphausia superba* Dana) from the Prydz Bay region of Antarctic waters. *Polar Biol* 6: 233–236
- Mafra, I., Ferreira, I. M. P. V. O., & Oliveira, M. B. P. P. O. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227, 649-665.
- Marko, P. B., Lee, S. C., Rice, A. M., Gramling, J. M., Fitzhenry, T. M., McAlister, J. S., et al. (2004). Mislabelling of a depleted reef fish. *Nature*, 430, 309–310.
- Martin, J.W., Davis, G.E. (2001) Un updated classification of the Recent Crustacea. *Nat Hist Mus of Los Angeles* 39: 1–124.
- Matzen da Silva, J., Creer, S., dos Santos, A., Costa, A.C., Cunha, M.R., et al. (2011). Systematic and Evolutionary Insights Derived from mtDNA COI Barcode Diversity in the Decapoda (Crustacea: Malacostraca). *PLoS ONE* 6(5): e19449. doi:10.1371/journal.pone.0019449
- Mauchline, J. & Fisher, L.R. (1969). The biology of euphausiids. *Advances in Marine Biology* 7: Academic Press: London.
- Ming, J., Xie, J., Xu, P., Liu, W., Ge, X., et al. (2010). Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). *Fish Shellfish Immunology*, 28, 407–418.
- Nicolé, S., Negrisoló, E., Eccher, G., Mantovani, R., Patarnello, T., Erickson, D. L., et al. (2012). DNA barcoding as a reliable method for the authentication of commercial seafood products. *Food Technology and Biotechnology*, 50(4), 387.

- Pérez-Barros, P., d'Amato, M.E., Guzmán, N.V., Lovrich, G.A. (2008) Taxonomic status of two South American sympatric squat lobsters, *Munida gregaria* and *Munida subrugosa* (Crustacea: Decapoda: Galatheidae), challenged by DNA sequence information. *Biological Journal of the Linnean Society* 94: 421-434.
- Procaccini, G.; Maltagliati, F. (2003). Approcci metodologici all'analisi della diversità genetica di organismi bentonici. *Biologia Marina Mediterranea*, (suppl.) 10, 509-548.
- Radulovici, A.E. Sainte-Marie, B. and DUFRESNE, F.(2009). DNA barcoding of marine crustaceans from the Estuary and Gulf of St Lawrence: a regional-scale approach. *Molecular Ecology Resources* 9 (Suppl. 1), 181–187 doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02643.x.
- Rasmussen, R.S., Morrissey, M.T. (2008). DNA-Based Methods for the identification of Commercial Fish and Seafood Species. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 7: 280-295.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *MolEcol Notes* 7: 355-364.
- Raupach, M.J., Barco, A., Steinke, D., Beermann, J., Laakmann, S., Mohrbeck, I., Neumann, H., Kihara, T.C., Pointner, K., Radulovici, A., Segelken-Voigt, A., Wesse, C. and Knebelberger, T. (2015). The Application of DNA Barcodes for the Identification of Marine Crustaceans from the North Sea and Adjacent Regions. *JOURNAL PLoS ONE* 10 (9), E0139421.
- Raupach, M.J., Hendrich, L., Kuchler, S.M., Deister, F., Morinière, J., Gossner, M.M. (2014). Building-up of a DNA barcode library for true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) of Germany reveals taxonomic uncertainties and surprises. *Public Library of Science ONE* 9: e106940. doi: 10.1371/journal.pone.0106940.
- Raupach MJ, Radulovici AE (2015) Looking back on a decade of barcoding crustaceans. *ZooKeys* 539: 53–81. doi: 10.3897/zookeys.539.6530.
- Rougerie R, Kitching IJ, Haxaire J, Miller SE, Hausmann A, Hebert PDN (2014) Australian Sphingidae – DNA barcodes challenge current species boundaries and distributions. *Public Library of Science ONE* 9: e101108. doi: 10.1371/journal.pone.0101108.
- Rudbeck, L., & Dissing, J. (1998). Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *Biotechniques*, 25, 588–592.
- Samadi, S., Puillandre, N., McPherson, E., Lambourdiere, J., Cruaud, C., Couloux, A. and Boisselier-Dubayle, M.-C. (2013). Unpublished. DNA barcode, type specimens and

species delimitation in the genus *Eumunida*.

