



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Dipartimento di Sanità pubblica, Patologia comparata  
e Igiene veterinaria**

*Scuola di Dottorato di Ricerca in  
SCIENZE VETERINARIE*

**Indirizzo in**

*“Sanità pubblica veterinaria e Patologia comparata”*

*XX Ciclo*

**“IDENTIFICAZIONE DI SPECIE DELLO STOCCAFISSO,  
NELL’OTTICA DELL’ISPEZIONE SANITARIA DI PRODOTTO”**

**Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Marco MARTINI**

**Supervisore : Ch.mo Prof. Valerio GIACCONE**

**Correlatore : Dott.ssa Barbara CARDAZZO**

**Dottorando: Gianluca BERTOJA**

**31 gennaio 2008**

# INDICE

INTRODUZIONE

SCOPO DELLA TESI

MATERIALE E METODI :

:

1. metodi morfometrici per la valutazione del prodotto importato
2. metodi molecolari per la valutazione del prodotto importato:
  - campioni
  - analisi molecolare dei campioni della specie di riferimento
  - real-time assays

RISULTATI:

1. analisi morfometrica di *Gadus morhua* e *Gadus macrocephalus*
2. analisi statistica di *Gadus morhua* e *Gadus macrocephalus*
3. analisi molecolare di *Gadus morhua* e *Gadus macrocephalus*

CONCLUSIONI

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

RIFERIMENTI DI NORMATIVA

## RIASSUNTO

Lo studio si è svolto, in base alle normative vigenti nel settore dell'igiene (Reg. CE 178/2002 e i Reg. 852-853-854/2004, Reg. 2073/2005, Reg. 333/2007 e il Reg. 1441/2007), al fine di elaborare un modello di tracciabilità e rintracciabilità completo, inglobante le numerose e varie problematiche igienico-sanitarie, su un prodotto del comparto della pesca in Italia storicamente importante e significativo, lo stoccafisso. A valorizzare tale ricerca è stato anche la modifica del 5 agosto 2005 al Decreto ministeriale del 14 gennaio 2005, per quanto concerne la denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale. Con tale atto si sono riconosciute 2 solo specie di Gadidi per la dicitura in etichetta di stoccafisso, *Gadus morhua* (*Gm*) e *Gadus macrocephalus*, mentre precedentemente erano anche riconosciute *Gadus challarias* e *Gadus ogak*. È stato studiato la filogenesi dei Gadidae individuando la classificazione morfologica e filogenetica; si sono studiati e valutati la fisiologia e la riproduzione, le procedure di pesca (lining, gillnet, seine, trawl) che vengono praticate, la lavorazione in barca del pescato (iugolazione, decapitazione, eviscerazione, asportazione dell'osso della coda, desquamazione, lavaggio e refrigerazione), l'essiccazione naturale (valutando come, durante il periodo di essiccazione, l'evento atmosferico può essere determinante), la classificazione finale, alle Isole Lofoten, del prodotto secondo la qualità e la taglia e, il momento finale, la spedizione in sacchi di iuta in Italia, analizzando come, un singolo momento o più, possono essere fattori determinanti, positivamente o negativamente, sulla qualità del prodotto fresco o del prodotto finale. Tali studi sono stati raccolti e discussi in un workshop svoltosi con Stefano Peruzzi, Associate Professor, PhD, Aquaculture and Fish Genetics, Norwegian College of Fishery Science, University of Tromsø, Department of Aquatic BioSciences, con il rappresentante del settore acquacoltura della Fiskeriforskning of Brevikva e Sigrid Brnyestad, Senior Research Engineer, Biotechnology Group, DNV Research, Høvik, Norvegia. Da tale confronto si sono potute delineare concrete linee guida sperimentali per la filiera primaria di tale pesce, evidenziando la valutazione del rischio ed individuando i "Punti Critici". Successivamente si è continuato lo studio nel campo della biologia molecolare, per la specifica identificazione della specie, in modo che sia rapido, preciso, economico ed applicabile sia sul prodotto fresco sia sul prodotto essiccato. Per questo motivo sono stati campionati porzioni di muscolo di 10 individui di *Gm* appartenenti a diverse popolazioni delle coste norvegesi e individui appartenenti alle specie filogeneticamente vicine a *Gm* il cui habitat geografico fossero le coste norvegesi: *Micromesistius poutassou*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Gadiculus argenteus*, *Gadus* (*Merlangius*) *merlangus*, *Brosme brosme* e *Pollachius virens*. Queste sono le specie che, sia per caratteristiche morfologiche che come habitat potrebbero entrare, in sostituzione di *Gm*, nella produzione dello stoccafisso norvegese. Una volta estratto il DNA l'appartenenza alla specie è stata verificata mediante amplificazione in PCR e successiva determinazione della sequenza nucleotidica. Le due regioni amplificate contengono una porzione del gene mitocondriale SSU-rRNA16S e una porzione del gene mitocondriale Citocromo b, le cui sequenze, una volta confrontate con il database GenBank hanno permesso l'identificazione di specie. In questo modo si dispone di una collezione di DNA utili per la messa a punto di un saggio molecolare per l'identificazione di specie *Gm*. Per la messa a punto di un saggio di identificazione di specie è stato necessario individuare un marcatore universale che potesse servire da controllo interno di amplificazione. Il gene mitocondriale SSU-rRNA16S che presenta delle regioni nucleotidiche molto conservate tra tutte le specie di Gadidi si prestava bene a tale scopo. Per l'identificazione di un marcatore specie specifico su cui disegnare un saggio in PCR che amplificasse solo il DNA di *Gm* si sono incontrate inizialmente delle difficoltà: il primo saggio disegnato sul gene mitocondriale *Cox1* si è poi alla verifica dimostrato poco specifico in quanto amplificava alcune altre specie vicine. Si è quindi proceduto al disegno di un saggio sul gene mitocondriale *ATP6\_8*, e in questo caso le successive verifiche hanno dimostrato una sufficiente specificità per identificare correttamente la specie *Gm*. I due saggi (*16S*-universale e *GmATP6\_8*) sono stati messi a punto in PCR real-time in quanto è uno strumento che permette analisi più rapide, precise ed economiche in quanto viene eliminata tutta la fase di analisi post-PCR. Successivamente 437 campioni di prodotto *Gadus morhua* essiccato relativi alla produzione 2006 e 50 campioni relativi alla produzione 2007 sono stati prelevati, in Italia, presso mercati ittici nazionali, importatori e alcune grossa distribuzioni. L'identificazione dei soggetti, effettuata singolarmente, è avvenuta tramite valutazione visiva e fotografica (apparecchio fotografico OLYMPUS  $\mu$  700, qualità immagine SHQ 3072  $\times$  2304, e con cavalletto fotografico di 1 metro di altezza). Il campionamento è stato effettuato dalla pinna caudale e ventrale. Il DNA è stato estratto con successo da 306 campioni ed è stato sottoposto ad analisi utilizzando i due saggi molecolari in PCR real-time *16S*-universale e *GmATP6\_8* (1° fase di screening: analisi del  $\Delta$ Ct con *Gm*  $\Delta$ Ct < 3). Di questi, 35 sono stati poi sottoposti ad analisi di sequenza (2° fase di screening) sia per verificare che il saggio fosse specifico anche sul prodotto essiccato (15 campioni scelti a caso), sia per verificare alcuni campioni che alla 1° fase di screening risultavano dubbi (20 campioni: 9 con  $\Delta$ Ct > 3 e 11 con  $\Delta$ Ct > 5). Per l'analisi di sequenza è stata amplificata una regione del gene *ATP8\_6* che comprende la porzione utilizzata nel saggio in real-time PCR, in questo modo attraverso il sequenziamento si può sia determinare la specie del campione, sia verificare le regioni di allineamento dei primer del *GmATP8\_6*-assay. Il gruppo con  $\Delta$ Ct < 3, quindi con identificazione certa dopo la 1° fase di screening è costituito da 278 campioni e rappresenta il 90,85 % del totale. Dopo sequenziamento di tutti i campioni selezionati solo 2 tra i 9 con  $\Delta$ Ct > 5, soglia poi verificata per identificare *Gm*, sono risultati non-*Gm* (rispettivamente, *Melanogrammus aeglefinus* e *Pollachius virens*). Parallelemente si è iniziato uno studio statistico per supportare alcuni problemi di caratterizzazione dello stoccafisso, in quanto una volta identificate alcune variabili informative legate alla specificità è possibile sia sottoporre successive partite di prodotto alla verifica della rispondenza ai requisiti dichiarati, sia mettere a confronto gruppi di partite diverse per stabilire se possono o meno appartenere alla stessa popolazione di prodotto. Le variabili informative utili alla caratterizzazione e monitoraggio sono di tipo fisico (dimensioni, peso, volume, ecc.) e/o di tipo bio-chimico (concentrazione di alcune specie bio-chimiche di interesse). Raccolte ed archiviate le tre principali misure morfometriche, con un opportuno software di elaborazione digitale si sta realizzando un insieme di elaborazioni statistiche, sia di tipo descrittivo sia di tipo inferenziale. L'enfasi dell'analisi sarà posta sul sottogruppo di unità di stoccafisso dove ciascun sottogruppo è relativo ad una varietà particolare di prodotto che viene identificato da una serie prefissata di criteri sulle proprietà qualitative dello stoccafisso. Statistiche descrittive: per ciascuna misura morfometrica e per ciascun sottogruppo di interesse misure di posizione, misure di variabilità ed istogrammi di frequenza e box-plot. Per ciascun sottogruppo di interesse: diagramma di dispersione per le due misure morfometriche e correlazione campionaria tra due misure morfometriche. Statistiche inferenziali: per ciascuna misura morfometrica e per ciascun sottogruppo di interesse si valuta l'intervallo di confidenza delle medie delle popolazioni di riferimento e l'intervallo di confidenza delle deviazioni standard delle popolazioni di riferimento. Per ciascun sottogruppo si sta valutando l'intervallo di confidenza simultaneo delle medie delle due misure morfometriche per le popolazioni di riferimento e l'intervallo di confidenza della correlazione tra due misure morfometriche. Inoltre si sta effettuando anche uno studio comparativo tra sottogruppi di interesse, così suddiviso: per ciascuna misura morfometrica e per la coppia di misure morfometriche. Al termine dell'analisi inferenziale sarà quindi possibile costruire una mappa delle caratteristiche morfometriche principali dello stoccafisso adeguata alle seguenti caratteristiche: 1) caratterizzare ciascuna sottopopolazione di interesse; 2) comparare le caratteristiche morfometriche delle sotto-popolazioni di interesse; 3) stabilire i criteri per una successiva implementazione di tecniche statistiche di controllo e monitoraggio dello stoccafisso. Con l'analisi delle GMP (Buone Pratiche di Lavorazione) e l'individuazione dei "Punti Critici" durante la pesca e la trasformazione, le tecniche di biologia molecolari proposte, congiuntamente a quelle statiche in atto, si può affermare che è stato elaborato un concreto modello di tracciabilità e rintracciabilità di un prodotto della pesca, volto a esaminare e tutelare gli aspetti della valutazione del rischio, igienico-sanitari e commerciali dall'allevamento alla tavola.

## ABSTRACT

According to regulations in force in the hygiene sector (EC norms 178/2002, 852-853-854/2004, 2073/2005, 333/2007 and 1441/2007), this study involved the preparation of a traceability/retraceability model covering the many, varied, hygienic and health problems concerning stockfish, a traditionally important and significant product from the Italian fishing industry. This research was rendered more salient partly as a result of the modification of August 5 2005 to Italian Ministerial Decree of January 14 2005, regarding the Italian name for fish species of commercial interest. To receive the official denomination of stockfish species, two Gadids were identified: *Gadus morhua* (Gm) and *Gadus macrocephalus*. Study of the phylogenesis and morphology of the Gadidae - with phylogenetics, physiology, reproduction, type of fishing practised, on-board processing of catch (severing of jugular vein, decapitation, evisceration, removal of tail bone, descaling, washing, refrigeration), natural drying, and final classification of the product according to quality and size criteria - involves examination of how a single stage or a few stages may have a considerable effect, positive or negative, on the quality of the fresh or finished product. These aspects were discussed during two workshops at Tromsø and Høvik, in Norway. Comparisons revealed clearcut experimental guidelines for the primary *filière* of stockfish, highlighting risk assessment and identifying "Critical Points". Study continued in the field of molecular biology, for definitive identification of the species, both fresh and dried, in a rapid, precise and economical manner. For this purpose, muscle portions from 10 specimens of Gm were sampled, belonging to various populations found off the Norwegian coasts and others belonging to species phylogenetically close to Gm, from a similar geographical habitat: *Micromesistius poutassou*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Gadiculus argenteus*, *Gadus (Merlangius) merlangus*, *Brosme brosme* and *Pollachius virens*. These species, as regards both their morphological characteristics and their habitat, may enter the production of Norwegian stockfish to replace Gm. After DNA extraction, species identification was ascertained by PCR amplification and determination of nucleotide sequences. The two amplified regions contain a portion of the mitochondrial gene SSU-rRNA16S and one of the mitochondrial gene Cytochrome b, the sequences of which were compared with the GenBank database, allowing correct species identification. This meant that a DNA file could be compiled, useful for preparing a molecular assay for identifying Gm species. For this, a universal marker for use as an internal amplification check also had to be identified. The mitochondrial gene SSU-rRNA16S, which has the highest conserved nucleotide regions among all the Gadid species, turned out to be the most suitable. Initial difficulties were encountered in identifying a species-specific marker on which to design a PCR assay to amplify only Gm-DNA, and the first assay on mitochondrial gene *CoxI* turned out to be poorly specific, in that it also amplified a few other neighbouring species. An assay on mitochondrial gene *ATP6\_8* was thus designed, and later checks showed that it was sufficiently specific to identify Gm species correctly. The two assays (16S-universal and GmATP6\_8) were carried out in real-time PCR, a tool which allows rapid, precise and low-cost analyses, since the whole post-PCR analytical phase can be eliminated. Then, 437 samples of dried *Gadus morhua* produced in 2006 and 50 produced in 2007 were procured from Italian fish markets, importers and wholesale distribution chains. Identification of each single sample was carried out by both visual and photographic inspection, and tissues from caudal and ventral fins were sampled. DNA was successfully extracted from 306 samples and analysed by 16S-universal and GmATP6\_8 (1st screening phase: analysis of  $f\phi Ct$  with Gm  $f\phi Ct < 3$ ). Of these two assays, 35 were then submitted to sequence analysis (2nd screening phase), both to verify if the assay was specific even on dried products (15 samples chosen at random) and in order to recheck any samples that had been considered as dubious during the first screening phase (20 samples: 9 with  $f\phi Ct > 3$  and 11 with  $f\phi Ct > 5$ ). For sequence analysis, a region of gene *ATP8\_6* was amplified, including the portion used for the real-time PCR assay. Thus, sequencing determined both the correct species and verified the aligned regions of the primers used for the GmATP8\_6-assay. The group with  $\Delta Ct < 3$  - that is, definitely identified after the 1st screening phase - contained 278 samples, i.e., 90.85 % of the total. After sequencing of all selected samples, only two of the nine with  $f\phi Ct > 5$  (the threshold identifying Gm), turned out to be non-Gm (*Melanogrammus aeglefinus* and *Pollachius virens*, respectively). In parallel, a statistical study was also carried out in support of some characterisation problems encountered in stockfish, and, after identification of some informational variables associated with specificity, it was possible to compare later batches of product with their declared contents and also to compare groups of different batches, to establish if they did or did not belong to the same population. The variables in question were physical (size, weight, volume) and biochemical (concentration of some biochemical species of interest). The main morphometric measurements were collected and filed, and digital software was then used to create a set of descriptive and inferential statistics. Analysis focused in particular on one subgroup of a stockfish batch/, in which each subgroup regarded a particular variety of the product, identified by an established series of criteria concerning the qualitative properties of stockfish. Descriptive statistics: for each morphometric measurement and subgroup of interest, position and variability measurements were carried out and frequency histograms and box-plots were prepared. Inferential statistics: for each morphometric measurement and subgroup of interest, the confidence intervals of the mean populations and standard deviations were made for each population. For each subgroup, the simultaneous confidence interval of the means of the two morphometric measurements for the reference populations and the confidence interval of the correlation between them was made. A comparative study among subgroups - for each morphometric measurement and for each pair of such measurements - is almost completed. After inferential analysis, a map of morphometric characteristics was constructed, showing the following: 1) characterisation of each subpopulation of interest; 2) comparison of the morphometric characteristics of each subpopulation of interest; 3) list of criteria for later implementation of technical control and monitoring statistics for stockfish. With careful attention to "Good Practices in Processing", identification of "Critical Points" during fishing and processing, and the proposed inspection techniques and molecular biology and statistical techniques, it may be stated that a valid model for the traceability/retraceability of a fish product has been prepared, suitable for examining and safeguarding aspects concerning risk assessment, hygiene and health, and marketing, from the sea to the table.

## INTRODUZIONE

La pesca e l'acquacoltura sono state nel corso della storia e lo sono, allo stato attuale, una risorsa alimentare importante e significativa che è riuscita a soddisfare fabbisogni alimentari qualitativi e quantitativi disparati, soprattutto nei paesi poveri, distribuiti diversamente nel contesto geografico mondiale prevalentemente nell'Oriente e nel Sud America.

E' un'attività molto antica con origini risalenti ad oltre 4000 anni fa: di tale affermazione si può trarre una significativa prova da un bassorilievo risalente circa al 2500 a. C. .

Presente nella tomba di Aktihetep, si rappresentava un uomo che pescava delle tilapie in uno stagno d'acqua dolce.



Figura 1: Antico Egitto, bassorilievo tombale.

Parimenti sono ascrivibili a circa il 1135 a. C. la nascita dei primi tentativi di acquacoltura, in particolare di carpicoltura, in Oriente e precisamente in Cina, dovuta a Fang, il padre della piscicoltura orientale che fu il fautore dei primi allevamenti rappresentati da stagni, con significative testimonianze pratiche dello stesso sull'accrescimento ed il comportamento dei pesci (tilapie e carpe erbivore).

In Italia, durante l'epoca romana, nelle lagune presenti nel nostro territorio venivano allevati e raccolti molluschi, in particolare ostriche.

Anche in Europa, in particolare modo nel bacino del Mediterraneo e nell'area geografica dei mari del Nord, si è assistito ad un uso continuo delle risorse ittiche che hanno formato, oltre che delle fonti nutrizionali, anche delle tradizioni alimentari per la popolazione residente conosciute ed apprezzate a livello gastronomico in tutto il mondo nel corso dei tempi.

