



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

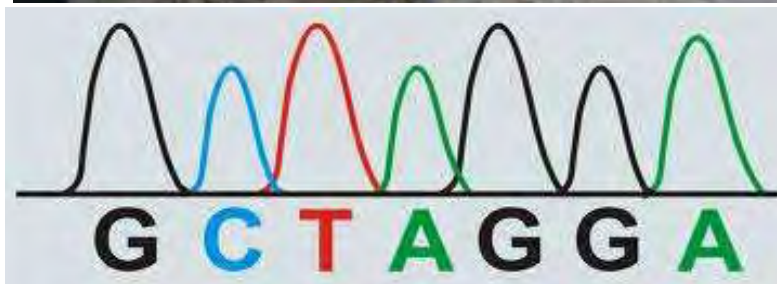
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΣΤΑΣΙΝΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΩΝ ΦΙΛΕΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΟΥ DNA BARCODING



ΛΑΡΙΣΑ 2013

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΩΝ ΦΙΛΕΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΟΥ DNA BARCODING

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ(ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΠΟΝΔΥΛΩΤΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΖΩΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ	ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιολογίας Σπολδυλωτών κ.Μούτου Αικατερίνη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου αυτή την εργασία,για την καθοδήγηση της και τη βοήθειά της και κυρίως για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον αντικείμενο

Ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής,τον καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών κ.Ζήση Μαμούρη και την λέκτορα Μοριακής Γενετικής ζωικών οργανισμών κ.Σαραφίδου Θεολογία

Ενα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον διδάκτορα κ.Σταμάτη Κων/νο για την αμέριστη βοήθεια του, τη συνεχή καθοδήγηση του και τη μετάδοση των γνώσεων του καθ όλη τη διάρκεια της εκπόνησης του πειραματικού μέρους.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ.Θέμη Γιαννούλη,την μεταπτυχιακό φοιτήτρια κ.Σαρρή Κων/να και όλα τα άτομα που παρευρέθηκαν την ίδια χρονική περίοδο στο εργαστήριο Γενετικής,Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για το φιλικό κλίμα συνεργασίας.

Τέλος ευχαριστώ θερμά τη μητέρα μου και την θεία μου για την ηθική και υλική υποστήριξη,καθώς και την ανεξάντλητη υπομονή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία σκοπός ήταν η μοριακή ανάλυση σε κατεψυγμένα και επεξεργασμένα φιλέτα ψαριών και η επαλήθευση των ειδών που αναγράφονται στην ετικέτα, ώστε να αποφευχθεί η νοθεία και η παραπλάνηση των καταναλωτών.

Στη συγκεκριμένη έρευνα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική PCR-SSCP(αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας DNA) για την ανάλυση του 16s -rRNA γονιδίου.Επίσης ,στα δείγματά μας πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση DNA (Sequencing) των προϊόντων PCR

Με αυτήν την προσέγγιση κάποια δείγματα που ανέγραφαν το είδος επιβεβαιώθηκαν ενώ τα υπόλοιπα βρέθηκαν πως ανήκαν σε διαφορετικό είδος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

❖ ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	8
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ GADIDAE-MERLUCCIDAE.....	9
GADUS MORHUA(Βακαλάος του Ατλαντικού)	11
THERAGRA CHALCOGRAMMA	12
POLLACHIUS VIRENS.....	13
MERLUCCIOUS MERLUCCIOUS (Ευρωπαϊκός μπακαλιάρος)	14
MERLUCCIOUS HUBBSI (Μπακαλιάρος της Αργεντινής).....	15
MERLUCCIOUS PRODUCTUS (Βακαλάος του βόρειου Ειρηνικού).....	16
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ PLEURONECTIDAE	17
LIMANDA ASPERA	17
PLEURONECTES PLATESSA	17
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΨΑΡΙΩΝ.....	19
ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	21
ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΨΑΡΙΩΝ ΕΜΠΟΡΙΟΥ	22
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	24
ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	26
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	26
Αντιδραστήρια-ρόλος αντιδραστηρίων	28
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ(PCR)	28
Αντιδραστήρια-Ρόλος αντιδραστηρίων	30
διαδικασία που ακολουθείται:	30
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	31
Αντιδραστήρια	32
ΑΝΑΛΥΣΗ SSCP(Single strand Conformation Polymorphism)	34
Αντιδραστήρια	34
Η ανάλυση SSCP αποτελείται από 3 στάδια.....	34
Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης.....	35
διαδικασία που ακολουθείται.....	36
Χρώση πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο(silver staining).....	37
διαδικασία που ακολουθείται	37
❖ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38

Multiple alignment των αλληλουχιών των δειγμάτων που μελετήθηκαν.....	45
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	48
❖ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

ΕΜΠΟΡΙΟ ΒΑΚΑΛΑΟΥ

Ο βακαλάος πρωτοεμφανίστηκε σαν εμπορικό προϊόν ήδη από την εποχή των Βίκινγκς (περί το 800 μΧ.). Οι Νορβηγοί καταλάμβαναν αποξηραμένο βακαλάο κατά τη διάρκεια των ταξιδιών τους και τον διέδωσαν και στη Νότια Ευρώπη. Αργότερα, τη σκυτάλη πήραν οι Άγγλοι, που εκπαίδευσαν σχετικά τους ναυτικούς τους και έκαναν γνωστά τα πλεονεκτήματά του στην Αμερική και τον Καναδά. Σημαντικό ρόλο έπαιξαν και οι Βάσκοι θαλασσοπόροι, που διέδωσαν τον βακαλάο στην Αφρική και στην Ασία τον 16ο και 17ο αιώνα.

Η αλιεία του πήρε τέτοια διάσταση ώστε φτάσαμε σε περιόδους κρίσεων όπως τους γνωστούς Πολέμους του Μπακαλιάρου (Cod War, τον "Ψυχρό Πόλεμο"), που οδήγησε σε "πάγωμα" των διπλωματικών σχέσεων Αγγλίας και Ισλανδίας στη δεκαετία του 1970. Καθώς τα παγκόσμια αποθέματα του ψαριού μειώνονταν δραστικά, το 1972, η Ισλανδία, της οποίας ο πληθυσμός της εξαρτιόταν σχεδόν αποκλειστικά από την αλιεία, κήρυξε μια "Προστατευόμενη Οικονομική Ζώνη", που ξεπερνούσε τα χωρικά της ύδατα και παράλληλα ανακοίνωσε μέτρα για τον περιορισμό της υπεραλίευσης. Ακολούθησε μια σειρά από συνοριακά επεισόδια, κατά τα οποία ο ισλανδικός στόλος απομάκρυνε βίαια αγγλικές μηχανότρατες που ψάρευαν σε αυτή την περιοχή. Σαν αποτέλεσμα, το Βρετανικό Ναυτικό, με πολεμικά πλοία και ρυμουλκά επενέβη δυναμικά και εκφόβισε τον κατά πολύ ασθενέστερο ισλανδικό στόλο.

Το 1976 οι δυο πλευρές κατέληξαν σε συμβιβασμό, με τις κυβερνήσεις των δυο χωρών να αποδέχονται την ελευθερία πρόσβασης μόνον 24 βρετανικών πλοιαρίων το χρόνο στην αμφισβητούμενη περιοχή (έκτασης 200 ναυτικών μιλίων).

Το 1992, ο Καναδάς επέβαλε κι αυτός περιορισμό στην αλιεία του βακαλάου κατά μήκος των ακτών του, ενέργεια που επίσης προκάλεσε διεθνείς αντιδράσεις και αργότερα ανακλήθηκε.

Για το 2006, η επιτρεπόμενη αλίευση για τον βακαλάο του βορειοδυτικού Ατλαντικού είχε προσδιοριστεί στους 23.000 τόνους, που αντιπροσώπευαν το μισό του εκτιμώμενου στοκ. Πιο ελπιδοφόρα είναι τα πράγματα για τον βακαλάο του βορειοανατολικού Ατλαντικού, όπου εκτιμάται ότι ζουν 473.000 τόνοι του ψαριού.

Η δραματική μείωση των ποσοτήτων στην πλευρά των ΗΠΑ και του Καναδά, αλλά και η πίεση που ασκείται από τις οικολογικές οργανώσεις και το περιβαλλοντικό κίνημα οδήγησε στην πλήρη απαγόρευση της αλιείας του βακαλάου σε ολόκληρες περιοχές, σε μια προσπάθεια διαφύλαξης της αναπαραγωγής του. Επιπλέον, οι ψαράδες στις βορειοανατολικές πολιτείες των ΗΠΑ επιτρέπεται να αλιεύουν βακαλάους μόνο για 90 ημέρες το χρόνο. Η κυβέρνηση δίνει κίνητρα για να προωθήσει εναλλακτικά είδη, όπως ο γάδος, που μοιάζει με τον βακαλάο, αλλά είναι μικρότερος και με χαμηλότερο θρεπτικό περιεχόμενο.

Στην Ελλάδα, ο βακαλάος εισάγεται από τις βόρειες χώρες και διατίθεται ως κατεψυγμένο προϊόν ή σε μορφή καθαρισμένου φιλέτου χωρίς κόκαλο, έτοιμου για μαγείρεμα.

ΒΑΚΑΛΑΟΣ-ΓΑΔΟΣ

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ GADIDAE-MERLUCCIDAE

Ο Βακαλάος ανήκει στην οικογένεια **Gadidae**, στην οποία ανήκουν πολλά είδη ιχθύων με υψηλή διατροφική και εμπορική αξία. Η οικογένεια περιλαμβάνει περίπου 60 είδη σαρκοφάγων ψαριών, τα οποία ζουν κυρίως στα βαθιά νερά των ψυχρών θαλασσών. Γνωστότερο και με μεγαλύτερο εμπορικό ενδιαφέρον είναι το είδος *Gadus morhua* ή βακαλάος του Ατλαντικού. Ο συγκεκριμένος βακαλάος αλιεύεται όλο τον χρόνο, ιδιαίτερα τον χειμώνα, για το κρέας, τα αβγά και το λάδι που εξάγεται από το συκώτι του (μουρουνέλαιο), αποτελώντας τη βάση της κερδοφόρας αλιείας στον βόρειο Ατλαντικό. Διατίθεται και νωπός, αλλά τις περισσότερες φορές διατηρείται στην άλμη ή αλατίζεται και ξηραίνεται στον αέρα, αφού αφαιρεθούν το κεφάλι και τα εντόσθια.

Το γένος *Gadus*, περιλαμβάνει άλλα δύο είδη, παρόμοια με τον βακαλάο του Ατλαντικού: το είδος *Gadus macrocephalus*, που αναφέρεται και ως βακαλάος του Ειρηνικού ή γκρίζος βακαλάος και το συγγενικό είδος *Gadus odac* ή βακαλάος της Γροιλανδίας. Τα υπόλοιπα είδη ταξινομούνται σε άλλα γένη σύμφωνα με πιο πρόσφατα συστήματα κατάταξης.

Στην ίδια οικογένεια ανήκουν και τα ατλαντικά είδη *Pollachius pollachius* και *Pollachius virens*. Τα ψάρια αυτά έχουν καστανοπράσινη ράχη, ανοιχτότερες πλευρές και αργυρόχρωμη κοιλιά. Το σώμα τους μπορεί να φτάσει σε μήκος το 1 μέτρο και σε βάρος τα 11 κιλά και καταλήγει σε διχλωτή ουρά. Συγγενικό είδος με τα είδη *Pollachius*, τα οποία ζουν στον Ειρηνικό, είναι το *Theragra chalcogramma* ή βακαλάος της Αλάσκας.

Η οικογένεια **Merluccidae** είναι μια οικογένεια γάδων που συμπεριλαμβάνει αρκετά είδη «μπακαλιάρων». Συνήθως συναντώνται στα κρύα νερά του Ατλαντικού και Ειρηνικού Ωκεανού καθώς και σε βάθη άνω των 50μέτρων στα ανοιχτά νερά τροπικών, υποτροπικών και εύκρατων περιοχών.

Τα πιο γνωστά είδη της συγκεκριμένης οικογένειας ανήκουν στα γένη *Macruronus* και *Merluccius*. Αυτά είναι μεγάλα, με μήκος που φτάνει μέχρι 1,5 μέτρα. Αρκετά είδη είναι υψηλής εμπορικής αξίας όπως για παράδειγμα το *Macruronus novaezealandiae*, που αλιεύεται στο νοτιοδυτικό Ειρηνικό και ο μπακαλιάρος του Βόρειου Ειρηνικού (*Merluccius productus*) που αλιεύεται στα ανοικτά της Δυτικής Βόρειας Αμερικής.

Στη Μεσόγειο απαντά το είδος *Merluccius merluccius*. Το σώμα του, μήκους 30-70 εκ., είναι γκρίζο μεταλλικό στη ράχη και λευκό στην κοιλιά. Είναι κοινό ψάρι όπου αλιεύεται και πωλείται συνήθως νωπό.

Συνολικά, υπάρχουν 12 είδη που περιλαμβάνονται στο γένος *Merluccius*, το οποίο συναντάται στον Ατλαντικό ωκεανό και στη Μεσόγειο (*Merluccius merluccius*), στις αφρικανικές ακτές του Ατλαντικού (*M. senegalensis*, *M. polli*, *M. capensis* και *M. paradoxus*), κατά μήκος του Ατλαντικού στις αμερικάνικες ακτές (*M. bilinearis* και *M. albidus* στο Βορρά, *M. hubbsi* και *M. australis* στον Νότιο Ειρηνικό γύρω από την Παταγονία), κατά μήκος των Αμερικανικών ακτών (από βορρά προς νότο *M. productus*, *M. angustimanus*, *M. gayi* και *M. australis*), καθώς και στην ανατολική Νέα Ζηλανδία (*M. australis*).

Η αλιεία, η επεξεργασία και η εξαγωγή του μπακαλιάρου, και ιδιαίτερα του είδους *Gadus morhua*, αποτελούν την κύρια απασχόληση των πληθυσμών που ζουν στις ακτές του βόρειου Ατλαντικού, κυρίως στην Αγγλία και στην Ισλανδία. Ο μπακαλιάρος που κυκλοφορεί στο εμπόριο με την ονομασία βακαλάος, διατίθεται σε διάφορες μορφές, όπως νωπός, κατεψυγμένος, αλίπαστος ή καπνιστός. Οι πληθυσμοί πολλών ειδών μπακαλιάρου, έχουν μειωθεί σε επικίνδυνο βαθμό, λόγω της εντατικής αλιείας αλλά και της ανόδου της θερμοκρασίας των θαλασσών.

Τα είδη Βακαλάου που θα μας απασχολήσουν στην παρούσα μελέτη είναι :

- ✓ Βακαλάος του Ατλαντικού-*Gadus morhua*
- ✓ Ευρωπαϊκός βακαλάος-*Merluccius merluccius*
- ✓ Βακαλάος της Αργεντινής-*Merluccius hubbsi*
- ✓ Βακαλάος του Βόρειου Ειρηνικού-*Merluccius productus*
- ✓ Μαύρος βακαλάος Αλάσκας-*Theragra chalcogramma*
- ✓ Κίτρινος βακαλάος -*Pollachius virens*

Gadus morhua (Βακαλάος του Ατλαντικού)

Ο Βακαλάος του Ατλαντικού (*Gadus morhua*) είναι ένα πολύ γνωστό είδος ψαριού που ανήκει στην οικογένεια των Gadidae, με τα χαρακτηριστικά "ακτινοπτερύγια" η οποία περιλαμβάνει ψάρια τα οποία παρουσιάζουν σπουδαία οικονομική σημασία.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ: Έχει μυτερό ρύγχος και μικρό προγούλι κάτω από το σαγόι του. Το στόμα του έχει μεγάλο άνοιγμα και διαθέτει ισχυρά δόντια. Το σώμα του είναι μεγάλο και καλύπτεται από μικρά λέπια και το μήκος του κυμαίνεται μεταξύ 20-150cm. Μπορεί να αυξηθεί σε 2 μέτρα μήκος και ζυγίζει έως 96 kg. Ζεί έως 15 χρόνια.

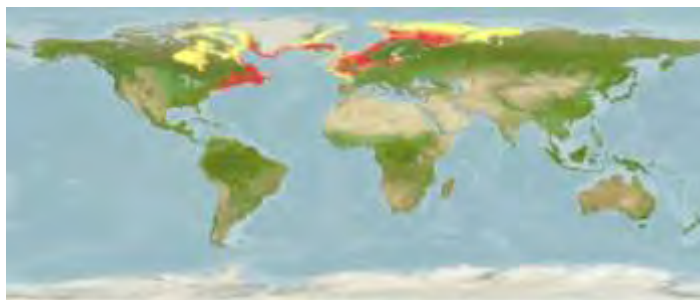
Συνήθως είναι λευκός ή γκρι, αλλά το χρώμα του ποικίλλει από καφέ ως πράσινο ή ακόμα και κόκκινο. Συχνά έχει καφετιά ή κοκκινωπά στίγματα, είτε στο σώμα είτε στο κεφάλι ενώ η κοιλιά είναι ανοιχτού χρώματος. Έχει ευχάριστο άρωμα, χαμηλά λιπαρά, πολλές πρωτεΐνες και πυκνή λευκή σάρκα, που απολεπίζεται εύκολα.

