

ALESSANDRA DALMASSO* - MARIA TERESA BOTTERO

Dipartimento di Patologia Animale - Università degli Studi di Torino -

Via Leonardo da Vinci 44 - 10095 Grugliasco - TO - Italia

* e-mail: alessandra.dalmasso@unito.it

IDENTIFICAZIONE DI SPECIE IN PRODOTTI ITTICI

Species identification in fish products

Parole chiave: identificazione di specie, prodotti ittici, metodiche biomolecolari
Key words: species identification, fish products, biomolecular methods

Negli ultimi anni il riconoscimento di specie nei prodotti ittici ha assunto un'importanza sempre maggiore per le molteplici implicazioni di carattere sanitario, commerciale e legale. Infatti, la possibilità di identificare con sicurezza le specie potenzialmente tossiche o allergeniche assume un grande significato negli ambiti della sicurezza alimentare, del controllo della commercializzazione e della tutela delle specie protette.

Da tempo sono note le intossicazioni dovute al consumo di specie ittiche contenenti sostanze di natura endogena o di contaminazione secondaria (tetradotossina, saxitossina, ciguatossina, maitotossina, scaritossina, ecc.) dotate di effetti sul sistema gastro-intestinale, cardio-circolatorio, neuromuscolare. Numerose ricerche hanno dimostrato la pericolosità di tali sostanze; di qui la particolare attenzione posta alla commercializzazione dei pesci esotici, più spesso coinvolti nelle intossicazioni (Hwang *et al.*, 2007).

Più recentemente un certo interesse è stato rivolto alla famiglia *Gempylidae*, nella cui muscolatura

sono presenti grassi non saponificabili con effetto diarrogeno (Leask *et al.*, 2004). A questa famiglia appartiene il genere *Ruvettus* (*Ruvettus pretiosus*), un pesce importato da alcuni anni anche in Italia, il cui consumo è stato più volte segnalato quale causa di diarrea (Pellegrino *et al.*, 2000). Il Ministero della Salute ne ha vietato la commercializzazione (Nota Min. San. 600/2000). L'EFSA (European Food Safety Authority) ha pubblicato un documento dedicato alle pratiche di lavorazione più opportune per prevenire gli effetti nocivi mentre negli USA vige tuttora la raccomandazione del Center for Food Safety and Applied Nutrition (CF-SAN-FDA) di non importare né commercializzare carni di *Ruvettus*.

È inoltre ben noto come il consumo di molte specie ittiche sia associato al complesso fenomeno dell'insorgenza delle allergie alimentari (Kull *et al.*, 2006). Nei pesci gli allergeni responsabili sono proteine sarcoplasmatiche (parvoalbumine) del tessuto muscolare, che possono essere responsabili di fenomeni di mo-

SUMMARY

In recent years, species identification of fish products has increasingly acquired importance, due to the safety, economical and legal reasons implied. Traditional methods rely upon the identification of morphological traits. However such an approach does not allow the identification of species used in fish products (slice, fillets, loin) and processed food (canned fish). Hence, laboratory techniques are required for the species identification in these products. Many researches, in the last decades, were carried out using electrophoretical and immunological methods focusing on protein profiles. Nonetheless, in recent years biomolecular techniques were also developed and used in the species identification of fish products: some analysing the whole genome (RAPD-PCR) and others targeting single DNA fragments (PCR, multiplex-PCR, Real Time PCR, PCR-RFLP, multiplex primer extension reaction, PCR-SSCP, sequencing).

SOMMARIO

Negli ultimi anni il riconoscimento di specie nei prodotti ittici ha assunto un'importanza sempre maggiore per le molteplici implicazioni di carattere sanitario, commerciale e legale. L'identificazione basata sul riconoscimento di alcuni caratteri morfologici specifici costituisce il metodo tradizionale. Tuttavia l'analisi macroscopica risulta impossibile nel caso di prodotti variamente lavorati (tranci, filetti e loins) e in prodotti trasformati (conservate). In tutti questi casi risulta indispensabile ricorrere a metodiche di laboratorio a supporto. In passato diversi studi hanno preso in considerazione le proteine identificate mediante metodi elettroforetici ed immunologici. Negli ultimi anni sono state messe a punto molte metodiche biomolecolari, alcune basate sull'analisi dell'intero genoma (RAPD-PCR), altre sull'analisi di un singolo frammento di DNA (PCR, multiplex-PCR, Real Time PCR, PCR-RFLP, multiplex primer extension reaction, PCR-SSCP, sequenziamento).

nosensibilizzazione come ad es. nel caso dell'allergia causata dal consumo di sogliola (Asero *et al.*, 1999). Altre volte, quando la struttura dell'allergene è simile in più specie, si possono verificare sensibilizzazioni crociate come nel caso della proteina Gad CI (o proteina M) del pesce spada (Poulsen *et al.*, 2001).