Classico esempio è appunto, per l'Italia, lo stoccafisso.

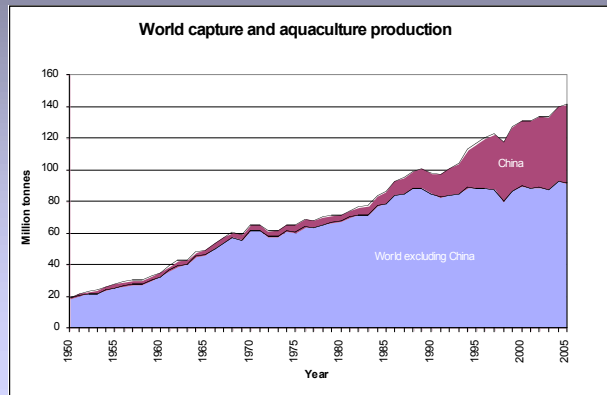
La piscicoltura moderna europea ha inizio con un risultato tecnico-scientifico certamente rilevante: la prima fecondazione artificiale di uova di trota di ruscello eseguita da Stephen Ludwig Jacobi, nel 1741.

Tale tecnica, riscoperta e affinata nel 1842 dal Prof. Coste del Collegio di Francia, diede l'avvio alla diffusione della trotiltura, che un secolo dopo esplose come la pratica di acquacoltura più diffusa nel mondo nord-occidentale.

Negli ultimi anni, e più precisamente dal 1980 in poi, l'acquacoltura sia d'acqua dolce che marina, ha conosciuto in tutto il mondo una crescita ed uno sviluppo esponenziale sia nella produzione che nelle tecnologie produttive.

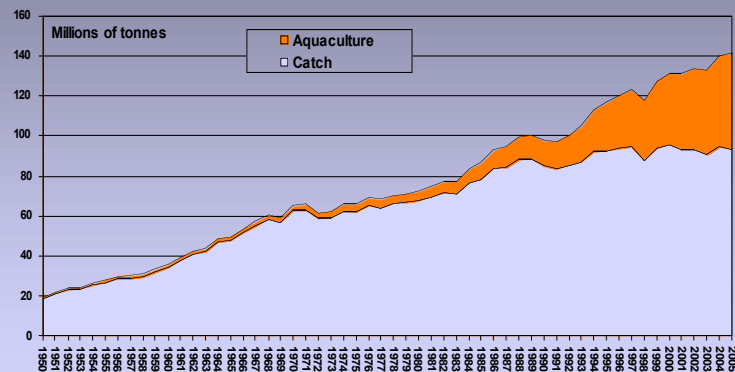
Si può addurre forse come motivazione anche l'impoverimento delle risorse ittiche naturali, con i dati di produzione e cattura nel mondo, vedasi figura 2.

## World capture and aquaculture production



1

## World Fish Supply (Production)



FISHSTAT 2007

2

Figura 2 : cattura e produzione acquacoltura nel mondo (fonte F.A.O. 2007).

In alcune parti dell'Italia c'è una tradizione antichissima che risale addirittura al Medioevo: quella di consumare particolari e pregiatissime specie di merluzzo nordico pescato ed essiccato in Norvegia, precisamente nel Mar di Norvegia e nel Mar di Barents.

E' proprio della Norvegia che i primi mercanti veneziani importarono a Venezia lo

stockfish: il capitano Pietro Querini naufragò nel 1432 davanti alle Isole Lofoten, precisamente a Rost (vedasi figura 3) e per sopravvivere si cibò di questo tipico prodotto locale; da allora tale prodotto è sempre stato uno dei pesci più amati e consumati in Italia e dai Veneti, tant'è che sono numerose le ricette per cucinarlo, soprattutto con la polenta.



Figura 3 : tragitto del percorso di Pietro Querini

L'Italia risulta essere il maggior paese importatore e consumatore di stockfish al mondo: difficile risulta però conoscere quantitativi e numeri.

Se nei secoli addietro lo stockfish poteva essere un "cibo da poveri", necessario sostituto di carni ben più costose, oggi l'approccio del consumatore italiano si è capovolto: è considerato un alimento di alto pregio, fonte di proteine nobili e molto magro, perfettamente in linea con i più moderni criteri nutrizionali di una dieta equilibrata.

In questo ultimo periodo si sta sviluppando secondo Roselund et al, 2007, l'allevamento di forme giovanili di merluzzo nordico: dal 2000 si è iniziato a produrre circa 500000 mila forme giovanili per arrivare agli 8 milioni nel 2005, con una previsione nel 2013 di circa 80 milioni di forme giovanili. Tale tendenza risulta significativa in quanto muterebbe l'approccio storico di tale prodotto, sempre fino ad ora solamente pescato, come illustrato nella figura 4 a e b.

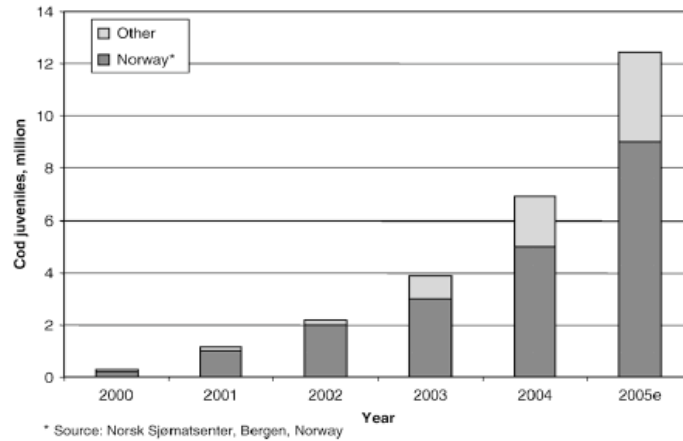


Fig. 1. Total production of cod juveniles (> 2 g) in the years 2000 to 2004 and estimates for 2005. Other includes production in Canada, Iceland, UK and the USA.

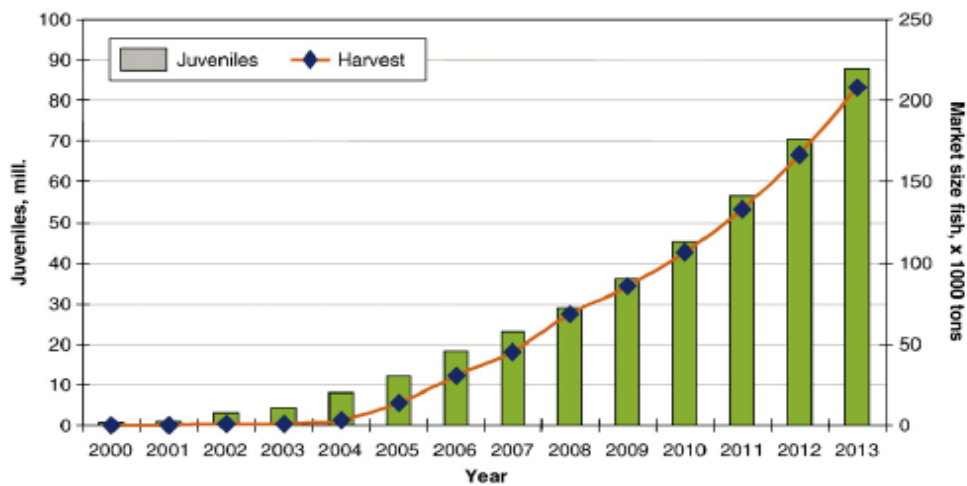


Figura 4 a e b : produzione totale di forme giovanili di merluzzo nordico nel mondo e previsioni di produzione in Norvegia.

Risulta interessante dal punto di vista scientifico valutare lo stato di freschezza e di conservazione: infatti numerosi sono gli studi scientifici nel mondo che hanno iniziato a delineare *“a model to predict fish quality from instrumental features”*, basato sulla

valutazione sensoriale della pelle, *rigor mortis* e odore delle branchie tramite tecniche strumentali quali colorimetria, analisi del tessuto e naso elettronico, riuscendo a dare una valutazione quantitativa dello stato di freschezza ed una valutazione del “*Quality Method Index (QIM)*”. Successivamente risulta significativo il lavoro di Bonilla et al. (2007), che analizza e mette a punto uno Metodo di Qualità, Quality Index Method (QIM) specifico per *Gadus morhua* (vedasi figura 5) volto appunto a determinare parametri di freschezza, in giorni, del prodotto in ghiaccio.

Quality Index Method scheme developed for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets with skin

Quality parameter	Description	Score	
Skin	Brightness	Iridescent pigmentation	0
		Rather dull	1
		Dull	2
	Mucus	Uniform, thin, transparent	0
		Little thicker, opaque	1
		Clotted, thick, yellowish	2
Flesh	Texture	Firm	0
		Rather soft	1
		Very soft	2
	Blood	Bright red, not present	0
		Dull red	1
		Shadowy, brown	2
	Odour	Fresh, neutral	0
		Seaweedy, marine, grass	1
		Sour milk	2
	Colour	Acetic, ammonia	3
		White, greyish	0
		Some yellowish, a little pinkish	1
	Bright	Yellow, over all pink	2
		Transparent, bluish	0
		Opaque	1
	Gaping	Milky	2
		No gaping, one longitudinal gaping at the neck part of the fillet	0
		Slight gaping less than 25% of the fillet	1
		Slight gaping, 25-75% of the fillet	2
		Deep gaping or slight gaping over 75% of the fillet	3

Quality index (0-18)

Figura 5: Q.I.M per *Gadus morhua* , (Bonilla et al., 2007)

Con l'istituzione dall'Agenzia europea della sicurezza alimentare (Reg. 178/2002) si è iniziato a delineare maggiormente la storia del prodotto alimentare: fino ad una trentina di anni fa, il consumatore comprava un prodotto alimentare basandosi soprattutto sulla

fiducia che riponeva nel produttore o nel dettagliante, fiducia che derivava dalla conoscenza diretta e dall'esperienza positiva sulla qualità dei prodotti, spesso di origine locale, precedentemente acquistati dalla stessa fonte.

La maggiore industrializzazione, il miglioramento dei mezzi di trasporto e l'avvento del Mercato Unico Europeo hanno aumentato significativamente la movimentazione e l'importazione dei prodotti alimentari e di conseguenza anche dei prodotti dell'acquacoltura, contribuendo a rendere meno certa, se non anonima, la provenienza dei prodotti. Attualmente il consumatore non acquista più solo dal negoziante di fiducia, ma sempre più spesso nel luogo a lui più facilmente accessibile, o in quello dove trova prezzi più bassi.

Se da un lato questa situazione ha portato a notevoli vantaggi pratici, dall'altro ha aggravato la situazione di mancanza di informazioni precise e complete sull'origine degli alimenti e sulle aziende coinvolte nella filiera del prodotto. Spesso sui prodotti alimentari si trovava soltanto il nome dell'ultima azienda della filiera produttiva (trasformatore o distributore), mentre era sconosciuta la "storia precedente" del prodotto.

La difficoltà di identificare in tempi brevi tutte le componenti della filiera che hanno contribuito al prodotto, rallenta fortemente il lavoro degli organismi di controllo. Nel caso di gravi rischi alimentari, tale carenza di informazioni rende la situazione molto vulnerabile quanto a sicurezza alimentare, traducendosi in una generale caduta di fiducia da parte dei consumatori che ne vengono a conoscenza, con riflessi a volte drammatici sul mercato del settore agro-alimentare (vedi caso BSE, influenza aviaria e diossine).

Questa fiducia è stata recuperata garantendo la trasparenza delle informazioni relative alla intera filiera produttiva o "rintracciabilità", strumento sanitario che si traduce in un aumento della sicurezza alimentare.

La definizione di tracciabilità e rintracciabilità si trova in numerose fonti giuridiche e si può così esprimere: "La capacità di ricostruire la storia e di seguire l'utilizzo di un prodotto, in

questo caso dell'acquacoltura mediante identificazioni e percorsi documentati, relativamente all'allevamento ed al sito idro-geografico dello stesso, alla specie allevata, alla metodica nutrizionale degli animali, a come sono stati allevati gli animali, alla successiva catena alimentare, ai flussi materiali ed agli operatori di filiera (ricordando che bisogna considerare sia la rintracciabilità interna ad ogni livello, sia la rintracciabilità fra le varie organizzazioni)".

Anche il Libro Bianco sulla Sicurezza Alimentare ha posto la filiera e la rintracciabilità al centro della propria proposta: "Il principio ispiratore del presente Libro Bianco è che la politica della sicurezza alimentare deve basarsi su un approccio completo e integrato... Ciò significa che esso deve considerare l'intera catena alimentare (filiera), dai campi alla tavola..." (capitolo 2, punto 8); "... una politica alimentare efficace richiede la rintracciabilità dei percorsi... degli alimenti nonché dei loro ingredienti" (capitolo 2, punto 10).

La parola chiave della rintracciabilità sembra dunque essere quella della "trasparenza totale", ovvero la conoscenza di tutte le fasi del processo e di tutti i trattamenti effettuati. Il comparto ittico, in particolare, presenta aspetti di notevole complessità di filiera che rende ancora più necessaria, anche se più difficile, la realizzazione di una piena trasparenza. Fino alla fine del 2002, momento dell'entrata in vigore del Reg. (CE) 178/2002, il consumatore non era in grado di sapere se il prodotto acquistato era pescato o allevato, quando e dove era stato catturato (origine nazionale o estera) o, specialmente nel prodotto lavorato, se era fresco o congelato e scongelato.

Nel settore ittico, pertanto, la rintracciabilità e l'etichettatura del prodotto si presentano come esigenze improrogabili del mercato, se si vuole avere a disposizione l'informazione necessaria per rintracciare in tempi rapidi le partite difettose e se si vuole informare il consumatore, come richiede per alcuni aspetti anche la recente legislazione sulla

organizzazione comune dei mercati nel settore della pesca e dell'acquacoltura (Regolamento CE 2000/104).

Anche se esistono delle difficoltà oggettive nelle operazioni per applicare tali strumenti, non deve essere dimenticato che la garanzia che offre un prodotto tracciato, che permette la piena rintracciabilità a monte della filiera, si traduce quasi automaticamente in maggiore sicurezza alimentare e maggiori volumi di consumo, come illustrato nella figura 6.



Figura 6 : esempio di tracciabilità e rintracciabilità in una filiera agro-alimentare.

Parimenti, per quanto concerne l'approccio statistico, risulta doveroso introdurre il concetto di morfometria (dal greco *μορφή* che significa forma e *μέτρον* che significa misura): è una disciplina caratterizzata da un insieme di metodi che si occupano dello studio della forma a partire da alcune misurazioni empiriche della forma stessa.

Il termine morfometria viene applicato alle scienze biologiche intese nel senso più lato.

In termini più formali, la morfometria si può definire come lo studio quantitativo della variazione delle forme biologiche avente come obiettivo lo studio delle associazioni che intercorrono tra forme progressivamente diverse, al fine di identificare le cause e gli effetti delle modificazioni nella forma.

Si tratta quindi dello studio della forma che tiene in considerazione lo sviluppo evolutivo della specie in esame: tale concetto è stato significativo ed importante per la mia tesi .

La morfometria coinvolge il calcolo di aree, volumi e altri dati quantitativi che a volte (ma non sempre) sono ottenuti dopo aver stabilito la posizione di specifici punti di interesse detti *landmark*.

Una volta riportata la forma in un piano, i landmark sono particolari punti descritti da coordinate cartesiane, associati eventualmente a nomi che derivano dalla proprietà di omologia (corrispondenza biologica) tra forme primarie. Si tratta di punti di corrispondenza in ciascun individuo che sono uguali tra ed entro popolazioni della stessa specie (Dryden e Mardia, 1998).

Quindi i landmark non hanno solo una posizione ben definita, ma hanno la stessa posizione in ogni forma oggetto di studio.

Le scienze biometriche hanno avuto origine e uno sviluppo secondo due principali linee guida: una prima origina direttamente dalla necessità di quantificare in modo oggettivo la variabilità nelle specie animali mentre una seconda ha preteso di rappresentare un modo visivo, immediato, i cambiamenti di forma tra organismo ed organismo (Slice et al., 1996).

Il secondo filone della morfometria è associato al nome di D'Arcy Thompson, anche se le sue origini sono da collocarsi nel XV secolo con la scoperta delle trasformazioni dovute alla prospettiva.

Sul finire degli anni '80, sotto l'impulso di un gruppo ristretto di ricercatori, tra cui Fred Bookstein e Jim Rohlf, queste due esperienze si sono fuse dando origine alla cosiddetta

*morfometria geometrica.*

Nell'applicazione delle tecniche morfometriche al caso studio dello stoccafisso, ci focalizzeremo sul primo dei due approcci, ovvero quello originato direttamente dalla biometria di Karl Pearson, Sewall Wright e Fisher e che applica soprattutto tecniche di statistica multivariata a misurazioni quantitative della forma.

Per questo motivo ci si riferisce ad esso con il nome di *morfometria multivariata*, ovvero l'insieme delle tradizionali tecniche di statistica multivariata, applicate ad prefissate variabili relative alla forma o dimensione di un oggetto, come ad esempio le distanze oppure gli angoli, con l'obiettivo di effettuare un'analisi morfometrica.

## SCOPO DELLA TESI

Con il lavoro presentato in questa tesi quindi ci si prefigge di delinare e valutare le caratteristiche generali del prodotto ittico che viene importato come *Stoccafisso*.

In riferimento alle normative vigenti nel settore dell'igiene (Reg. CE 178/2002, Reg. CE 852-853-854/2004, Reg. CE 2073/2005, Reg. 333/2007, Reg. CE 1441/2007 e successive modifiche e/o integrazioni), verrà elaborato uno studio di un modello di tracciabilità-rintracciabilità, partendo dalla produzione primaria (che a norma di legge sarà obbligatorio a partire del 1° gennaio 2009), inglobante numerose e varie problematiche ispettive, igienico-sanitarie e statistiche, sullo stoccafisso, prodotto del comparto della pesca in Italia storicamente importante e significativo.

A motivare tale ricerca è anche la modifica del 5 agosto 2005 al Decreto ministeriale del 14 gennaio 2005 , per quanto concerne la denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale.

Con tale atto si sono riconosciute 2 specie di Gadidi per la dicitura in etichetta di stoccafisso, *Gadus morhua* (Gm) e *Gadus macrocephalus*.