Χαρακτηριστικό γνώρισμα του γάδου είναι το προτεταμένο οστό της άνω γνάθου, η ανοιχτόχρωμη πλαϊνή γραμμή και το έντονο μουστάκι στο πηγούνι, το οποίο χρησιμεύει ως αισθητήριο κατά την αναζήτηση τροφής. Ο γάδος, όπως και τα υπόλοιπα ψάρια αυτού του είδους, είναι αρπακτικό.



Εικόνα 2: Απεικόνιση του *Gadus morhua* (www.fishbase.org)

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ: Συναντάται κυρίως στο βόρειο ημισφαίριο και στα ψυχρά κλίματα, ιδιαίτερα στο βόρειο Ατλαντικό Ωκεανό και τη Βόρεια Θάλασσα.



Εικόνα 3: Γεωγραφική κατανομή του *Gadus morhua* (www.fishbase.org)

- Κύριες χώρες παραγωγής σε επίπεδο ΕΕ – Ιρλανδία, Ηνωμένο Βασίλειο.
- Κύριες χώρες παραγωγής σε παγκόσμιο επίπεδο – Νορβηγία, Ισλανδία, Ιρλανδία, Ηνωμένο Βασίλειο

ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΑΞΙΑ: Ο βακαλάος παρουσιάζει μεγάλη εμπορική αξία καθώς υπολογίζεται ότι αλιεύονται ετησίως 500.000.000kg. Είναι ο πιο ακριβός τύπος γάδου. Ελάχιστα μέρη του ψαριού μένουν αχρησιμοποίητα: το κρέας του προτιμάται από τους ανθρώπους για τη διατροφή τους. Έχει ευχάριστο άρωμα, χαμηλά λιπαρά, πολλές πρωτεΐνες και πυκνή λευκή σάρκα, που απολεπίζεται εύκολα.

Η νηκτική κύστη γίνεται ψαρόκολλα για τον καθαρισμό της μύρας και του κρασιού, τα κεφάλια τους βράζονται και γίνονται κόλλα, ενώ από το συκώτι του ψαριού εξάγεται το μουρουνέλαιο και τα εντόσθιά του γίνονται λιπάσματα. Το μουρουνέλαιο περιέχει μεγάλες ποσότητες βιταμίνης Α (στη μορφή της ρετινόλης, που χρησιμεύει ως αντί-οξειδωτικό και είναι σημαντική για την όραση και την ανάπτυξη των οστών), βιταμίνη D, που συμβάλλει στη διατήρηση του ασβεστίου και του φωσφόρου στα σωστά επίπεδα στο αίμα και βιταμίνη Κ που βοηθά στην πήξη του αίματος και ωμέγα-3 λιπαρά οξέα.

Theragra chalcogramma

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ: Φτάνει τα 80 cm μήκος περίπου και βάρος που φτάνει τα 3.850 g. Ζεί έως 15 χρόνια. Το χρώμα του είναι λαδί –καφέ στο πίσω μέρος του σώματός του και γίνεται ασημένιο στα πλευρά, συχνά με αποχρωματισμένα μοτίβα.



Εικόνα 4:*Theragra chalcogramma* (www.fishbase.org)

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ: ζει κυρίως στις ακτές του βόρειου Ειρηνικού, μεταξύ της Ιαπωνίας και του Κόλπου της Αλάσκας.



Εικόνα 5: Γεωγραφική κατανομή του *Theragra chalcogramma* (www.fishbase.org)

ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΑΞΙΑ :Ως βρώσιμο ψάρι, ξεκίνησε να αλιεύεται το 1984. Συχνά, η επεξεργασία του γίνεται αμέσως μετά την αλίευσή του, επάνω στο σκάφος. Στο εμπόριο, υπάρχει κυρίως με τη μορφή κατεψυγμένων προϊόντων. Το κρέας του είναι μαλακό, λευκό, λεπτό, πολύ τρυφερό και γευστικό. Διατίθεται καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου σε σχετικά ίδια ποιότητα στην ψαραγορά. Επειδή υπάρχει σε μεγάλες ποσότητες και η αλιεία του πραγματοποιείται σε διεθνή κλίμακα, η τιμή του είναι προσιτή, παρά την πολύ υψηλή του ποιότητα. Το κρέας τους χρησιμοποιείται για την παραγωγή σουρίμι.

Pollachius virens

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ: ανήκει στην οικογένεια Gadidae. Τα ενήλικα άτομα μπορούν να φτάσουν σε μήκος τα 130 cm και σε βάρος τα 32kg. Η μέγιστη ηλικία που έχει καταγραφεί είναι 25 χρόνια. Το σχήμα του σώματός του είναι επίμηκες και έχει μια ανοιχτόχρωμη πλαϊνή λωρίδα. Η πλάτη του έχει πράσινο έως μαύρο καφέ χρώμα, ενώ η κοιλιά του ασημί λευκό. Στο προτεταμένο οστό της κάτω γνάθου, όμως, βρίσκεται μόνο ένα μικρό ή καθόλου μουστάκι.



Εικόνα 6: απεικόνιση του *Pollachius virens* (www.fishbase.org)

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ: Ζει σε ολόκληρη την περιοχή του Βόρειου Ατλαντικού. Οι κύριες περιοχές αλιείας του βρίσκονται στην Ισλανδία, τη Νορβηγία και τη Βόρεια Θάλασσα.



Εικόνα 7: Γεωγραφική κατανομή *Pollachius virens* (www. fish base.org)

ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ: Στο εμπόριο κυκλοφορούν κατά μέσο όρο βακαλάοι είδους *Pollachius virens* μήκους 70 εκ. κατά μέσο όρο και βάρους 3 - 4 κιλών. Παρά την καλή σχέση τιμής-απόδοσης, ο μαύρος μπακαλιάρος είναι ένα σημαντικό βρώσιμο ψάρι. Το φιλέτο έχει ένα ελαφρώς γκρι-κοκκινωπό χρώμα, είναι πολύ λεπτό και έχει μεγάλη συνοχή. Το κρέας, όταν μαγειρεύεται, γίνεται ανοιχτόχρωμο. Επίσης, ένα σημαντικό μέρος του ψαριού διατίθεται αλατισμένο, καπνιστό, κομμένο σε φέτες και με κοκκινωπό χρώμα ως "φέτες μπακαλιάρου" ή "σνίτσελ μπακαλιάρου" (υποκατάστατο σολομού) στο εμπόριο.

Merluccius merluccius (ευρωπαϊκός μπακαλιάρος)

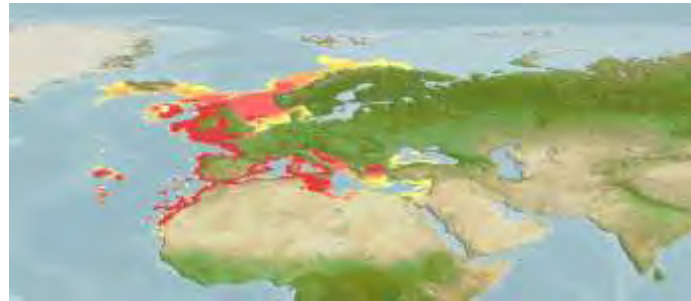
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ: Το μέγιστο μήκος του φτάνει τα 140 cm και το βάρος του τα 15kg. Όσο αφορά την ηλικία του, η μέγιστη αναφερόμενη ηλικία φτάνει τα 20 έτη. Τρέφεται με καλαμάρια, αντζούγιες, σαρδέλες, ρέγγες, γαρίδες και άλλα μικρά θαλάσσια.

Το σώμα τους είναι επίμηκες ελαφρά πιεσμένο πλευρικά. Το ραχιαίο και εδρικό πτερύγιο είναι επιμήκη σχεδόν συμμετρικά τοποθετημένα. Ο ουραίος μίσχος είναι λεπτός. Τα λέπια του είναι μικρά και στρογγυλά και διαθέτει μόνο 2 ραχιαία πτερύγια, ενώ οι μεγάλοι έχουν 3. Το πρώτο είναι το 1/4 σε μήκος σε σχέση το δεύτερο, καθώς και το έδρικό. Όλα τα πτερύγια είναι μαλακά -μαλακοπτερύγιος ιχθύς. Διαθέτει κάτω σαγόνη πιο μακρύ απ ότι το άνω και δεν έχει γένη. Συνήθως είναι λευκός ή γκρι, αλλά το χρώμα του ποικίλλει από καφέ ως πράσινο ή ακόμα και κόκκινο. Έχει γκρί μεταλλική πλάτη και λευκή κοιλιά. Χαρακτηριστική είναι η καφέ πλευρική γραμμή που έχει στο σώμα του. Επίσης πολύ χαρακτηριστικό για αυτό το αρπακτικό ψάρι, είναι οι μαύρες κοιλότητες του στόματος και των βραγχίων, καθώς και το εντυπωσιακά μυτερό του κεφάλι.



Εικόνα 8: Απεικόνιση του *Merluccius merluccius* (www.fishbase.org)

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ :Συναντάται στον Ανατολικό Ατλαντικό: τη Νορβηγία και την Ισλανδία, νότια της Μαυριτανίας. Επίσης στη Θάλασσα της Μεσογείου και κατά μήκος της νότιας ακτής της Μαύρης Θάλασσας.



Εικόνα 9: Γεωγραφική κατανομή του *Merluccius merluccius* (www.fishbase.org)

***Merluccius hubbsi* (Βακαλάος της Αργεντινής)**

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ: Παρόμοια χαρακτηριστικά με τον ευρωπαϊκό μπακαλιάρο (*Merluccius merluccius*). Ο βακαλάος της Αργεντινής μπορεί να φτάσει σε μήκος 95 cm. Το μέγιστο βάρος του φτάνει μέχρι 5 κιλά. Το χρώμα είναι ασημί με χρυσή λάμψη στην πλάτη και λευκό-ασημένιο στην κοιλιά.



Εικόνα 10: Απεικόνιση του *Merluccius hubbsi* (www.fishbase.org)

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ: απαντάται στο νοτιοδυτικό Ατλαντικό Ωκεανό, κατά μήκος των ακτών της Αργεντινής.



Εικόνα 11: Γεωγραφική κατανομή *Merluccius hubbsi* (www.fishbase.org)

***Merluccius productus* (βακαλάος του βόρειου Ειρηνικού)**

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ: Το μήκος του μπορεί να φτάσει τα 91 cm και η μέγιστη αναφερόμενη ηλικία είναι 16 χρόνια. Το χρώμα του συνήθως είναι μεταλλικό γκρί-ασημί με μαύρους ιριδισμούς ενώ η κοιλία του είναι λευκή-ασημί. Διαθέτει δυο νωτιαία πτερύγια και ένα ουραίο πτερύγιο το οποίο είναι πάντα κοίλο.



Εικόνα 12: Απεικόνιση του *Merluccius productus* (www.fishbase.org)

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ απαντάται στον Ανατολικό Ειρηνικό Ωκεανό από την περιοχή βόρεια του νησιού Vancouver μέχρι το βόρειο τμήμα του κόλπου της Καλιφόρνια.



Εικόνα 12: Γεωγραφική κατανομή του *Merluccius productus* (www.fishbase.org)

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ PLEURONECTIDAE

Περιέχει είδη πλατύψαρων ψαριών που παρουσιάζουν μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον όπως *Limanda aspera* και *Pleuronectes platessa* και τα οποία περιγράφονται παρακάτω.

Τα πλατύψαρα ψάρια λόγω του ιδιαίτερου σχήματος και του τρόπου που κινούνται στο βυθό, παρουσιάζουν μια ιδιομορφία στα μάτια, καθώς σταδιακά το δεξί έρχεται να πλησιάσει το αριστερό. Έτσι η πλευρά που κοιτάει προς τα πάνω και άρα αυτή με την οποία κινούνται είναι δεδομένη.

Limanda aspera

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ: Το κιτρινόπτερο ψάρι *Limanda aspera* είναι ένα πλατύψαρο της οικογένειας Pleuronectidae. Το μήκος τους αυξάνεται έως 49 cm στα αρσενικά, εάν και το κοινό μήκος είναι περίπου 33,5 cm. Φτάνουν σε βάρος έως 1,7kg και η μέγιστη καταγραφόμενη ηλικία είναι 26 χρόνια. Το σώμα είναι βαρύ, διαθέτει μικρό στόμα και μάτια στενά τοποθετημένα στο κεφάλι. Η πάνω πλευρά του σώματός του είναι λαδί –καφέ με μαύρα μοτίβα. Το ουραίο και τα ραχιαία πτερύγια είναι κίτρινα και είναι τοποθετημένα και στις δυο πλευρές του σώματος.



Εικόνα 13: *Limanda aspera* (www.fishbase.org)

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ: Το φυσικό τους περιβάλλον είναι τα εύκρατα νερά του Βόρειου Ειρηνικού, από την Κορέα και τη θάλασσα της Ιαπωνίας μέχρι τη δυτική ακτή του Καναδά.

Pleuronectes platessa

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ: Η χωματίδα ή καλκάνι είναι το πιο γνωστό είδος πλατύψαρου στα μέρη μας. Ανήκει στην οικογένεια Pleuronectidae. Η πλάτη και το ουραίο πτερύγιο είναι όπως στο *Limanda aspera*, διατεταγμένα σε ακραίο πτερύγιο γύρω από το σώμα. Ένα από τα χαρακτηριστικά της χωματίδας είναι οι κόκκινες κηλίδες

στην καφέ-πράσινη πλευρά των ματιών του ψαριού. Η "τυφλή" πλευρά είναι λευκή με εν μέρει με σκουρόχρωμες κηλίδες.

Το μέγιστο μήκος που μπορεί να φτάσει είναι 95 εκατοστά ,το βάρος του 7 κιλά και μπορεί να ζήσει έως περίπου 50 χρόνια. Ωστόσο, τέτοιες περιπτώσεις είναι σπάνιες. Το μέσο μήκος που φτάνει είναι 25 – 40 cm και το βάρος γύρω στα 2 – 3 κιλά. Είναι σε θέση να προσαρμόσει το χρώμα του σε αντίστοιχο με εκείνο του περιβάλλοντός του αλλά τα πορτοκαλί σημεία παραμένουν πάντα ορατά.

Για την αλιεία, αποτελεί το πιο σημαντικό πλατύψαρο. Χρησιμοποιείται νωπό και κατεψυγμένο, τρώγεται στον ατμό, βραστό, τηγανητό και στο φούρνο.



Εικόνα 14: Απεικόνιση του *Pleuronectes platessa* (www.fishbase.org)

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ: Η περιοχή εξάπλωσής τους είναι ο βορειοανατολικός Ατλαντικός, από τη Λευκή Θάλασσα έως τα νότια της Πορτογαλίας, τη Βόρεια Θάλασσα και τη δυτική Βαλτική. Αλιεύεται συχνότερα σε όλη την περιοχή του βορειοανατολικού Ατλαντικού και συγκαταλέγεται στα σημαντικότερα βρώσιμα ψάρια. Το λεπτό της κρέας είναι λευκό και τρυφερό.



Εικόνα 15: Γεωγραφική κατανομή του *Pleuronectes platessa* (www.fishbase.org)

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΨΑΡΙΩΝ

Αμέσως μετά την εξαλίευση το σώμα του ψαριού είναι ελαστικό και ευλύγιστο. Έχει λαμπερή εμφάνιση, με ζωηρά χαρακτηριστικά, μεταλλική λάμψη και ανταύγειες ίριδας. Το δέρμα είναι εύφυγρο, καλά προσκολλημένο στους μύες και χωρίς ρυτίδες. Η γλοιώδης βλέννα που τα καλύπτει είναι κανονικά επιστρωμένη, υδαρής και διαυγής και η δε οσμή είναι χαρακτηριστική και ευχάριστη. Τα λέπια είναι προσκολλημένα στο δέρμα και γυαλιστερά. Τα μάτια είναι ζωηρά, λαμπερά και ο κερατοειδής χιτώνας προεξέχει φυσιολογικά. Τα βράγχια είναι υγρά, λαμπερά, χωρίς βακτηριδιακή βλέννα, με χρώμα ρόδινο έως έντονα κόκκινο, με ευχάριστη οσμή (Τεχνολογία ψαριών και ιχθύων, Μπλούκας, 2004).

