



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni
Lazio e Toscana

Roma 9 giugno 2015

TRACCIABILITÀ ED ETICHETTATURA DEGLI ALIMENTI: SVILUPPO ED ARMONIZZAZIONE DI METODOLOGIE ANALITICHE BIOMOLECOLARI PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE

Annalisa Paternò



Centro di Riferenza Nazionale per la ricerca di OGM



Obiettivi

Work- package 1

- ⊙ Individuare e validare un sistema di amplificazione, in PCR real time, di un gene di riferimento per l'identificazione e quantificazione di specie ittiche per le quali esiste almeno un evento geneticamente modificato autorizzato o in corso di autorizzazione in paesi terzi
- ⊙ Sviluppare o individuare e validare metodi PCR specifici e metodi basati su sequenziamento del DNA per l'identificazione di specie ittiche e terrestri presenti in matrici alimentari semplici e complesse



Obiettivi

Work- package 2

Individuare il sistema più idoneo di amplificazione, in PCR real time, del gene di riferimento per l'identificazione e quantificazione della specie soia (*Glycine max*)



Obiettivi

Work- package 1

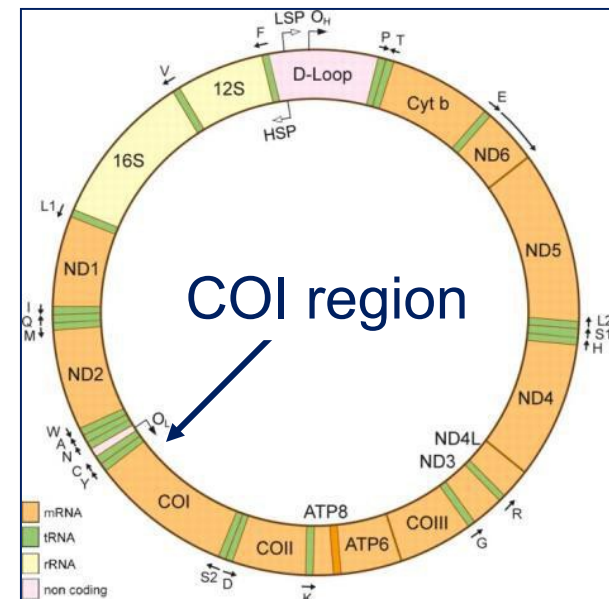
- ⊙ Individuare e validare un sistema di amplificazione, in PCR real time, di un gene di riferimento per l'identificazione e quantificazione di specie ittiche per le quali esiste almeno un evento geneticamente modificato autorizzato o in corso di autorizzazione in paesi terzi
- ⊙ Sviluppare o individuare e validare metodi PCR specifici e metodi basati su sequenziamento del DNA per l'identificazione di specie ittiche e terrestri presenti in matrici alimentari semplici e complesse



DNA barcoding

E' un sistema d'identificazione delle specie biologiche basato sulla caratterizzazione di una determinata sequenza nucleotidica (marker)

Nel caso del regno animale il marker più diffuso è una porzione del gene mitocondriale della COI



COI = cytochrome oxidase sub I



What is CBOL?

The Consortium for the Barcode of Life (CBOL) is an international initiative devoted to developing DNA barcoding as a global standard for the identification of biological species. [DNA barcoding](#) is a new technique that uses a short DNA sequence from a standardized and agreed-upon position in the genome as a molecular diagnostic for species-level identification. **DNA barcode sequences** are very short relative to the entire genome and they can be obtained reasonably quickly and cheaply. The "Folmer region" at the 5' end of the cytochrome c oxidase subunit 1 mitochondrial region (COI) is emerging as the standard barcode region for almost all groups of higher animals. This region is 648 nucleotide base pairs long in most groups and is flanked by regions of conserved sequences, making it relatively easy to isolate and analyze. A growing number of studies have shown that COI sequence variability is very low (generally less than 1-2%) and that the COI sequences of even closely related species differ by several percent, making it possible to identify species with high confidence. For those groups in which COI is unable to resolve species-level differences, CBOL recommends the use of an additional gene region. In some groups, COI is not an effective barcode region and a different standard region must be identified. In all cases, DNA barcoding is based on the use of a short, standard region that enables cost-effective species identification.

To learn more about DNA barcoding, see:

→ [Barcode of Life Initiative \(PDF, 1.83Mb\)](#)

 Search[Sitemap](#) | [text size](#) +/-

Current Event

[Pictures from the Third International Barcode of Life Conference now online!](#)

Get Involved in CBOL!