**ECHINODERMI**

Nr.	Ordine	Famiglia	Genere e specie	Demonimazione in lingua italiana
600	Echinodermi	Echinidae	<i>Paracentrotus lividus</i>	<b>Riccio di mare</b>
601	Echinodermi	Echinidae	<i>Loxechinus albus</i>	<b>Riccio di mare del Pacifico</b>

**PRODOTTI CONSERVATI**

Nr.	Ordine	Famiglia	Genere e specie	Demonimazione in lingua italiana
602	Gadiformes	Gadidae	<i>Gadus macrocephalus</i>	<b>Baccalà (se salato)</b>
603	Gadiformes	Gadidae	<i>Gadus morhua</i>	<b>Stoccafisso(se essiccato)</b>

05A07901

AUGUSTA IANNINI, *direttore*FRANCESCO NOCITA, *redattore*

(G503119/1) Roma, 2005 - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato S.p.A. - S.

Figura 7: Denominazione delle specie *Gadus macrocephalus* e *Gadus morhua* .

Come in altri tipi di pesce, anche per lo stoccafisso (*stockfish*) si potrebbero avere delle frodi con le quali si cerca di vendere per stoccafisso “vero” quello che non è per legge, ossia appartiene a specie di gadiformi diverse da *Gadus morhua* e *Gadus macrocephalus*. A differenza del pesce fresco crudo però, per tale prodotto il procedimento di essiccazione molto accentuato incide in modo drastico sull'integrità delle proteine muscolari, rendendo arduo ricorrere a prove diagnostiche di identificazione di specie, quali la PAGE, la PAGIF o le prove immunoenzimatiche.

Diverse metodiche molecolari basate su PCR amplification e analisi di sequenza o PCR amplification e analisi RFLP, SSCP e DGGE sono state messe a punto per l'analisi di campioni sia freschi e processati.

Queste metodiche sono sicuramente molto sensibili ma per modalità di esecuzione e costi di gestione non si adattano bene al processamento rapido di un gran numero di campioni, come richiesto dalla necessità attuale di una valutazione a campione del prodotto importato.

Sarà quindi importante per valutare tale prodotto mettere a punto una metodica di identificazione di specie, che sia rapida, sufficientemente affidabile ed economica per permetterne l'applicazione a campione sul prodotto importato.

## MATERIALI E METODI

### 1. METODI MORFOMETRICI PER LA VALUTAZIONE DEL PRODOTTO IMPORTATO

In questo studio è stata sviluppata ed applicata una metodica molecolare basata sulla PCR Real-Time per l'identificazione specie-specifica della specie *Gadus morhua* sui campioni essiccati che vengono importati ed etichettati stoccafisso.

Questa metodica permette di effettuare uno screening rapido e preciso su un gran numero di campioni con costi molto ridotti.

L'identificazione morfologica, effettuata al campionamento permette di confrontare i parametri rilevati con il dato molecolare. Le analisi sono state condotte su 437 campioni di gadiformi essiccati, prelevati in Italia, in parte presso centri di importazione specializzati, mercati ittici e in parte direttamente in retailers shop.



Figura 8: esempio di arrivo in Italia, presso un'importatore, di una partita di stoccafisso nei tipici sacchi di iuta.

Tutti i pesci, sottoposti a prelievo, erano preventivamente valutati a livello ispettivo, al fine

di verificare il loro corretto stato di conservazione e provenivano dalla Norvegia; venivano posti in vendita con la denominazione “stoccafisso”, vincolando quindi il prodotto al rispetto della normativa italiana vigente in materia.

Da ciascun pesce essiccato si procedeva, con pinze e forbici sterili, al prelievo di 20 g. di tessuto della pinna caudale e ventrale; il tessuto prelevato era subito immerso in 2 ml di una apposita soluzione fissatrice al 70% di etanolo.

Tutti gli stoccafissi di origine e produzione norvegese sono classificati, all’origine, in base ad una dettagliata e rigida “scala di classi” seguendo la classificazione del “*Norwegian Industry Standard for Fish. Classification of stockfish*”: ciascuna di questa classi individua una categoria di qualità.

Per una migliore comprensione si specifica che sono riconosciute 2 classificazioni merceologiche, in base alla morfologia e taglia, di *Gadus morhua* essiccato, così distinte ed identificabili, secondo la QUALITÀ:

- “*Prima*”: *clean nape and belly, no signs of slime formation, natural shape and open belly, no contacts stains, no frost damage, no mould and free of blemishes,*
- “*Secunda*”: *may have some coating in the belly area, may have partially closed belly, must not have gaff marks and tears, or contain remains from the liver, may be slightly frost damaged but not to the extent that fresh flesh is not visible along the backbone, may contain blood or blood stains and some mould is acceptable,*

e secondo la LUNGHEZZA: *the length of the fish is measured according to the so-called stockfish measure, the fish is measured from the middle of the curve of the collar bone to the end of the tail arch.*

Per ottenere un quadro più armonico e completo, abbiamo effettuato i prelievi scegliendo esemplari che appartenevano alle differenti categorie commerciali, così riconosciute in ambito internazionale nella sotto riportata tabella.

## PRIMA SCELTA:

<b>Ragno</b>	Lo stoccafisso deve essere del tipo più magro, senza difetti e lungo più di 60 cm. Deve avere un colore brillante.
<b>Westre Magro – WM</b> (Tynn Westre)	Tipo sottile e magro senza la minima polposità. Deve avere un colore brillante. Si trova in tre diverse dimensioni: 60/80 cm., 50/60 cm. e 40/50 cm.
<b>Westre Demi Magro – WDM</b> (Halvtynn Westre)	Deve avere gli stessi requisiti qualitativi del tipo WM, ma può essere un po' più polposo sui lati del dorso. Si trova in due diverse dimensioni: 60/80 cm. e 50/60 cm.
<b>Grand Premier – GP</b>	Un tipo particolare di stoccafisso che deve avere un colore brillante e che si può definire come un tipo di Bremese meno polposa. Deve essere lungo più di 60 cm.
<b>Lub</b>	Può avere dei piccoli difetti. Quantità: 30 – 45 pesci per 50 Kg
<b>Bremese – BR</b>	Tipo polposo. Quantità: 40 – 55 pesci per 50 Kg.
<b>Olandese – HO</b> (Vanlig Hollender)	Tipo polposo. Quantità: 58 – 63 pesci per 50 Kg.
<b>Westre Corrente – WC</b> (Vanlig Westre)	Polposo, robusto e di colore brillante. Quantità: 70 – 80 pesci per 50 Kg.
<b>Westre Ancona – WA</b>	Stoccafisso con le stesse caratteristiche e la stessa qualità del tipo Westre Corrente e Westre Demi Magro, ma più polposo. Quantità: 70 – 78 pesci per 50 Kg.
<b>Westre Piccolo – WP</b> (Liten Westre)	Deve essere di colore brillante. Quantità: 100 – 120 pesci per 50 Kg.

Lo stoccafisso più piccolo dei tipi Westre piccolo e Westre Magro 40/50 è venduto sia come Westre Piccolo Piccolo (con un numero di pesci prestabilito) oppure come Lofoten 100/200 (100 – 200 grammi per ciascun stoccafisso).

## SECONDA SCELTA:

<b>ITALIANO Grande – IG</b> (Stor Italiener)	Quantità: 55 – 60 pesci per 50 Kg. È la seconda scelta dei tipi BR / GP e WM 60/80.
<b>ITALIANO Grande Magro – IGM</b> (Stor Tynn Italiener)	Un tipo più magro della stessa grandezza e classificazione del tipo IG.
<b>ITALIANO Medio – IM</b> (Middels Italiener)	Come il tipo IG ma più piccolo. È la seconda scelta del WA / WC. Quantità: 70 – 80 pesci per 50 Kg.
<b>ITALIANO Medio Magro – IMM</b> (Middels Tynn Italiener)	Un tipo più sottile di IM oppure la seconda scelta del tipo WM 50/60.
<b>ITALIANO Piccolo – IP</b> (Liten Italiener)	È la seconda scelta del tipo WP. Quantità: 100 – 120 pesci per 50 Kg.

Tabella 1 : classificazione dello stoccafisso di prima e seconda scelta.

Per l'esattezza sono stati sottoposti ad analisi le seguenti categorie:

- Westre Magro - WM Tynn Westre (Quality Prima): tipo sottile e magro senza la minima pomposità; deve avere un colore brillante e si trova in diverse dimensioni: eseguiti 159 prelievi;
- Bremese – BR (Quality Prima): tipo polposo; quantità 40-55 pesci per 50 kg : eseguiti 27 prelievi;
- Olandese – HO (Quality Prima): tipo polposo; quantità 58-63 pesci per 50 kg : eseguiti 15 prelievi;
- LUB(Quality Prima): può avere dei piccoli difetti; quantità 30-45 pesci per 50 kg: eseguito 1 prelievo;
- Westre Piccolo - WP Liten Destre (Quality Prima): deve essere di colore brillante; quantità 100-120 pesci per 50 kg : eseguiti 27 prelievi;
- Italiano grande – IG Stor Italiener (Quality Secunda): quantità 55-60 pesci per 50 kg.. eseguiti 30 prelievi;
- Italiano Medio – IM Middels Italiener (Quality Secunda): come il tipo IG ma più piccolo; quantità 70-80 pesci per 50 kg: eseguiti 27 prelievi;
- FINMARK (Quality Secunda): eseguiti 30 prelievi.

## 2. METODI MOLECOLARI PER LA VALUTAZIONE DEL PRODOTTO IMPORTATO

### a) Campioni

I campioni delle specie di riferimento, tessuto muscolare di *Gadus morhua* (6 individui), *Micromesistius poutassou*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Gadiculus argenteus*, *Gadus (Merlangius) merlangus*, *Brosme brosme* e *Pollachius virens* sono stati gentilmente forniti da Stefano Peruzzi, Associate Professor, PhD, Aquaculture and Fish Genetics, Norwegian College of Fishery Science, UNIVERSITY OF TROMSØ, Department of Aquatic BioSciences, Norway.

Successivamente sono stati effettuati in Italia, nei mercati ittici e presso importatori, l'identificazione ispettiva e morfologica di n°. 437 campioni essiccati di *Gadus morhua*, relativi alla produzione dell'anno 2006, provenienti dalla Norvegia, dalla pinna ventrale e caudale, con pinze sterili, conservati in singole provette sterili da 2 ml. e successivamente, dopo l'estrazione del DNA, posti singolarmente in etanolo al 70%. Parallelamente ogni campione è stato identificato singolarmente con apparecchio fotografico OLYMPUS  $\mu$  700, qualità immagine SHQ 3072  $\times$  2304, con cavalletto fotografico di 1 metro di altezza.



Figura 9 . esempio di identificazione visiva di *Gadus morhua*.

## b) Analisi molecolare dei campioni delle specie di riferimento

Il DNA è stato estratto dai campioni di tessuto delle specie di riferimento utilizzando Invisorb Spin Tissue Mini kit (Invitek, Berlin). 50 ng di DNA estratto sono stati sottoposti ad amplificazione utilizzando "PRIMUS thermalcycler (MWG)", con il seguente ciclo: iniziale denaturazione per 2 min. a 94°C, per 20 sec. a 94°C, per 30 sec. alla temperatura di ogni paio di primer (vedasi tabella PRIMER), per 30 sec. a 72°C, in un volume finale di 20 micro l.

Le due regioni dei geni SSU-rRNA 16s e Cytochrome b ottenute sono state sottoposte a sequenziamento usando il "ABI PRISM Dye Terminator Cycle sequencing kit" (PE Applied Biosystem). L'elettroforesi è stata effettuata con "ABI PRISM model 377, version 2.1.1, automated sequencer".

La sequenza di ogni frammento è stata confrontata con quelle disponibili nel database Genbank, usando il programma BLAST (Altschul et al. 1990).

## c) Real-Time Assays

Le sequenze dei geni mitocondriali SSU-rRNA 16s e ATP 6\_8 delle specie elencate in tabella sono state scaricate dal database Genbank ed allineate con il programma Clustal X (Thompson et al. 1997). Le sequenze dei due geni mitocondriali SSU-rRNA 16s e ATP 6\_8 di Gm sono state utilizzate per disegnare i Real Time assays, 16s-assay univernale e GmATP8\_6-assay specie-specifico, utilizzando il programma Primer Express (Applied Biosystem).

Primer	Sequenza (5'→3')	Tm (°C)
ATP8_6F	CTTTTTACCTCTAAATGTGGG	54,0
ATP8_6R	CTGTGTTGTAGGAGTGAAG	54,5
16S_F	CCCGAAACTGAGCGAGCTAC	61,4
16S_R	TCTTTTGCCACAGAGACGGG	59,4
Primer	Sequenza (5'→3')	Tm (°C)
H15149 ( <i>cytb</i> )	AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	50,0
L14841 ( <i>cytb</i> )	AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA	50,0
16S_F	CGCCTGTTTATCAAAACAT	55,0
16S_R	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	55,0
ATP_F	TGAAACTGACCATGACACTAA	54,0
ATP_R	CTGCTGAGGAAATTAGATGAAT	54,0

Tabella n°. 2: sequenza nucleotidica dei primer utilizzati nei saggi molecolari.

Le reazioni di real-time PCR sono state effettuate in triplicato nello strumento ABI PRISM 7000, con la Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, US) utilizzando le condizioni di amplificazione fornite dal produttore, in un volume finale di 20  $\mu$ l.

L'efficienza dei real time assays è stata verificata in utilizzando 8 diluizioni seriali 1:2 di DNA estratto (partendo dalla diluizione dell'estratto 1:20) dal tessuto muscolare di *Gm*, la specificità è stata verificata utilizzando i DNA estratti dai campioni delle specie di riferimento (estratti diluiti 1:20).

Verificata efficienza e funzionalità i due saggi 16s-assay universale e *Gm*ATP8\_6-assay specie specifico sono stati utilizzati per analizzare tutti i campioni prelevati dagli importatori.

Species	SSU-rRNA16s	ATP 6_8
<i>Gadus morhua</i>	AM489716	AM489716
<i>Theragra chalcogramma</i>	DQ356946	DQ356946
<i>Micromesistius poutassou</i>	AJ517844	-
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	AM489717	AM489717
<i>Gadiculus argenteus</i>	AJ517847	-
<i>Gadus macrocephalus</i>	DQ356938	DQ356938
<i>Gadus (Merlangius) merlangus</i>	DQ020496	DQ020496
<i>Brosme brosme</i>	AJ315617	-
<i>Pollachius virens</i>	DQ356945	DQ356945
<i>Lota lota</i>	AJ517849	-
<i>Molva dipterygia</i>	AJ517848	-
<i>Trisopterus minutus</i>	AJ517846	-
<i>Danio rerio</i>	AC024175	-
<i>Pagrus major</i>	AP002949	-

Tabella n°. 3: specie e accession number delle sequenze utilizzate per ottenere gli allineamenti per disegnare i saggi real-time.

## RISULTATI

### a) Analisi morfometrica di *Gadus morhua* e *Gadus macrocephalus*

L'analisi morfologica condotta sui singoli esemplari di stockfish esaminati non ha fornito alcuna differenza dagli standard richiesti; in altri termini tutti gli esemplari sottoposti ad analisi rispondevano macroscopicamente agli standards morfologici tipici e riconosciuti di *Gadus morhua* e *Gadus macrocephalus*

### b) Analisi statistica morfometrica di *Gadus morhua* e *Gadus macrocephalus*

L'analisi statistica di seguito presentata ha potuto contare su un ampio database costituito da un campione di 301 stoccafissi.

Ai fini dell'applicazione delle tecniche morfometriche sono stati considerati 6 gruppi di stoccafisso, di cui i primi 5 costituiti da stoccafissi di prima scelta e il restante da stoccafissi di seconda scelta.

I gruppi considerati hanno numerosità campionaria ( $n$ ) molto diversa, anche se questo aspetto non pregiudica l'affidabilità dei risultati ottenuti.

In Tabella 4 sono riportate tutte le specifiche sulla definizione dei 6 gruppi che hanno costituito i vari sotto-campioni oggetto dell'analisi statistica morfometrica.

	Gruppo	Descrizione	<i>n</i>
1	BR	Bremer 15 marzo; BR 2 marzo	47
2	HO	HO 2 marzo	25
3	WA	WA 16 febb.; WA 15 marzo	36
4	WM	50-60 ; WM 50-60 16 febb.; WM 50-60 15 marzo; WM 40-50 2 marzo; WM 60-80 16 febb.; WM 60-80 15 marzo; WM 20-40 2 marzo	103
5	WP	WP 80-100 15 marzo; WP 2 marzo; WP ; 400-600	61
6	IG&IM	IG 2 marzo, IM 16 febb.; IM 15 marzo	29

Tabella 4: definizione dei gruppi di *Gadus morhua* .

Per poter procedere con l'analisi morfometrica, nella forma della stoccafisso sono stati individuati quattro landmark, ovvero punti di rilevanza anatomica ritenuti particolarmente informativi sulla forma dello stoccafisso.

I quattro landmark sono riportanti (in colore bianco) nella Figura 10.



Figura 10: Stoccafisso e landmark selezionati

Successivamente, i quattro landmark sono stati riportati mediante apposito software in ciascuna immagine digitale relativa ai 301 stoccafissi campionati in questo studio. A partire da queste immagini dotate di landmark sono state poi calcolate le distanze tra questi 4 punti, sempre mediante l'utilizzo di un apposito software. Nel seguito, con  $D_{12}$  si indicherà la distanza tra i punti 1 e 2, con  $D_{41}$  la distanza tra i punti 4 e 1, con  $D_{42}$  si indicherà la distanza tra i punti 4 e 2 ed infine con  $D_{43}$  la distanza tra i punti 4 e 3. Le quattro distanze rappresentano dunque le variabili scelte per l'analisi statistica morfometrica della forma dello stoccafisso.

Le tabelle sotto riportate contengono l'insieme delle usuali statistiche descrittive di base (media, deviazione standard, range, massimo, minimo ed ampiezza campionaria), per ognuno dei sei gruppi considerati e per ciascuna delle 4 distanze e riportano le statistiche descrittive sulle 4 variabili, in base ad un diverso criterio di classificazione dei 301 stoccafisso, ovvero per il gruppo degli stoccafissi di prima scelta (BR, HO, WA, WM, WP) e per il gruppo degli stoccafissi di seconda scelta (IM e IG), rispettivamente.

	<i>D12</i>	<i>D41</i>	<i>D42</i>	<i>D43</i>
Media	503.36	2473.77	2487.19	2295.20
Standard Error	11.40	24.14	25.09	22.22
St. Dev.	78.12	165.52	171.97	152.31
Range	339.03	762.12	770.21	680.66
Min	339.28	2207.21	2192.51	2075.47
Max	678.31	2969.33	2962.72	2756.12
Ampiezza campione	47	47	47	47

Tabella 5: statistiche descrittive gruppo BR.