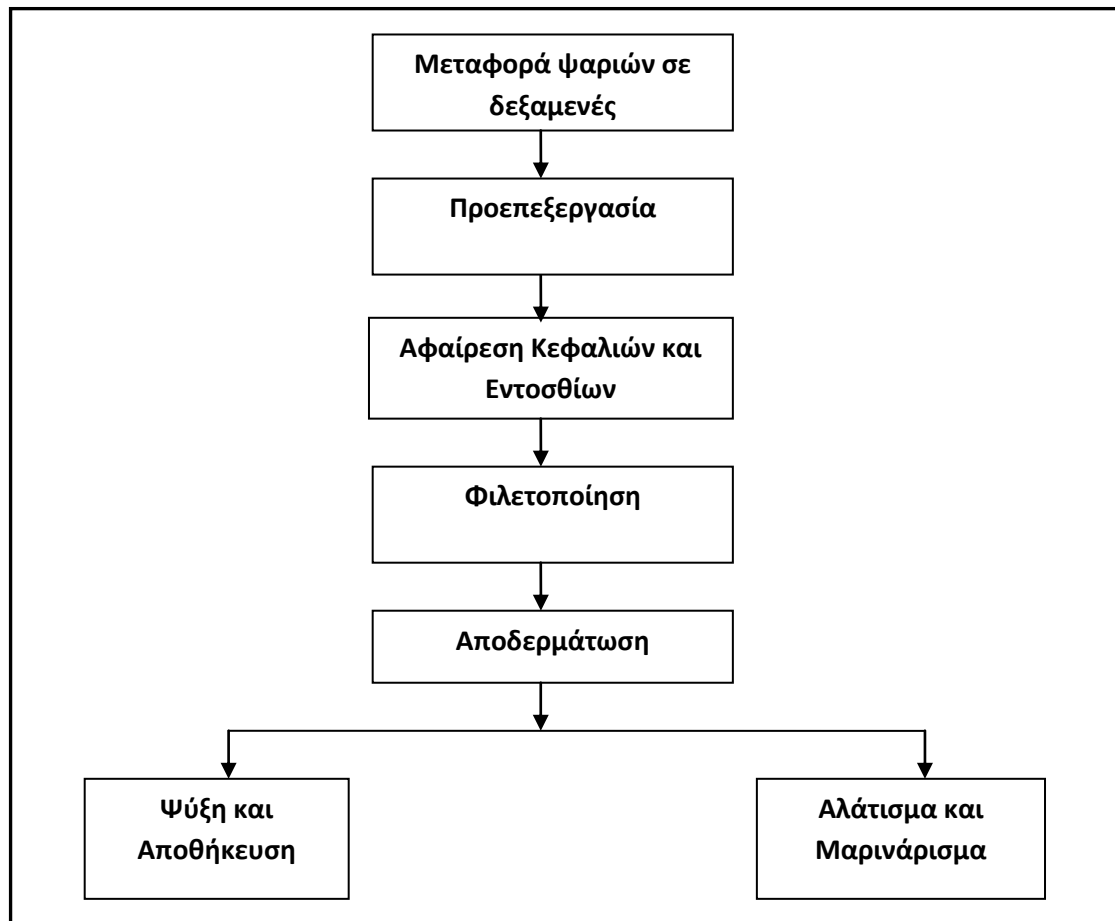
Σύντομα το σώμα του ψαριού γίνεται σκληρό και συμπαγές και διανύει τη φάση της νεκρικής ακαμψίας. Η διάρκεια του φαινομένου εξαρτάται από το είδος του ψαριού, τον τρόπο αλιείας και τη θερμοκρασία συντήρησης. Μετά το πέρας αυτού του φαινομένου οι ιστοί αρχίζουν να χαλαρώνουν, η στιλπνότητα του εξωτερικού χρωματισμού και οι ανταύγειες ίριδος εξαφανίζονται. Τα μάτια χάνουν τη λαμπρότητα τους και βυθίζονται στις οφθαλμικές κόγχες και η κόρη γίνεται θολή και αόρατη. Η γλοιώδης βλέννα που καλύπτει το σώμα γίνεται περισσότερη και θολή, ενώ το δέρμα αφυδατώνεται και η οσμή του αρχίζει και γίνεται δυσάρεστη και αμμωνιακή. Τα βράγχια γίνονται σκοτεινότερα και παρουσιάζουν επίσης άσχημη οσμή.

Διατήρηση των νωπών ψαριών

Η ενζυμική δραστηριότητα αλλά και η μικροβιακή ανάπτυξη επηρεάζονται σημαντικά από τη θερμοκρασία. Πολλά βακτήρια δεν αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 10 βαθμών, ενώ ακόμα και οι ψυχρότροφοι οργανισμοί εμφανίζουν βραδύτερο ρυθμό ανάπτυξης και παρατεταμένη φάση προσαρμογής όταν η θερμοκρασία είναι κοντά στους 0 βαθμούς.

Κατά συνέπεια η διατηρησιμότητα των νωπών ιχθυηρών αυξάνεται σημαντικά όταν αυτά υφίστανται άμεση και ταχεία ψύξη και η συντήρησή τους πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες, κατά προτίμηση στους 0 βαθμούς Κελσίου. Η αγορά για τα ψάρια και τα προϊόντα ψαριών έχει αλλάξει τα τελευταία χρόνια. Οι υπεραγορές είναι τώρα οι κύριοι αγοραστές των ψαριών και αναμένουν τις σταθερές προμήθειες. Οι φρέσκες πωλήσεις ψαριών έχουν πέσει, αλλά η ζήτηση για τα επεξεργασμένα ψάρια και τα έτοιμα γεύματα έχει αυξηθεί. Παρά αυτό, η απασχόληση στην επεξεργασία ψαριών έχει πέσει, με 60% των ψαριών που καταναλώνονται στην ΕΕ να προέρχεται από το εξωτερικό. Αυτό οφείλεται εν μέρει στη δυνατότητα να μεταφερθούν τα φρέσκα ψάρια διεθνώς.

Οι μονάδες επεξεργασίας ψαριών προμηθεύονται με τα φρέσκα αλιευμένα ψάρια και ακολουθούν τη διαδικασία που παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1: Διάγραμμα ροής των διαδικασιών παραγωγής σε μονάδα επεξεργασίας ψαριών (www.fish_cleaner_production.gr)

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Η γενετική παραλλακτικότητα είναι ένα τεράστιο θέμα το οποίο βρίσκει λύση στην εξέταση των εκάστοτε οργανισμών σε μοριακό επίπεδο, χρησιμοποιώντας τεχνικές που μας διευκολύνουν στην προσπάθεια ταυτοποίησης ατόμων, ομάδων πληθυσμών και ειδών.

Ουσιαστικά οι τεχνικές αυτές βασίζονται στην εύρεση περιοχών ή σημείων στη γενετική δομή που μπορεί να διαφέρουν μεταξύ ατόμων, πληθυσμών, φυλών και ειδών που ονομάζονται πολυμορφικοί τόποι. Για την αναγνώρισή τους χρησιμοποιούνται οι μοριακοί δείκτες οι οποίοι είναι μοριακά γενετικά εργαλεία που αφορούν τόσο το πυρηνικό όσο και το εξωπυρηνικό (μιτοχονδριακό και χλωροπλαστικό) DNA.

Συγκεκριμένα, οι μοριακοί δείκτες είναι τυχαία επιλεγμένα τμήματα του DNA χωρίς άμεση επίδραση στο φαινότυπο και δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον μια και αξιοποιούν τον πολυμορφισμό που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA χωρίς αναγκαία επίπτωση στα προϊόντα που τυχόν κωδικοποιούν. Επιπλέον, δεν εξαρτώνται από το αναπτυξιακό στάδιο του οργανισμού και δύνανται να καλύψουν ολόκληρο το γονιδίωμα σε προβλεπόμενες γενετικές αποστάσεις Χατζόπουλος, 2004).

Τα κριτήρια επιλογής μοριακών δεικτών είναι πολλά και σχετίζονται τόσο με αυτούς τους ίδιους όπως:

- η αφθονία
- ο πολυμορφισμός
- η εξειδίκευση για ορισμένο γενετικό τόπο
- τα συγκυρίαρχα αλληλόμορφα
- όσο και με τη διαδικασία παραγωγής τους.

Αναφορικά με τη διαδικασία παραγωγής τους:

- θα πρέπει να δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα
- να έχει χαμηλές απαιτήσεις σε ανθρώπινο δυναμικό και τεχνική εξειδίκευση
- να έχει μικρό κόστος εφαρμογής και ανάπτυξης,
- να απαιτεί μικρή ποσότητα DNA
- να επιδέχεται αυτοματισμούς.

Η κατηγορία των DNA δεικτών είναι πολυπληθής και αφορά γενετικούς πολυμορφικούς τύπους οι οποίοι είναι δυνατό να ανιχνευτούν με μοριακή ανάλυση. Οι δείκτες με τις περισσότερες εφαρμογές είναι τα RFLP (Restriction Fragment length Polymorphisms), τα AFLP (Ampified Fragment length Polymorphisms), τα RAPD (Randomly Amplified DNA Polymorphisms), οι μινιδουρόφοροι (minisatellites), τα SSR (Simple Sequence Repeats), τα SNP (Single

Nucleotide Polymorphisms), τα SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms) και η DNA αλληλούχιση (DNA ή PCR Sequencing).

ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΨΑΡΙΩΝ ΕΜΠΟΡΙΟΥ

Η ταυτοποίηση των ειδών ιχθύων είναι σημαντική καθώς αυξάνεται το ενδιαφέρον των καταναλωτών για την κατανάλωση ψαριών, το κρέας των οποίων είναι υψηλής ποιότητας και διατροφικής αξίας και για την καταπολέμηση της νοθείας που αφορά την πώληση κάποιων ψαριών αντί άλλων ειδών που έχουν υψηλότερη εμπορική αξία. Η νοθεία γίνεται με σκοπό το οικονομικό κέρδος λόγω της διαφορετικής εμπορικής αξίας που έχουν τα διαφορετικά είδη. Η ταυτοποίηση των ειδών είναι επίσης ζωτικής σημασίας για την πρόληψη τροφικών αλλεργιών και μπορούν να εφαρμοστούν και στη διαχείριση της αλιείας.

Οι μέθοδοι που βασίζονται σε ανάλυση πρωτεϊνών όπως η χρήση ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF) και η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2DE) παρουσιάζουν σημαντικό εργαλείο για την εξακρίβωση των ειδών όπως *Merluccius australis*, *M. Gayi*, *M. australis*, *M. hubbsi* και *M. capensis* (Pinerio et al. 1998, 2000, 2001). Ωστόσο, όλες οι μέθοδοι ανίχνευσης πρωτεϊνών που είναι κυρίως ηλεκτροφορητικές, χρωματογραφικές και ανοσολογικές είναι πολύ επίπονες και χρονοβόρες και απαιτούν ένα καλά καθορισμένο πρότυπο για σύγκριση με άγνωστο δείγματα.

Από την άλλη πλευρά, η εισαγωγή των μοριακών γενετικών μεθόδων, από την απλή τεχνική της PCR, την τεχνική PCR-RFLP καθώς και την άμεση αλληλούχιση των τμημάτων-στόχων του DNA παρέχουν σημαντικές βελτιώσεις στη διαφοροποίηση των ειδών ψαριών και παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον. Η τεχνική PCR-RFLP, η οποία αποτελείται από την PCR, που στόχος της είναι η ενίσχυση τμήματος του μιτοχondριακού γονιδίου cytochrome b που προκύπτει από πέψη με περιοριστικά ένζυμα, χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση ενός ευρέος φάσματος βακαλάων (Hold et al. 2001. Quinterio et al. 2001).

Συγκεκριμένα οι DNA δείκτες που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των περισσότερων ειδών βακαλάου γενικά βασίζονται σε επιλογή ενός τμήματος DNA, στην ενίσχυσή του μέσω PCR, και στον περαιτέρω προσδιορισμό των ειδών με βάση την ανάλυση της ακολουθίας χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους: άμεση αλληλουχία, περιορισμό και πέψη, καθώς και παρατήρηση του προϊόντος PCR σε πηκτή αγαρόζης, ακρυλαμίδης ή πολυακρυλαμίδης. Όλες αυτές οι μέθοδοι επιτρέπουν την ταυτοποίηση ειδών βακαλάου που αφορούν τον έλεγχο ή την ανίχνευση εμπορικής απάτης στα θαλασσινά. Ωστόσο, η χρήση τους δεν έχει τεθεί πλήρως σε εφαρμογή διότι στην πραγματική ζωή δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την πραγματική έκταση της απάτης των επεξεργασμένων προϊόντων βακαλάου που κυκλοφορούν στις διάφορες αγορές.

Ταυτοποίηση ειδών βακαλάου έχει ήδη πραγματοποιηθεί βάσει του πολυμορφισμού του μιτοχονδριακού γονιδίου Cytochrome b (Kocher et al, 1989) καθώς και του 5s rRNA (Perez & Garcia-Vazquez 2004). Αντίστοιχα, ο πολυμορφισμός του Cytochrome b χρησιμοποιήθηκε για τη μοριακή ταυτοποίηση ειδών ψαριών σε προϊόντα που έχουν ως βάση το σουρίμι (λευκό ψάρι, *Theragra chalcogramma*) (Carr et al. 1991)

Το mtDNA θεωρείται κατάλληλο για χρήση σε μελέτες διαχωρισμού ειδών και αυτό για τους εξής λόγους:

- Η ποσότητά του ανά κύτταρο θεωρείται υπερεπαρκής αφού απαντάται περίπου σε πολλαπλά αντίτυπα (1000 φορές περισσότερο από το πυρηνικό DNA). Κάτι τέτοιο αυξάνει την πιθανότητα επιτυχούς ενίσχυσης με την τεχνική της PCR, του επιθυμητού τμήματος του γονιδιώματος που μας ενδιαφέρει.
- Εξαιτίας της μητρικής του προέλευσης και την απουσία ανασυνδυασμού κληρονομείται απaráλλακτο από γενιά σε γενιά.
- Ο μεγάλος ρυθμός μεταλλαγής του έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση πολυμορφισμών και τη δημιουργία μεγάλης ποικιλομορφίας μεταξύ των μιτοχονδρίων, όχι μόνο μεταξύ των ειδών αλλά και ανάμεσα στο ίδιο είδος.

Τα γονίδια του mt- DNA με τη μεγαλύτερη προτίμηση σε μελέτες διαχωρισμού ειδών είναι: cyt b, 12s, 16s rRNA και το D-loop. Η επιλογή αυτών των γονιδίων στηρίζεται στη μεγάλη εξελικτική συντήρησή τους και στις επιμέρους διαφορές που παρουσιάζουν μεταξύ των ειδών.

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας είναι να εφαρμοστεί μοριακή ανάλυση σε κατεψυγμένα και επεξεργασμένα προϊόντα βακαλάου και γλώσσας ώστε να αποφευχθεί η νοθεία και η παραπλάνηση των καταναλωτών.

Οι περισσότερες από τις έρευνες σχετικά με τα επεξεργασμένα προϊόντα βακαλάου που πραγματοποιήθηκαν στο παρελθόν εφάρμοσαν την τεχνική PCR-RFLP για την ανάλυση του μιτοχονδριακού γονιδίου κυτόχρωμα β (cytochrome b) ενώ σε άλλες έρευνες χρησιμοποιήθηκε η PCR για ενίσχυση του 5s rDNA γονιδίου. Στην έρευνα που αφορούσε τα επεξεργασμένα προϊόντα με βάση το σουρίμι χρησιμοποιήθηκε η τεχνική mt-SNPs.

Στη συγκεκριμένη έρευνα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική PCR-SSCP για την ανάλυση του 16s -rRNA γονιδίου η οποία πλεονεκτεί έναντι της τεχνικής PCR-RFLP επειδή είναι πιο σύντομη και πιο οικονομική.

Επίσης, στα δείγματά μας πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση DNA (Sequencing) των προϊόντων PCR, καθώς η τεχνική SSCP δεν έδωσε σαφή αποτελέσματα για κάποια δείγματα.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 18 δείγματα επεξεργασμένων προϊόντων ψαριών εμπορίου από διαφορετικές μάρκες ευρείας κατανάλωσης (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Δείγματα προϊόντων ψαριού που χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση

	ΔΕΙΓΜΑΤΑ -ΜΑΡΚΕΣ	ΚΟΜΜΑΤΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΕ	ΑΝΑΓΡΑΦΟΜΕΝΟ ΕΙΔΟΣ
1	KALLIMANIS	ΠΑΝΑΡΙΣΜΕΝΟ ΦΙΛΕΤΟ- FISHSTICK	ΒΑΚΑΛΛΟΣ
2	ΛΑΝΑΡΑΣ	ΦΕΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΣΟΥΡΙΜΙ ΛΕΥΚΟ ΨΑΡΙ
3	ΛΑΝΑΡΑΣ	ΦΙΛΕΤΟ	MERLUCCIUS MERLUCCIUS
4	KALLIMANIS	ΦΙΛΕΤΟ	LIMANDA ASPERA
5	ΛΑΝΑΡΑΣ	ΦΙΛΕΤΟ	PLEURONECTES PLATESSA
6	ΘΑΛΑΣΣΙΟΣ ΚΟΣΜΟΣ	ΦΙΛΕΤΟ	POLLACHIUS VIRENUS
7	ΘΑΛΑΣΣΙΟΣ ΚΟΣΜΟΣ	ΦΙΛΕΤΟ	LIMANDA ASPERA
8	OCEANTRADER	ΦΙΛΕΤΟ(BREADED)	THERAGRA CHALCOGRAMMA
9	TRAWLIC	ΦΙΛΕΤΟ	THERAGRA CHALCOGRAMMA
10	ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΣ	ΓΑΔΟΣ ΦΙΛΕΤΟ	THERAGRA CHALCOGRAMMA
11	ΧΥΜΑ ΙΣΛΑΝΔΙΑΣ	ΦΙΛΕΤΟ	ΒΑΚΑΛΛΟΣ
12	IGLO	ΠΑΝΑΡΙΣΜΕΝΟ ΦΙΛΕΤΟ- FISHSTICK	THERAGRA CHALCOGRAMMA
13	ΧΥΜΑ		ΤΑΡΑΜΑΣ
14	PESCANOVA	ΠΑΝΑΡΙΣΜΕΝΟ ΦΙΛΕΤΟ- FISHSTICK	ΒΑΚΑΛΛΟΣ
15	CARREFOUR	ΠΑΝΑΡΙΣΜΕΝΟ ΦΙΛΕΤΟ- FISHSTICK	ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΣ
16	MR.GRAND	ΦΙΛΕΤΟ	LIMANDA ASPERA
17	MR.GRAND	ΦΙΛΕΤΟ	THERAGRA CHALCOGRAMMA
18	TRATA ON ICE	ΦΙΛΕΤΟ	GADUS MORHUA

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Για τη μοριακή ανάλυση του DNA καθοριστική σημασία παίζει η σωστή απομόνωση. Μια αποτελεσματική μέθοδος απομόνωσης πρέπει να είναι αποδοτική ποιοτικά και ποσοτικά και να δίνει DNA καλής ποιότητας. Για τη μελέτη των δειγμάτων μου απομονώθηκε mtDNA από τους ιστούς των δειγμάτων ,σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Asahida et al.(1996) το οποίο τροποποιήθηκε για τις ανάγκες του πειράματος.

Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν σχεδόν 50mg ιστού και ακολουθήθηκε η εξής πειραματική διαδικασία:

- 1.Τεμαχισμός του ιστού και τοποθέτησή του σε φιαλίδια erpendorf των 2ml
- 2.Προσθήκη 600 μl TNES-UREA BUFFER και 10 μl proteinase K(20 mg/ml) και έντονη ανάδευση στο vortex
- 3.Τοποθέτηση στον αναδευτήρα ώστε τα δείγματα να περιστρέφονται και μεταφορά τους στον κλίβανο για 2 ώρες στους 37°C ώστε να διαλυθούν
- 4.Εξαγωγή από τον κλίβανο και προσθήκη 350 μl φαινόλης και 350 μl χλωροφόρμιου και ανακίνηση με το χέρι
- 5.Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 10min στους 4 °C
6. Λήψη και μεταφορά του υπερκείμενου υγρού σε νέο φιαλίδιο erpendorf των 2 ml και προσθήκη 700 μl χλωροφόρμιου.
- 7.Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 3 min στους 4 °C
- 8.Λήψη και μεταφορά υπερκείμενου σε νέο erpendorf και προσθήκη 1 ml φαινόλης
- 9.Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min στους 4 °C
10. Λήψη και μεταφορά υπερκείμενου σε νέο erpendorf και προσθήκη 500 μl φαινόλης και 500 μl χλωροφορμίου-vortex
- 11.Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 5 min στους 4 °C
- 12.Λήψη και μεταφορά υπερκείμενου σε νέο erpendorf και προσθήκη 1 ml χλωροφόρμιου –vortex
- 13.Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 5 min στους 4 °C
- 14.Λήψη και μεταφορά υπερκείμενου σε νέο erpendorf και προσθήκη 1 ml ισοπροπανόλης –ανάδευση με το χέρι
- 15.Τοποθέτηση στην κατάψυξη στους -20 °C για 30 min
16. .Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 20 min στους 4 °C
- 17.Απομάκρυνση του υπερκείμενου παρατηρώντας το ίζημα να μην μετακινηθεί και το χάσουμε
- 18.Προσθήκη 1 ml αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 5 min στους 4 °C

19. Απομάκρυνση του υπερκείμενου παρατηρώντας το ίζημα να μην μετακινηθεί και το χάσουμε

20. Στέγνωμα δειγμάτων με επώαση στους 55°C

21. Προσθήκη 100ml αποστειρωμένου dd H₂O ώστε να διαλυθεί το ίζημα

22. Αποθήκευση του απομονωμένου DNA

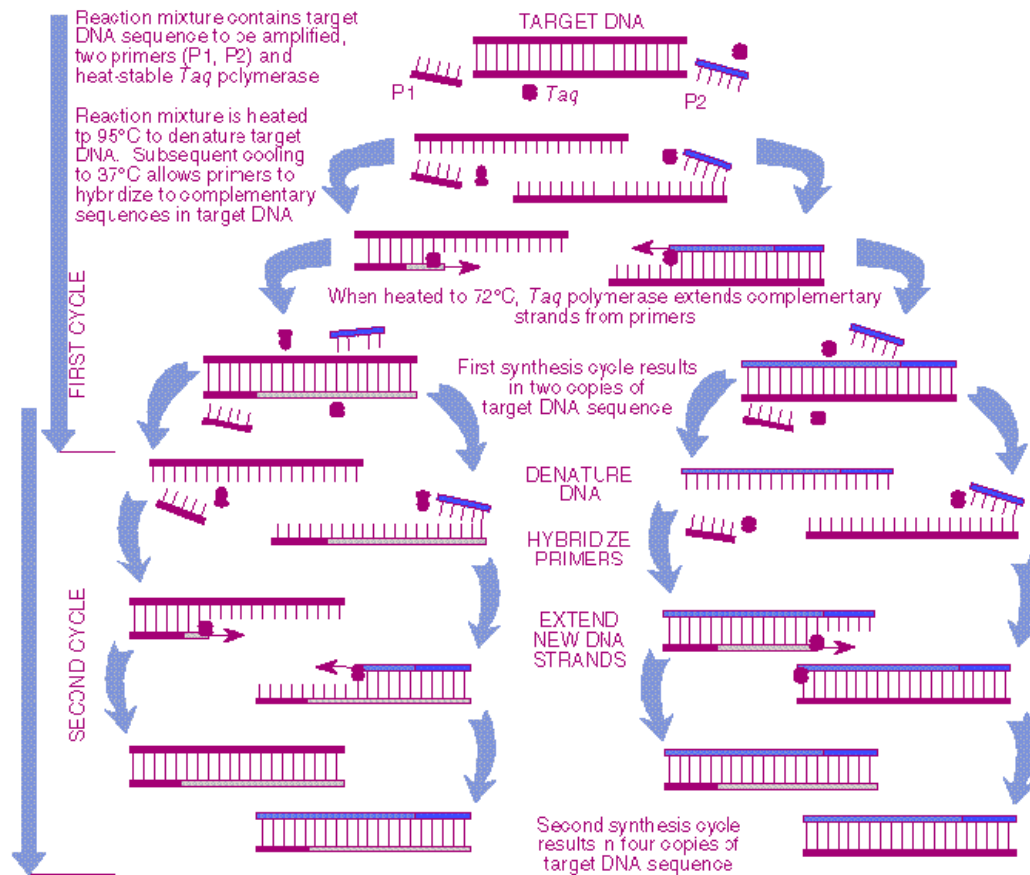
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΡΟΛΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

- TNES-urea Buffer: Το NaCl που περιέχεται σε αυτό ρυθμίζει την οσμωτική πίεση προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και ομογενοποίηση του ιστού.
- Πρωτεϊνάση K: Προκαλεί την πέψη των πρωτεϊνών
- Φαινόλη: Χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και το διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα της φαινόλης έχει pH>7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην επάνω υδάτινη φάση.
- Χλωροφόρμιο: Χρησιμοποιείται για καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω υψηλής πυκνότητας. Συμβάλλει επίσης στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της φαινόλης από την υδατική φάση.
- Αιθανόλη: Χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση του DNA καθώς είναι αδιάλυτο στο συγκεκριμένο οργανικό διαλύτη.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η PCR είναι μία in vitro μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA. Με την PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η αλληλουχία του γονιδίου (ή «θραύσματος DNA») είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων, το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινήτρες πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του θραύσματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί.

DNA Amplification Using Polymerase Chain Reaction



Source: *DNA Science*, see Fig. 13.

Εικόνα 16: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR in vitro (<http://DNA.science.com>)

Η τεχνική περιλαμβάνει την κυκλική επανάληψη τριών αντιδράσεων:

1. Αποδιάταξη του DNA (template denaturation):

Το δίκλωνο μόριο DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνες αλυσίδες σε θερμοκρασία 94-96 °C

2. Υβριδοποίηση των εκκνητήρων (primer annealing):

Οι δυο εκκνητές υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στις δυο αλυσίδες του DNA. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης εξαρτάται από το μήκος και την αλληλουχία των εκκνητών. Στην περίπτωση μας 50-65 °C.

3. Πολυμερισμός (primer extension):

Στο στάδιο αυτό γίνεται επιμήκυνση των εκκινητών με κατεύθυνση 5'-3' έχοντας ως υπόστρωμα τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση καταλύεται από την Taq DNA πολυμεράση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72 °C.

Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA. Στη πράξη 30 με 40 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA θραύσματος. Σε κάθε κύκλο που διαρκεί περίπου πέντε λεπτά η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία διαρκεί μερικές ώρες

Για τον πολλαπλασιασμό του 16S rRNA χρησιμοποιήσαμε universal primers. Οι primers αυτοί είναι σχεδιασμένοι από πολλά είδη πτηνών, θηλαστικών και ψαριών με αποτέλεσμα να μπορούν να δώσουν PCR προϊόν για πολλά διαφορετικά είδη.

Πίνακας 2α: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA, όπου Y= C ή T

<u>Εκκινητής</u>	<u>Αλληλουχία</u>
B-M.16sRNA.Fw	5'-AYA AGA CGA GAA GAC CC-3'
B-M.16sRNA.Rv	5'-GAT TGC GCT GTT ATC CC-3'

Αντιδραστήρια-Ρόλος αντιδραστηρίων

- Αποστειρωμένο νερό (dd H₂O)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer 10X), ρυθμίζει το pH ώστε να έχω τις ιδανικές συνθήκες για τη δράση του ενζύμου.
- Χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂ 50 mM), ιόντα Mg²⁺ απαραίτητα για την ενζυμική δράση
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)- απαιτούνται για τον πολυμερισμό
- Εκκινητές ,συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου (16s RNA,Fw, 16s RNA,Rv)
- Ενζυμο Taq DNA πολυμεράση, καταλύει στον πολυμερισμό. Με τη δράση της προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητή και η αλυσίδα επεκτείνεται

Πίνακας 2b: Αντιδραστήρια και αντίστοιχες ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή μίγματος που χρησιμοποιήθηκε κατά την PCR

Εκμαγείο DNA	1μl
dNTPs(10mM each)	1μl
MgCl ₂ (50mM)	2μl
Buffer 10X	5μl
Εκκινητής Fw	1μl
Εκκινητής Rv	1μl
Taq DNA polymerase 5U\μl	0,2μl
ddH ₂ O	38,8μl
Συνολικός όγκος	50μl

Πίνακας 3:Στάδια της PCR

ΣΤΑΔΙΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ C	ΧΡΟΝΟΣ
Αρχική αποδιάταξη	95oC	4min
Αποδιάταξη	95oC	40sec
Συγκόλληση Εκκινητών	53oC	50sec
Επιμήκυνση	72oC	50sec
Τελική Επιμήκυνση	72oC	10min

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Μέθοδος διαχωρισμού και ελέγχου του DNA. Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθός τους, καθώς αυτά είναι αρνητικά φορτισμένα κινούνται διαμέσου των πόρων της πηκτής υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Η τεχνική αυτήν εφαρμόστηκε τόσο για τον έλεγχο της ποιότητας της απομόνωσης όσο και για τα προϊόντα που προέκυψαν μετά την εφαρμογή της τεχνικής PCR. Στην πρώτη περίπτωση παίρνουμε πληροφορίες για την ακεραιότητα-κατακερματισμό του απομονωμένου DNA και για την ποσότητα του η οποία είναι ανάλογη της έντασης της ζώνης που εμφανίζεται.

Στην περίπτωση των προϊόντων μετά την PCR, η τεχνική μας δίνει πληροφορίες για το μέγεθος του καθώς και την καθαρότητα του DNA σε περίπτωση επιμόλυνσης όπου υπάρχουν μη επιθυμητά τμήματα DNA τα οποία ενισχύθηκαν κατά την PCR.

Αντιδραστήρια

- -Αγαρόζη(HT)
- -TAE 1X
- -Βρωμιούχο Αιθίδιο(EtBr)
- -Διάλυμα φόρτωσης (loading buffer)

✓ **TAE 50X (500ml): 121g Tris base +28,5 ml Acetic Acid+50mlEDTA**

0,5M+ddH₂O έως τελικό όγκο 500ml

✓ **LOADING BUFFER 6X (10ml):1ml Bromophenol blue 1% w/v +0,5 ml TBE**

20X+5ml Glycerol+ddH₂O έως τελικό όγκο 10ml.

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

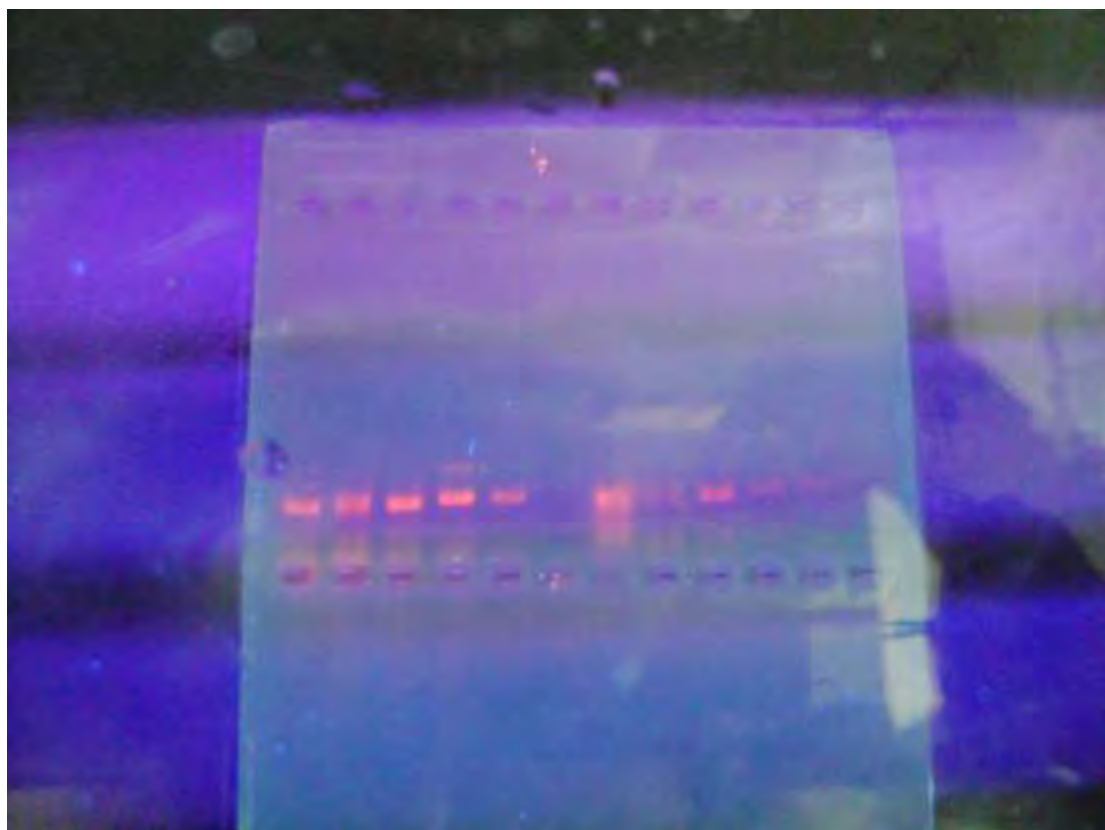
- 1.Προετοιμάζουμε το εκμαγείο (ειδικό καλούπι) στο οποίο τοποθετείται η πηκτή και τοποθετούμε τα εξαρτήματα <<χτενάκια>> που θα σχηματίσουν τις θέσεις στις οποίες θα εισαχθεί το δείγμα <<πηγάδια>>
- 2.Εντός κωνικής φιάλης των 100ml ζυγίζουμε 0,6g αγαρόζης και προσθέτουμε 40 ml διαλύματος TAE 1X
- 3.Βάζουμε το διάλυμα σε φούρνο μικροκυμάτων και ανακινούμε ανά διαστήματα ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη
- 4.Αφήνουμε το διάλυμα να κρυώσει λίγο, προσθέτουμε 4 μl βρωμιούχο αιθίδιο και το τοποθετούμε στο ειδικό καλούπι. Με τη βοήθεια πλαστικού tip απομακρύνουμε φυσαλίδες που τυχόν έχουν δημιουργηθεί
- 5.Περιμένουμε να πήξει η αγαρόζη σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα αφαιρούμε τα χτενάκια
- 6.Τοποθετούμε την πηκτή στην συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης
- 7.Γεμίζουμε την συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X ώστε να καλυφθεί πλήρως η πηκτή
- 8.Προετοιμάζουμε τα δείγματα για ηλεκτροφόρηση αναμειγνύοντας 5μl προϊόντος PCR με 3μl loading buffer

9. Τοποθετούμε <<φορτώνουμε>> τα δείγματα με μικροπιπέτα σε κάθε ένα από τα πηγάδια

10. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100volts

11. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης παρατηρούμε την πηκτή πάνω σε ειδική συσκευή με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας

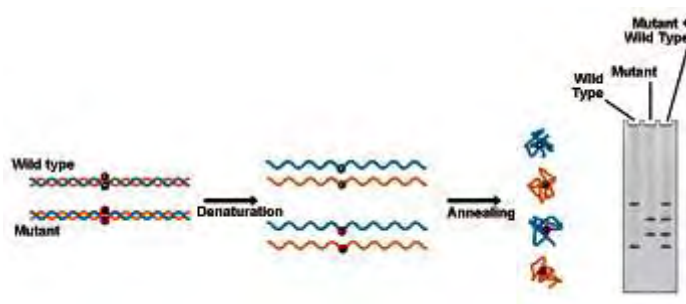
Το διάλυμα πλήρωσης περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης που εξυπηρετεί ως δείκτης παρακολούθησης της ηλεκτροφόρησης, γλυκερόλη για την καθίζηση των δειγμάτων στα πηγάδια και EDTA για την δέσμευση των κατιόντων και την παύση οποιασδήποτε ενζυμικής ενεργότητας. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες φως καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων DNA. Το TAE προσφέρει καλύτερη ανάλυση ρυθμίζοντας την ηλεκτρική αγωγιμότητα.