Se l'identificazione di specie è di vitale importanza per quanto riguarda il riconoscimento dei prodotti tossici o allergenici, non trascurabile appare l'aspetto attinente alla commercializzazione di prodotti provenienti da Paesi terzi. L'Italia importa più di 990.000 tonnellate dall'estero (Ismea, 2006). Il pescato d'importazione è costituito in alcuni casi da specie alloctone, poco conosciute sui nostri mercati, il che rende particolarmente complesso il compito delle autorità preposte ai controlli ufficiali, sia per quanto concerne la valutazione dell'idoneità sanitaria, sia per il controllo delle frodi e dell'etichettatura previsto dai Regolamenti CE 104/2000 e CE 2065/2001.

Infine, la corretta identificazione di specie può avere dei risvolti positivi anche dal punto di vista ecologico-legale ad esempio per il controllo del rispetto del fermo biologico (Reg. CE 2369/2002). Per questi motivi, diventa fondamentale identificare inequivocabilmente e rapidamente le specie oggetto di commercializzazione. L'identificazione basata sul riconoscimento di alcuni caratteri morfologici specifici (mandibola, denti, pinne), costituisce il metodo tradizionale per quanto riguarda le specie ittiche. Tuttavia l'analisi macroscopica risulta spesso complessa e difficile a causa dell'estrema plasticità con cui

le popolazioni reagiscono a fattori ambientali e fisiologici. Inoltre l'analisi morfologica diventa impossibile nel caso di prodotti variamente lavorati (tranci, filetti, ecc.) che tra l'altro rappresentano la quasi totalità del prodotto fresco commercializzato sui nostri mercati. Ancora più problematica risulta l'identificazione di specie in prodotti trasformati (conservate), dove alla perdita dell'integrità anatomica si associa anche l'azione denaturante del trattamento termico. Inoltre in questi prodotti, risulta difficile anche la corretta identificazione della materia prima, in quanto sempre più frequentemente commercializzata sotto forma di semilavorato (loins).

È chiaro come in questi casi sia indispensabile ricorrere a metodiche di laboratorio a supporto dell'analisi morfologica. Tuttavia la scelta della molecola target è fortemente condizionata dalla stretta relazione filogenetica esistente fra alcune specie ittiche e dal tipo di trattamento subito dalla matrice alimentare.

In passato diversi studi hanno preso in considerazione le proteine identificate mediante metodi elettroforetici ed immunologici. Con i metodi elettroforetici si ottiene una separazione delle proteine in grado di dare origine a patterns specie-specifici. In particolare nel settore ittico è stata ampiamente utilizzata l'isoelettrofocalizzazione (IEF) di proteine sarcoplasmatiche (Berrini *et al.*, 2006). Questa tecnica prevede una corsa elettroforetica su gel in presenza di un tampone con pH tale da permettere una divisione delle proteine non solo grazie al loro peso o carica netta, ma anche

in base al differente punto isoeletttrico. La IEF ha permesso di analizzare in maniera soddisfacente matrici crude, tuttavia si è dimostrata poco applicabile nel caso di alimenti misti o sottoposti a trattamenti tecnologici drastici quali l'applicazione di alte temperature. Infatti questi trattamenti inducono la denaturazione delle proteine muscolari con conseguente cambiamento delle proprietà fisico-chimiche che porta all'alterazione della mobilità elettroforetica.

Altre metodiche quali la High Performance Liquid Chromatography (HPLC) e l'Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sono state ampiamente utilizzate nel settore ittico (Knuutinen *et al.*, 1998; Asensio *et al.*, 2003). In particolare l'HPLC, ha permesso di differenziare 16 specie ittiche appartenenti ai salmonidi, ciprinidi e coregoni (Knuutinen *et al.*, 1998). Tuttavia anche questa metodica trova un grosso limite nella termolabilità delle proteine target, per cui è poco applicabile a prodotti sottoposti ad alte temperature.