	<i>D12</i>	<i>D41</i>	<i>D42</i>	<i>D43</i>
Media	484.70	2295.62	2320.27	2139.57
Standard Error	10.48	15.66	19.55	15.38
St. Dev.	52.40	78.32	97.77	76.91
Range	250.55	265.68	351.68	308.70
Min	345.68	2164.39	2127.56	1974.15
Max	596.23	2430.07	2479.24	2282.84
Ampiezza campione	25	25	25	25

Tabella 6: statistiche descrittive gruppo HO

	<i>D12</i>	<i>D41</i>	<i>D42</i>	<i>D43</i>
Media	501.08	2393.06	2405.96	2204.97
Standard Error	12.50	20.30	24.45	20.84
St. Dev.	74.97	121.78	146.72	125.02
Range	278.52	506.24	611.32	483.46
Min	369.17	2191.38	2098.17	1977.43
Max	647.69	2697.61	2709.49	2460.89
Ampiezza campione	36	36	36	36

Tabella 7: statistiche descrittive gruppo WA

	<i>D12</i>	<i>D41</i>	<i>D42</i>	<i>D43</i>
Media	475.92	2447.02	2459.45	2246.69
Standard Error	8.26	16.22	17.83	14.60
St. Dev.	83.83	164.62	180.99	148.22
Range	450.85	871.32	1121.03	834.51
Min	313.39	2032.71	1819.39	1774.49
Max	764.25	2904.03	2940.42	2609.00
Ampiezza campione	103	103	103	103

Tabella 8: statistiche descrittive gruppo WM

	<i>D12</i>	<i>D41</i>	<i>D42</i>	<i>D43</i>
Media	514.42	2403.58	2426.28	2231.39
Standard Error	10.79	19.12	21.33	17.89
St. Dev.	84.24	149.32	166.57	139.76
Range	395.92	692.41	752.79	567.55
Min	347.20	2031.01	1978.08	1893.51
Max	743.12	2723.42	2730.87	2461.07
Ampiezza campione	61	61	61	61

Tabella 9: statistiche descrittive gruppo WP

	<i>D12</i>	<i>D41</i>	<i>D42</i>	<i>D43</i>
Media	494.26	2394.01	2417.20	2159.55
Standard Error	19.53	36.30	25.88	25.17
St. Dev.	64.77	120.38	85.85	83.48
Range	189.78	365.60	279.81	269.09
Min	379.86	2251.53	2255.57	2062.93
Max	569.64	2617.13	2535.39	2332.02
Ampiezza campione	11	11	11	11

Tabella 10: statistiche descrittive gruppo IG

	<i>D12</i>	<i>D41</i>	<i>D42</i>	<i>D43</i>
Media	537.95	2464.44	2497.10	2302.15
Standard Error	19.19	62.03	61.59	55.44
St. Dev.	81.43	263.15	261.29	235.22
Range	326.01	906.62	820.10	775.31
Min	425.01	2077.26	2067.31	1887.76
Max	751.02	2983.88	2887.41	2663.07
Ampiezza campione	18	18	18	18

Tabella 11: statistiche descrittive gruppo IM.

	<i>D12</i>	<i>D41</i>	<i>D42</i>	<i>D43</i>
Mean	493.43	2420.84	2436.93	2236.27
Standard Error	4.88	9.51	10.35	8.73
St. Dev.	80.43	156.87	170.76	143.93
Range	450.85	938.32	1143.33	981.63
Min	313.39	2031.01	1819.39	1774.49
Max	764.25	2969.33	2962.72	2756.12
Sample Size	272	272	272	272

Tabella 12: statistiche descrittive stoccafissi di I scelta (BR, HO, WA, WM, WP)

	<i>D12</i>	<i>D41</i>	<i>D42</i>	<i>D43</i>
Media	521.38	2437.73	2466.79	2248.06
Standard Error	14.37	40.87	39.67	37.62
St. Dev.	77.39	220.07	213.64	202.59
Range	371.15	906.62	820.10	775.31
Min	379.86	2077.26	2067.31	1887.76
Max	751.02	2983.88	2887.41	2663.07
Ampiezza campione	29	29	29	29

Tabella 13: statistiche descrittive gruppo stoccafissi di II scelta (IG&IM)

Oltre alla disparità in termini di ampiezza campionaria tra il gruppo degli stoccafissi di prima e quelli di seconda scelta, ciò che appare dall'analisi dalle ultime due tabelle è che il gruppo di prima scelta sembra distribuirsi su valori mediamente inferiori per tutte e quattro le distanze ed in particolare relativamente alle variabili *D12* e *D42*.

Tuttavia, data la bassa numerosità del gruppo IG&IM (stoccafissi di seconda scelta) risulta difficile dare giudizi statisticamente attendibili sulla differenze dei valori medi.

Sempre nell'ambito dell'analisi descrittiva, abbiamo costruito, per ogni variabile e per ciascun gruppo, i boxplot (anche chiamati *Box & Whiskers plot*, ovvero diagramma a scatola e baffi) confrontandone la distribuzione (in termini di mediana, quartili, lunghezza baffi) con quella desumibile dalla costruzione di intervalli basati su media +/- deviazione standard.

In questo modo possiamo confrontare graficamente un indicatore robusto (come la mediana ricavabile dal boxplot) con un indicatore non robusto quale la media campionaria, in quanto esso come è noto risulta meno affidabile in caso di presenza di osservazioni anomale (*outliers*). Le tabelle con le statistiche relative ai boxplot e i corrispondenti grafici sono di seguito riportati.

Distance 1-2	BR	HO	IG&IM	WA	WM	WP
Extreme of Lower Whisker	339.282	416.274	379.863	369.168	313.394	347.197
Q1- Lower Hinge	451.423	456.631	474.128	428.527	418.877	461.983
Q2- Median	499.249	493.401	519.52	497.817	462.252	519.32
Q3-Upper Hinge	541.334	513.873	552.986	554.740	526.0245	568.032
Extreme of Upper Whisker	669.881	596.232	645.368	647.693	681.131	707.874

Tabella 14: statistiche sul boxplot (Distanza tra i punti 1 e 2)

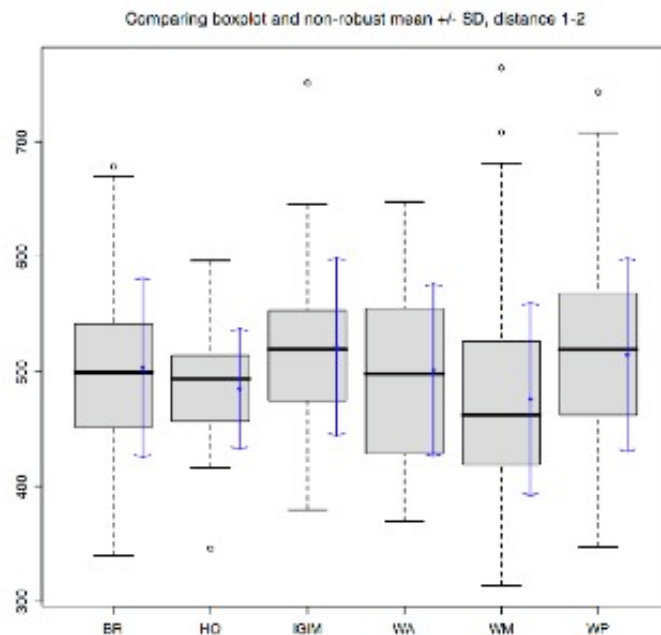


Figura 11: boxplot e intervallo basato su media +/- deviazione standard per la variabile D12.

Distance 1- 4	BR	HO	IG&IM	WA	WM	WP
Extreme of Lower Whisker	2207.209	2164.388	2077.262	2191.376	2079.833	2103.214
Q1- Lower Hinge	2344.284	2238.411	2301.657	2316.899	2355.418	2320.917
Q2- Median	2434.982	2299.358	2340.13	2396.229	2465.541	2439.611
Q3-Upper Hinge	2570.803	2349.796	2540.784	2464.343	2547.713	2497.277
Extreme of Upper Whisker	2860.092	2430.07	2878.41	2626.756	2764.352	2723.417

Tabella 15: statistiche sul boxplot (Distanza tra i punti 1 e 4)

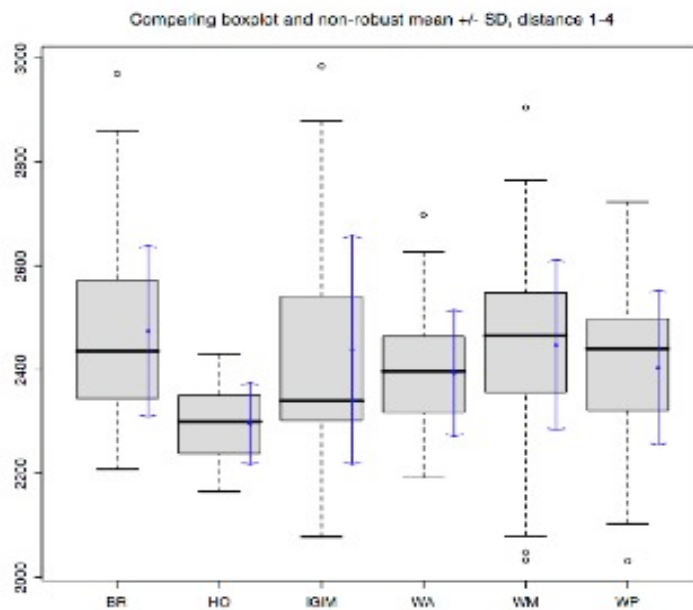


Figura 12: boxplot e intervallo basato su media +/- deviazione standard per la variabile

D42

Distance 2- 4	BR	HO	IG&IM	WA	WM	WP
Extreme of Lower Whisker	2192.509	2127.564	2067.313	2098.167	2045.014	2101.097
Q1- Lower Hinge	2356.123	2259.779	2339.368	2302.023	2345.391	2361.536
Q2- Median	2472.459	2332.36	2420.794	2409.067	2482.691	2442.345
Q3-Upper Hinge	2609.481	2400.753	2535.39	2494.785	2581.08	2544.731
Extreme of Upper Whisker	2962.723	2479.243	2801.112	2709.49	2805.441	2730.87

Tabella 16: statistiche sul boxplot (Distanza tra i punti 2 e 4)

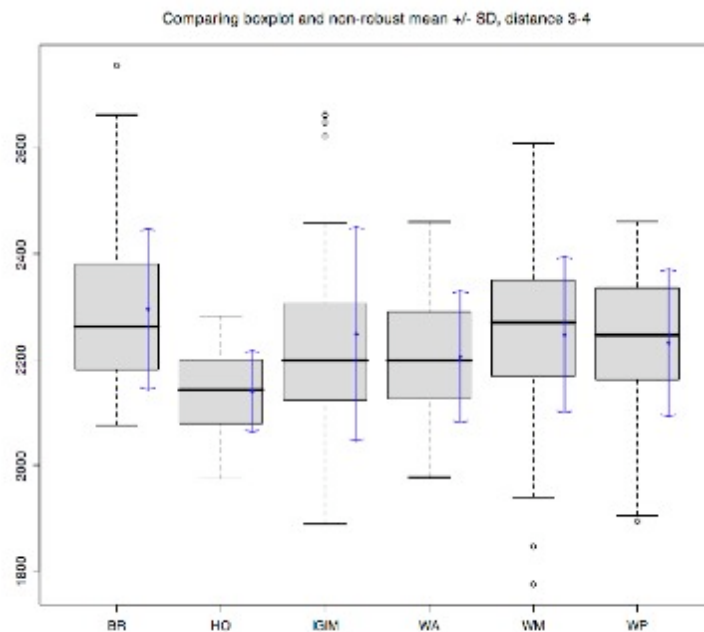


Figura 13: boxplot e intervallo basato su media  $\pm$  deviazione standard

per la variabile D43

Distance 3- 4	BR	HO	IG&IM	WA	WM	WP
Extreme of Lower Whisker	2075.466	1974.146	1887.762	1977.425	1938.864	1904.252
Q1- Lower Hinge	2180.478	2078.424	2123.403	2125.881	2168.764	2161.555
Q2- Median	2262.117	2142.382	2198.179	2198.097	2269.716	2246.288
Q3-Upper Hinge	2380.427	2199.154	2305.82	2290.358	2350.133	2335.237
Extreme of Upper Whisker	2663.304	2282.842	2458.833	2460.886	2609.002	2461.066

Tabella 17: statistiche sul boxplot (Distanza tra i punti 3 e 4)

### *Analisi statistica inferenziale*

La statistica inferenziale si occupa di utilizzare l'informazione desumibile da un campione di soggetti per trarre delle conclusioni relativamente alla popolazione a cui il campione può essere riferito. Si tratta perciò dell'insieme delle tecniche statistiche di maggiore rilevanza in qualsiasi studio empirico in quanto ciò che si fa è generalizzare i risultati ottenuti da un campione verso la popolazione, ovvero alla totalità dei casi a cui è possibile riferire il campione stesso.

Per quanto riguarda l'obiettivo dell'analisi inferenziale nel presente studio si è stabilito di studiare se è possibile discriminare i sotto-gruppi di stoccafissi rispetto delle distanze morfometriche prese in considerazione. A proposito della eventualità di comparare complessivamente gli stoccafissi di prima scelta e di seconda scelta, bisogna ricordare che stiamo parlando di un gruppo di 272 soggetti (I scelta) contro un gruppo di 29 soggetti (II scelta).

Essendo la numerosità del primo gruppo di gran lunga superiore a quella del secondo, la quantità di informazione portata dal primo gruppo è maggiore rispetto a quella portata dal secondo. Questo renderebbe particolarmente difficile il raggiungimento dell'obiettivo prefissato, quindi è più appropriato considerare la classificazione in sei gruppi, così come stabilito nell'introduzione alla analisi statistica.

Al fine di studiare se i gruppi differiscono tra loro sulla base delle distanze considerate, abbiamo inizialmente realizzato una cosiddetta analisi della varianza multivariata ad una via (*one-way Multivariate Analysis of Variance, one-way MANOVA*) e poi abbiamo rappresentato graficamente i risultati dei test sui confronti multipli. L'analisi della varianza multivariata è la naturale estensione al caso multivariato (più variabili dipendenti) dell'analisi della varianza (*ANOVA*) classica univariata (una sola variabile dipendente). Tale procedura consente di confrontare le medie di diversi gruppi per verificare l'ipotesi nulla che le medie dei gruppi sono uguali contro l'ipotesi alternativa che almeno una sia diversa.

Questo tipo di analisi porta a concludere che le medie dei gruppi sono diverse senza però evidenziare quale (o quali) gruppo ha contribuito al rifiuto dell'ipotesi nulla. Fornisce quindi un risultato globale e non da indicazioni parziali.

Una procedura in grado di fornire tale informazione aggiuntive viene chiamato procedura per confronti multipli (*Multiple Comparison Procedure*).

Quando si effettua un semplice test *t* di *Student* per confrontare le medie di due gruppi (la varianza è ignota), il ricercatore può specificare la soglia critica, o livello di significatività, che determina il rifiuto o l'accettazione dell'ipotesi nulla.

Di solito si pone tale livello di significatività  $\alpha$  uguale al 5% ( $\alpha = 0.05$ ).

Ma per evidenziare tutte le possibili differenze significative tra le medie, non è corretto ricorrere al test *t* di *Student* ripetendo l'analisi tante volte, quanti sono i possibili confronti a coppie tra i singoli gruppi. Infatti, con il metodo del *t* di *Student*, si utilizza solo una parte

dei dati e la probabilità  $\alpha$  prescelta per l'accettazione dell'ipotesi nulla, la probabilità di commettere un errore di primo tipo (rifiutare l'ipotesi nulla quando in realtà è vera) è valida solamente per ogni singolo confronto.

Ma quando si devono gestire più di due gruppi, ci sono più coppie di gruppi da confrontare e se si applica la statistica test  $t$  di *Student* standard tale livello  $\alpha$  sarà applicato a tutti i confronti e la probabilità di trovare false significatività aumenterà con il numero di confronti considerati.

Le procedure per confronti multipli sono state sviluppate per ovviare a questo problema.

In particolare, se i confronti sono numerosi, la probabilità complessiva che almeno uno di essi si dimostri significativo solo per effetto del caso è maggiore.

Effettuando  $k$  confronti con il test  $t$  di *Student* ognuno alla probabilità  $\alpha$ , la probabilità complessiva  $\alpha'$  di commettere almeno un errore di I tipo (che il test rifiuti l'ipotesi nulla quando in realtà essa è vera) diventa  $\alpha' = 1 - (1 - \alpha)^k$ . Per esempio, se si effettuano  $k=10$  confronti tra le medie di gruppi estratti a caso dalla stessa popolazione e per ognuno di essi  $\alpha = 0.05$ , la probabilità complessiva che almeno uno risulti significativo solo per effetto di fluttuazioni casuali diventa 0.40.

Uno dei metodi possibili per effettuare confronti multipli è quello proposto da Tukey. Si tratta di una procedura utile a verificare le ipotesi per cui il livello di significatività è esattamente pari ad  $\alpha$  quando le dimensioni campionarie sono uguali ed al più  $\alpha$  quando le dimensioni campionarie sono diverse. La procedura può anche essere usata per realizzare intervalli di confidenza per la differenza tra tutte le coppie di medie di popolazione.

Per questi intervalli il livello di confidenza simultaneo è  $100(1 - \alpha)$  quando le dimensioni campionarie sono uguali ed al più  $100(1 - \alpha)$  quando le dimensioni campionarie sono diverse.

La procedura di Tukey o HSD (Honestly Significant Difference) è basata sulla statistica range studentizzato. La versione per dimensioni campionarie diverse è nota anche come procedura Tukey-Kramer.

E' noto in letteratura che tale procedura è conservativa se si considera un'ANOVA ad una via nel caso di gruppi con ampiezze campionarie diverse. Tuttavia, esistono altri metodi per realizzare confronti multipli. Basta pensare ai metodi classici di Bonferroni, Scheffé o Fisher (LSD, Least Significant Difference).