Εικόνα 17: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης-Παρατήρηση της πηκτής πάνω σε ειδική συσκευή με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας.

ΑΝΑΛΥΣΗ SSCP (Single strand Conformation Polymorphism)

Η μέθοδος στηρίζεται στη διαφορετική δομή και συνεπώς διαφορετική κινητικότητα σε πηκτή που λαμβάνουν μονόκλιωνα μόρια DNA που διαφέρουν μεταξύ τους έστω και μια βάση. Στην SSCP η κινητικότητα των μονόκλωνων μορίων DNA επηρεάζεται αισθητά όταν υπάρχουν αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία. Αυτό συμβαίνει λόγω της ασταθούς φύσης του μονόκλωνου DNA που απουσία του συμπληρωματικού κλώνου μπορεί να σχηματίσει ενδομοριακούς δεσμούς σχηματίζοντας αναδιπλώσεις και μια χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή. Αυτή την ιδιότητα του μονόκλωνου DNA εκμεταλλεύεται η μέθοδος SSCP (Orita M et al,1989) Τα δείγματα –προϊόντα της PCR πριν την ηλεκτροφόρησή τους υφίστανται αποδιάταξη με θέρμανση ώστε να σχηματιστούν οι μονόκλωνες αλυσίδες ενώ στη συνέχεια η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται απουσία αποδιατακτικού μέσου ώστε να επιτρέπονται μερικώς οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Έτσι, η κινητικότητα του μορίου δεν εξαρτάται μόνο από το μέγεθος του αλλά και από την τριτοταγή δομή του που με τη σειρά της καθορίζεται από την αλληλουχία του κλώνου. Μετά την ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται χρώση της πηκτής με διάλυμα νιτρικού αργύρου που έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα.



Εικόνα 17: Αρχή της μεθόδου SSCP (www.nationaldiagnostics.com)

Αντιδραστήρια

- Διπλά αποσταγμένο νερό(dd H₂O)
- Ακρυλαμίδη
- Δισ-ακρυλαμίδη
- 10X TBE

- Γλυκερόλη 50%
- Temed (tetramethylenediamine)99%
- Ammonium Persulfate (APS) 20%
- Loading Buffer(6X)(σύσταση :Bromophenol blue 1% w/v,20X TBE, Glycerol, dd H₂O)
- Αιθανόλη 100%
- Οξικό οξύ 99%
- Νιτρικός άργυρος (AgNO₃)
- Υδροξείδιο του νατρίου(NaOH)
- Βορουδρίδιο του νατρίου (NaBH₄)
- Φορμαλδεΰδη 37%

Η ανάλυση SSCP αποτελείται από 3 στάδια :

- την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR
- την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης
- την χρώση της πηκτής για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Οι ποσότητες αντιστοιχούν για τη δημιουργία μιας πηκτής.

Πίνακας 4:Συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για την Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης 10%

Πηκτή πολυακρυλαμίδης	10%
Acrylamide	6,1875g
Bis-Acrylamide	0,165g

Glycerol 50%	6,25g
TBE 10X	5ml
TEMED	62,5μl
APS 20%	300μl
H ₂ O	Εως τα 62,5 ml
Συνολικός όγκος	62,5 ml

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

1. Προετοιμάζουμε την συσκευή παρασκευής της πηκτής
2. Σε ποτήρι ζέσεως προσθέτουμε 6,1875g Acrylamide+0,165g Bis-Acrylamide+6,25g Glycerol 50%+5ml TBE 10X. Αναδεύουμε σε οριζόντιο αναδευτήρα μέχρι πλήρους διάλυσης των συστατικών.
3. Διηθούμε το διάλυμα και συμπληρώνουμε με ddH₂O έως τα 62,5 ml και μεταφέρουμε το διάλυμα σε κωνική φιάλη
4. Προσθέτουμε 62,5μl TEMED και 300μl APS 20% και περιχύνουμε το διάλυμα στη συσκευή παρασκευής της πηκτής.
5. Τοποθετούμε τη χτένα για τη δημιουργία των πηγαδιών και περιμένουμε 45min ώστε να είναι έτοιμη η πηκτική για ηλεκτροφόρηση
6. Ετοιμάζουμε τα δείγματα για αποδιάταξη βάζοντας στα erppendorf 5μl από το προϊόν της PCR και 10μl αποδιατακτικού διαλύματος (95% φορμαμίδιο 0,05% v/v μπλέ της βρωμοφαινόλης, 0,05% v/v κυανό του ξυλενίου, 10mM NAOH)
7. Πραγματοποιείται αποδιάταξη. Τα δείγματα επωάζονται για 2min στους 92C, 2min στους 95C και 7min στους 97C.
8. Μετά την εξαγωγή τους από τον θερμοκυκλοποιητή (cyclogene) τα δείγματα τοποθετούνται απευθείας στον πάγο

9.Φορτώνουμε τα δείγματα στα πηγάδια και πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση στα 220 volts για 18-20 ώρες

Χρώση πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (silver staining)

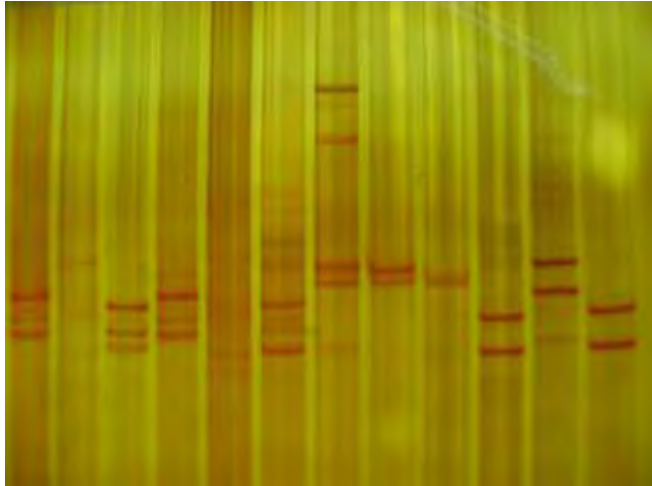
Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων γίνεται χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και αντιδρά με τη φορμαλδεύδη παρουσία βάσης. Οι ζώνες του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούμε είναι τα εξής :

Διάλυμα 1	-ΕΤΟΗ 8 ml -Acetic acid 0,5ml -ddH ₂ O έως τα 400ml
Διάλυμα 2	-δ/μα AgNO ₃ 1g/lit
Διάλυμα 3	-ΝΑΟΗ 3g -ΝαΒΗ ₄ 0,01g -Formaldehyde 1ml -ddH ₂ O έως τα 200ml

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής :

- 1.Εμβαπτίζουμε την πηκτή σε 200ml δ/τος 1 για 3min
- 2.Απομακρύνουμε το διάλυμα με αναρρόφηση
- 3.Επαναλαμβάνουμε τα στάδια 1,2
- 4.Ξεπλένουμε μια φορά με ddH₂O για 1min και απομακρύνουμε το νερό
- 5.Προσθέτουμε το διάλυμα 2 για 15 min
- 6.Απομακρύνουμε το διάλυμα και ξεπλένουμε 2 φορές με ddH₂O για 1min
- 7.Απομακρύνουμε το νερό και προσθέτουμε το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στις πηκτές



Εικόνα 18: Παρατήρηση ορατών ζωνών στην πηκτή πολυακρυλαμίδης

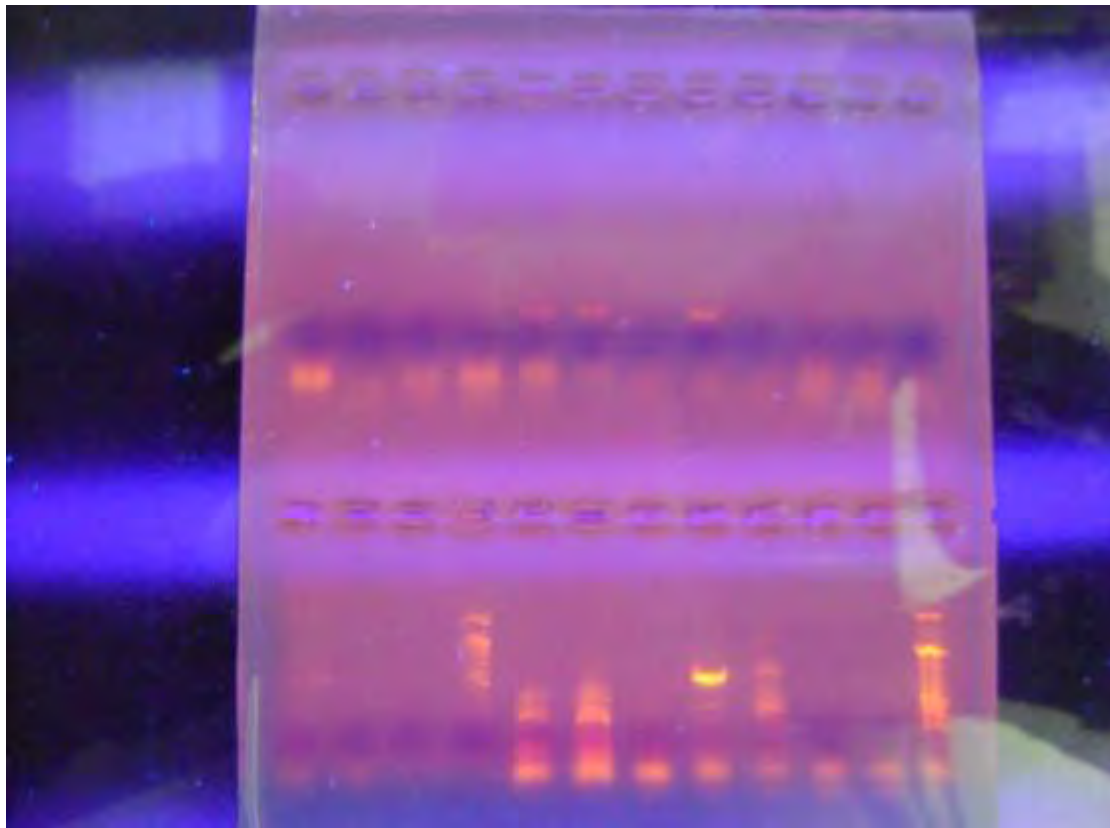
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

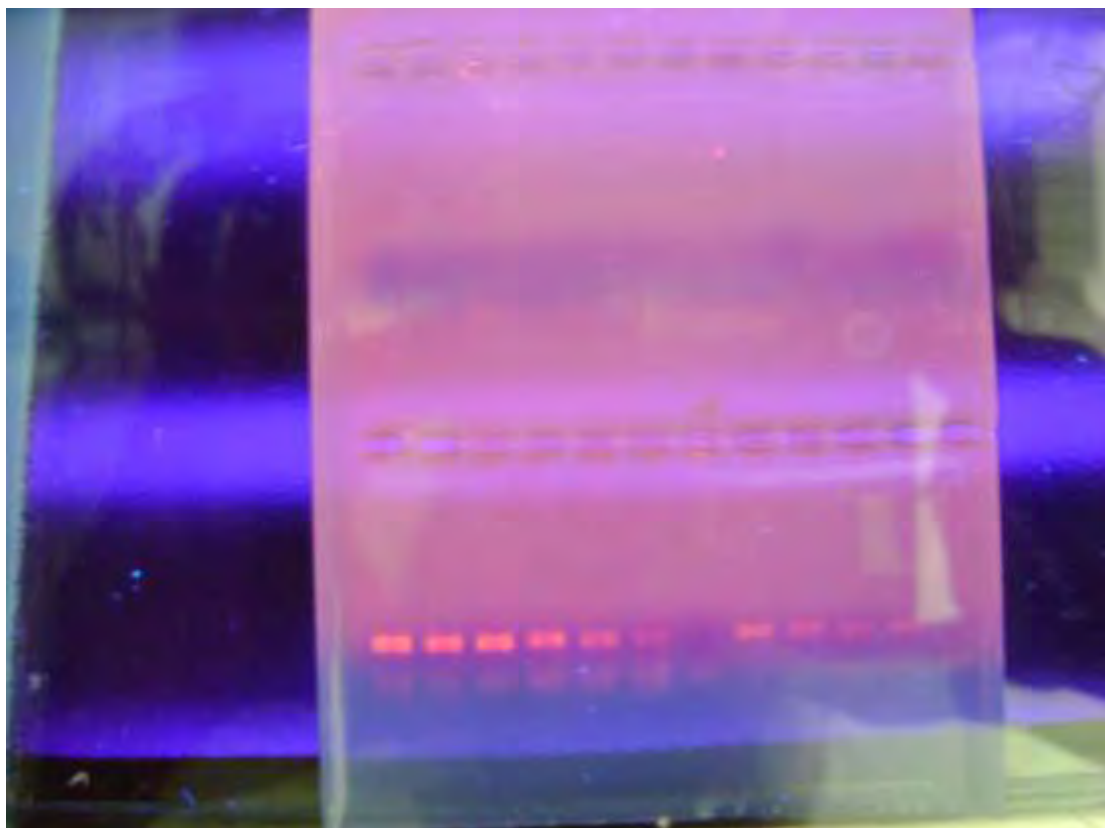
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δείγματα προϊόντων ψαριού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν όλα κατεψυγμένα και προέρχονται από σούπερ μάρκετ της Λάρισας. Ο Πίνακας 1 (Υλικά και Μέθοδοι) παρουσιάζει αναλυτικά τα 18 επεξεργασμένα προϊόντα ψαριού που αναλύθηκαν καθώς και το είδος που αναγράφονταν στις ετικέτες.

Το DNA που απομονώθηκε δεν ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητικό ποιοτικά και ποσοτικά και αυτό διότι τα δείγματά μας είχαν υποστεί επεξεργασία, η οποία αλλοιώνει το DNA και στην παρουσία αναστολέων της PCR. Έτσι στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης οι ζώνες δεν ήταν έντονες εξαιτίας του κατακερματισμού του DNA (Εικ. 19).



Εικόνα 19: Ενδεικτική απεικόνιση σε πηκτή αгарόζης του DNA που απομονώθηκε από προϊόντα βακαλάου και πλατύψαρου



Εικόνα 20: Απεικόνιση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης του DNA που απομονώθηκε από επεξεργασμένα προϊόντα βακαλάου-DNA καλύτερης ποιότητας

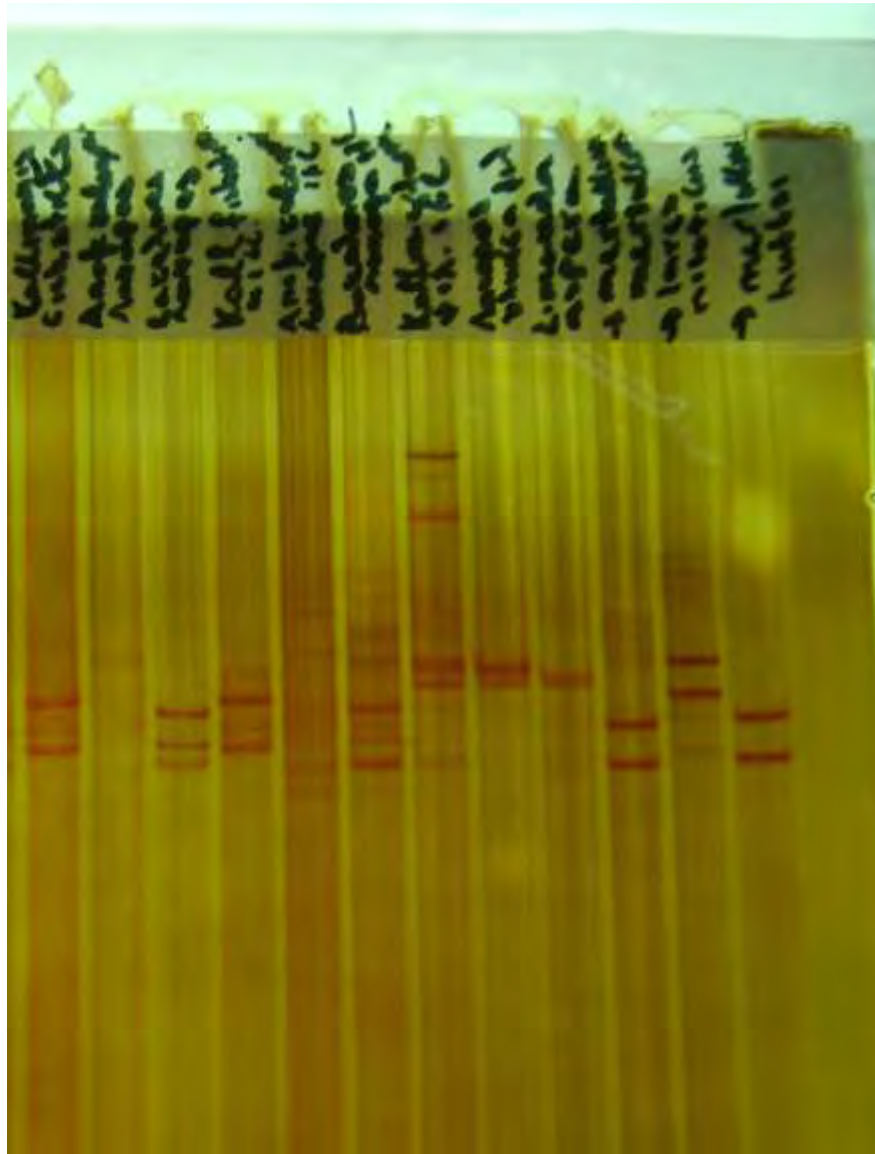
Στη συνέχεια εφαρμόστηκε PCR με την οποία πολλαπλασιάστηκε τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA (Εικ. 20).