Per quanto riguarda il test ELISA, esso è stato ampiamente utilizzato per differenziare specie ittiche quali *Solea solea*, *Pleuronectes platessa*, *Platichthys flesus* e *Reinhardtius hippoglossoides* (Cespedes *et al.*, 1999). Questa metodica utilizza anticorpi policlonali diretti verso proteine solubili muscolari. Sebbene il test ELISA presenti caratteristiche eccellenti quali estrema rapidità e costi ridotti, tuttavia permangono ancora alcuni problemi legati all'estrazione delle proteine da matrici alimentari composite, alle cross-reazioni frequenti e al riconoscimento di epitopi "termostabili".

A tutto ciò si aggiunge ancora l'elevato polimorfismo proteico frequentemente osservato in alcune specie ittiche e l'elevato grado di omologia di altre, aspetti che potrebbero ostacolare l'utilizzo delle proteine in questo settore (Rehbein *et al.*, 1995).

Questi problemi hanno stimolato la ricerca verso l'utilizzo di nuovi marcatori molecolari da utilizzare in questi casi specifici. In particolare, negli ultimi anni, le tecniche biomolecolari basate sull'analisi del DNA hanno affiancato e, in alcuni casi, sostituito le metodiche tradizionali descritte sopra. La scelta di questo tipo di metodiche è giustificata da molteplici vantaggi.

In genere, il DNA presenta una maggiore resistenza alle alte temperature, anche se può essere degradato in frammenti di lunghezza variabile quando il trattamento termico è particolarmente severo (Momcilovic *et al.*, 2000).

Negli studi di identificazione di specie, una parte cruciale è rappresentata dalla scelta della porzione di DNA che si intende analizzare. Generalmente è molto usato il DNA mitocondriale in quanto offre innumerevoli vantaggi rispetto al nucleare. Innanzitutto, essendo presente nelle singole cellule in un numero elevato di copie, facilita da una parte la ricerca di tessuto presente in minime quantità, dall'altra offre l'indubbio vantaggio di aumentare le probabilità di ritrovare ancora molecole integre anche in seguito a trattamenti denaturanti. Inoltre essendo circolare, possiede una notevole resistenza intrinseca alla denaturazione dovuta al calore e quindi risulta particolarmente indicato per l'analisi di matrici ali-

mentari sottoposte a trattamenti termici.

I geni mitocondriali maggiormente considerati per gli studi di identificazione di specie sono il *citocromo b* (*cyt b*), il *D-loop*, il *NADH2* e le subunità ribosomiali 12S *rRNA* e 16S *rRNA* (Quinteiro *et al.*, 2001; Sanjuan *et al.*, 2002; Klossa-Kilia *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006; Dalmasso *et al.*, 2006). Queste regioni presentano una particolare struttura costituita da zone variabili alternate a zone altamente conservate, che permette il disegno sia di primers specie-specifici che poco specifici.

In alternativa al DNA mitocondriale, è stato ampiamente utilizzato il gene nucleare 5S rDNA. Alcune ricerche basate sull'analisi di questo gene hanno permesso l'identificazione di tre specie di *Trachurus* (Karaïskou *et al.*, 2003), nove specie di *Merluccius* (Perez *et al.*, 2004) e altre specie quali *Lates niloticus*, *Epinephelus guaza*, *Polyprion americanus* (Asensio *et al.*, 2001).

Attualmente, sono state messe a punto molte metodiche che prevedono l'amplificazione del DNA, alcune basate sull'analisi dell'intero genoma, altre sull'analisi di un singolo frammento di DNA.

Tra le prime, una metodica ampiamente utilizzata nello studio dei prodotti ittici è la Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) (Govindaraju *et al.*, 2004). Questa tecnica prevede l'utilizzo di primers corti (9-10 bp) non specifici in grado di generare profili elettroforetici caratteristici. I vantaggi sono legati alla rapidità e al basso costo, purtroppo la scarsa riproducibilità e l'impossibilità di applicarla a matrici miste e trattate termi-

camente, ostacola in parte il suo utilizzo.