Passando all'applicazione dall'analisi MANOVA al caso studio degli stoccafissi, la conclusione a cui si giunge è che i 6 gruppi presentano medie statisticamente differenti ( $p=0.0002$ ). Se poi andiamo ad effettuare, variabile per variabile, un'analisi ANOVA troviamo che anche per ogni variabile il  $p$  value è inferiore a 0.001 e se applichiamo una procedura per confronti multipli (metodo di Tukey) vediamo che per quanto riguarda la variabile  $D12$  i gruppi che portano al rifiuto dell'ipotesi nulla, ovvero con medie significativamente diverse, sono i gruppi 4 e 5 (WM e WP hanno medie significativamente diverse se si considera la distanza tra i punti 1 e 2); se si considera la variabile  $D41$  i gruppi che presentano medie significativamente diverse sono i gruppi 1, 2, 4, 5 e 6 (BR, HO, WM, WP, IG&IM); se si considera la variabile  $D42$  i gruppi che presentano medie significativamente diverse sono i gruppi 1, 2, 4 e 6 (BR, HO, WM); infine per quanto riguarda la variabile  $D43$  i gruppi che presentano medie significativamente diverse sono i gruppi 1, 2, 4 ossia i gruppi BR, HO e WM (vedi figure sotto riportate da Figura 14 a Figura 17).

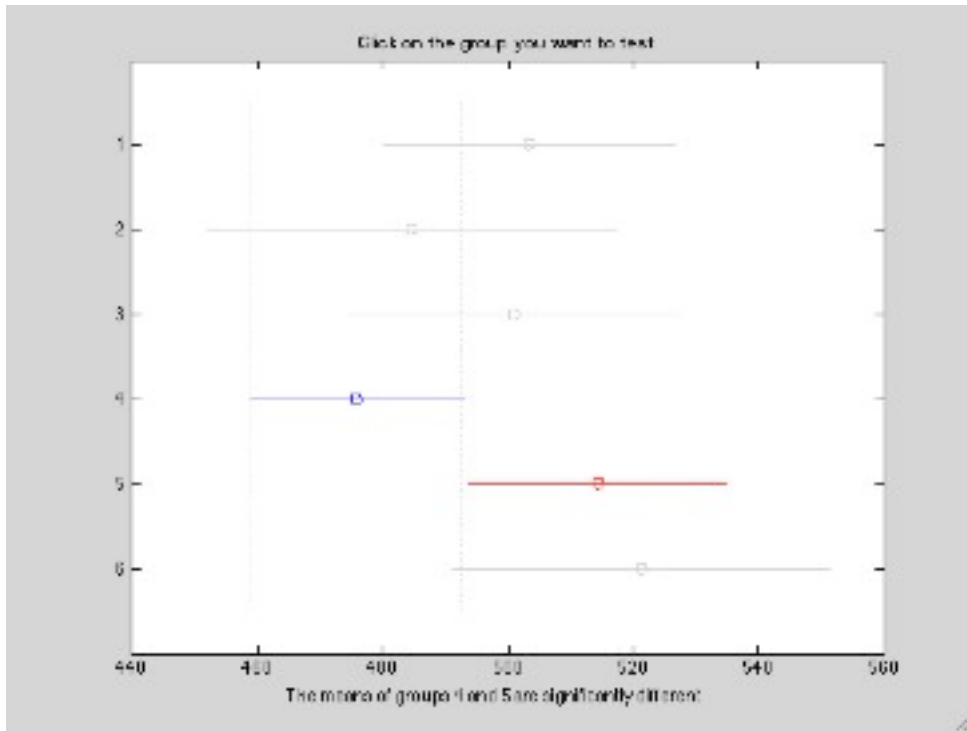


Figura 14: confronti multipli tra le medie (Distanza tra i punti 1-2)

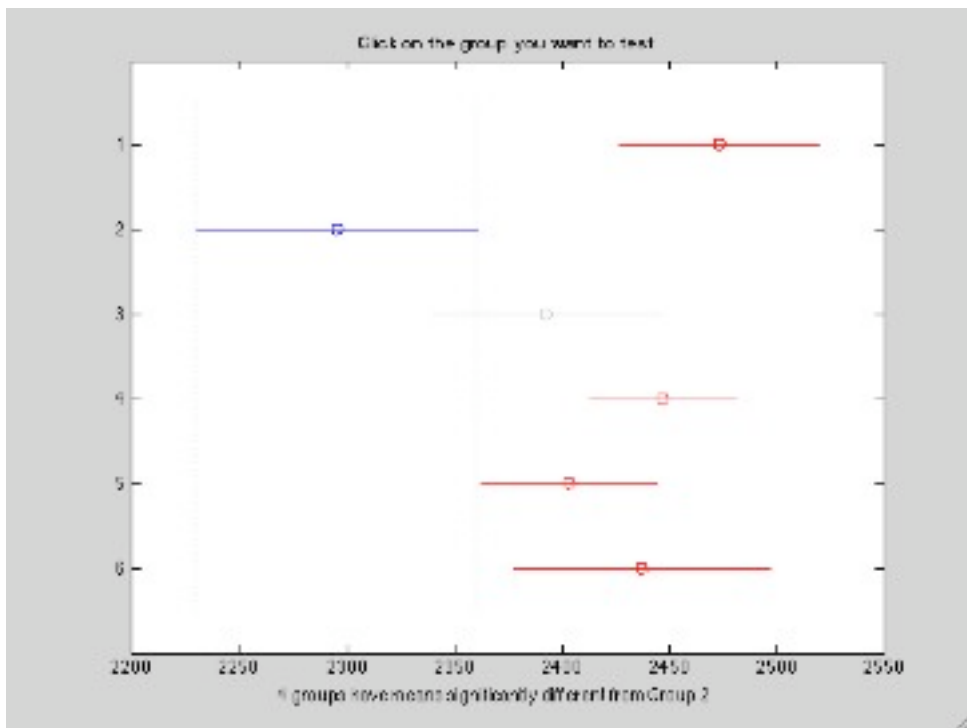


Figura 15: confronti multipli tra le medie (Distanza tra i punti 1-4)

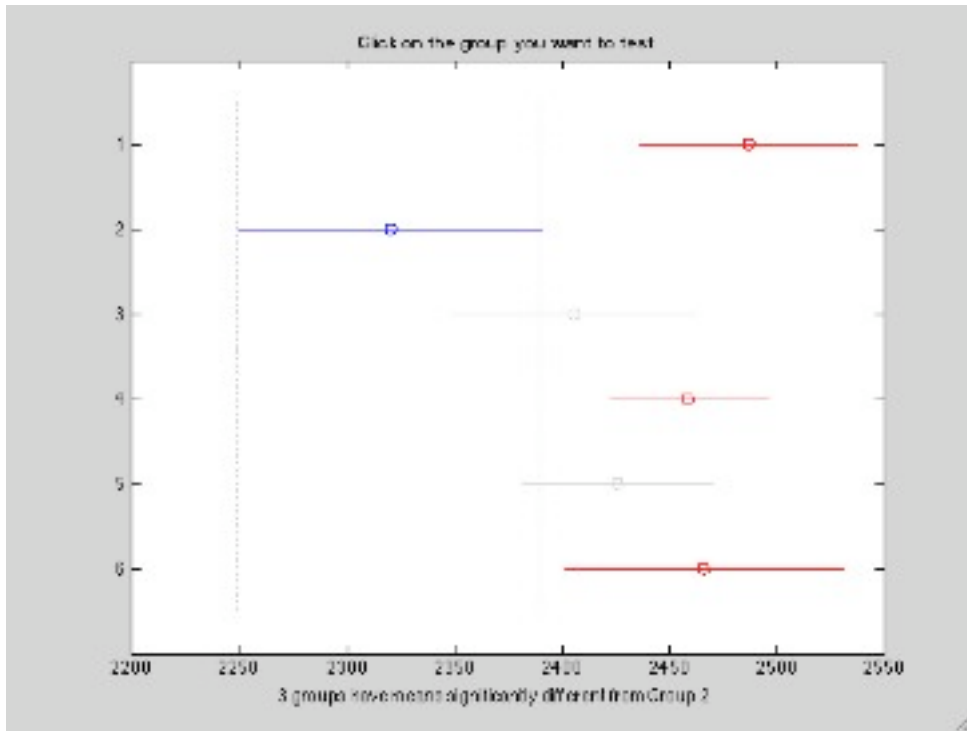


Figura 16: confronti multipli tra le medie (Distanza tra i punti 2-4)

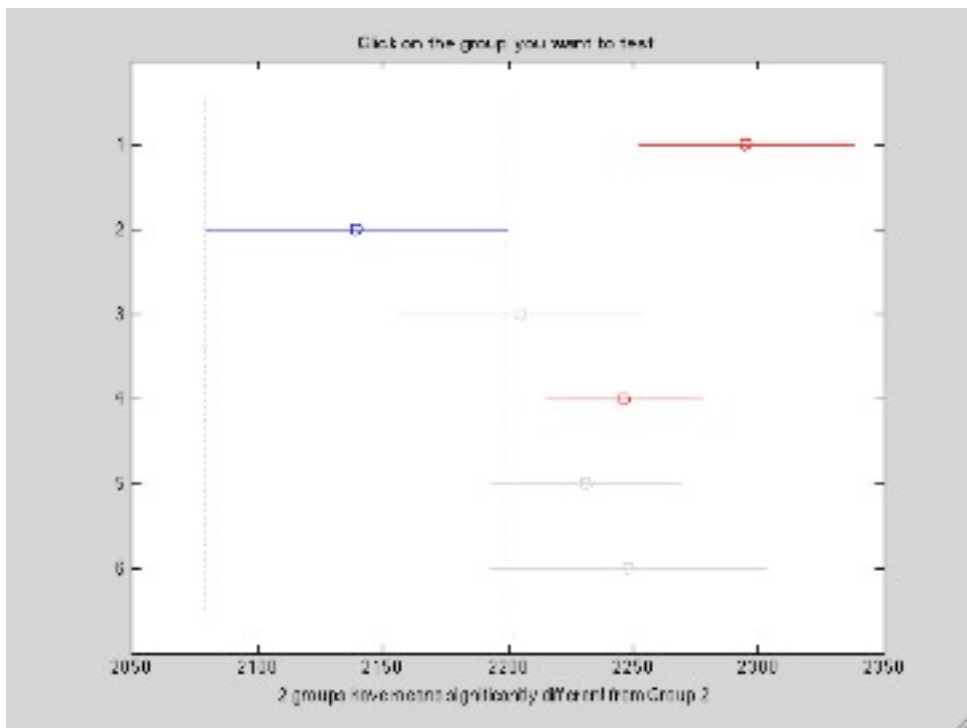


Figura 17: Confronti multipli tra le medie (Distanza tra i punti 3-4)

Utilizzando l'output dell'analisi *MANOVA*, l'analisi statistica è proseguita nella applicazione di una tecnica detta *cluster MANOVA*, ovvero una procedura multivariata che consente di raggruppare i gruppi più simili tra loro sulla base di alcuni criteri di raggruppamento specificati a priori.

A livello grafico, tramite questo tipo di analisi, è possibile ottenere il cosiddetto dendrogramma delle gerarchie ovvero un diagramma ad albero che fornisce un'immagine delle relazioni esistenti fra i gruppi che vengono raggruppati sulla base di una misura di distanza scelta a priori.

Più in dettaglio, si costruisce a partire dai rami corrispondenti ai casi iniziali, ognuno dei quali rappresenta un gruppo distinto, sino ad arrivare alla radice che rappresenta lo stadio finale in cui tutti i casi sono racchiusi in un unico cluster.

I dendrogrammi possono essere utilizzati per avere informazioni circa il numero appropriato di cluster da considerare: in particolare, si seziona l'albero in modo da ottenere il minor numero di macro-gruppi con omogeneità interna massima (ovvero, composti da unità simili).

Per quanto riguarda i metodi di raggruppamento vi sono varie alternative tra cui citiamo il metodo *Single* (ovvero del legame singolo o del vicino più vicino) in cui la distanza tra due gruppi è uguale alla distanza tra gli elementi dei due gruppi che sono più vicini, il metodo *Average* (o della *Media*), in cui la distanza tra due gruppi è uguale alla media delle distanze tra i singoli elementi, il metodo del *Centroide*, in cui la distanza tra due gruppi è uguale alla distanza tra i centroidi dei gruppi, il metodo della *Mediana* in cui la distanza tra due gruppi è uguale alla distanza tra i vettori dei valori mediani dei gruppi, il metodo *Ward* in cui la distanza tra due gruppi è una funzione delle devianze tra i due gruppi.

In Figura 18 e 19 sono riportati i dendrogrammi ottenuti dopo aver effettuato una *cluster MANOVA*, utilizzando il metodo di raggruppamento del *Legame Singolo* e della *Media* rispettivamente.

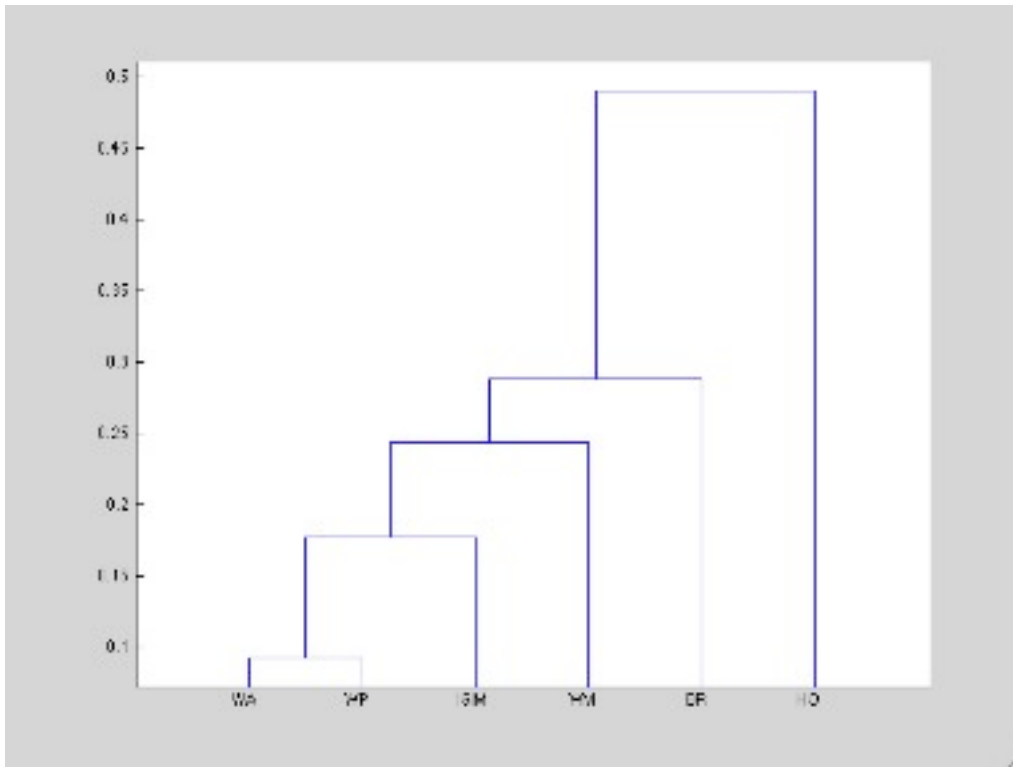


Figura 18: cluster Manova utilizzando il metodo di raggruppamento del vicino più vicino

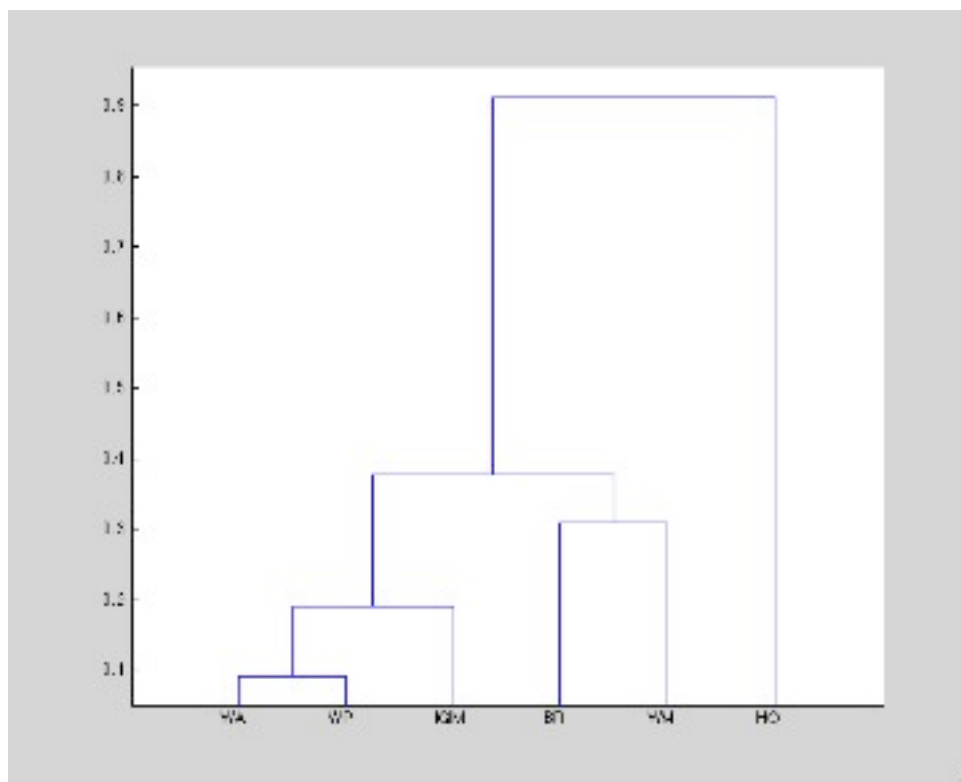


Figura 19: cluster Manova utilizzando il metodo Average

Osservando i dendrogrammi, si può concludere che i 6 gruppi iniziali potrebbero essere riclassificati in 3 cluster, dove ciascun cluster rappresenta dei gruppi di stoccafissi che sono caratterizzati da una maggiore somiglianza delle quattro distanze morfometriche prese in esame.

Il primo cluster include i gruppi WA, WP e IG&IM, il secondo i gruppi WM e BR ed il terzo è costituito dal gruppo HO. A livello di interpretazione si noti perciò come nel primo cluster gli stoccafissi di seconda scelta (IG & IM) presentano delle forti analogie morfometriche con i gruppi WA e WP e quindi dal punto di vista della morfometria potrebbero essere confusi con questi ultimi. Questo non succede per i gruppi WM-BR e HO in quanto appartenenti a cluster diversi.

In generale, gli obiettivi principali delle metodologie di analisi statistica multivariata sono riassumibili nella sintesi delle osservazioni ovvero nella semplificazione della loro struttura (riduzione del numero delle variabili tramite, ad esempio, l'analisi delle componenti principali), nell'ordinamento e nel raggruppamento delle osservazioni (si occupa quindi del problema della classificazione utilizzando, ad esempio, tecniche di analisi discriminante o di *Cluster Analysis*), nello studio delle interdipendenze tra le variabili, nella formulazione e verifica di ipotesi operative.