Ακολούθησε ανάλυση SSCP για να ταυτοποιηθούν τα είδη στα οποία ανήκουν τα δείγματά μας (Εικ. 21-23).

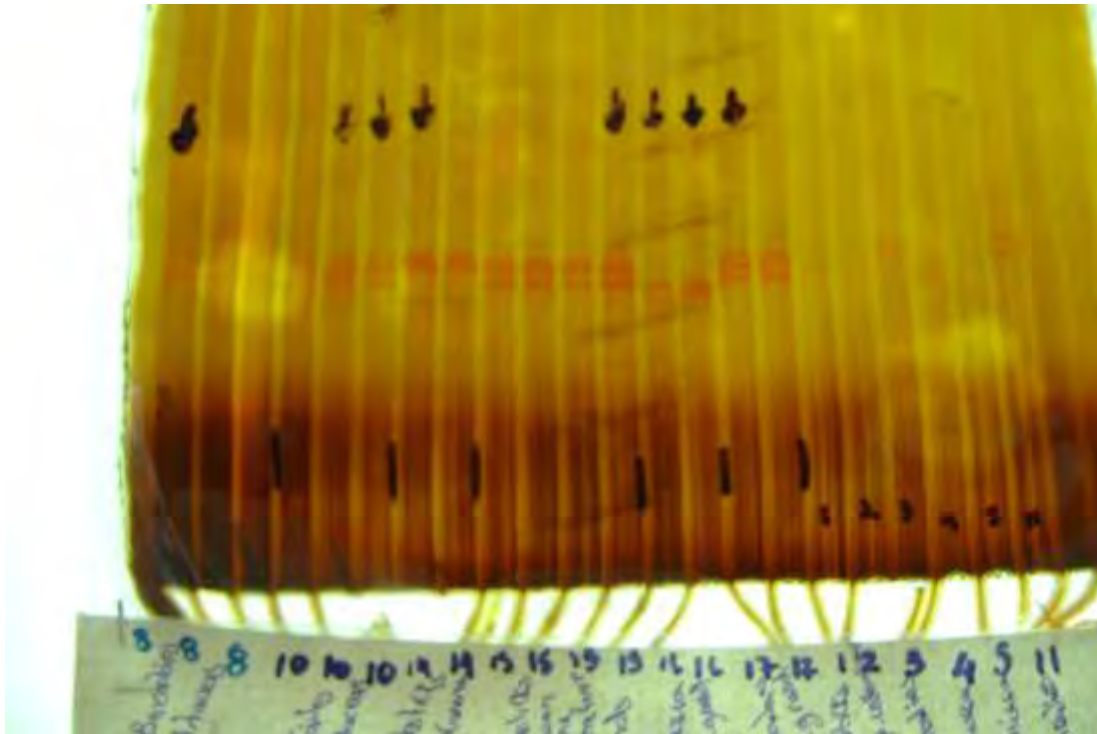
Μελετήθηκαν 3 διαφορετικά τεμάχια των δειγμάτων 8 και 10 αντίστοιχα, 2 διαφορετικά τεμάχια των δειγμάτων 14, 16 και 17 και 4 διαφορετικά τεμάχια του δείγματος 15.

Και στα 18 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη, έγινε αλληλούχιση DNA (sequencing) των προϊόντων PCR καθώς η τεχνική SSCP δεν έδωσε σαφή αποτελέσματα. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε σε κέντρο διαγνωστικής Ιατρικής-Μοριακής βιολογίας-Γενετικής- Βιοτεχνολογίας.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Bioedit και έπειτα μέσω Nucleotide BLAST ώστε να προσδιορίσουμε σε ποιο είδος ανήκει η αλληλουχία που επεξεργαστήκαμε (Εικ.24).



Εικόνα 21:Ανάλυση SSCP ενδεικτικά στα 12 πρώτα δείγματά μας. Η αρίθμηση είναι από 1-12 από αριστερά προς τα δεξιά και αντιστοιχεί στην αρίθμηση των 12 πρώτων δειγμάτων του Πίνακα 1.



Εικόνα 22:Ανάλυση SSCP στα δείγματα 8,10,14,15,16,17 του πίνακα 1.

	10	20	30	40	50	60
ΔΕΙΓΜΑ 1_KALLIMANIS FISHSTIC
ΔΕΙΓΜΑ 2-ΛΑΝΑΡΑΣ ΕΟΥΡΙΜΙ ΨΑΡΙ	-----C	CGCGGGTAA	AACACAACCC	CCATGTGGAC	CGGGGATATT	
ΔΕΙΓΜΑ 3_ΛΑΝΑΡΑΣ Μ.ΜΕΡΛΟΥΚ	GTGTCTTTGG	TTGGGGCGAC	CGCGGAGTAA	AACACAACCT	CCATGTGGAC	GGGGATACT
ΔΕΙΓΜΑ 5-ΛΑΝΑΡΑΣ ΓΛΩΣΣΑ ΦΙΛΕΤΟ	-----AA	GACCCATGG	AGCTTTAGAC	ACACAGGTGG	CCCATGTCAA	
ΔΕΙΓΜΑ 6-Θ.Κ ΒΑΚΑΛΑΟΣ ΦΙΛΕΤΟ	-----GAGAAGAC	CCTATGG	A	GCTTTAGACC	TAAAGTAAGT	CACGTTTAAAC
ΔΕΙΓΜΑ 7-Θ.Κ -LIMANDA ASPERA	-----TATGG	AGCTTTAGAC	ACACAGGTGG	CCCATGTCAA		
ΔΕΙΓΜΑ 8_OCEANTR.THER.CHALCOGR	-----AAG	ACGAGAAGAC	CCTATGG	A	GCTTTAGACC	TAAAGTAAGT
ΔΕΙΓΜΑ 8b-OCEANTR.THER.CHA	-----GG	A	GCTTTAGACC	TAAAGTAAGT	CACGTTTAAAC	
ΔΕΙΓΜΑ 9_TRAWLIC THER.CHALCOGR	-----GAGAAGAC	CCTATGG	A	GCTTTAGACC	TAAAGTAAGT	CACGTTTAAAC
ΔΕΙΓΜΑ 10_ΓΑΔΟΣ ΑΛΑΕΚΑΣ THERAG	-----AAG	ACGAGAAGAC	CCTATGG	A	GCTTTAGACC	TAAAGTAAGT
ΔΕΙΓΜΑ 10a_ΓΑΔΟΣ ΑΛΑΕΚΑΣ THERAG	-----AAG	ACGAGAAGAC	CCTATGG	A	GCTTTAGACC	TAAAGTAAGT
ΔΕΙΓΜΑ 10b_ΓΑΔΟΣ ΑΛΑΕΚΑΣ THERAG	-----AAG	ACGAGAAGAC	CCTATGG	A	GCTTTAGACC	TAAAGTAAGT
ΔΕΙΓΜΑ 11_ΦΙΛΕΤΟ ΒΑΚΑΛΑΟΥ ΞΕΛΑ	-----AAG	ACGAGAAGAC	CCTATGG	A	GCTTTAGACC	TAAAGTAAGT
ΔΕΙΓΜΑ 12_FISHSTICKS IGLO T.CH	-----AAG	ACGAGAAGAC	CCTATGG	A	GCTTTAGACC	TAAAGTAAGT
ΔΕΙΓΜΑ 13_TAPAMAE	-----AAG	ACGAGAAGAC	CCTGTGG	A	GCTTTAGACC	TAAAGTAAAC
ΔΕΙΓΜΑ 14_FISHSTICKS_PESCA	-----GAGAAGAC	CCTATGG	A	GCTTTAGACC	TAAAGTAAGT	CACGTTTAAAC
ΔΕΙΓΜΑ 15_FISHSTICKS_POISS	-----AAGACGAGAA	GACCCATGG	AGCTTTAGAC	ACACAGGTGG	CCCATGTCAA	
ΔΕΙΓΜΑ 16a-M.GRAND LIM.ASPERA	-----CGAGAA	GACCCATGG	AGCTTTAGAC	ACACAGGTGG	CCCATGTCAA	
ΔΕΙΓΜΑ 16b-M.GRAND LIM.ASPERA	-----ACGAGAAGAC	CCTATGG	A	GCTTTAGACC	TAAAGTAAGT	CACGTTTAAAC
ΔΕΙΓΜΑ 17_M.GRAND T.CHALCOGRAMMA	-----AAG	ACGAGAAGAC	CCTATGG	A	GCTTTAGACC	TAAAGTAAGT
ΔΕΙΓΜΑ 18_TPATATA G.MORHUA	-----AAG	ACGAGAAGAC	CCTATGG	A	GCTTTAGACC	TAAAGTAAGT
	70	80	90	100	110	120
ΔΕΙΓΜΑ 1_KALLIMANIS FISHSTIC	ATCCCTAATA	CTCAGAGCCT	CTACTCCAAG	TAAACAGAAAT	TCTGACCTTT	CT.A.CC..T
ΔΕΙΓΜΑ 2-ΛΑΝΑΡΑΣ ΕΟΥΡΙΜΙ ΨΑΡΙ	-----T	TCGGTTGGG				
ΔΕΙΓΜΑ 3_ΛΑΝΑΡΑΣ Μ.ΜΕΡΛΟΥΚ	ATCCCTAAAA	CTCAGAGCCT	CCACTCCAAG	CAACAGAAAT	TCTGACCTCA	CT.A.CC..T

ΔΕΙΓΜΑ 5-ΛΑΝΑΡΑΣ ΓΛΩΣΣΑ ΦΙΛΕΤΟ ATACCCTCCG CTAAGGGCCT GAACTAAGTG --GACCTGC CTTGATGTC.-
 ΔΕΙΓΜΑ 6-Θ.Κ ΒΑΚΑΛΑΟΣ ΦΙΛΕΤΟ ATGC-TAAAA T-AACAGAAA AAACCTTAGTG --ATATTTAC TGAAGTGTTC. T.....-
 ΔΕΙΓΜΑ 7-Θ.Κ -LIMANDA ASPERA ATACCCTCCG CTAAGGGCCT GAACTAAGTG --GACCTGC CTTGATGTC.-
 ΔΕΙΓΜΑ 8 OCEANTR.THER.CHALCOGR ATGC-TAAAA T-AACAGAAA AAACCTTAGTG --ATATTTAC TGAAGTGTTC. T.....-
 ΔΕΙΓΜΑ 8b-OCEANTR.THER.CHA ATGC-TAAAA T-AACAGAAA AAACCTTAGTG --ATATTTAC TGAAGTGTTC. T.....-
 ΔΕΙΓΜΑ 9 TRAWLIC THER.CHALCOGR ATGC-TAAAA T-AACAGAAA AAACCTTAGTG --ATATTTAC TGAAGTGTTC. T.....-
 ΔΕΙΓΜΑ 10 ΓΑΔΟΣ ΑΛΑΕΚΑΣ THERAG ATGC-TAAAA T-AACAGAAA AAACCTTAGTG --ATATTTAC TGAAGTGTTC. T.....-
 ΔΕΙΓΜΑ 10a ΓΑΔΟΣ ΑΛΑΕΚΑΣ THERAG ATGC-TAAAA T-AACAGAAA AAACCTTAGTG --ATATTTAC TGAAGTGTTC. T.....-
 ΔΕΙΓΜΑ 10b ΓΑΔΟΣ ΑΛΑΕΚΑΣ THERAG ATGC-TAAAA T-AACAGAAA AAACCTTAGTG --ATATTTAC TGAAGTGTTC. T.....-
 ΔΕΙΓΜΑ 11 ΦΙΛΕΤΟ ΒΑΚΑΛΑΟΥ ΙΣΛΑ -----TGA T-AACAGTAA AAACCTTAGTG --ATATTTAC TGAAGTGTTC. T.....-
 ΔΕΙΓΜΑ 12 FISHSTICKS IGLO T.CH ATGC-TAAAA T-AACAGAAA AAACCTTAGTG --ATATTTAC TGAAGTGTTC. T.....-
 ΔΕΙΓΜΑ 13 ΤΑΡΑΜΑΣ -----TGA T-AACAGTAA AAACCTTAGTG --ATATTTAC TGAAGTGTTC. T.....-
 ΔΕΙΓΜΑ 14 FISHSTICKS PESCA GTAC-TAGAA TTAATAGCAA AAACCTTAGTG G-ACATTTAT TTAAGTGTTC. T.....-
 ΔΕΙΓΜΑ 15 FISHSTICKS_POISS ATGC-TAGAA T-AACAGTAA AAACCTTAGTG --ATATTTAC TGAAGTGTTC. T.....-
 ΔΕΙΓΜΑ 16a-M.GRAND LIM.ASPERA ATACCCTCCG CTAAGGGCCT GAACTAAGTG --GAGCCTGC CTTGATGTC.-
 ΔΕΙΓΜΑ 16b-M.GRAND LIM.ASPERA ATACCCTCCG CTAAGGGCCT GAACTAAGTG --GAGCCTGC CTTGATGTC.-
 ΔΕΙΓΜΑ 17 M.GRAND T.CHALCOGRAMMA ATGC-TAAAA T-AACAGAAA AAACCTTAGTG --ATATTTAC TGAAGTGTTC. T.....-
 ΔΕΙΓΜΑ 18 ΤΡΑΤΑ G.MORHUA ATGC-TGTGA T-AACAGTAA AAACCTTAGTG --ATATTTAC TGAAGTGTTC. T.....-

130 140 150 160 170 180
 ΔΕΙΓΜΑ 1 KALLIMANIS FISHSTIC ATA..G..C AACG.AC.G-.GTTA..CTA G...T-AAC. .TT.T... ..-
 ΔΕΙΓΜΑ 2-ΛΑΝΑΡΑΣ ΕΟΥΠΙΜΙ ΨΑΠΙ GCGACC-ATG GGGAAATACAA AACCCCCACG TGGAGGGGA GCAC-ACCC TAAGTTACTT
 ΔΕΙΓΜΑ 3 ΛΑΝΑΡΑΣ M.MERLUCC A.AG..G..T AACG.AC.C-.GTTA..C.A G...T-AAC. .G.A.T.A-----
 ΔΕΙΓΜΑ 5-ΛΑΝΑΡΑΣ ΓΛΩΣΣΑ ΦΙΛΕΤΟ
 ΔΕΙΓΜΑ 6-Θ.Κ ΒΑΚΑΛΑΟΣ ΦΙΛΕΤΟGCG. .T..A..CT.CC..G AT.TT.T... ..-
 ΔΕΙΓΜΑ 7-Θ.Κ -LIMANDA ASPERA
 ΔΕΙΓΜΑ 8 OCEANTR.THER.CHALCOGRGCG. .T..A..CT.CC..G AT.TT.T... ..-
 ΔΕΙΓΜΑ 8b-OCEANTR.THER.CHAGCG. .T..A..CT.CC..G AT.TT.T... ..-
 ΔΕΙΓΜΑ 9 TRAWLIC THER.CHALCOGRGCG. .T..A..CT.CC..G AT.TT.T... ..-
 ΔΕΙΓΜΑ 10 ΓΑΔΟΣ ΑΛΑΕΚΑΣ THERAGGCG. .T..A..CT.CC..G AT.TT.T... ..-
 ΔΕΙΓΜΑ 10a ΓΑΔΟΣ ΑΛΑΕΚΑΣ THERAGGCG. .T..A..CT.CC..G AT.TT.T... ..-
 ΔΕΙΓΜΑ 10b ΓΑΔΟΣ ΑΛΑΕΚΑΣ THERAGGCG. .T..A..CT.CC..G AT.TT.T... ..-
 ΔΕΙΓΜΑ 11 ΦΙΛΕΤΟ ΒΑΚΑΛΑΟΥ ΙΣΛΑGCG. .T..A..CT.CC..G AT.TT.T... ..-
 ΔΕΙΓΜΑ 12 FISHSTICKS IGLO T.CHGCG. .T..A..CT.CC..G AT.TT.T... ..-
 ΔΕΙΓΜΑ 13 ΤΑΡΑΜΑΣGCG. .T..A..CT.CC..G AT.TT.T... ..-
 ΔΕΙΓΜΑ 14 FISHSTICKS PESCAGCG. A.T..A..TT..T.C-.G AT..TTT... ..-A..
 ΔΕΙΓΜΑ 15 FISHSTICKS_POISSGCG. .T..A..CT.CC..G AT.TT.T... ..-
 ΔΕΙΓΜΑ 16a-M.GRAND LIM.ASPERA
 ΔΕΙΓΜΑ 16b-M.GRAND LIM.ASPERA
 ΔΕΙΓΜΑ 17 M.GRAND T.CHALCOGRAMMAGCG. .T..A..CT.CC..G AT.TT.T... ..-
 ΔΕΙΓΜΑ 18 ΤΡΑΤΑ G.MORHUAGCG. .T..A..CT.CC..G AT.TT.T... ..-