[View CBOL member locations](#)

[Find out how you can get involved](#)

[Learn about major CBOL projects and other barcode initiatives](#)

[Browse Case Studies of barcoding projects](#)

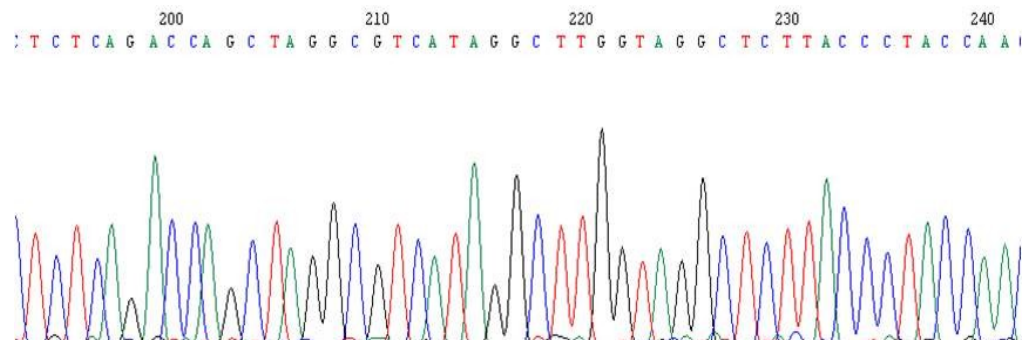
[Propose a barcoding project, post a Case Study, and find partners](#)

[Submit barcode data](#)

[Examine barcode data](#)

[Join CBOL](#)

- ⊙ Amplificazione mediante PCR con primer universali
- ⊙ Analisi della sequenza per identificazione della specie



Kingdoms of Life Being Barcoded

Print

Specimen Records : 3,616,226

Specimens with Barcodes : 2,690,943

Species with Barcodes : 195,012

Search Taxonomy

Animals:

- [Acanthocephala](#) [430]
- [Annelida](#) [33745]
- [Arthropoda](#) [2642465]
- [Brachiopoda](#) [128]
- [Brvozoa](#) [1539]
- [Chaetognatha](#) [373]
- [Chordata](#) [391389]
- [Cnidaria](#) [10542]
- [Cyclophora](#) [327]
- [Echinodermata](#) [30153]
- [Echiura](#) [37]
- [Gnathostomulida](#) [15]
- [Hemichordata](#) [37]
- [Mollusca](#) [89229]
- [Nematoda](#) [8369]
- [Nemertea](#) [952]
- [Onychophora](#) [596]
- [Platyhelminthes](#) [10486]
- [Porifera](#) [2381]
- [Priapulida](#) [21]
- [Rotifera](#) [7925]
- [Sipuncula](#) [388]
- [Tardigrada](#) [1693]
- [Xenoturbellida](#) [4]

Plants:

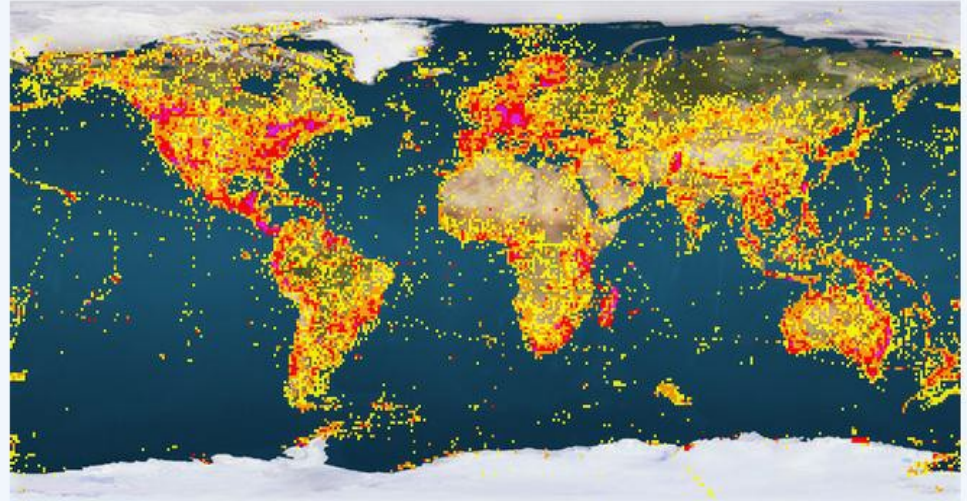
- [Bryophyta](#) [2442]
- [Chlorophyta](#) [9482]
- [Lycopodiophyta](#) [563]
- [Magnoliophyta](#) [186384]
- [Pinophyta](#) [4959]
- [Pteridophyta](#) [8072]
- [Rhodophyta](#) [36004]

