

GIOVANNI BERNARDINI*, ROSALBA GORNATT*, GENCIANA TEROVA*,
MARCO SAROGLIA*

Approccio molecolare per misurare la qualità in acquacoltura

Lo studio dei marcatori molecolari per monitorare la qualità, lo stato di benessere o qualsivoglia altra condizione fisiologica o patologica del pesce può essere affrontata in modi differenti e la biologia molecolare ne offre una certa varietà. Proprio con queste tecniche, nel corso di questi ultimi anni, abbiamo collezionato una serie di biomarcatori per mezzo dei quali possiamo “porre delle domande” al pesce e “ottenere” delle risposte. HSP70 (Heat shock protein 70), HSP90, HMGC_oA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase) e BDNF (Brain derived neutrophic factor) ci danno indicazioni sul benessere (Gornati et al., 2004, Gornati et al., 2005; Tognoli et al., 2010), grazie alla miostatina, alla miosina e ai fattori di crescita abbiamo indicazioni sulla crescita (Terova et al., 2006; Terova et al., 2007a) mentre la grelina e la gastricsina possono essere correlate all'appetito e alla digestione (Terova et al., 2007b; Terova et al., 2008a). Altri biomarcatori ci indicano cambiamenti ambientali correlati alla temperatura (WAP, warm acclimation protein), all'ipossia (HIF, hypoxia inducible factor) o alla carica batterica (epcidina) (Rossi et al., 2007; Terova et al., 2008b). Il grande vantaggio dell'utilizzo di tali biomarcatori è rappresentato dalla precocità e precisione dell'informazione. I marcatori molecolari infatti, per la loro natura, sono in grado di descrivere una risposta immediata a livello genico alle pressioni ambientali, quindi di monitorare il percorso qualitativo della filiera molto prima che in essa compaiano caratteri zootecnici, immunologici o patologici indesiderati, causati da errori nei protocolli di gestione. Le informazioni ottenute in seguito a questo studio sono raggruppate nella tool-box (tab. 1) dove sono elencati alcuni dei più noti geni descrittivi di caratteri ritenuti di rilievo per la filiera biologica dell'acquacoltura. Questi biomarcatori possono

* *Dipartimento di Biotecnologie e Scienze Molecolari, Università degli Studi dell'Insubria*

essere misurati velocemente e precisamente grazie alla PCR quantitativa detta real-time-PCR. Questa tecnica è in grado di monitorare la formazione del prodotto di PCR mentre avviene (cioè, in tempo reale). Questa tecnologia ha dato prova di essere riproducibile e affidabile. Il principale svantaggio della real time è il costo piuttosto alto di ogni reazione a causa della sonda specifica da sintetizzare ad hoc. Ultimamente, tuttavia, si è fatto largo l'impiego della real time usando, con primer specifici, un intercalante fluorescente, il SYBR Green. Tale molecola, legandosi al dsDNA permette la rilevazione dei prodotti di PCR a ogni ciclo. Lo svantaggio che ha l'uso del SYBR Green sulla sonda specifica è che il SYBR Green segnalerà tutto il dsDNA, compresi i prodotti di reazione non-specifici. A fronte quindi di costi decisamente minori e di maggior semplicità d'uso è essenziale, per ottenere risultati accurati, una reazione ben ottimizzata. Misurando la degradazione dell'RNA totale, quella del messaggero di alcuni geni selezionati o quella di alcune proteine è anche possibile, in linea di principio, determinare come e per quanto tempo il pesce sia stato conservato dopo la morte. L'importanza della conservazione del pesce per ritardare il deterioramento *postmortem* è cosa nota. Per questo motivo abbiamo iniziato la ricerca di marcatori molecolari che possano aiutare a compiere una valutazione oggettiva dello stato di conservazione del pesce intero o dei prodotti lavorati.