190 200 210 220 230 240
 ΔΕΙΓΜΑ 1 KALLIMANIS FISHSTICCT.TA..C .GT.A.....TT TTC.....
 ΔΕΙΓΜΑ 2-ΛΑΝΑΡΑΣ ΕΟΥΠΙΜΙ ΨΑΠΙ CTTCTCCCG AAGCCAGAGC AACGGCTCTA ACCAGCAGAA ATTCTGACCA AAATGATCCG
 ΔΕΙΓΜΑ 3 ΛΑΝΑΡΑΣ M.MERLUCC
 ΔΕΙΓΜΑ 5-ΛΑΝΑΡΑΣ ΓΛΩΣΣΑ ΦΙΛΕΤΟ
 ΔΕΙΓΜΑ 6-Θ.Κ ΒΑΚΑΛΑΟΣ ΦΙΛΕΤΟCT.TA..C .GT.A.....TT TTC.....
 ΔΕΙΓΜΑ 7-Θ.Κ -LIMANDA ASPERA
 ΔΕΙΓΜΑ 8 OCEANTR.THER.CHALCOGRCT.TA..C .GT.A.....TT TTC.....
 ΔΕΙΓΜΑ 8b-OCEANTR.THER.CHACT.TA..C .GT.A.....TT TTC.....
 ΔΕΙΓΜΑ 9 TRAWLIC THER.CHALCOGRCT.TA..C .GT.A.....TT TTC.....
 ΔΕΙΓΜΑ 10 ΓΑΔΟΣ ΑΛΑΕΚΑΣ THERAGCT.TA..C .GT.A.....TT TTC.....
 ΔΕΙΓΜΑ 10a ΓΑΔΟΣ ΑΛΑΕΚΑΣ THERAGCT.TA..C .GT.A.....TT TTC.....
 ΔΕΙΓΜΑ 10b ΓΑΔΟΣ ΑΛΑΕΚΑΣ THERAGCT.TA..C .GT.A.....TT TTC.....
 ΔΕΙΓΜΑ 11 ΦΙΛΕΤΟ ΒΑΚΑΛΑΟΥ ΙΣΛΑCT.TA..C .GT.A.....TT TTC.....
 ΔΕΙΓΜΑ 12 FISHSTICKS IGLO T.CHCT.TA..C .GT.A.....TT TTC.....
 ΔΕΙΓΜΑ 13 ΤΑΡΑΜΑΣCT.TA..C .GT.A.....TT TTC.....
 ΔΕΙΓΜΑ 14 FISHSTICKS PESCACT.CA..C .G..A.....T T.C.....
 ΔΕΙΓΜΑ 15 FISHSTICKS_POISSCT.TA..C .GT.A.....TT TTC.....
 ΔΕΙΓΜΑ 16a-M.GRAND LIM.ASPERA
 ΔΕΙΓΜΑ 16b-M.GRAND LIM.ASPERA
 ΔΕΙΓΜΑ 17 M.GRAND T.CHALCOGRAMMACT.TA..C .GT.A.....TT TTC.....
 ΔΕΙΓΜΑ 18 ΤΡΑΤΑ G.MORHUACT.TA..C .GT.A.....TT TTC.....

```

                250           260           270           280
ΔΕΙΓΜΑ 1 KALLIMANIS FISHSTIC   ...|...|...|...|...|...|...|...|...
ΔΕΙΓΜΑ 2-ΛΑΝΑΡΑΣ ΕΟΥΠΙΜΙ ΨΑΡΙ G...TA...G...
ΔΕΙΓΜΑ 3 ΛΑΝΑΡΑΣ M.MERLUCC    G...TA...T...A...G...G...G...G...G...
ΔΕΙΓΜΑ 5-ΛΑΝΑΡΑΣ ΓΛΩΣΣΑ ΦΙΛΕΤΟ ...|...|...|...|...|...|...|...|...
ΔΕΙΓΜΑ 6-Θ.Κ ΒΑΚΑΛΑΟΣ ΦΙΛΕΤΟ ...TA...G...
ΔΕΙΓΜΑ 7-Θ.Κ -LIMANDA ASPERA  ...|...|...|...|...|...|...|...|...
ΔΕΙΓΜΑ 8 OCEANTR.THER.CHALCOGR ...TA...G...
ΔΕΙΓΜΑ 8b OCEANTR.THER.CHALCOG ...TA...G...
ΔΕΙΓΜΑ 9 TRAWLIC THER.CHALCOGR ...TA...G...
ΔΕΙΓΜΑ 10 ΓΑΔΟΣ ΑΛΛΕΚΑΣ THERAG ...TA...G...
ΔΕΙΓΜΑ 10a ΓΑΔΟΣ ΑΛΛΕΚΑΣ THERAG ...TA...G...
ΔΕΙΓΜΑ 10b ΓΑΔΟΣ ΑΛΛΕΚΑΣ THERAG ...TA...G...
ΔΕΙΓΜΑ 11 ΦΙΛΕΤΟ ΒΑΚΑΛΑΟΥ ΙΣΛΑ ...TA...G...
ΔΕΙΓΜΑ 12 FISHSTICKS IGLO T.CH ...TA...G...
ΔΕΙΓΜΑ 13 ΤΑΡΑΜΑΣ
ΔΕΙΓΜΑ 14 FISHSTICKS_PESCA     ...CA...T...C...C...
ΔΕΙΓΜΑ 15 FISHSTICKS_POISS    ...TA...G...
ΔΕΙΓΜΑ 16a-M.GRAND LIM.ASPERA  ...|...|...|...|...|...|...|...|...
ΔΕΙΓΜΑ 16b-M.GRAND LIM.ASPERA  ...|...|...|...|...|...|...|...|...
ΔΕΙΓΜΑ 17 M.GRAND T.CHALCOGRAMMA ...TA...G...
ΔΕΙΓΜΑ 18 ΤΡΑΤΑ G.MORHUA      ...TA...G...

```

Εικόνα 23. MULTIPLE ALIGNMENT ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

Πίνακας 6: Επεξεργασμένα προϊόντα ψαριών εμπορίου που αναλύθηκαν, χώρα προέλευσής τους καθώς και αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από την ανάλυση τους

	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΤΥΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΑΝΑΓΡΑΦΟΜΕΝΟ ΕΙΔΟΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	ΑΝΑΓΡΑΦΟΜΕΝΗ ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ-ΚΩΔΙΚΟΣ FAO
1	KALLIMANIS	ΠΑΝΑΡΙΣΜΕΝΟ ΦΙΛΕΤΟ-FISHSTICK	ΒΑΚΑΛΑΟΣ	THERAGRA CHALCOGRAMMA	ΒΟΡΕΙΟΔΥΤΙΚΟΣ ΕΙΡΗΝΙΚΟΣ ΩΚΕΑΝΟΣ (FAO ZONE: 61)
2	ΛΑΝΑΡΑΣ	ΦΕΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΣΟΥΡΙΜΙ ΛΕΥΚΟ ΨΑΡΙ	LIMANDA ASPERA	ΑΥΣΤΡΙΑ
3	ΛΑΝΑΡΑΣ	ΦΙΛΕΤΟ	MERLUCCIOUS MERLUCCIOUS	MERLUCCIOUS HUBBSI	ΝΟΤΙΟΔΥΤΙΚΟΣ ΑΤΛΑΝΤΙΚΟΣ ΩΚΕΑΝΟΣ (FAO ZONE: 41) - ΑΡΓΕΝΤΙΝΗ
4	KALLIMANIS	ΦΙΛΕΤΟ	LIMANDA ASPERA		ΒΟΡΕΙΟΔΥΤΙΚΟΣ ΕΙΡΗΝΙΚΟΣ ΩΚΕΑΝΟΣ (FAO ZONE:61) Η ΒΟΡΕΙΟΑΝΑΤΟΛΙΚΟΣ ΕΙΡΗΝΙΚΟΣ ΩΚΕΑΝΟΣ (FAO ZONE: 67)
5	ΛΑΝΑΡΑΣ	ΦΙΛΕΤΟ	PLEURONECTES PLATESSA	LIMANDA ASPERA	ΒΟΡΕΙΟΑΝΑΤΟΛΙΚΟΣ ΑΤΛΑΝΤΙΚΟΣ ΩΚΕΑΝΟΣ (FAO ZONE 27)-ΟΛΛΑΝΔΙΑ
6	ΘΑΛΑΣΣΙΟΣ ΚΟΣΜΟΣ	ΦΙΛΕΤΟ	POLLACHIUS VIRENS	THERAGRA CHALCOGRAMMA	ΒΟΡΕΙΟΔΥΤΙΚΟΣ ΕΙΡΗΝΙΚΟΣ ΩΚΕΑΝΟΣ (FAO ZONE 61)
7	ΘΑΛΑΣΣΙΟΣ ΚΟΣΜΟΣ	ΦΙΛΕΤΟ	LIMANDA ASPERA	LIMANDA ASPERA	
8	OCEANTRADER	ΦΙΛΕΤΟ (BREADED)	THERAGRA CHALCOGRAMMA	THERAGRA CHALCOGRAMMA	ΒΟΡΕΙΟΔΥΤΙΚΟΣ ΕΙΡΗΝΙΚΟΣ ΩΚΕΑΝΟΣ (FAO ZONE 61) ΚΑΙ ΒΟΡΕΙΟΑΝΑΤΟΛΙΚΟΣ ΕΙΡΗΝΙΚΟΣ ΩΚΕΑΝΟΣ (FAO ZONE 67)
9	TRAWLIC	ΦΙΛΕΤΟ	THERAGRA CHALCOGRAMMA	THERAGRA CHALCOGRAMMA	ΒΟΡΕΙΟΔΥΤΙΚΟΣ ΕΙΡΗΝΙΚΟΣ (FAO 61) ΚΑΙ ΒΟΡΕΙΟΑΝΑΤΟΛΙΚΟΣ ΕΙΡΗΝΙΚΟΣ ΩΚΕΑΝΟΣ (FAO ZONE 67)
10	ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΣ	ΓΑΔΟΣ ΦΙΛΕΤΟ	THERAGRA CHALCOGRAMMA	THERAGRA CHALCOGRAMMA	ΒΟΡΕΙΟΑΝΑΤΟΛΙΚΟΣ ΕΙΡΗΝΙΚΟΣ ΩΚΕΑΝΟΣ (FAO ZONE 67)- ΑΛΑΣΚΑ
11	ΧΥΜΑ ΙΣΛΑΝΔΙΑΣ	ΦΙΛΕΤΟ	ΒΑΚΑΛΑΟΣ	GADUS MORHUA	ΙΣΛΑΝΔΙΑ
12	IGLO	ΠΑΝΑΡΙΣΜΕΝΟ ΦΙΛΕΤΟ-FISHSTICK	THERAGRA CHALCOGRAMMA	THERAGRA CHALCOGRAMMA	ΕΙΡΗΝΙΚΟΣ ΩΚΕΑΝΟΣ
13	ΧΥΜΑ		ΤΑΡΑΜΑΣ	GADUS MORHUA	
14	PESCANOVA	ΠΑΝΑΡΙΣΜΕΝΟ ΦΙΛΕΤΟ-FISHSTICK	ΒΑΚΑΛΑΟΣ	MERLUCCIOUS PRODUCTUS	
15	CARREFOUR	ΠΑΝΑΡΙΣΜΕΝΟ ΦΙΛΕΤΟ-FISHSTICK	ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΣ	THERAGRA CHALCOGRAMMA	ΑΛΑΣΚΑ
16	MR.GRAND	ΦΙΛΕΤΟ	LIMANDA ASPERA	LIMANDA ASPERA	Β.Α.ΕΙΡΗΝΙΚΟΣ ΩΚΕΑΝΟΣ (FAO ZONE 67)- ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΙΝΑ
17	MR.GRAND	ΦΙΛΕΤΟ	THERAGRA CHALCOGRAMMA	THERAGRA CHALCOGRAMMA	Β.Δ ΕΙΡΗΝΙΚΟΣ ΩΚΕΑΝΟΣ (FAO ZONE 61)- ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΙΝΑ
18	TRATA ON ICE	ΦΙΛΕΤΟ	GADUS MORHUA	GADUS MORHUA	Β.Α ΑΤΛΑΝΤΙΚΟΣ ΩΚΕΑΝΟΣ (FAO ZONE 27)

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 6, οχτώ δείγματα στα οποία αναγραφόταν το είδος επιβεβαιώθηκαν (δείγματα 7, 8, 9, 10, 12, 16, 17, 18).

Από το δείγμα 8 αναλύθηκαν 3 διαφορετικά κομμάτια από την ίδια συσκευασία όπου τα 2 στάλθηκαν για αλληλούχιση και επιβεβαιώθηκε ότι ανήκουν στο αναγραφόμενο είδος.

Όσο αφορά το δείγμα 10 χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση 3 διαφορετικά τεμάχια του γάδου Αλάσκας Βασιλόπουλος και σύμφωνα με την αλληλούχιση που έγινε, διαπιστώθηκε ότι και τα 3 ανήκουν στο είδος *Theragra chalcogramma*.

Σχετικά με τα δείγματα 16 (γλώσσα φιλέτο Mr.Grand) και 17 (φιλέτο βακαλάος Mr.Grand) αναλύθηκαν και στις δυο περιπτώσεις από 2 διαφορετικά τεμάχια των συσκευασιών των συγκεκριμένων δειγμάτων, όπως παρατηρούμε και στην ανάλυση SSCP (Εικ. 22), και σύμφωνα με την αλληλούχιση που πραγματοποιήθηκε, επιβεβαιώθηκε πως ανήκουν στο αναγραφόμενο είδος.

Από τα υπόλοιπα, το δείγμα 1 όπου στην ετικέτα του αναφέρονταν γενικά ως βακαλάος, ταυτοποιήθηκε πως ανήκει στο είδος *Theragra chalcogramma*, του οποίου η τιμή είναι προσιτή, καθώς επίσης και τα δείγματα 11, 14 στα οποία το είδος αναγράφονταν γενικά ως βακαλάος βρέθηκαν πως ανήκουν στα είδη *Gadus morhua* και *Merluccius productus* αντίστοιχα. Στο δείγμα 14 (Fishsticks Pescanova) χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση δυο διαφορετικά τεμάχια fishsticks όπως παρατηρούμε και στην SSCP ανάλυσή τους στην Εικόνα 22 όπου μόνο στο ένα πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση.

Το δείγμα 2 όπου αναγράφονταν ως σουρίμι λευκό ψάρι (συνήθως παρασκευάζεται από *Theragra chalcogramma*) βρέθηκε πως ανήκει σε ένα είδος πλατύψαρου, *Limanda aspera*.

Το δείγμα 3, όπου το αναγραφόμενο είδος περιγράφονταν ως *Merluccius merluccius*, ταυτοποιήθηκε πως ανήκει σε ένα συγγενικό και πιο οικονομικό είδος, *Merluccius hubbsi*.

Το δείγμα 5, όπου αναφέρονταν ως *Pleuronectes platessa*, που αποτελεί το πιο σημαντικό είδος πλατύψαρου για την αλιεία, βρέθηκε ότι ανήκει στο είδος πλατύψαρου *Limanda aspera*.

Το δείγμα 6 όπου αναγράφονταν πως ανήκει στο είδος μπακαλιάρου *Pollachius virens*, ταυτοποιήθηκε πως ανήκει στο είδος *Theragra chalcogramma*.

Το δείγμα 13 που αναφέρεται ως ταραμάς ταυτοποιήθηκε πως ανήκει στο είδος *Gadus morhua*.

Τέλος, όσο αφορά το δείγμα 15 (fishsticks poisson pane Carrefour kids), από το οποίο μελετήθηκαν συνολικά 4 διαφορετικά τεμάχια όπως παρατηρούμε και στην Εικόνα 22 και το οποίο αναγράφονταν ως μπακαλιάρος Αλάσκας ταυτοποιήθηκε μέσω αλληλούχισης πως ανήκει στο είδος *Theragra chalcogramma*.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα επεξεργασμένα προϊόντα ψαριών εμπορίου κατέχουν ένα μεγάλο κομμάτι της παγκόσμιας αγοράς και αποτελούν ένα τρόφιμο μείζονος ενδιαφέροντος για το κοινωνικό σύνολο. Το γεγονός ότι κάποια είδη ψαριών μοιάζουν αρκετά μορφολογικά σε αντιπαράθεση με τη διαφορετική εμπορική τους αξία που αποτελεί βασικό κίνητρο για νοθεία.