Fungi:

- [Ascomycota](#) [65492]
- [Basidiomycota](#) [35587]
- [Chytridiomycota](#) [231]
- [Glomeromycota](#) [3043]
- [Myxomycota](#) [209]
- [Zygomycota](#) [2583]

Protists:

- [Chlorarachniophyta](#) [66]
- [Ciliophora](#) [527]
- [Heterokontophyta](#) [11746]
- [Pyrrophytophyta](#) [2147]



- Le specie sono identificate cimentando la loro sequenza di DNA barcode in un database internazionale dove sono depositate sequenze barcode di riferimento.
- Barcoding Of Life Data systems (BOLD) attualmente contiene 195,012 species



Risultati DNA barcoding

- © Matrici: peli, prodotti alimentari preparati o trasformati, organi, tessuti

Sono state identificate:

mammiferi (*Rattus rattus* ; *Mus musculus* ; *Sus scrofa*; *Loxodonta africana*; *Vulpes vulpes*); **anfibi** (*Rana spp*); rettili (*Natrix natrix*); **uccelli** (*Gallus gallus* ; *Anas platyrhynchos*); **molluschi** (*Octopus vulgaris* ; *Amphioctopus spp*); **insetti** (*Megaselia spp*; *Aethina tumida*)



Identificazione di specie ittica

Approcci:

- ⊙ Identificazione morfologica
- ⊙ Analisi delle proteine: isoelettrofocalizzazione
- ⊙ Analisi del DNA:
 - real time PCR specie specifica
 - DNA Barcoding



SEARCH

[Home](#) | [Food](#) | [Drugs](#) | [Medical Devices](#) | [Radiation-Emitting Products](#) | [Vaccines, Blood & Biologics](#) | [Animal & Veterinary](#) | [Cosmetics](#) | [Tobacco Products](#)

Reference Standard Sequence Library (RSSL) for Seafood Identification



[FDA Home](#) [DNA-based Seafood Identification](#) [Reference Standard Sequence Library \(RSSL\) for Seafood Identification](#) [Original Search Results](#)

This searchable database contains DNA reference barcode sequences (FASTA format) and other data for each of the specimens. Clicking on the link for a Scientific Name opens a detail page for that species that includes the DNA reference sequence for that specimen and additional data. Photographs are included for some species. The posted/modified date indicates when data for that sample was loaded or modified. The initial data for the sequence library were posted in November 2011.

Authentication and voucher information: All Vertebrate (V) specimens with a sample ID number beginning with "FDA" were authenticated and are currently vouchered at the [Smithsonian National Museum of Natural History](#) (NMNH).

All vertebrate specimens with a sample ID number beginning with "RFE" (collected 1993-1998) were authenticated and most are currently vouchered at the [California Academy of Sciences](#) (CAS).

All vertebrate specimens with a sample ID number beginning with either "PI" or "RP" were collected from commercial fish markets in the Philippine Islands and are currently vouchered at the [Smithsonian National Museum of Natural History](#) (NMNH).

Select species of puffer fish are vouchered at the [National Museum of Nature and Science, Tokyo, Japan](#) (NMNST).

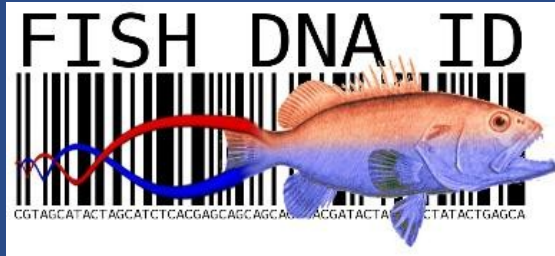
All Invertebrate specimens (I), or I(C) for Crustaceans, with sample ID numbers beginning with either "FDA" or "ULLZ" were authenticated and are currently vouchered at the [University of Louisiana at Lafayette](#) (ULL).

All invertebrate specimens with sample ID numbers beginning with "NSIL" were authenticated by the National Marine Fisheries Service and provided by the NOAA National Seafood Inspection Laboratory.