Recentemente, abbiamo studiato i processi biologici *postmortem* grazie a tecniche di elettroforesi bidimensionale e di spettrometria di massa (2D DIGE e MALDI-TOF). All'inizio della prova trenta esemplari di spigola sono stati pescati e in seguito macellati con tre modalità diverse: dieci per asfissia all'aria, altri per asfissia/ipotermia in acqua+ghiaccio e i rimanenti dieci, per recisione del midollo spinale. In seguito, ognuno dei gruppi sperimentali è stato suddiviso in due sottogruppi di 5 esemplari, conservati per 5 giorni *postmortem* all'interno di due termostati alle rispettive temperature di 18° C e di 1° C. Il primo campionamento è stato eseguito al momento della morte (tempo zero), prelevando un cubetto di tessuto muscolare dal quadrante muscolare latero-dorsale (epiassiale) di ciascun pesce. I successivi sei prelievi sono stati eseguiti allo stesso modo dopo 2, 4, 24, 48 ore, quindi dopo 3 e 5 giorni di conservazione *postmortem* alle rispettive temperature. Tutti i frammenti muscolari prelevati sono stati sottoposti alle analisi proteomica, utilizzando la tecnica dell'elettroforesi bidimensionale differenziale o DIGE, una tecnica modernissima che rende possibile l'analisi e il confronto simultaneo di centinaia di proteine presenti in campioni biologici diversi, aiutando sia nell'identificazione e sia nella quantificazione delle proteine espresse in modo diverso. L'indagine proteomica presentata (fig. 1), unitamente allo studio della proteomica differenziale che è stata parte integrante dello studio,

| GENE | GENE BANK A.N. | SPECIE DI TELEOSTEI | FUNZIONE FISIOLÓGICA DELLA PROTEINA CODIFICATA DAL GENE | |
|--|-------------------|------------------------|---|--------------------------------------|
| | | | Stress | Digestione Nutrizione Crescita |
| Glucocorticoid Receptor | AY549305 | <i>D. labrax</i> | + | - |
| | AY863149 | <i>S. trutta</i> | + | - |
| HIF-1 α | DQ171936 | <i>D. labrax</i> | + | - |
| Glucose-transporter 2 | EF014277 | " " | + | + |
| Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) | DQ915807 | " " | + | - |
| Heat shock protein 70 (HSP70) | AY423555 | " " | + | - |
| Heat shock protein 90 (HSP90) | AY395632 | " " | + | - |
| 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCoAR) | AY424801 | " " | + | + |
| Proto-oncogene protein (c-Fos) | DQ838581 | " " | + | - |
| Na ⁺ /H ⁺ exchanger (NHE-1) | EU180587 | " " | + | - |
| Intestinal oligopeptide transporter-1 (PepT1) | GU733710 | <i>S. aurata</i> | - | + |
| | FJ237043 | <i>D. labrax</i> | | |
| Ghrelin | DQ665912 | " " | - | + |
| Pepsinogen C | EF690286 | " " | - | + |
| Fatty acid Δ 6-desaturase | EU647692 | " " | - | + |
| Insulin-like growth factor -1 (IGF1) | AY800248 | " " | - | + |
| Insulin-like growth factor-2 (IGF2) | AY839105 | " " | - | + |
| Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP- 2) | EU526670 | " " | - | + |
| Fibroblast growth factor-6 (FGF6) | AY831723 | " " | - | + |
| Lipin1 | EU644089 | " " | - | + |
| Leptin | In progress | " " | - | + |
| Myostatin | AY839106 | " " | - | + |
| Myosin heavy chain | DQ317302 | " " | - | + |
| Beta Actin | AY148350 | " " | - | + |
| Alpha-actinin | HM147821 | " " | - | - |
| Cathepsin L | FJ807676 | " " | - | - |
| Calpain 1 | FJ821591 | " " | - | - |
| Bile-salt activated lipase (bal) | EU647691 | " " | | + |

Tab. 1 *Geni identificati come descrittori di caratteri ritenuti di rilievo per la filiera biologica dell'acquacoltura e funzione fisiologica/ambito di impiego*

ha consentito di individuare le proteine più idonee a uno studio della qualità *postmortem* riconducibile agli standard di vita del pesce e al percorso di macellazione-conservazione del prodotto.

Importante, inoltre, può essere l'uso di tecniche molecolari per contrastare le frodi alimentari. Esiste un'accresciuta competizione nel mercato globale tra le aziende che producono specie ittiche da acquacoltura e hanno il mercato italiano come bersaglio. Con i costi ormai affrontabili del trasporto aereo, non solamente i prodotti delle regioni mediterranee, ma anche quelli dell'Estremo Oriente riescono a raggiungere i mercati europei a prezzi competitivi, anche se con standard di qualità non facilmente verificabili e spesso non conformi ai nostri regolamenti nazionali o comunitari. Tra le frodi più diffuse c'è l'etichettatura mancante o errata, che determina una falsa "carta d'identità", una mancata tracciabilità del prodotto e la conseguente vendita di prodotti scongelati spacciati per freschi, di prodotti allevati spacciati per prodotti di cattura, di specie diverse da quelle dichiarate. La frode di sostituzione di specie si inserisce nella categoria delle frodi per contraffazione, cioè sostituzione di alimenti con altri di minor pregio ma con caratteristiche macroscopiche assai affini. La vendita di specie diverse da quelle dichiarate è molto diffusa nel settore ittico. L'identificazione morfologica, non sempre facile da attuare data l'elevata varietà di specie, non è applicabile su prodotti ittici venduti in tranci e filetti, lavorati e trasformati. Le implicazioni economiche non sono le uniche conseguenze correlate a questo tipo di frode. La corretta identificazione della specie, in ambito ecologico, facilita sia la tutela delle specie protette che il controllo del rispetto del fermo biologico per una pesca responsabile, mentre, in ambito sanitario, permette il monitoraggio di quelle "nuove" specie, potenzialmente tossiche, che stanno popolando mari che prima non costituivano il loro habitat naturale.