Tra le metodiche che si basano sull'analisi di un solo frammento la più usata è la Polymerase Chain Reaction (PCR), tecnica veloce, sensibile, che permette l'analisi di matrici miste e trattate termicamente (conservate). L'identificazione diretta di specie mediante PCR prevede l'amplificazione di un frammento di interesse utilizzando una coppia di primers specie-specifici (PCR), o più coppie di primers per la differenziazione contemporanea di più specie all'interno di un alimento (multiplex PCR) (Infante *et al.*, 2006). Una recente evoluzione di questa tecnica è la Real Time PCR che permette, oltre all'amplificazione del frammento di DNA, la quantificazione dell'amplicone formatosi. La Real Time PCR, oltre ad essere utile per la quantificazione di specie nelle matrici miste, offre il vantaggio di essere fortemente automatizzata e di non richiedere manipolazioni post-PCR (Lopez and Pardo, 2005).

Tuttavia queste metodiche possono incontrare dei limiti nell'analisi di specie strettamente correlate in quanto l'elevata omologia delle sequenze non sempre permette il disegno di primers specie specifici.

Per questo motivo, negli ultimi anni, molti studi hanno focalizzato l'attenzione sulla messa a punto di metodiche basate sull'analisi di singole mutazioni specie specifiche da utilizzare come siti di diagnosi.

Fra queste, la PCR-Restriction Fragment Length (PCR-RFLP) è stata ampiamente utilizzata per lo studio e l'autenticazione di diverse specie ittiche (Pardo e

Perez-Villareal, 2004; Zhang *et al.*, 2006). Tale metodica è basata sull'analisi di singole mutazioni specie specifiche (siti di diagnosi) evidenziate mediante presenza o assenza di digestioni operate da enzimi di restrizione (Quinteiro *et al.*, 2001). Questa tecnica permette quindi di differenziare specie le cui sequenze sono molto simili ed è applicabile ai prodotti denaturati. Tuttavia anch'essa presenta alcuni limiti: non è applicabile all'analisi di matrici miste poiché in esse si verifica la sovrapposizione di diversi pattern di restrizione e, quando il numero di specie da differenziare è elevato, l'ottimizzazione del protocollo diventa complessa poiché si deve ricorrere all'utilizzo di più enzimi.

Recentemente è stata sviluppata una metodica basata sempre sull'analisi dei siti di diagnosi ma mediante minisequenziamento (multiplex primer-extension reaction) (Bottero *et al.*, 2007). Questa tecnica oltre ad essere adatta per l'identificazione di specie strettamente correlate e applicabile all'analisi di matrici alimentari trattate termicamente, offre una elevata precisione di lettura del risultato. Inoltre, poiché permette l'analisi contemporanea di più siti di diagnosi, risulta essere più rapida e più facilmente automatizzabile della PCR-RFLP.

Un'altra metodica biomolecolare utilizzata per l'identificazione di specie ittiche strettamente correlate è la PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) (Colombo *et al.*, 2005). Essa si basa sulla differente migrazione elettroforetica in gel di acrilamide di piccoli frammenti di DNA previa amplificazione e successiva denaturazione. Infatti in queste

condizioni la mobilità elettroforetica risulta influenzata dalla composizione del frammento.

Recentemente è stata messa a punto una metodica per discriminare diverse specie di cernie mediante analisi dei profili delle temperature di melting (T_m) (Trotta *et al.*, 2005). Questa tecnica si basa sull'amplificazione di un frammento di DNA comune a più specie e la successiva analisi della T_m dell'amplicone. Tale procedura permette di distinguere differenti frammenti di amplificazione in funzione delle loro sequenze. Questo protocollo risulta facilmente applicabile a matrici miste e trattate termicamente, ma non è utilizzabile nell'identificazione di specie strettamente correlate perché all'interno di un frammento di amplificazione, se pur di ridotte dimensioni, le singole mutazioni puntiformi influenzano relativamente poco questo parametro.

A questo proposito altri autori (Dalmasso *et al.*, 2007) hanno considerato la T_m relativa all'impiego di sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Grazie alla chimica di queste sonde, la sola presenza di una mutazione puntiforme determina una notevole variazione della temperatura che permette la discriminazione fra la specie.