Individual collection voucher reference numbers are provided where available.

FDA Acceptable Market Names and common names are derived from [The Seafood List - FDA's Guide to Acceptable Market Names for Seafood Sold in Interstate Commerce](#) where available. For Species not currently covered in the Seafood List (which are indicated by "n/a" in the Acceptable Market Name column), common names are taken from ITIS: [Integrated Taxonomic Information System](#), where available, or [Fishbase](#).

An asterisk (*) next to the Market Name indicates that a specific rule or regulation applies to that species. A dagger symbol (†) next to the Common Name identifies names that are



Merluccius capensis/paradoxus, Merluccius hubbsi,
Gadus morhua, Spaurus aurata, Pangasius
hypophthalmus/micronemus, Epinephelus
marginatus, Neosalanx spp./Protosalanx spp.,
Mustelus asterias/mustelus, Lophius
budegassa/piscatorius, Thunnus albacares e
Lamna nasus, Dicentrarchus labrax, Hippoglossus
hippoglossus (dichiarate in etichetta)



Obiettivi

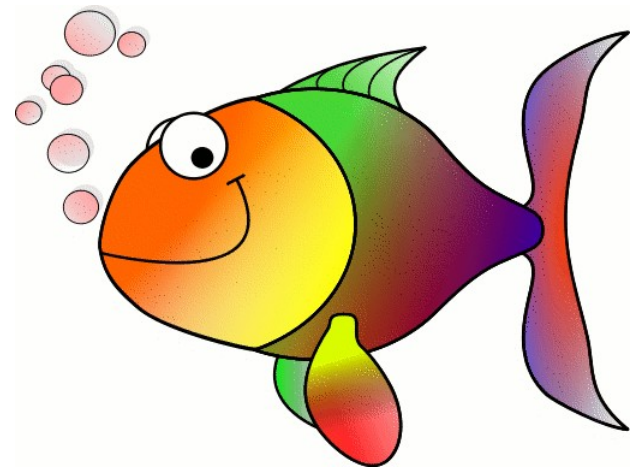
Work- package 1

- ⊙ Individuare e validare un sistema di amplificazione, in PCR real time, di un gene di riferimento per l'identificazione e quantificazione di specie ittiche per le quali esiste almeno un evento geneticamente modificato autorizzato o in corso di autorizzazione in paesi terzi
- ⊙ Sviluppare o individuare e validare metodi PCR specifici e metodi basati su sequenziamento del DNA per l'identificazione di specie ittiche e terrestri presenti in matrici alimentari semplici e complesse



Pesci geneticamente modificati

I pesci GM saranno probabilmente i primi animali GM sul mercato europeo





Salmon GM per uso alimentare



- © AquAdvantage è il nome commerciale di un salmone atlantico (***Salmo salar***) transgenico sviluppato da AquaBounty Technologies
- © Cresce in metà tempo rispetto ad un salmone normale

U.S. Department of Health and Human Services

FDA U.S. Food and Drug Administration
Protecting and Promoting Your Health

A to Z Index | Follow FDA | En Español

Home | Food | Drugs | Medical Devices | Radiation-Emitting Products | Vaccines, Blood & Biologics | Animal & Veterinary | Cosmetics | Tobacco Products

Animal & Veterinary

Home > Animal & Veterinary > Development & Approval Process > Genetic Engineering > Genetically Engineered Animals

Genetically Engineered Animals

▶ **AquAdvantage Salmon**

Oxitec Mosquito

Resources for You

- CVM GFI #187 Regulation of Genetically Engineered Animals Containing Heritable Recombinant DNA Constructs (PDF - 149KB)

AquAdvantage Salmon

FDA has issued for public comment a draft environmental assessment (EA) related to the agency's review of an application concerning AquAdvantage Salmon, a genetically engineered Atlantic salmon. FDA's preliminary finding is that an approval of this application, under the specific conditions proposed in the application, would not have a significant impact (FONSI) on the U.S. environment. AquAdvantage Salmon is a product of AquaBounty Technologies (AquaBounty), of Maynard, Mass.