L'identificazione delle specie ittiche si può basare sulla separazione e caratterizzazione di proteine specie-specifiche, utilizzando tecniche elettroforetiche o dosaggi immunoenzimatici. Un approccio completamente diverso si basa invece sull'analisi del DNA genomico. In linea generale, un approccio proteico è sfavorito rispetto a un approccio basato sull'analisi del DNA perché le macromolecole proteiche possono essere distrutte o modificate da alcuni processi come il calore o l'essiccamento a cui i prodotti possono essere sottoposti durante le varie fasi della loro lavorazione e perché il pattern proteico può variare a seconda del tessuto in esame o della fase del ciclo vitale (es. uova o novellame rispetto al pesce adulto).

L'utilizzo di metodi di identificazione delle specie ittiche basati sul DNA presenta numerosi vantaggi rispetto a quelli basati sulle proteine come una

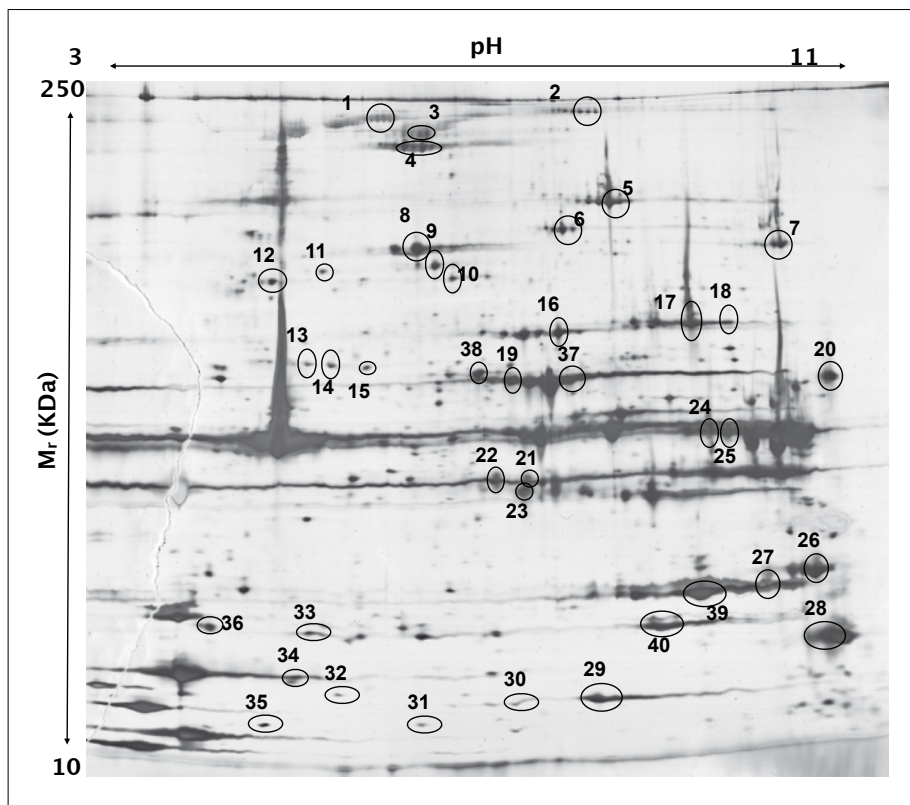


Fig. 1 Elettroforesi bidimensionale di proteine totali del muscolo di spigola (*Dicentrarchus labrax*)