Μια συνηθισμένη παρατυπία που αποτελεί απάτη για τον καταναλωτή είναι ότι πολλά προϊόντα δεν αναγράφουν στην ετικέτα ακριβώς σε ποιο είδος βακαλάου ανήκουν (πλήρης εμπορική και /ή λατινική ονομασία) ή αναγράφουν διαφορετικό είδος από αυτό που ταυτοποιείται. Το άρθρο 2 του Ευρωπαϊκού κανονισμού 2000/13/ΕΚ προβλέπει ότι η σήμανση με οποιονδήποτε τρόπο και αν πραγματοποιείται δεν πρέπει να είναι τέτοιας φύσεως ώστε να οδηγεί σε παραπλάνηση του αγοραστή κυρίως ως προς τα χαρακτηριστικά, τη φύση του τροφίμου, την ταυτότητα, τις ιδιότητες, τη σύνθεση, την ποσότητα, την διατηρησιμότητα, την καταγωγή ή προέλευση, τον τρόπο παρασκευής ή λήψεως. Συνεπώς η εσφαλμένη ή η ελλιπής επισήμανση οδηγεί σε εξαπάτηση και έτσι καθιστά αναγκαία την ταυτοποίηση.

Ακόμη, παρατηρώντας στον Πίνακα 6 τις χώρες προέλευσης των δειγμάτων που μελετήθηκαν συμπεραίνουμε ότι πραγματοποιείται μαζική είσοδος στην Ελληνική αγορά, ψαριών του Ειρηνικού και Ατλαντικού ωκεανού καθώς και άλλων χωρών.

Μια τεράστια απάτη λαμβάνει χώρα εις βάρος του ανυποψίαστου κοινού: τα ψάρια φέρουν παραπλανητικές ετικέτες και παρουσιάζονται ως πιο ακριβά ή ως είδη αλιευμένα με επιλεκτικές μεθόδους. Αυτό συμβαίνει καθώς η ζήτηση για θαλασσινά αυξάνεται, ενώ η διαθεσιμότητα των ντόπιων αλιευμάτων μειώνεται λόγω της υπεραλίευσης. Έτσι, η Ελλάδα αναγκάζεται να εισάγει όλο και περισσότερα ψάρια, τα οποία είναι φθηνότερα, κατακλύζουν τις αγορές και συχνά πωλούνται στους καταναλωτές με δόλο. Με την επεξεργασία και τη διάθεση τους ως παναρισμένα, καπνιστά κλπ. αποκρύπτεται η πραγματική τους μορφή, οσμή και γεύση.

Οι οικονομολόγοι και οι εμπορικοί αναλυτές δεν χρειάζεται να ψάξουν πολύ για να καταλάβουν τους λόγους που η Ε.Ε εισάγει μεγάλες ποσότητες ειδών. Σύμφωνα με τους ερευνητές, αν γενικά η αγορά της Ε.Ε στηριζόταν αποκλειστικά σε άγρια είδη

ψαριών από τα ευρωπαϊκά νερά για να καλύψει τις ετήσιες ανάγκες της, τα αποθέματα θα τελείωναν πολύ σύντομα. Η υπεραλίευση σε συνδυασμό με την αυξανόμενη ζήτηση δημιουργεί μια ακόμη μεγαλύτερη μείωση στην προσφορά, η οποία καλύπτεται από τα αλιεύματα των ευρωπαϊκών σκαφών που αλιεύουν στην ανοικτή θάλασσα, τις υδατοκαλλιέργειες και τα εισαγόμενα ψάρια. Η πίεση που υφίσταται ο τομέας της αλιείας, της επεξεργασίας και του λιανικού εμπορίου για να βρεθούν νέες πηγές αλιευτικών προϊόντων και να διατηρηθεί η κερδοφορία δημιουργεί το κίνητρο για να παραποιοούνται τα στοιχεία των φθηνότερων ψαριών και να πωλούνται ως ακριβότερα είδη. Η απάτη με τα ψάρια που υφίστανται την «κατάλληλη» επεξεργασία είναι αρκετά εύκολη γιατί εμείς, ως καταναλωτές, είναι συνήθως αδύνατον να εντοπίσουμε τη διαφορά.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια για τη μοριακή ταυτοποίηση κατεψυγμένων φιλέτων και επεξεργασμένων προϊόντων βακαλάου και γλώσσας. Η διαδικασία στηρίχτηκε σε δείκτες μιτοχονδριακού γονιδιώματος και ειδικότερα σε ένα τμήμα του γονιδίου 16S r RNA. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική PCR-SSCP καθώς και η αλληλούχιση DNA (sequencing) των προϊόντων PCR των δειγμάτων μας.

Ο πολυμορφισμός του μιτοχονδριακού DNA έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ταυτοποίηση πολλών ειδών βακαλάου (Hold et al. 2001. Quinterio et al. 2001). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε τσέχικη αγορά, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 20 δείγματα βακαλάου από τα οποία με την τεχνική PCR-RFLP για το μιτοχονδριακό γονίδιο Cytochrome b ταυτοποιήθηκαν 3 είδη:- *Merluccius productus*, *Merluccius hubbsi* και *Merluccius gayi* (Kocher et al, 1989). Αντίστοιχα, για τη διαφοροποίηση άλλων 6 ειδών βακαλάου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο 5s rRNA (Perez and Garcia-Vazquez 2004).

Μια άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε για τη μοριακή ταυτοποίηση ειδών ψαριών σε προϊόντα που έχουν ως βάση το σουρίμι (λευκό ψάρι, *Theragra chalcogramma*) έδειξε ότι από 19 δείγματα μόνο τα 3 ανήκαν στο ψάρι *Theragra chalcogramma* και τα υπόλοιπα σε ψάρια των οικογενειών Merluccidae, Gadidae, Sparidae and Pomacentridae (Lee, 1984). Η τεχνική ταυτοποίησης που χρησιμοποιήθηκε και σε αυτήν την έρευνα ήταν η PCR-RFLP όπου έγινε χρήση εκκινητών γενικής χρήσης (universal), που ενισχύουν μια περιοχή 359 βάσεων του γονιδίου του mtDNA, Cyt b (Carr et al. 1991)

Έρευνες από το πανεπιστήμιο του Οβιέδο, στην Ισπανία το 2004, το 2006 και το 2010 αποκάλυψαν υψηλά ποσοστά αντικατάστασης των ειδών μπακαλιάρου και παραπλάνησης σχετικά με το είδος τους: σε ποσοστό μεταξύ 31-39% ανακαλύφθηκε αφρικανικός βακαλάος, ο οποίος είναι φθηνότερος σε σχέση με εκείνον που αλιεύεται στην Ευρώπη ή εισάγεται από την Αμερική. Αν και από επιστημονικής άποψης δεν υπάρχει ουσιαστική διαφορά στην ποιότητα των διάφορων ειδών βακαλάου, οι καταναλωτές αντιλαμβάνονται κάποια διαφορά και είναι πρόθυμοι

να πληρώσουν περισσότερα για φρέσκο, ντόπιο βακαλάο. Ο μέσος όρος τιμών για τον ευρωπαϊκό βακαλάο για το 2010 (11.72ευρώ/κιλό) ήταν σχεδόν διπλάσιος από τον αντίστοιχο αφρικανικό (6.79ευρώ/κιλό). Στη μελέτη αυτή που πραγματοποιήθηκε παρατηρήθηκε υψηλό επίπεδο εσφαλμένης σήμανσης στα είδη μπακαλιάρου στις ισπανικές και ελληνικές αγορές προτείνοντας τη δόλια εισαγωγή Αφρικανικών ειδών (Garcia-Vazquez et al., 2011). Η ανάλυση του DNA σε προϊόντα μπακαλιάρου που διατίθενται στη νότια ευρωπαϊκή αγορά (Ισπανία και Ελλάδα) έδειξαν πάνω από 30% εσφαλμένη επισήμανση με βάση το είδος αντικατάστασης. Μεγαλύτερη απάτη παρατηρείται σε ουρές και φιλέτα σε σχέση με το ολόκληρο κομμάτι ψαριού. Τα Αφρικανικά είδη ψαριών ήταν αυτά που αναπλήρωναν τα αμερικάνικα και τα ευρωπαϊκά είδη και αυτό είναι μια περίπτωση σκόπιμης εσφαλμένης σήμανσης καθώς οι πραγματικές τιμές αγοράς των Ευρωπαϊκών και Αμερικανικών προϊόντων μπακαλιάρου είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες των Αφρικανικών προϊόντων στις αλυσίδες αγορών της Ισπανίας. Τα αποτελέσματα δείχνουν απάτη εις βάρος των παραγωγών της Αφρικής. Με εντολή της Κυβέρνησης πραγματοποιούνται γενετικές έρευνες των προϊόντων εμπορίου του βακαλάου και επιβάλλεται η χρήση ετικετών των θαλάσσιων προϊόντων με σκοπό να μειωθούν τα επίπεδα της απάτης (Garcia-Vazquez et al., 2009).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ababouch, L. (2006) Assuring fish safety and quality in international fish trade. *Marine Pollution Bulletin* 53, 561-568
- Amanda L. Brooker, Doug Cook, Paul Bentzen, Jonathan M. Wright, Roger W. Doyle (2011) Organisation of microsatellites differs between mammals and cold water teleost fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic* 51, 1959-1966
- Ardura A, Polla Ginuino Gomes, Garcia- Vazquez E, (2010) Application of barcoding to Amazonian commercial fish labeling. *Food Research International* 43,1549-1552
- Barbuto M, M. Galimberti, A. Ferri, E.Labra, M.Malandra, R.Galli, P. Casiraghi (2010) DNA barcoding reveals fraudulent substitution in shark seafood products. *Food Research International* 43(1) 376-381.
- Becchetti, L. Rosati (2007) Global Social Preferences and the Demand for Socially Responsible Products. *World Economy* 30,807-836
- Belfroid, A. C Purperhart, M Ariese (2000). Organotin levels in seafood. *Marine Pollution Bulletin* 40(3), 226-232.
- Cao, H Suzuki, N.Sakurai, T. Matsuzaki, K.Shiraishi, H. Morita (2008) Probabilistic estimation of dietary exposure of the general Japanese population to dioxins in fish, using region-specific fish monitoring data. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 18, 236-245
- Carrera E, Garcia E, Cespedes golzalez, Fernandez R(2000). Differentiation of smoked salmo salar, *Oncorhynchus mykiss* and *Brama raii* using the nuclear marker 5sRNA. *Food Science Technology* 35, 401-406
- Clover Ch. (2004). *The End of the Line: How Overfishing Is Changing the World and What We Eat.*, New Press
- Connolly J.,D. Shaw (2006) Identifying fair trade in consumption choice, *Journal of Strategic Marketing* 14,353-368
- Davidson MH, Stein EA, Bays HE, Maki KC, Doyle RT, Shalwitz RA, Ballantyne CM, Ginsberg HN (2007). Efficacy and tolerability of adding prescription omega-3 fatty acids 4 g/d to Simvastatin 40 mg/d in hypertriglyceridemic patients: An 8-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clinical Therapeutics* 29(7),1354–1367.
- Garcia-Vazquez E, J Perez, L. Martinez, A.Pardinaz, B.Lopez, N.Karaiskou, M.Casa, M.Schiaffino, A.Triantafyllidis (2011) High levels of mistabeling in Spanish and Greek hake markets suggests the fraudulent introduction of African species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 475-480
- Garcia-Vazquez, E. Horreo, J. L. Campo, D. Machado-Schiaffino, G. Bista, I. Triantafyllidis, A.Juanes, F. (2009) Mislabelling of commercial North American hakes suggests underreported exploitation of *Merluccius albidus*. *Food Science* 138,790-796
- Girish, P. S.(2004) Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science* 70, 551-556.
- J.Horreo, A.Andura, I.Pola, J.Martinez, E.Garvia-Vanquez (2012) Universal primers for species authentication of animal foodstuff in a single polymerase chain reaction. *Science of Food and Agriculture* 35(2), 351-362
- Harris W, William S. (1997). n-3 fatty acids and serum lipoproteins. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71(1),1715-1755
- Hasegawa, M. Kishino, H.Yano (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22, 160-174.

- Hold G.L, Valerie J. Russell, Susan E. Pryde, Hartmut Rehbein, Javier Quinteiro, Manuel Rey-Mendez, Carmen G. Sotelo, Ricardo I. Pérez-Martin, Ana T. Santos, Carla Rosa (2001) Validation of a PCR-RFLP based method for the identification of salmon species in food products. *European Food Research and Technology* 212(3),385-389
- Kazumaru I., K.Susuki, K.Ozaki, H.Yamasita (2006) DNA analysis for identification of food-associated foreign substances. *Journal of Food Quality* 29, 531-542
- Karaiskou, N. Triantafyllidis, A. Triantafyllidis Lee (1984), Surimi process technology. *Food Technology* 69,38-11
- Kristin Sullivan, Cod Liver Oil: The Number One Super food (2006), 100 Amazing Facts about Food. Share the wealth
- Kocher T. D., Thomas W, Meyer A, Edward S, Paado S, S.X. Villablanca ,A.C Wilson (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals :Aplification and sequencing with conserved primers,US National Library of Medicine National Institutes of Health 86(16),6196-200
- Kurlansky M. (1997). *Cod: A Biography of the Fish That Changed the World.*
- Lopez, J. (2007) Hake Market Report. Food and Agriculture Organization
- Lundstrom R. (1980) Fish species identification by thin-layer polyacrylamide gel isoelectric focusing: Collaborative study. *Journal-Association of Official Analytical Chemistry* 63, 69-73
- Marko, P. B.Lee, S. C.Rice, A. M. Gramling, J. M. Fitzhenry, T. M. McAalister, J. S. Harper, G. R. Moran, A. L. (2004) Mislabelling of a depleted reef fish. *Nature* 31,309-310
- Miller D., Mariani S.(2010) Smoke, mirrors and mislabeled cod: Poor transparency in the European seafood industry. *Frontiers in Ecology and Environment* 8, 517-519
- Osman M., A. Ashoor, Marsh, P.C. (1987) Liquid chromatographic identification of common fish species. *Analytical Chemistry*. 70, 618-625.
- Perez, J., Garcia-Vazquez, E. (2004) Genetic identification of nine hake species for detection of commercial fraud. *Journal of Food Protection* 67,2792-2796.
- Pinero, C. Barros-Velazquez, J. Perez-Martin, R. I.Martinez, I. Jacobsen, T. Rehbein, H.Kundiger, R.Mendes, R. Etienne, M.Jerome, M. Craig, A. Mackie, I. M.Jessen, F. Development Roche, H.M. (1996). The effect of low-fat dietary treatment with and without fish oil supplementation, *European Journal of Clinical Nutrition* 50(9),617-624
- Quinteiro J,Vidal R,Sotelo C,Perez-Martin R (2001) Identification of hake species (*Merluccius* Genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequencing *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(11),5108-5114
- Sanchez A,Quinteiro J,Rey-Mentez M,Perez-Martin R, Sotelo G (2009) Identification of European Hake Species (*Merluccius merluccius*) using real time PCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(9),3397-3403
- Sodoumou, Z. Gnassia-Barelli, M. Siau, Y.Morton, V. Romeo (2005) Distribution and concentration of trace metals in tissues of different fish species from the Atlantic coast of western Africa. *Bulletin Environment Toxicology* 74, 988-995.
- Steven.M.Carr, S. M. Marshall(1991) D. Detection of intra-specific DNA Sequence variation in the mitochondrial cytochrome b gene of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48(1), 48-52
- Stinn J.F De Sylva, Fleming L.E., Hack, E (2000). Geographic Information Systems (GIS) and ciguatera fish poisoning in the tropical Western Atlantic region. *Proceedings of the 1998 Geographic Information Systems in Public Health*
- Titiana Pepe,Michelle Trotta,Isolina di Marco,Aniello Anastasio,Jose Manolo Botista,Maria Luiza Cortesi (2007) Fish species identification in surimi- based products. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry* 55(9), 3681-3685
- Trotta, M. Schonhuth, S.Pepe, T. Cortesi, M. L.Puyet, A. Bautista(2005) Multiplex PCR method for use in real-time PCR for identification of fish fillets from grouper (*Epinephelus*

and *Mycteroperca* species) and common substitute species. Food Chemistry 53(6), 2039-2045.

- Van Dolah, F. M. (2000) Marine algal toxins: Origins, health effects and their increased occurrence. Environmental Health Supplement ,Toxicological science 85(2),133-141

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ανανιάδη Κ. (1978) Υδατοκαλλιέργειες
- Βαρελτσής Κ(1999)Ποιοτικός έλεγχος και τεχνολογία αλιευμάτων
- Κασπίρης Π.(2000) Τα ψάρια της Ελλάδος
- Μπλούκας Ι.(2004)Συσκευασία τροφίμων ,Εκδόσεις Σταμούλης
- Νεοφύτου Χ.(1997),Ιχθυολογία και ιχθυοπαθολογία
- Παπαναστασίου Δ.(1976)Τεχνολογία και ποιοτικός έλεγχος αλιευμάτων, Εκδόσεις ΙΩΝ
- Πνευματικάτος Γ.(1981)Ιχθυοτροφία και ιχθυοπαθολογία

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

- [www.tsamisaquarium .gr](http://www.tsamisaquarium.gr)
- <http://www.iatronet.gr>
- <http://ec.europa.eu/fisheries/publications/facts>
- <http://www.pbs.org/emptyoceans>
- www.fishbase.org
- www.fishingcy.com
- <http://molecular.roche.com>
- [99www.ocean2012.eu](http://www.ocean2012.eu)