Environmental Documents

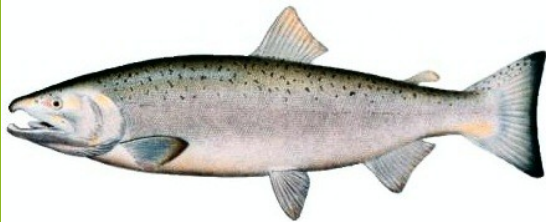
- FDA Extends Comment Period on AquAdvantage Salmon Documents
- Notice of Draft Environmental Assessment and Preliminary Finding of No Significant Impact Concerning a Genetically Engineered Atlantic Salmon
- AquAdvantage Salmon Draft Environmental Assessment (PDF - 5.4MB)
- AquAdvantage Salmon Preliminary Finding of No Significant Impact (PDF - 5.1KB)

Nelle uova è stato introdotto DNA che codifica per un ormone della crescita, che si è inserito stabilmente nel genoma



Tipi di salmone d'interesse commerciale

- ◎ Salmone atlantico (***Salmo salar***)
- ◎ Salmone reale (*Oncorhynchus tshawytscha*)
- ◎ Salmone rosso (*Oncorhynchus nerka*)
- ◎ Salmone argentato (*Oncorhynchus kisutch*)
- ◎ Salmone rosa (*Oncorhynchus gorbuscha*)

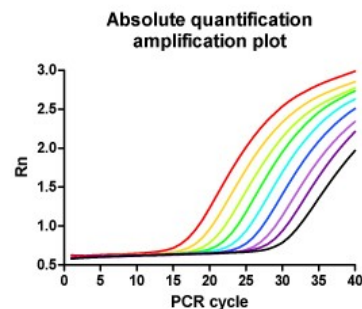




Real time PCR

Dall'analisi della letteratura è stata identificata una metodica real time per la rilevazione del salmone atlantico e una per il salmone rosa , ampiamente impiegati nell'industria alimentare (*Rasmussen-Hellberg et al 2010*).

Tali campioni sono stati analizzati in doppio con metodica real time e tramite sequenziamento della citocromo c ossidasi





DNA barcoding vs real time PCR

- © Matrici testate:
salmone affumicato
sushi
filetti di salmone surgelato

Specie identificate:

Salmo salar

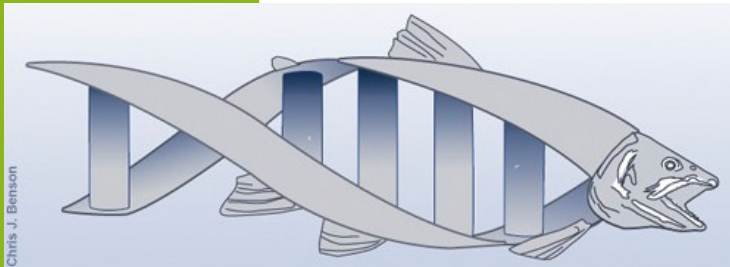
Oncorhynchus gorbuscha

Corrispondenza tra i risultati ottenuti con le due metodiche



Salmone transgenico ?

- © Non è stato possibile effettuare analisi per l'impossibilità di reperire materiale GM





Metodo per verificare l'identità tassonomica di prodotti carnei destinati al consumo umano ed animale

- ⊙ Il sistema consente di distinguere correttamente le matrici biologiche di pollo, suino, bovino, suino, caprino, ovino, bufalino, equino, tacchino, coniglio topo e ratto
- ⊙ prevede l'impiego di diverse sonde molecolari (probe), ciascuna specifica per una delle specie indagate, immobilizzate su di un supporto secondo



Metodo per verificare l'identità tassonomica di prodotti carnei destinati al consumo umano ed animale

- © I prodotti di PCR ottenuti dalle matrici alimentari vengono cimentati ed ibridati sul supporto dove, in seguito al legame con la sonda corrispondente, la loro presenza viene evidenziata attraverso una reazione enzimatica/colorimetrica.
- © L'identificazione della singola specie avviene sulla base della sua posizione sul supporto solido



DIREZIONE OPERATIVA CONTROLLO DEGLI ALIMENTI

pag 1 di 15

POS MIC 014 INT rev. 4 del 27/01/2014

IDENTIFICAZIONE SPECIE AVICOLA, IDENTIFICAZIONE SPECIE BOVINA, IDENTIFICAZIONE SPECIE OVINA, IDENTIFICAZIONE SPECIE SUINA, IDENTIFICAZIONE SPECIE CAPRINA, IDENTIFICAZIONE SPECIE BUFALINA, IDENTIFICAZIONE SPECIE EQUINA, IDENTIFICAZIONE SPECIE ITTICHE, IDENTIFICAZIONE SPECIE POLLO, IDENTIFICAZIONE SPECIE TACCHINO, IDENTIFICAZIONE SPECIE CUNICOLA, IDENTIFICAZIONE SPECIE TOPO, IDENTIFICAZIONE SPECIE RATTO (MICROARRAY)