maggior specificità e sensibilità, una buona affidabilità anche in campioni processati (il DNA è una molecola altamente termostabile) e la potenzialità di fornire un quantitativo maggiore di informazioni grazie alla degenerazione del codice genetico e alla presenza di regioni specie-specifiche non codificanti all'interno del genoma. Inoltre l'informazione contenuta nelle molecole di DNA è uguale in tutte le cellule e non varia a seconda dell'età, del tipo di tessuto, dell'alimentazione e delle condizioni fisiologiche. Quindi, abbiamo deciso di perseguire la via dell'analisi del DNA genomico e per far questo abbiamo individuato, nel gene codificante per l'rRNA ribosomiale 5S, un target genetico già utilizzato in diversi lavori (Pendas et al., 1994; Carrera et al., 2000; Asensio et al., 2001; Karaïskou et al., 2003; Moran et al., 2006), che consente, per le caratteristiche della sua sequenza, di discriminare specie diverse semplicemente confrontando la lunghezza delle bande dei prodotti di PCR, senza dover ricorrere al sequenziamento. Il gene codificante per l'rRNA

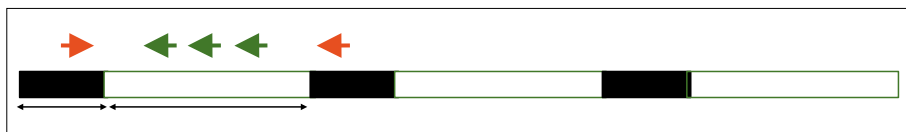


Fig. 2 Gene per l'rRNA 5S. In nero è riportata la sequenza conservata e i relativi primer "universali", in bianco è riportata la sequenza specie-specifica e i diversi primer specie-specifici

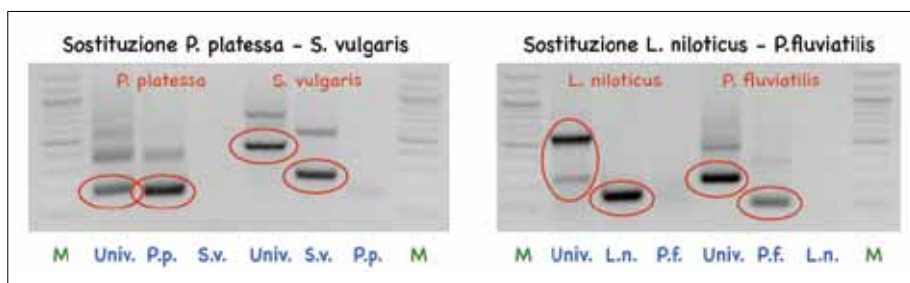


Fig. 3 Esempi di gel di elettroforesi in agarosio all'1% che dimostrano l'efficacia dell'approccio scelto per identificare le specie ittiche che vengono normalmente scambiate in caso di frode alimentare. Le bande sono state ottenute amplificando il DNA genomico delle specie riportate in rosso con i primer "universali" (Univ.) o i primer specifici delle specie riportate in blu (P.p. = *Pleuronectes platessa*, S.v. = *Solea vulgaris*, L.n. = *Lates niloticus*, P.f. = *Perca fluviatilis*). "M" indica il marker "100bp DNA ladder" (New England Biolabs)

ribosomale 5S è infatti costituito da una sequenza codificante di 120 nucleotidi, molto conservata tra le specie, e una sequenza non codificante (non transcribed spacer, NTS), che varia da specie a specie sia in lunghezza che in sequenza (fig. 2).

Abbiamo recentemente dimostrato che è possibile discriminare le diverse specie con la tecnica PCR eseguita con primer "universali" disegnati sulla sequenza conservata e con primer specifici disegnati sulla sequenza dell'NTS. Entrambe le sequenze possono essere amplificate nella stessa reazione con una PCR multiplex (attualmente tale tecnica trova la sua applicazione più frequente in diagnostica). Così concepita l'analisi richiede solo alcune ore e potrebbe essere condotta anche in laboratori mobili. Qualora sorgessero contestazioni, basterebbe procedere al sequenziamento.

RIASSUNTO

Lo studio dei marcatori molecolari utili per monitorare la qualità in acquacoltura può essere affrontata in modi differenti e la biologia molecolare ne offre una certa varietà.

Proprio con queste tecniche, nel corso di questi ultimi anni, abbiamo collezionato una serie di biomarcatori per mezzo dei quali possiamo porre delle domande al pesce e ottenere delle risposte. I marcatori molecolari, per la loro natura, sono in grado di descrivere una risposta immediata a livello genico alle pressioni ambientali, quindi di monitorare il percorso qualitativo della filiera molto prima che in essa compaiano caratteri zootecnici, immunologici o patologici indesiderati, causati da errori nei protocolli di gestione.