Sawayama, E. & Takagi, M. (2015). Genetic diversity and structure of domesticated strains of red sea bream, *Pagrus major*, inferred from microsatellite DNA markers. *Aquaculture Research*, 46, 9

Shen Y-Y, Che X, Murphy RW (2013) Assessing DNA barcoding as a tool for species identification and data quality control. *Public Library of Science ONE* 8: e57125. doi: 10.1371/journal.pone.0057125.

Smith, P. J., McVeagh, S. M., & Steinke, D. (2008). DNA barcoding for the identification of smokedfish products. *Journal of Fish Biology*, 72, 464–471.

Steinke, D. & Hanner, R. (2011). The FISH-BOL collaborators' protocol, *Mitochondrial DNA*, 22:sup1, 10-14, DOI: 10.3109/19401736.2010.536538

Steinke, D., Zemplak, T.S., Gavin, H., Hebert, P. (2009). DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. *Mar Biol* 156, 2641-2647.

Steinke, D., Connell, A.D., Hebert, P.D.N. (2016). Linking adults and immatures of South African marine fishes. *Genome* 59: 959–967 (2016) dx.doi.org/10.1139/gen-2015-0212.

Steinke, D., & Hanner, R. (2011). The FISH-BOL collaborators' protocol. *Mitochondrial DNA*, 22, 10–14.

Stoeckle, M. Y.; Hebert, P.D.N. (2008): *Le scienze*. Dicembre, pp 70-74.

Strutzenberger, P., Brehm, G., Fiedler, K. (2011). DNA barcoding-based species delimitation increases species count of *Eois* (Geometridae) moths in a well-studied tropical mountain forest up to 50%. *Insect Science* 18: 349–362. doi: 10.1111/j.1744-7917.2010.01366.x.

Tagliavia, M., Nicosia, A., Salamone, M., **Biondo, G.**, Bennici, C. D., Mazzola, S., Cuttitta A. Development of a fast DNA extraction method for sea food and marine species identification. *Food Chemistry* 203 (2016) 375–378.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

Terossi, M. and Mantelatto, F.L. (2012). Morphological and genetic variability in *Hippolyte obliquimanus* Dana, 1852 (Decapoda: Caridea: Hippolytidae) from Brazil and the Caribbean sea. *Crustaceana* 85 (6), 685-712.

Tortonese, E., 1956: *Leptocardia, Ciclostomata, Selachii*. Vol II. Ed. Calderini,



Bologne, Italy, pp 69-74; 87-88.

Tortonese, E., 1970: Osteichthyes – Pesci ossei, Vol X. Calderini Ed, Bologne, Italy, pp. 45-49;55-59.

Tortonese, E., 1975: Osteichthyes – Pesci ossei, Vol XI. Ed. Calderini, Bologne, Italy, pp. 636.

Valdez-Moreno, M., Vasquez-Yeomans, L., Elias-Gutierrez, M., Ivanova, N.V. and Hebert, P.D.N. Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management. Unpublished - Direct Submission on *database* GENBANK by Aquatic Ecology and Systematics, El Colegio de la Frontera Sur, Av. Centenario Km 5.5, Chetumal, Q. Roo 77014, Mexico.

Ward, R. D.; Hanner, R.; Hebert, P. D. N., (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. J. Fish Biol. 74, 329–356

Ward, R. D.; Zemlak, T. S.; Innes, B. H.; Last, P. R.; Hebert, P. D. N. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 360, 1847–1857.

Wallace, D.C., (1994). Mitochondrial-DNA Mutations in Diseases of Energy-Metabolism. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 26, 241-250.