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

IDENTIFICAZIONE SPECIE AVICOLA, IDENTIFICAZIONE SPECIE BOVINA, IDENTIFICAZIONE SPECIE OVINA, IDENTIFICAZIONE SPECIE SUINA, IDENTIFICAZIONE SPECIE CAPRINA, IDENTIFICAZIONE SPECIE BUFALINA, IDENTIFICAZIONE SPECIE EQUINA, IDENTIFICAZIONE SPECIE ITTICHE, IDENTIFICAZIONE SPECIE POLLO, IDENTIFICAZIONE SPECIE TACCHINO, IDENTIFICAZIONE SPECIE CUNICOLA, IDENTIFICAZIONE SPECIE TOPO, IDENTIFICAZIONE SPECIE RATTO (MICROARRAY)

Redatto:

B. M. VARCASIA

B. M. Varcasia

Verificato Responsabile Struttura Semplice:

P. DE SANTIS

P. De Santis

Verificato RQ:

S. GUZZO

S. Guzzo

Qualità Qualità Qualità Qualità Qualità

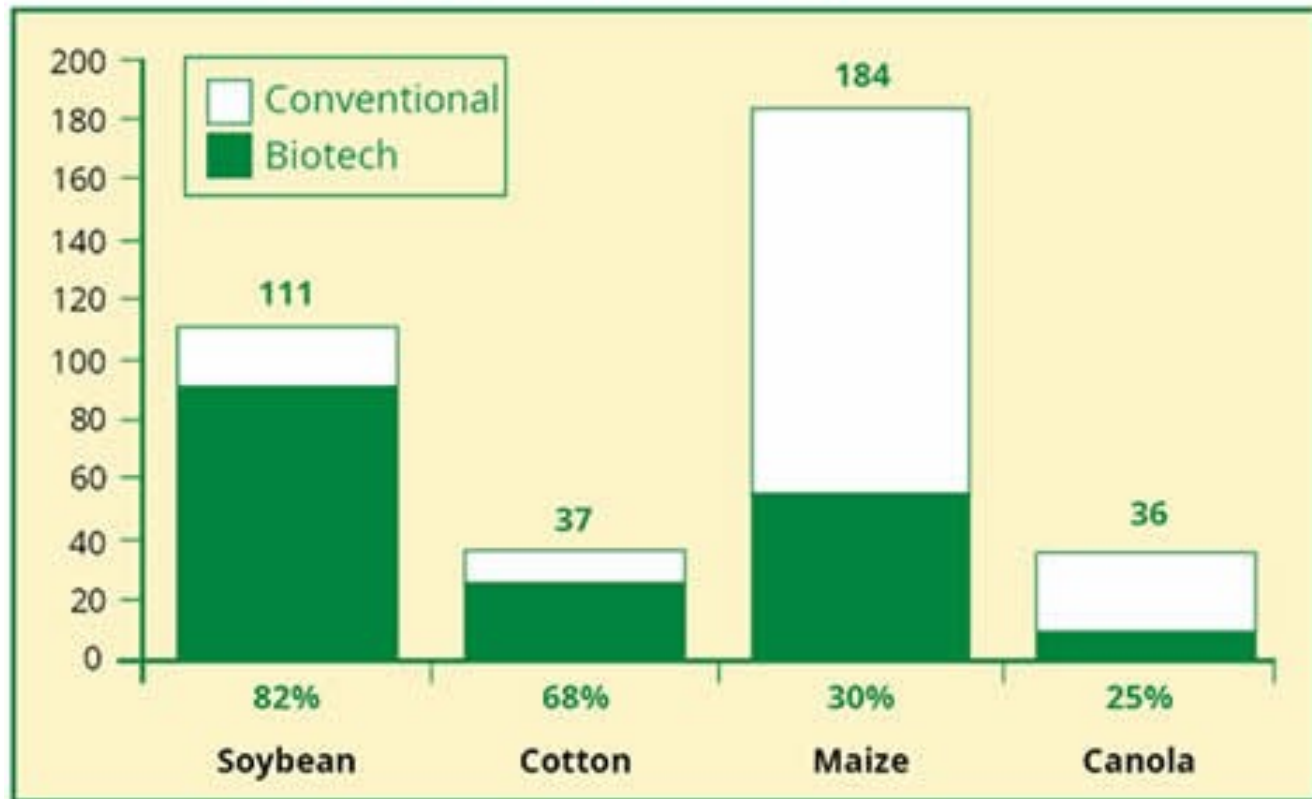


Work- package 2

**Identificazione della specie
soia (*Glycine max*)**



Principali colture biotech



Source: Clive James, 2014.