ABSTRACT

Molecular biomarkers are useful to evaluate quality in aquaculture. By means of these techniques, in the last few years, we have obtained several biomarkers (put together in a sort of tool-box) that we use to question the fish and obtain the right answer.

BIBLIOGRAFIA

- ASENSIO L., GONZÁLEZ I., FERNÁNDEZ A., CÉSPEDES A., RODRÍGUEZ M.A., HERNÁNDEZ P.E., GARCÍA T. AND MARTÍN R. (2001): *Identification of Nile Perch (*Lates niloticus*), Grouper (*Epinephelus guaza*) and Wreck Fish (*Polyprius Americanus*) fillets by PCR amplification of the 5S rDNA gene*, «Journal of AOAC international», 84 (3), pp. 777-781.
- CARRERA E., GARCÍA T., CÉSPEDES A., GONZÁLEZ I., FERNÁNDEZ A., ASENSIO L.M., HERNÁNDEZ P.E., MARTÍN R. (2000): *Differentiation of smoked *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* and *Brama raii* using the nuclear marker 5S rDNA*, «International journal of food science and technology», 35, pp. 401-406.
- GORNATI R., PAPIS E., RIMOLDI S., CHINI V., TEROVA G., PRATI M., SAROGLIA M., BERNARDINI G. (2005): *Molecular markers for animal biotechnology: sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) HMG-CoA reductase mRNA*, «Gene», 344, pp. 299-305.
- GORNATI R., TEROVA G., VIGETTI D., PRATI M., SAROGLIA M., BERNARDINI G. (2004): *Effects of population density on seabass (*Dicentrarchus labrax*) gene expression*, «Aquaculture», 230, pp. 229-239.
- KARAIKOU N., TRIANTAFYLIDIS A. AND TRIANTAPHYLIDIS C. (2003): *Discrimination of three *Trachurus* species using both mitochondrial- and nuclear-based DNA approaches*, «J. Agric. Food Chem.», 51 (17), pp. 4935-4940.
- MORAN P., GARCIA-VAZQUEZ E. (2006): *Identification of highly prized commercial fish using a PCR-based methodology*, «Biochemistry and molecular biology education», 34 (2), pp. 121-124.
- PENDAS A.M., MORAN P., FREIJE J.P. AND GARCIA-VAZQUEZ E. (1994): *Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA*, «Cytogenet Cell Genet», 67 (1), pp. 31-36.
- ROSSI F., CHINI V., CATTANEO A.G., BERNARDINI G., TEROVA G., SAROGLIA M., GORNATI R. (2007): *EST-based identification of genes expressed in perch (*Perca fluviatilis*, L.)*, «Gene expression», 14, pp. 117-127.
- TEROVA G., BERNARDINI G., BINELLI G., GORNATI R., SAROGLIA M. (2006): *cDNA encoding sequences for myostatin and FGF6 in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) and the*

- effect of fasting and refeeding on their abundance levels*, «Domest Anim Endocrinol.», 30, pp. 304-319.
- TEROVA G., RIMOLDI S., BERNARDINI G., GORNATI R., SAROGLIA M. (2008a): *Sea bass ghrelin: molecular cloning and mRNA quantification during fasting and refeeding*, «Gen. & Comp. Endocrinology», 155, pp. 341-351.
- TEROVA G., RIMOLDI S., CHINI V., GORNATI R., BERNARDINI G., SAROGLIA M. (2007a): *Cloning and expression analysis of insulin-like growth factor I and II in liver and muscle of sea bass (Dicentrarchus labrax, L.) during long-term fasting and refeeding*, «Journal of Fish Biology», 70, pp. 219-233.
- TEROVA G., RIMOLDI S., CORÀ S., BERNARDINI G., GORNATI R., SAROGLIA M. (2008b): *Acute and chronic hypoxia affects HIF-1 α mRNA levels in sea bass (Dicentrarchus labrax)*, «Aquaculture», 279, pp. 150-159.
- TEROVA G., RIMOLDI S., LARGHI S., BERNARDINI G., GORNATI R., SAROGLIA M. (2007b): *Regulation of progastrin mRNA levels in sea bass (Dicentrarchus labrax) in response to fluctuations in food availability*, «Biochemical and Biophysical Research Communications», 363, pp. 591-596.
- TOGNOLI C., ROSSI F., DI COLA F., BAJ G., TONGIORGI E., TEROVA G., SAROGLIA M., BERNARDINI G., GORNATI R. (2010): *Acute stress alters transcript expression pattern and reduces processing of proBDNF to mature BDNF in Dicentrarchus labrax*, «BMC Neuroscience», 11 (4), pp. 1-17.