Infine il sequenziamento rappresenta una tecnica che permette di identificare la specie tramite il confronto della sequenza ottenuta con quelle già depositate nelle banche dati (Genbank) utilizzando software in grado di analizzare le omologie fra le sequenze nucleotidiche (Quinteiro *et al.*, 2001; Terol *et al.*, 2002). Tale procedura, pur risultando molto adatta nell'analisi di pro-

dotti trattati termicamente, non è applicabile in quelli misti oltre ad essere laboriosa e costosa. Inoltre il suo utilizzo implica la disponibilità nel database di un numero considerevole di sequenze di specie diverse. Infatti quando si compiono studi di identificazione su prodotti ittici, nonostante molte specie abbiano un'importanza commerciale sempre maggiore, si deve molto spesso far fronte al problema della scarsità di informazioni su di esse ed in particolare alla mancanza di sequenze depositate sulle banche dati.

In conclusione, si deve osservare come tutte le tecniche utilizzate per l'identificazione di specie siano caratterizzate da vantaggi e da svantaggi molto spesso complementari. Per questo motivo, si auspica il loro utilizzo in parallelo nelle analisi routinarie. In particolare, l'attenzione andrebbe posta sulle diverse metodiche basate sull'analisi del DNA. Per rendere sempre più attendibili e applicabili queste metodiche è tuttavia necessario procedere ad un rigoroso lavoro di sequenziamento per la creazione di un database di pubblico dominio con le sequenze delle specie ittiche di interesse commerciale. In questo modo si potrebbe portare un serio contributo per l'individuazione della correttezza dell'etichettatura, a garanzia della sicurezza dei consumatori.

BIBLIOGRAFIA

- Asensio L., Gonzalez I., Fernandez A., Rodriguez M.A., Hernandez P.E., Garcia T., Martin R. PCR-SSCP: a simple method for the authentication of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*), and Nile perch (*Lates niloticus*) filets. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 1720-1723, 2001.