Identificazione della specie soia

- © La legislazione Europea ha reso obbligatorio che il richiedente autorizzazione includa nel dossier il metodo per l'identificazione e quantificazione del nuovo evento GM e quindi anche il metodo per la rilevazione del gene endogeno

- 
- Gene di riferimento: lectina, ma numerosi metodi per l'identificazione di specie della soia
 - Tecnica di elezione real time PCR



Identificazione della specie soia

- ◎ CRA (Centro per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura) ha fornito 20 varietà appartenenti al genere *Glicine max* (per un totale di 38 campioni)
- ◎ Sono state presi in esame 8 metodi real time per l'identificazione della soia che hanno come target una regione del gene lectina:
 - A) dal nucleotide 1224 al 1304 - amplicone 81 bp (Pauli et al 2001)
 - B) dal nucleotide 1267 al 1340 – amplicone 74 bp (EURL Validated method 40-3-2)
 - C) dal nucleotide 1340 al 1441 – amplicone 102 bp (EURL Validated method A5547)
 - D) dal nucleotide 1253 al 1333 – amplicone 81 bp (Terry et al 2001)
 - E) dal nucleotide 1215 al 1332 – amplicone 118 bp (Shindo et al 2002)
 - F) dal nucleotide 1274 al 1332 – amplicone 59 bp (Pardigol et al 2003)
 - G) dal nucleotide 1208 al 1277 – amplicone 70 bp (Hird et al 2003)
 - H) dal nucleotide 1131 al 1311 – amplicone 181 bp (Waiblinger et al 2001)



Identificazione della specie soia

Caratteristiche gene endogeno:

- ⊙ Stabilità nel numero di copie
- ⊙ Stabilità a livello di sequenza genica

→ La percentuale GM viene stabilita sulla base della percentuale **soia GM/ specie soia (ingrediente)**





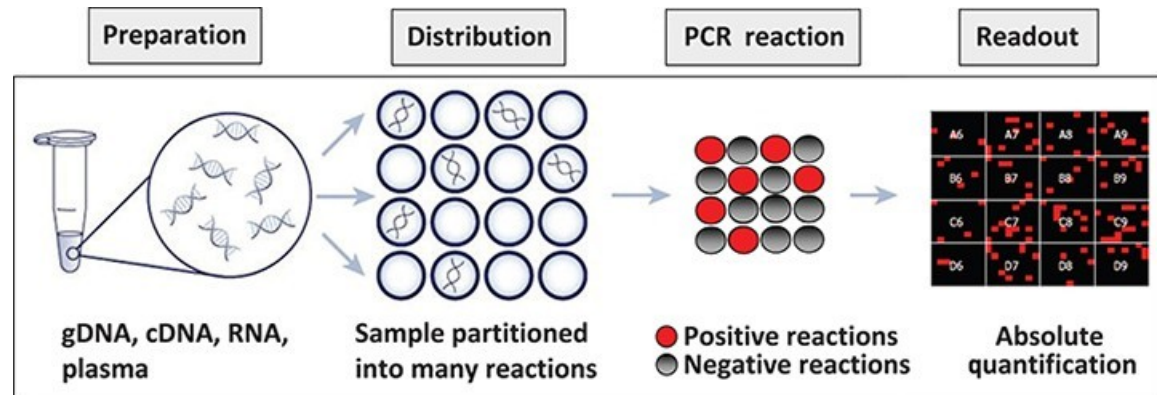
...work in progress

- © E' in corso l'accreditamento della prova per l'identificazione di specie ittica con la metodica del DNA barcoding
- © Per ciò che concerne l'identificazione della soia, i metodi validati dal Laboratorio Europeo di Riferimento sono stati trasferiti e testati in PCR digitale



PCR digitale: PCR di terza generazione

- ◎ Quantificazione assoluta del numero di copie di target presente nel campione
- ◎ Assenza di una curva di calibrazione (necessaria per la quantificazione in real time PCR)





Grazie per l'attenzione