Concentrandoci in particolare sull'obiettivo di classificazione, peraltro già raggiunto tramite la *cluster MANOVA*, abbiamo anche applicato una ulteriore tecnica detta *analisi discriminante (LDA, Linear Discriminant analysis)*.

Si tratta di un metodo di analisi statistica multivariata che consente di attribuire degli individui a uno di più gruppi. Sotto il nome di analisi discriminante sono raggruppate tutte le tecniche di analisi multivariata che aiutano a trovare una regola di discriminazione, ovvero una regola di classificazione che misura l'importanza dei fattori che determinano l'appartenenza di un'osservazione ad un gruppo.

Nelle figure sotto riportate, troviamo rappresentati gli stoccafissi appartenenti ai 6 gruppi oggetto di studio (identificati da punti con forma e colore diversi<sup>1</sup>) e le funzioni discriminanti, (rappresentate dai tratti spezzati) sulla base dei valori che i gruppi assumono nelle variabili considerate (le distanze considerate sono indicate nel titolo).

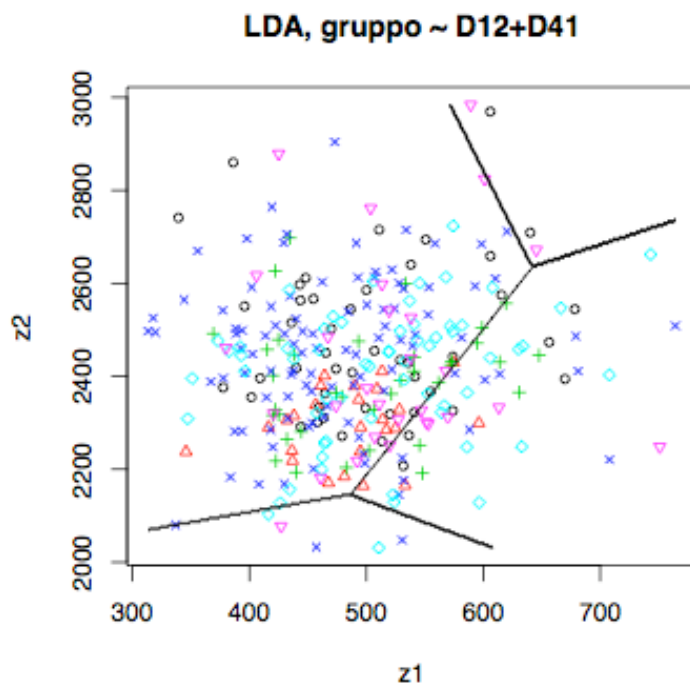


Figura 20: analisi Discriminante (distanze D12 e D41)

<sup>1</sup> Il primo gruppo BR è rappresentato da un cerchio nero, il secondo gruppo HO è rappresentato da un triangolo rosso, il terzo gruppo WA è rappresentato dal simbolo "più" (+) in verde, il quarto gruppo WM da una croce blu, il quinto gruppo WP da un quadrato azzurro, il sesto gruppo IG&IM da un triangolo con il vertice rovesciato in viola.

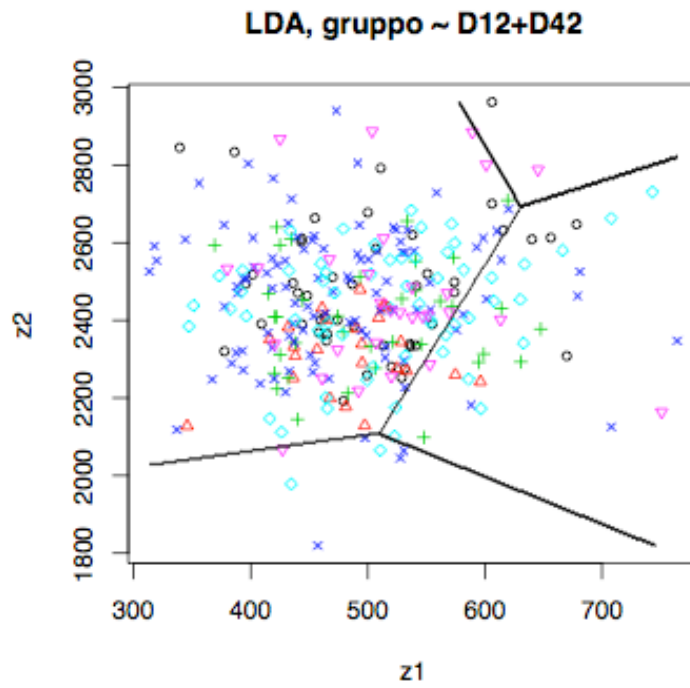


Figura 21: analisi Discriminante (distanze D12 e D42)

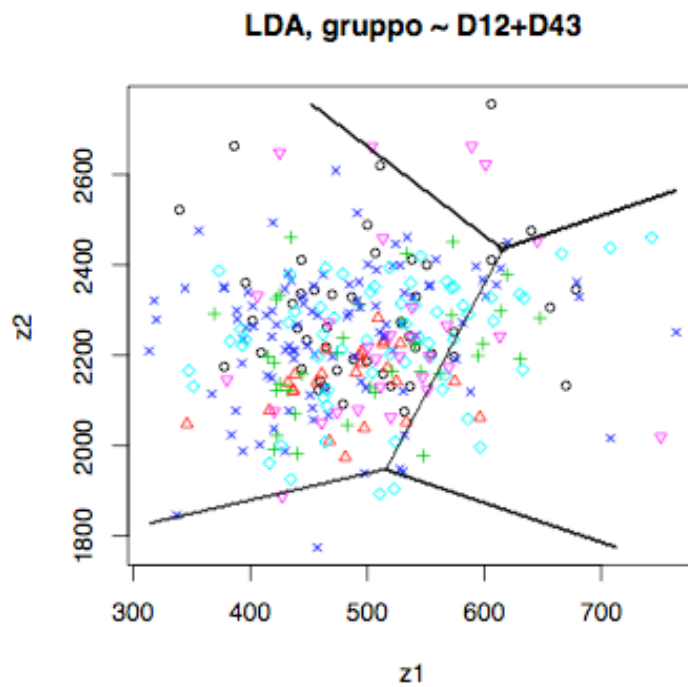


Figura 22: analisi Discriminante (distanze D12 e D43)

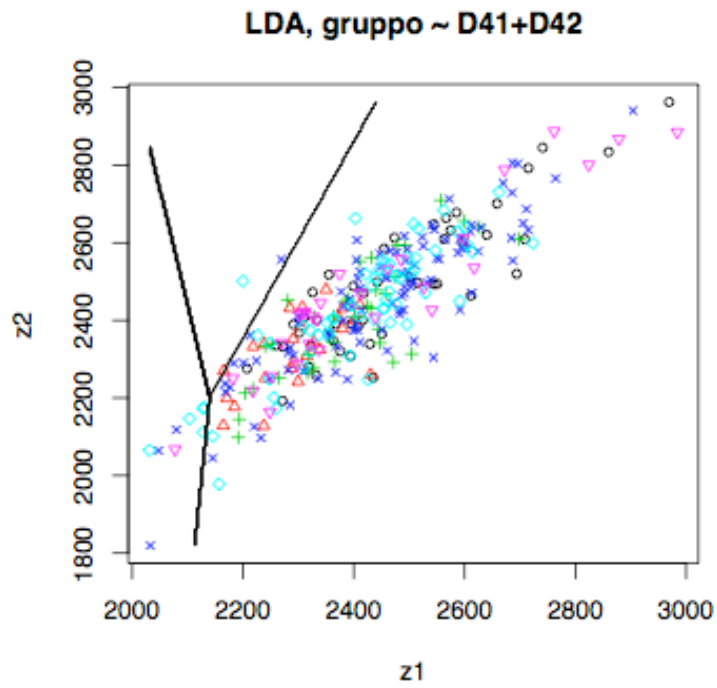


Figura 23: analisi Discriminante (distanze D41 e D42)

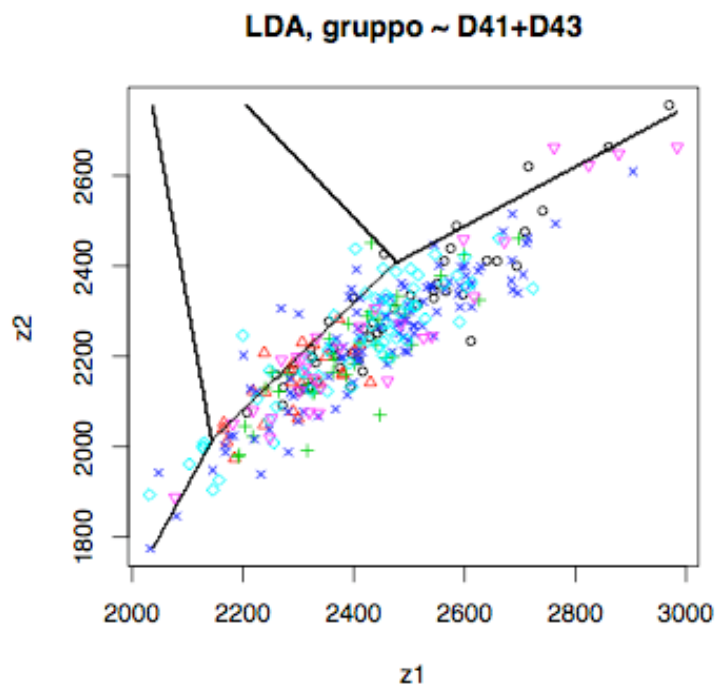


Figura 24: analisi Discriminante (distanze D41 e D43)

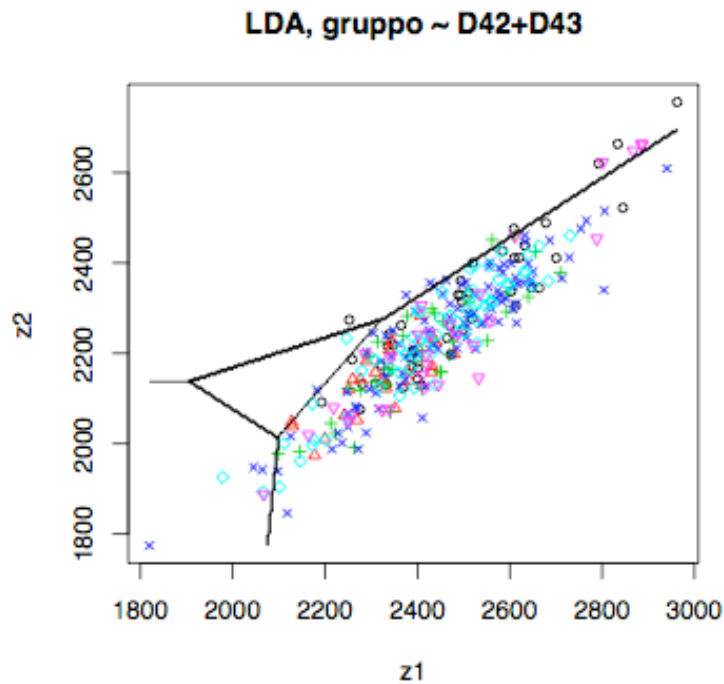


Figura 25: analisi Discriminante (distanze D42 e D43)

E' possibile analizzare la capacità predittiva dell'analisi discriminante effettuata rispetto ai sei gruppi originari, definiti nella fase iniziale dell'analisi statistica. A questo proposito, se si considera l'analisi discriminante con le distanze tra i punti 1-2 e 4-1 ( $D_{12}$  e  $D_{41}$ ) si può rilevare quanti soggetti verrebbero riassegnati ai gruppi di origine in base alla regola definita dall'analisi discriminante. Ciò che si ottiene (Tabella 16) è che 4 soggetti vengono assegnati al primo gruppo BR, 5 al gruppo HO, 244 al gruppo WM e 48 al gruppo WP.

1-BR	2-HO	3-WA	4-WM	5-WP	6-IG&IM
4	5	0	244	48	0

Tabella 18: ri-classificazione degli stoccafissi mediante analisi discriminante ( $D_{12}$  e  $D_{41}$ )

Ricordiamo che i dati originari erano così suddivisi,

1-BR	2-HO	3-WA	4-WM	5-WP	6-IG&IM
47	25	36	103	61	29

non si può affermare che questa tecnica può portare dei risultati soddisfacenti. Infatti, la proporzione di stoccafissi erroneamente classificati risulta tutt'altro che trascurabile.

Se si effettua una *LDA* e si considerano come variabili le distanze tra i punti 1-2 e 4-2 (*D12* e *D42*) otteniamo che 2 soggetti vengono assegnati al primo gruppo BR, 7 al gruppo HO, 252 al gruppo WM e 40 al gruppo WP (Tabella 19).

1-BR	2-HO	3-WA	4-WM	5-WP	6-IG&IM
2	7	0	252	40	0

Tabella 19: ri-classificazione degli stoccafissi mediante analisi discriminante (*D12* e *D42*)

Se invece si considerano le distanze tra i punti 1-2 e 4-3 (*D12* e *D43*) otteniamo che 7 soggetti vengono assegnati al primo gruppo BR, 4 al gruppo HO, 246 al gruppo WM e 44 al gruppo WP (vedi Tabella 20).

1-BR	2-HO	3-WA	4-WM	5-WP	6-IG&IM
7	4	0	246	44	0

Tabella 20: ri-classificazione degli stoccafissi mediante analisi discriminante (*D12* e *D41*)

Se si considerano le variabili *D41* e *D42*, tramite *LDA*, si assegnano 9 soggetti al gruppo HO, 289 al gruppo WM e 3 al gruppo WP (vedi Tabella 21).

1-BR	2-HO	3-WA	4-WM	5-WP	6-IG&IM
0	9	0	289	3	0

Tabella 21: Ri-classificazione degli stoccafissi mediante analisi discriminante (*D41* e *D42*)

Se si considerano le variabili *D41* e *D43* otteniamo che 5 soggetti vengono assegnati al primo gruppo BR, 8 soggetti vengono assegnati al gruppo HO, 260 al gruppo WM e 28 al gruppo WP (vedi Tabella 22).

1-BR	2-HO	3-WA	4-WM	5-WP	6-IG&IM
5	8	0	260	28	0

Tabella 22: Ri-classificazione degli stoccafissi mediante analisi discriminante (*D41* e *D43*)

Infine se si considerano le variabili *D42* e *D43* otteniamo che 12 soggetti vengono assegnati al primo gruppo BR, 6 soggetti vengono assegnati al gruppo HO, 280 al gruppo WM e 3 al gruppo WP (vedi Tabella 23)

1-BR	2-HO	3-WA	4-WM	5-WP	6-IG&IM
12	6	0	280	3	0

Tabella 23: Ri-classificazione degli stoccafissi mediante analisi discriminante (*D12* e *D41*)

Si noti che i gruppi che originariamente avevano bassa numerosità (come il gruppo degli stoccafissi di seconda scelta e il gruppo WA, aventi rispettivamente numerosità 29 e 36) vengono sempre assegnati ad altri gruppi.

Abbiamo infine anche effettuato un'analisi *MANOVA Non Parametrica* considerando i 5 gruppi di stoccafissi di prima scelta. In particolare abbiamo applicato la metodologia *NPC (Nonparametric Combination)* di permutazione NPC (Pesarin, 2001), ottenendo così non solo un test parziale per ogni singola distanza ma anche un test globale ottenuto come combinazione non parametrica dei test precedenti.

Tutti i test non parametrici hanno in comune la caratteristica di non richiedere la specificazione del modello probabilistico distributivo sottostante i dati, per esempio non richiedono la normalità della distribuzione. Questi metodi presentano quindi un vantaggio indubbio rispetto ai tradizionali metodi parametrici (test t, Chi-quadrato, ...), sia quando la non-normalità è evidente, sia quando la normalità della distribuzione dei dati è solo

probabile. Nello specifico del nostro caso studio, è difficile sostenere che i dati abbiano distribuzione sia normale e ci sono valori anomali, come evidenziato dai boxplot. Inoltre i sotto-campioni sono fortemente sbilanciati nella loro numerosità.

Per questo è consigliabile l'utilizzo di metodi NPC che tramite il condizionamento all'insieme dei dati osservati forniscono test statistici con buone proprietà anche in presenza di anomalie come quelle sopra citate, senza richiedere l'ipotesi della specificazione della distribuzione dei dati stessi.

Il gruppo degli stoccafissi di prima scelta, che include i gruppi BR, HO, WA, WM e WP, presenta medie statisticamente diverse sia a livello di ogni singola variabile, sia in relazione alla combinazione globale dei test parziali ( $p < 0.05$ , vedi Tabella 22). Questo risultato è coerente con quello ottenuto nell'analisi MANOVA e ANOVA.

	<i>p-</i> <i>value</i>
<i>D12</i>	0.0345
<i>D41</i>	0.0001
<i>D42</i>	0.0011
<i>D43</i>	0.0001
Global (Tippett)	0.0003

Tabella 24: P-values ottenuti dopo aver realizzato una MANOVA non parametrica di permutazione con 10000 iterazioni sul gruppo degli stoccafissi di prima scelta

c) Analisi molecolare di *Gadus morhua* e *Gadus macrocephalus*

Per effettuare una corretta identificazione di specie con metodo PCR è stato necessario procurarsi il DNA delle principali specie di gadiformi che possono assomigliare a *Gadus morhua*. Sono stati quindi reperiti esemplari freschi (tessuto muscolare) riconducibili alle seguenti specie: *Gadus morhua*, *Micromesistius poutassou*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Gadiculus argenteus*, *Gadus (Merlangius) merlangus*, *Brosme brosme* e *Pollachius virens*.

Da tutti i campioni delle specie di riferimento si è ottenuto il DNA per estrazione seguendo i normali protocolli operativi (vedi materiali e metodi).

Le due regioni dei geni SSU-rRNA 16s e Cytochrome b ottenute sono state sottoposte a sequenziamento successivamente analizzate con il programma BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) per confrontare le stesse con quelle depositate nel database Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A questo punto sono stati costruiti due dataset di sequenze: la prima con le sequenze di un gene conservato (gene mitocondriale SSU-rRNA16S) di varie specie di teleostei che una volta allineate potessero venire utilizzate come template per disegnare un Real-Time PCR assay universale, cioè una coppia di primer che amplificasse una porzione del gene di tutte le specie e potesse servire da controllo di amplificazione (16S-assay). Sono state selezionate alcune specie vicine a *Gadus morhua* ed altre più distanti filogeneticamente (Teletchea et al. 2006, Bakke et al. 2005).