Weigt, L.A., Baldwin, C.C., Driskell, A., Smith, D.G., Ormos, A., Reyier, E.A. (2012). Using DNA barcoding to assess Caribbean reef fish biodiversity: expanding taxonomic and geographic coverage. PLoS One.;7(7):e41059. doi: 10.1371/journal.pone.0041059.

Weyant, R. S., Edmonds, P., & Swaminathan, B. (1990). Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase. Biotechniques, 9(3), 308–309.

Wilson, E.O., 2005: Systematics and the future of biology. Proceeding of the National Academy of Science. 102, 6520–6521.

Wilson, K.; Cachill, V.; Ballment, E.; Benzie, J.; (2000). The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: Are Malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods? Molecular Biology and Evolution, 17, 863-874.

Wong, E. H. K. & Hanner, R. H. (2008). DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. Food Research International, 41(8), 828–837.

Woolfe, M. & Primrose, S. (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends Biotechnol* 22, 222–226.

Yancy, H. F., Zemlak, T. S., Mason, J. A., Washington, J. D., Tenge, B. J., Nguyen, N. - L., et al. (2008). The potential use of DNA barcodes in regulatory science: Applications of the regulatory fish encyclopedia. *Journal of Food Protection*, 71, 210–217.

Yue, G. H., & Orban, L. (2001). Rapid isolation of DNA from fresh and preserved fish scales for polymerase chain reaction. *Marine Biotechnology*, 3, 199–204.

Zane, L., Ostellari, L., Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Cuzin-Roudy J. et al. (1999). Genetic differentiation in a pelagic crustacean (*Meganyctiphanes norvegica*, Euphausiacea) from the North East Atlantic and Mediterranean Sea. *Mar Biol* 136: 191–199.

Zhou, X., Robinson, J.L., Geraci, C.J., Parker, C.R., Flint, Jr O.S., Etnier, D.A., Ruitter, D., DeWalt, R.E., Jacobus, L.M., Hebert, P.D.N. (2011). Accelerated construction of a regional DNA-barcode reference library: caddisflies (Trichoptera) in the Great Smoky Mountains National Park. *Journal of the North American Benthological Society* 30: 131–162. doi: 10.1899/10-010.1.



## *Ringraziamenti*

Desidero ringraziare il Prof. Marco Arculeo che con costanza, discrezione e determinazione mi ha permesso di acquisire la professionalità e la preparazione di cui oggi vado orgogliosa.

Esprimo la mia più sincera gratitudine alla Dott.ssa Angela Cuttitta ricercatrice dell'IAMC CNR S.S. di Capo Granitola, per avermi accolta nel suo *team*, supportata scientificamente ed umanamente.

Un grazie particolare lo rivolgo al Dott. Aldo Nicosia e il Dott. Marcello Tagliavia che mi hanno ben guidata col loro metodo scientifico, elargendo indicazioni e impostazioni fortificanti.

Un sentito ringraziamento va alla Dott.ssa Isabel Maneiro che mi ha supportato nella classificazione dei crostacei dello zooplancton e al Dott. Antonino Titone e la Dott.ssa Daniela Massi dell'IAMC CNR S.S. di Mazara del Vallo per avermi permesso di partecipare al *sorting* delle campagne oceanografiche CAMPBIOL 2015 e MEDSUDMED 2015 per recuperare i campioni di pesci ossei e crostacei bentonici.

Un sentito ringraziamento va ad entrambi i revisori, la Prof.ssa Rita Cannas e il Prof. Roberto Guidetti che mi hanno dedicato del tempo con meticolosità e zelo, consentendomi di migliorare forma e contenuti della tesi.

Il grazie col cuore va ai miei colleghi, Carmelo, Marilena, Grazia, con i quali lavoro ogni giorno fianco a fianco mettendo il cervello ed il cuore nella ricerca scientifica.

A Linda e Serena “compagne di dottorato” un grazie speciale per aver condiviso le mie ansie e gioito per i miei successi.

Alla mia famiglia, la mia forza, grazie per essere *Noi*.