- Asensio L., Gonzalez I., Rodriguez M.A., Mayoral B., Lopez-Calleja I., Hernandez P.E., Garcia T., Martin R. Identification of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*), and Nile perch (*Lates niloticus*) fillets by polyclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1169-1172, 2003.
- Asero R., Mistrello G., Roncarolo D., Casarini M., Falagiani P. True monosensitivity to a tropical sole. *Allergy*, 54, 1228-1229, 1999.
- Berrini A., Tepedino V., Borromeo V., Secchi C. Identification of freshwater fish commercially labelled "perch" by isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *Food Chemistry*, 96, 163-168, 2006.
- Bottero M.T., Dalmaso A., Cappelletti M., Secchi C., Civera T. Differentiation of five tuna species by a multiplex primer-extension assay. *Journal of biotechnology*, 129, 575-580, 2007.
- Cespedes A., Garcia T., Carrera E., Gonzalez I., Fernandez A., Asensio L., Hernandez P.E., Martin R. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of sole (*Solea solea*), European plaice (*Pleuronectes platessa*), flounder (*Platichthys flesus*), and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *Journal of Food Protection*, 62, 1178-1182, 1999.
- Colombo F., Mangiagalli G., Renon P. Identification of tuna species by computer-assisted and cluster analysis of PCR-SSCP electrophoretic patterns. *Food Control*, 16, 51-53, 2005.
- Dalmaso A., Civera T., Bottero M.T. Biomolecular approaches for the identification of tuna species. *Veterinary Research Communication*, 30, 179-181, 2006.
- Dalmaso A., Fontanella E., Piatti P., Civera T., Secchi C., Bottero M.T. Identification of four *Thynnus* species by means of Real-Time PCR and melting curve analysis. *Veterinary Research Communication*, 31, 355-357, 2007.
- Govindaraju G.S., Jayasankar P. Taxonomic relationship among seven species of groupers (genus *Epinephelus*; family Serranidae) as revealed by RAPD fingerprinting. *Marine Biotechnology*, 6, 229-237, 2004.
- Hwang D.F., Noguchi T. Tetrodotoxin poisoning. *Advances in Food and Nutrition Research*, 52, 141-236, 2007.
- Infante C., Manchado M. Multiplex-polymerase chain reaction assay for the authentication of the mackerel *Scomber colias* in commercial canned products. *Journal of AOAC International*, 89, 708-711, 2006.
- Karaïskou T. Discrimination of three trachurus species using both mitochondrial and nuclear approach. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 4935-4940, 2003.
- Klossa-Kilia E., Papisotiropoulos V., Kiliass G., Alahiotis S. Authentication of Messolongi (Greece) fish roe using PCR-RFLP analysis of 16s rRNA mtDNA segment. *Food Control*, 13, 169-172, 2002.
- Knuutinen J., Harjula P. Identification of fish species by reversed-phase high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Chromatography B*, 705, 11-21, 1998.
- Kull I., Bergstrom A., Lilja G., Pershagen G., Wickman M. Fish consumption during the first year of life and development of allergic diseases during childhood. *Allergy*, 61, 1009-1015, 2006.
- Leask A., Yankos P., Ferson M.J. South Eastern Sydney Public Health Unit. Fish, so foul! Foodborne illness caused by combined fish histamine and wax ester poisoning. *Communicable Diseases Intelligence*, 28, 83-85, 2004.
- Lopez I., Pardo M.A. Application of relative quantification TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction technology for the identification and quantification of *Thunnus alalunga* and *Thunnus albacares*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4554-4560, 2005.
- Momcilovic D., Rasooly A. Detection and analysis of animal materials in food and feed. *Journal of Food Protection*, 63, 1602-1609, 2000.
- Nota Min. San. n. 600.9.3/24481/AG50/721 del 29 marzo 2000 relativa al divieto di importazione e commercializzazione in Italia di pesci appartenenti alle specie *Ruvettus pretiosus* e *Lepidocibium flavobrunneum*.
- Pardo M.A., Pérez-Villareal B. Identification of commercial canned tuna species by restriction site analysis of mitochondrial DNA products obtained by nested primer PCR. *Food Chemistry*, 86, 143-150, 2004.
- Pellegrino C., Cianti L., Boccetti M. Indagine epidemiologica su 4 casi di intossicazione da consumo di carni di *Ruvettus pretiosus*. *Atti X Convegno Nazionale AIVI*. Marsala, 12-14 ottobre 2000. 245-249, 2000.
- Perez J., Garcia-Vazquez E. Genetic identification of nine hake species for detection of commercial fraud. *Journal of Food Protection*, 67, 2792-2796, 2004.
- Poulsen L.K., Hansen T.K., Norgaard A., Vestergaard H., Stahl Skov P., Bindslev-Jensen C. Allergens from fish and egg. *Allergy*, 67, 39-42, 2001.
- Quinteiro J., Vidal R., Izquierdo M., Sotelo C.G., Chapela M.J., Perez-Martin R.I., Rehbein H., Hold G.L., Russell V.J., Pryde S.E., Rosa C., Santos A.T., Rey-Mendez M. Identification of Hake species (*Merluccius* Genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5108-5114, 2001.
- Regolamento CE 104/2000 del Consiglio del 17 dicembre 1999 relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura. G.U.C.E. L 17/22, 21/1/2000.
- Regolamento CE 2065/2001 della Commissione del 22 ottobre 2001 che stabilisce le modalità di applicazione del Reg. CE 104/2000 per quanto concerne l'informazione ai consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura. G.U.C.E. L 287/6, 23/10/2001.
- Regolamento CE n. 2369/2002 del Consiglio del 20 dicembre 2002 recante modifica del regolamento (CE) n. 2792/1999 che definisce modalità e condizioni delle azioni strutturali comunitarie nel settore della pesca. G.U.C.E. L 358/49, 31/12/2002.
- Rehbein H., Etienne M., Jerome M., Hattula T., Knudsen L.B., Jessen F., Luten J.B., Bouquet W., Mackie I.M., Ritchie A.H., Martin R., Mendes R. Influence of variation in methodology on the reliability of the isoelectric focusing method of fish species identification. *Food Chemistry*, 52, 193-197, 1995.
- Report ISMEA su pesca e acquacoltura, 27-06-2006, www.ismea.it.
- Sanjuan A., Comesana A.S. Molecular identification of nine commercial flatfish species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a segment of the *Cytochrome b* region. *Journal of food protection*, 65, 1016-1023, 2002.
- Terol J., Mascarell R., Fernandez-Pedrosa V., Perez-Alonso M. Statistical validation of the identification of tuna species: bootstrap analysis of mitochondrial DNA sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 963-969, 2002.
- Trotta M., Schonhuth S., Pepe T., Cortesi M.L., Puyet A., Bautista J.M. Multiplex PCR method for use in real-time PCR for identification of fish fillets from grouper (*Epinephelus* and *Mycteroperca* species) and common substitute species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2039-2045, 2005.
- Zhang J., Huang H., Cai Z., Huang L. Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA gene sequence. *Food Control*, 17, 557-563, 2006.