Il secondo dataset è stato costruito con le sequenze dei geni mitocondriali ATP8\_6 di specie vicine a *Gadus morhua* e che, nella maggior parte dei casi, condividono la zona di pesca (coste norvegesi). L'allineamento di queste sequenze ha permesso di identificare delle regioni su cui disegnare una coppia di primer specie-specifici per *Gadus morhua* (*GmATP8\_6*-assay).

L'efficienza e la specificità degli assay (16S-assay e *GmATP8\_6*-assay) sono stati verificati utilizzando DNA estratto da campioni di specie di riferimento prelevati direttamente dalle zone di pesca (vedi Materiali e Metodi).

L'identificazione di specie per i campioni di riferimento era stata preventivamente verificata grazie ad amplificazione e sequenza di porzioni dei geni mitocondriali SSU-rRNA 16S e Cytochrome b (vedi tabella primer materiali e metodi) e confronto delle sequenze ottenute con il database Genbank.

Per i campioni estratti da tessuto di *Gadus morhua* le curve di amplificazione in real-time PCR di entrambi i saggi (16s-assay e *GmATP8\_6*-assay) apparivano nella maggior parte dei casi sovrapponibili ( $\Delta$ Ct uguale o vicino a 0), mentre per i campioni di riferimento non-*Gadus morhua* il  $\Delta$ Ct tra 16S assay e *GmATP8\_6* assay risultava  $> 5$ .

Il DNA dei campioni da sottoporre ad analisi è stato estratto e direttamente sottoposto ad amplificazione in PCR real-time per entrambi i saggi (16s-assay e *GmATP8\_6*-assay).

Il risultato è riportato in tabella.

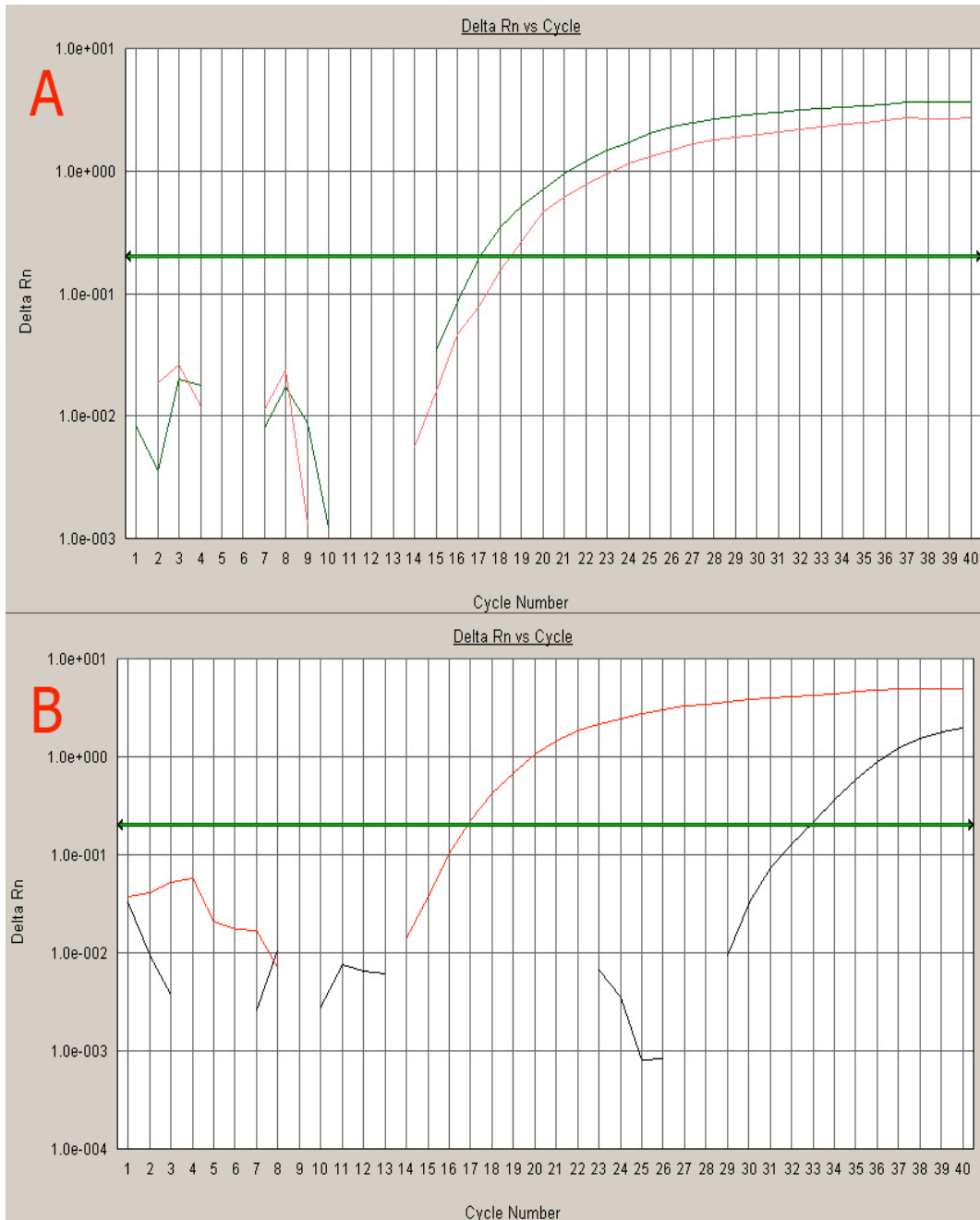


Figura 26: esempio di “amplification plots” del saggio universale 16s (rosso) e del saggio *GmATP8\_6* specie specifico (verde); A. *Gadus morhua* B. *Gadiculus argenteus*

I campioni totali analizzati in PCR real-time (1° fase di screening) sono 306 e, di questi, 35 sono stati poi sottoposti ad analisi di sequenza (2° fase di screening).

Per l'analisi di sequenza è stata amplificata una regione del gene ATP8\_6 che comprende la porzione utilizzata nel saggio in real-time PCR, in questo modo attraverso il sequenziamento si può sia determinare la specie del campione, sia verificare le regioni di allineamento dei primer del *GmATP8\_6*-assay.

Sulla base del  $\Delta Ct$  dei due geni amplificati sono stati individuati due gruppi:  $\Delta Ct > 3$  (20 campioni) e  $\Delta Ct < 3$ .

Il gruppo con  $\Delta Ct < 3$  è costituito da 278 campioni e rappresenta il 90.85 % del totale dei campioni che risultano *Gadus morhua* fin dalla prima analisi. Per controllare tale risultato sono stati selezionati in modo casuale 10 campioni con  $\Delta Ct < 3$  per essere sequenziati. Il sequenziamento ha confermato questi dati.

Venti campioni mostravano un  $\Delta Ct > 3$ , 6.5 % del totale e sono stati considerati campioni di dubbia identificazione con il nostro saggio. Questi si suddividono in 2 sottogruppi:  $\Delta Ct < 5$  (9 campioni) e  $\Delta Ct > 5$  (11 campioni). Tale soglia rispecchia il valore riscontrato nei campioni di riferimento non-*Gadus morhua*. Dopo sequenziamento i 9 campioni del primo sottogruppo si sono rivelati *Gadus morhua* e solo 2 (0.65%) di quelli con  $\Delta Ct > 5$  sono risultati non-*Gadus morhua* e, rispettivamente, *Melanogrammus aeglefinus* e *Pollachius virens*.

Infine per un totale di otto campioni l'identificazione di specie con il nostro saggio non è stata possibile per mancata funzionamento di uno o di entrambi i test, probabilmente dovuto alla presenza di inibitori di amplificazione nel DNA estratto.

Per questi è stato quindi necessario sequenziare il DNA per ottenere le informazioni in

merito alla specie: tutti sono risultati *Gadus morhua*.

## CONCLUSIONI

In base a quanto sopra esposto mi giova evidenziare che l'argomento trattato risulta essere più complesso del previsto, in quanto come più volte accennato, difficilmente si riesce a definire una completa e reale tracciabilità e rintracciabilità del prodotto della pesca.

Gran parte del prodotto campionato (tranne solo due campioni, che peraltro avevano origine comune) sono risultati appartenenti alla specie *Gadus morhua*.

E' doveroso ricordare che:

1. per oltre il 90% dei campioni l'analisi PCR con il metodo da noi utilizzato ha dato esito positivo sin dalle prime fasi;
2. nel 10% restante dei campioni si sono riscontrate inizialmente difficoltà interpretative dei risultati, tanto che in questi si è dovuto ricorrere al sequenziamento dell'intero genoma per giungere ad una esatta identificazione di specie;
3. mettere a punto una metodica di PCR che permettesse di fare un'efficace identificazione di *Gadus morhua* e *Gadus macrocephalus* rispetto ad altre specie di gadidiformi d'interesse commerciale;
4. applicare la suddetta metodica ad un numero estremamente elevato e significativo di campioni di stockfish, prelevati in varie regioni italiane. Ciò al fine di verificare il rispetto della normativa vigente italiana in tema di etichettatura;
5. evidenziare la prevalenza di eventuali frodi nel mercato italiano del prodotto.
6. Il gruppo degli stoccafissi di prima scelta, come sopra accennato, che include i gruppi BR, HO, WA, WM e WP, presenta medie statisticamente diverse sia a livello

di ogni singola variabile, sia in relazione alla combinazione globale dei test parziali, portando un significativo contributo all'analisi statistica della popolazione.

Le conclusioni che possiamo dunque trarre da questa indagine sono:

- la metodica di PCR da noi utilizzata consente di giungere a fare identificazione di specie in tempi brevi e con bassi costi con una percentuale molto alta (oltre il 90% il riconoscimento di specie è possibile con lo screening di base). Il margine dei casi dubbi è limitato e quindi la metodica può costituire una valida alternativa ad altri sistemi analitici sinora proposti, come PAGE, PAGIF e altri.
- Con l'analisi delle "Buone Pratiche di Lavorazione" e l'individuazione dei "Punti Critici" durante la pesca e la trasformazione, le tecniche di biologia molecolari proposte e quelle statiche, si può affermare che è stato elaborato un concreto modello di tracciabilità-rintracciabilità di un prodotto della pesca, volto a esaminare e tutelare gli aspetti della valutazione del rischio, igienico-sanitari e commerciali dall'allevamento alla tavola.

Utopia ?

Sicuramente è un proposta importante sotto diversi punti di vista, ma solamente con concrete e reali proposte si riuscirà a tutelare l'allevatore, l'intera catena produttiva ed il consumatore e a diffondere una maggiore cultura e conseguente consumo dei prodotti della pesca.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Alma Cardenas Bonilla, Kolbrun Sveinsdottir, Emilia Martinsdottir. Development of Quality Index Method (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets and application in shelf life study. *Food Control* 18 (2007) 352-358.
2. Altschul, S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search, tool. *J Mol Biol.* 1990, 215, 403-10.
3. Bakke I, Johansen SD. Molecular phylogenetics of gadidae and related gadiformes based on mitochondrial DNA sequences. *Mar Biotechnol.* 2005, 7, 61-9.
4. Dryden I. L., Mardia, K. V. (1998) *Statistical Shape Analysis*. John Wiley & Sons, Chichester, New York.
5. Futoshi Aranishi, Takane Okimoto, Shotaro Izumi. Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by PCR-RFLP analysis. *J. Appl. Genet.* 46(1), 2005, pp. 69-73.
6. Giuseppe Comi, Lucilla Iacumin, Kalliopio Rantsiou, Carlo Cantoni, Luca Cocolin. Molecular methods for the differentiation of species used in production of cod-fish can detect commercial frauds. *Food Control* 16 (2005) 37-42.
7. ISMEA. Filiera pesca e acquacoltura. Il settore ittico in Italia e nel mondo: le tendenze recenti. Gennaio 2006, pagg. 187 e 364.
8. Yan Jiao, Yong Chen, Joe Wroblewski. An application of the composite risk assessment method in assessing fisheries stock status. *Fisheries research* 72 (2005) 173-183.
9. Macagnano, M. Careche, A. Herrero, R. Paolesse, E. Martinelli, G. Pennazza, P. Carmona, A. D'Amico, C. Di Natale. A model to predict fish quality from instrumental features. *Sensor and Actuators B* 111-112 (2005) 293-298.

10. Michele Trotta, Susanna Schönhuth, Tiziana Pepe, M. Luisa Cortesi, Antonio Puyet and Josè M. Bautista. Multiplex PCR Method for Use in Real-time PCR for Identification of Fish Fillets from Grouper (*Epinephelus* and *Mycteroperca* Species) and Common Substitute Species. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 2039-2045.
11. Paloma Moránt and Eva Garcia-Vazquez. Identification of Highly Prized Commercial Fish Using a PCR-based Methodology. *BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY EDUCATION* Vol. 34, No. 2, pp.121-124, 2006.
12. Pesarin F. (2001) *Multivariate Permutation tests: with application in Biostatistics*. John Wiley & Sons: Chichester-New York, 2001.
13. Slice, D. E., Bookstein, F. L., Marcus, L. F., Rohlf, F. J. (1996) A glossary for geometric morphometrics. *Advances in Morphometrics*, 284, 531-551.
14. Roselund G., Halldórsson Ó. Cod juvenile production: research and commercial developments. *Aquaculture* 268 (2007) 188-194.
15. Teletchea F., Laudet V., Hanni C. Phylogeny of the Gadidae (sensu Svetovidov, 1948) based on their morphology and two mitochondrial genes. *Mol Phylogenet Evol.* 2006, 38, 189-99.
16. Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 4876-4882.

#### RIFERIMENTI DI NORMATIVA

17. DIRETTIVA DEL CONSIGLIO del 18 dicembre 1978 relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale, nonché la relativa pubblicità (79/112/CEE)

18. MINISTERO DELLA MARINA MERCANTILE. DECRETO del 15 luglio 1983. Denominazione in lingua italiana di alcune specie ittiche di interesse commerciale.
19. Testo aggiornato del decreto del Ministro della marina mercantile 15 luglio 1983, recante: "Denominazione in lingua italiana di alcune specie ittiche di interesse commerciale". Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, serie generale n. 296 del 19/12/1987.
20. MINISTERO DELLA MARINA MERCANTILE. DECRETO del 18 febbraio 1989. Modificazioni ed integrazioni al decreto ministeriale del 15 luglio 1983 concernente: "Denominazione in lingua italiana di alcune specie ittiche di interesse commerciale".
21. DIRETTIVA DEL CONSIGLIO del 14 giugno 1989 che modifica la direttiva 79/112/CEE relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale, nonché la relativa pubblicità (89/395/CEE).
22. DIRETTIVA DEL CONSIGLIO dell' 11 dicembre 1989 relativa ai controlli veterinari applicabili negli scambi intracomunitari, nella prospettiva della realizzazione del mercato interno (89/662/CEE).
23. DIRETTIVA DEL CONSIGLIO del 28 gennaio 1991 che stabilisce le norme di polizia veterinaria per la commercializzazione di animali e prodotti dell'acquacoltura (91/67/CEE).
24. MINISTERO DELLA MARINA MERCANTILE. DECRETO del 25 febbraio 1991. Integrazioni al decreto ministeriale del 15 luglio 1983 concernente: "Denominazione in lingua italiana di alcune specie ittiche di interesse commerciale", e successivi aggiornamenti.
25. DECRETO LEGISLATIVO del 27 gennaio 1992, n. 109. Attuazione delle Direttive 89/395/CEE e 89/396/CEE concernenti l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari.

26. DECRETO dell'11 marzo 1992. Integrazioni al decreto ministeriale del 15 luglio 1983 concernente: "Denominazione in lingua italiana di alcune specie ittiche di interesse commerciale", e successivi aggiornamenti.
27. MINISTERO DELLA MARINA MERCANTILE. DECRETO del 28 luglio 1992. Integrazioni all'elenco delle denominazioni in lingua italiana delle specie ittiche.
28. DECRETO LEGISLATIVO del 30 dicembre 1992, n. 530. Attuazione della direttiva 91/492/CEE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi.
29. DECRETO LEGISLATIVO del 30 dicembre 1992, n. 531. Attuazione della direttiva 91/493/CEE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei prodotti della pesca.
14. DECRETO DEL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA del 30 dicembre 1992, n. 555. Regolamento per l'attuazione della direttiva 91/67/CEE che stabilisce le norme di polizia sanitaria per i prodotti di acquacoltura.
30. MINISTERO DELLA MARINA MERCANTILE. DECRETO dell'11 marzo 1993. Integrazioni al decreto ministeriale del 15 luglio 1983 concernente denominazioni in lingua italiana di alcune specie ittiche di interesse commerciale, e successive integrazioni.
31. DIRETTIVA 93/54/CEE DEL CONSIGLIO del 24 giugno 1993 recante modifica della direttiva 91/67/CEE che stabilisce le norme di polizia sanitaria per la commercializzazione di animali e prodotti d'acquacoltura.
32. DIRETTIVA 93/102/CEE DELLA COMMISSIONE del 16 novembre 1993 recante modifica alla direttiva 79/112/CEE del Consiglio relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale, nonché alla relativa pubblicità.

33. Proposta di regolamento (CE) del Consiglio recante modifica del regolamento (CEE) n. 3759/92 relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura (94/C 322/10).
34. CONSIGLIO POSIZIONE COMUNE (CE) N. 7/95 definita dal Consiglio del 15 giugno 1995, che modifica la direttiva 79/112/CEE relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale, nonché alla relativa pubblicità (95/C 182/01).
35. DIRETTIVA 95/22/CEE DEL CONSIGLIO del 22 giugno 1995 recante modifica della direttiva 91/67/CEE che stabilisce le norme di polizia sanitaria per la commercializzazione di animali e prodotti di acquacoltura.
36. DECRETO LEGISLATIVO del 26 ottobre 1995, n. 524. Modificazioni ed integrazioni al decreto legislativo del 30 dicembre 1992, n. 531, che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e alla commercializzazione dei prodotti della pesca.
37. DIRETTIVA 95/71/CEE DEL CONSIGLIO del 22 dicembre 1995 che modifica l'allegato alla direttiva 91/493/CEE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e alla commercializzazione dei prodotti della pesca.
38. REGOLAMENTO (CE) N. 1762/96 DELLA COMMISSIONE dell'11 settembre 1996 che modifica il regolamento (CE) n. 2939/94 recante modalità d'applicazione del regolamento (CEE) n. 105/76 del Consiglio relativo al riconoscimento delle organizzazioni di produttori nel settore della pesca.
39. REGOLAMENTO (CE) N. 2406/96 DEL CONSIGLIO del 26 novembre 1996 che stabilisce norme comuni di commercializzazione per taluni prodotti della pesca.
40. DIRETTIVA 97/4/CEE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 27 gennaio 1997 che modifica la direttiva 79/112/CEE relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità.

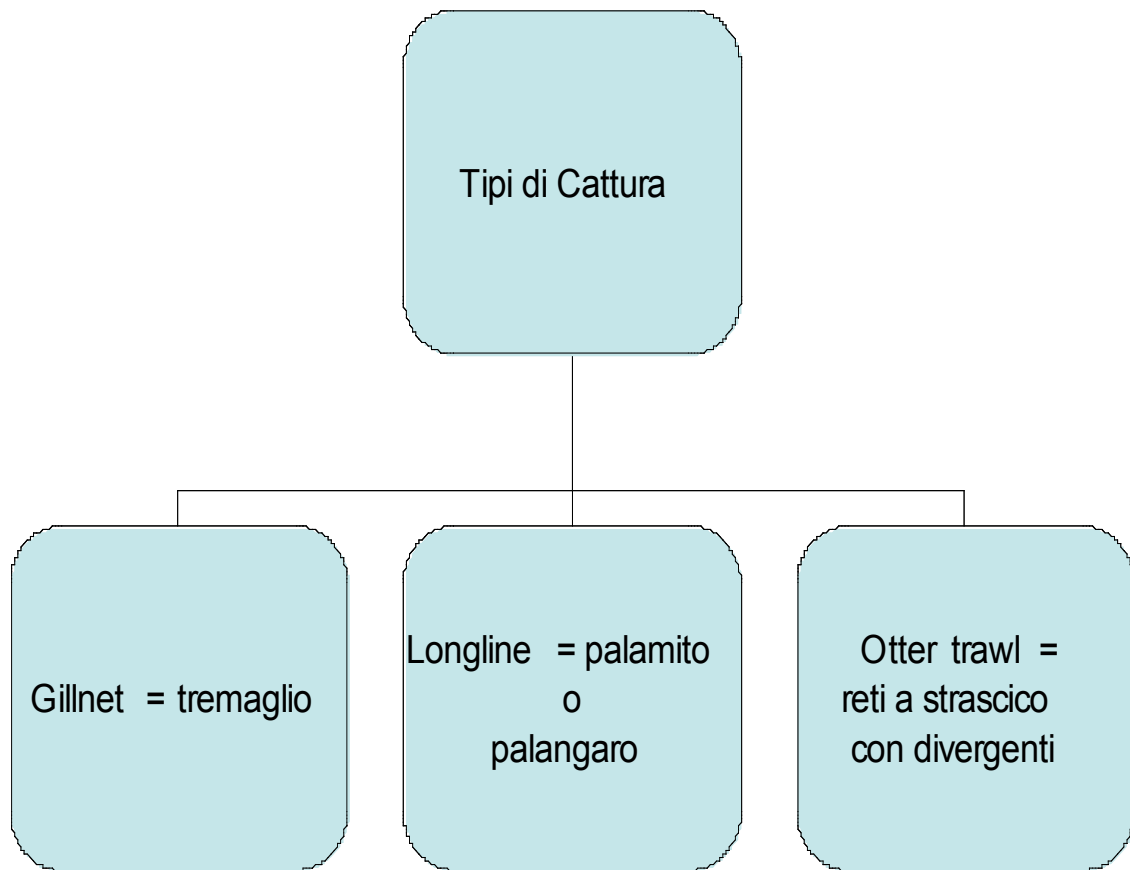
41. REGOLAMENTO (CE) N. 323/97 DELLA COMMISSIONE del 21 febbraio 1997 recante modifica del regolamento (CE) n. 2406/96 del Consiglio che stabilisce norme comuni di commercializzazione per taluni prodotti della pesca.
42. DECRETO del 29 gennaio 1997. MINISTERO DELLA SANITA'. Modificazioni al decreto della repubblica del 30 dicembre 1992, n. 555, recante regolamento di attuazione della direttiva 91/67/CEE che stabilisce le norme di polizia sanitaria per la commercializzazione di animali e prodotti di acquacoltura.
43. DECRETO DEL PRESIDENTE DEL CONSIGLIO DEI MINISTRI del 28 luglio 1997, n. 311. Regolamento recante norme di attuazione delle direttive 94/54/CE e 96/21/CE recanti modifiche della direttiva 79/112/CE concernente l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari destinati al consumatore.
44. DIRETTIVA 97/61/CE DEL CONSIGLIO del 20 ottobre 1997 che modifica l'allegato della direttiva 91/492/CEE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e alla commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi.
45. DECRETO del 28 ottobre 1997. MINISTERO PER LE POLITICHE AGRICOLE. Integrazione al decreto ministeriale del 15 luglio 1983 relativo all'elenco delle denominazioni in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale.
46. LEGGE del 21 maggio 1998, n. 164. Misure in materia di pesca e di acquacoltura.
47. DIRETTIVA 98/45/CE DEL CONSIGLIO del 24 giugno 1998 che modifica la direttiva 91/67/CEE che stabilisce le norme di polizia sanitaria per la commercializzazione di animali e prodotti d'acquacoltura.
48. Testo aggiornato del decreto legislativo del 30 dicembre 1992, n. 530, recante: "Attuazione della direttiva 91/492/CEE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi".

49. REGOLAMENTO (CE) N. 104/2000 DEL CONSIGLIO del 17 dicembre 1999 relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura.
50. DECRETO DEL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA del 16 dicembre 1999, n. 543. Regolamento recante norme di attuazione della direttiva 98/45/CE, che modifica la direttiva 91/67/CEE concernente norme di polizia sanitaria per la commercializzazione di animali e prodotti di acquacoltura.
51. DECRETO LEGISLATIVO del 25 febbraio 2000, n. 68. Attuazione della direttiva 97/4/CE, che modifica la direttiva 79/112/CEE, in materia di etichettatura, presentazione e pubblicità dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale.
52. CIRCOLARE DEL 31 marzo 2000, n. 165. MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO. Linee guida relative al principio della dichiarazione della quantità degli ingredienti (art. 8 del decreto legislativo n. 109/1992) nonché ulteriori informazioni per la corretta applicazione delle disposizioni riguardanti l'etichettatura dei prodotti alimentari.
53. DIRETTIVA 2000/13/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 20 marzo 2000 relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità
54. DECRETO LEGISLATIVO del 10 agosto 2000, n. 259. Attuazione della direttiva 1999/10/CE in materia di etichettatura dei prodotti alimentari.
55. CIRCOLARE del 12 marzo 2001, n. 166. MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO. Istruzioni in materia di etichettatura e presentazione dei prodotti alimentari.
56. DECRETO del 22 dicembre 2000. MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI. Modificazioni al decreto ministeriale del 21 luglio 1998 concernente la disciplina della pesca dei molluschi bivalvi.

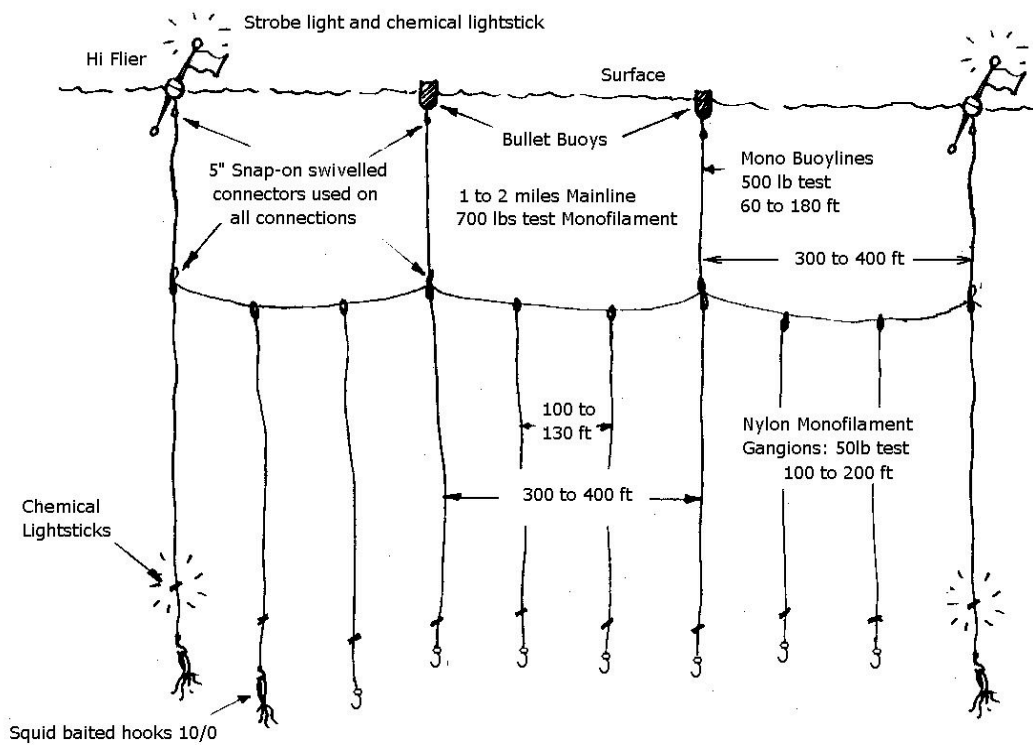
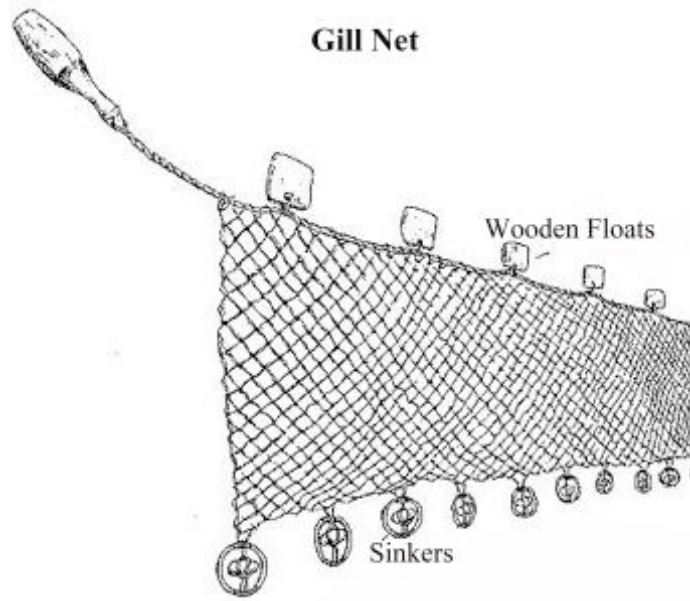
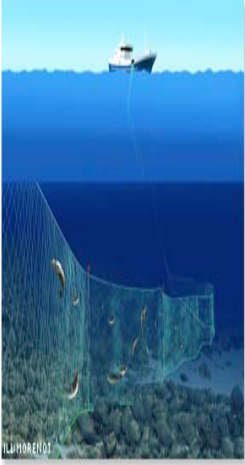
57. CIRCOLARE DEL 2 agosto 2001, n. 167. MINISTERO DELLE ATTIVITA PRODUTTIVE. Etichettatura e presentazione di prodotti alimentari.
58. REGOLAMENTO (CE) N. 2065/2001 DELLA COMMISSIONE del 22 ottobre 2001 che stabilisce le modalità d'applicazione del regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l'informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura.
59. DECRETO DEL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA del 24 ottobre 2001, n. 425. Regolamento di attuazione della direttiva 2000/27/CE, che modifica la direttiva 93/53/CEE, recante misure comunitarie minime di lotta contro talune malattie dei pesci.
60. REGOLAMENTO (CE) N. 2495/2001 DELLA COMMISSIONE del 19 dicembre 2001 recante modifica del regolamento (CE) n. 2406/96 del Consiglio che stabilisce norme comuni di commercializzazione per taluni prodotti della pesca.
61. RACCOMANDAZIONE DELL'AUTORITA' DI VIGILANZA EFTA N. 228/01/COL CEE del 2 luglio 2001 relativa ad un programma di controlli ufficiale dei prodotti alimentari per il 2001.
62. DECRETO del 27 marzo 2002. MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI. Etichettatura dei prodotti ittici e sistema di controllo.
63. RACCOMANDAZIONE DELLA COMMISSIONE CEE del 10 gennaio 2003 relativa ad un programma coordinato di controlli ufficiali dei prodotti alimentari per il 2003.
64. DECISIONE DELLA COMMISSIONE del 5 febbraio 2003 che modifica la direttiva 95/70/CE del Consiglio che istituisce misure comunitarie minime di lotta contro talune malattie dei molluschi bivalvi
65. Frederiksen M., 2001. Danish development work on traceability. Abstracts from 2nd Tracefish Conference, Tuesday September 25 th
66. Libro Bianco sulla Sicurezza Alimentare, 2000.

67. Norwegian Industry Standard for Fish. Classification of stockfish, BERGEN, Norway, 1998.
68. Ministero delle Politiche Agricole e Forestali della Repubblica Italiana , Decreto del 14 gennaio 2005 e modifica del 5 agosto 2005. Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale. Supplemento ordinario alla GAZZETTA UFFICIALE, Serie generale – n. 181, pagg. 6-39.
69. Regolamento (CE) N. 852-853-854, 2004
70. Regolamento (CE), 2073/2005
71. Regolamento (CE) N. 333, 2007
72. Regolamento (CE) N. 1441, 2007
73. Dryden I. L., Mardia, K. V. (1998) *Statistical Shape Analysis*. John Wiley & Sons, Chichester, New York.
74. Pesarin F. (2001) *Multivariate Permutation tests: with application in Biostatistics*. John Wiley & Sons: Chichester-New York, 2001
75. Slice, D. E., Bookstein, F. L., Marcus, L. F., Rohlf, F. J. (1996) A glossary for geometric morphometrics. *Advances in Morphometrics*, 284, 531-551.

Aggiunta di foto effettuate personalmente in Norvegia e di schemi

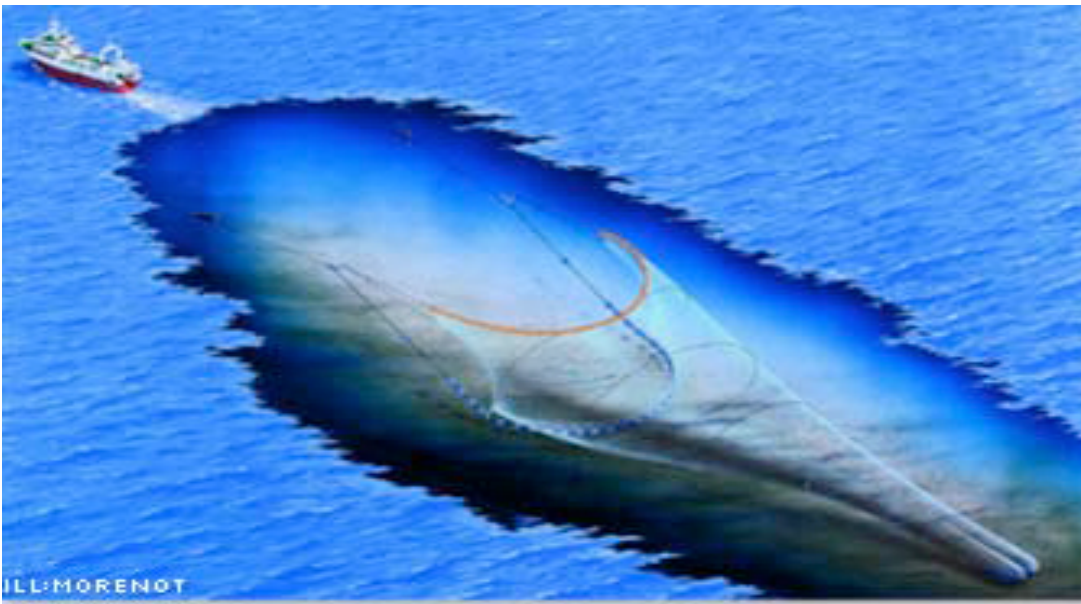


Tipi di pesca attualmente usati in Norvegia.

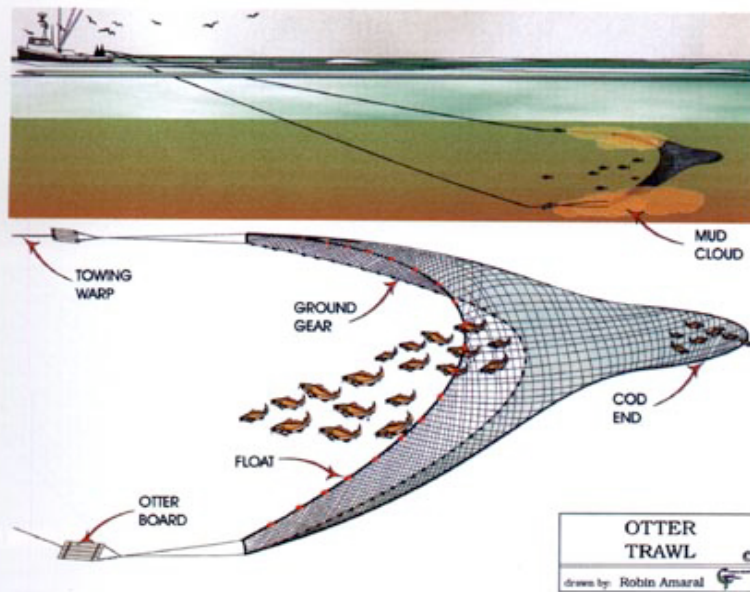


Typical Longline Set

Tipi di pesca attualmente usati in Norvegia.



**SMOLOWITZ**  
**FIGURE 3**  
 (page 49)  
 A bottom  
 trawl.  
 Drawing  
 by Robin  
 Amaral.



Tipi di pesca attualmente usati in Norvegia.



Decapitazione del pesce in barca.



Eviscerazione del pesce in barca.



Misurazione del pesce in barca.



Inizio asciugatura del pesce in barca.



Essiccamento nelle tipiche rastrelliere in Norvegia.

## **Ringraziamenti**

Si ringraziano gentilmente il Prof. Stefano Peruzzi, Associate Professor, PhD, Aquaculture and Fish Genetics, Norwegian College of Fishery Science, UNIVERSITY OF TROMSØ, Department of Aquatic BioSciences, Norway, la Fiskeriforskning di Breivika, Norway, la Dott.ssa Sigrid BRYNESTAD, Dr. scient., Senior Research Engineer, Biotechnology group, DNV Research, Høvik, Norway la Dott. ssa Barbara Cardazzo, la Dott.ssa Lisa Carraro, la Dott.ssa Alba Minnini, la RIVAMAR nelle persone di Gianni e Marco Scarpa, il Prof. Livio Corain e Patrizio Cattaneo per la disponibilità ed il concreto aiuto dato a tale ricerca .