

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Αυθεντικότητα και
νοθεία αλιευμάτων της οικογένειας Soleidae στην ελληνική αγορά.»**

Ιωάννα Γιαννούλη

Βόλος 2023

**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF AGRICULTURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF ICHTHYOLOGY AND AQUATIC
ENVIRONMENT**

POSTGRADUATE MASTER'S THESIS

**“Soleidae family: authenticity and adulteration of catches in the
Greek market.”**

Ioanna Giannoulis

VOLOS 2023

**«Αυθεντικότητα και
νοθεία αλιευμάτων της οικογένειας Soleidae στην ελληνική αγορά.»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1) Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων

2) Γεώργιος Γκάφας, Αναπληρωτής καθηγητής, Μοριακή Βιολογία Διατήρησης Θαλασσιών Θηλαστικών και Ιχθυοαποθεμάτων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος

3) Ιωάννης Γιαντσής, Επίκουρος Καθηγητής Γενετικής Βελτίωσης Ζωικών Οργανισμών, Πανεπιστημίου Δυτικής Μακεδονίας, Μέλος

Στους ανθρώπους μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την περάτωση της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να τη φέρω εις πέρας. Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο για την πολύτιμη βοήθεια του και την διαρκή υποστήριξή του τόσο κατά την διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Ιωάννα Σαραντοπούλου, μέλος ΕΤΕΠ, για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της σε όλο το πειραματικό στάδιο της δεδομένης έρευνας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Περίληψη

Τα αλιεύματα αποτελούν σημαντικό τμήμα της ανθρώπινης διατροφής και μια κατηγορία τροφίμων υψηλής προστιθέμενης αξίας, ενώ παράλληλα είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε δόλια υποκατάσταση. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η αυθεντικότητα και η νοθεία αλιευμάτων της οικογένειας Soleidae στην ελληνική αγορά. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκαν συνολικά 70 δείγματα τα οποία ελέγχθηκαν για την αυθεντικότητά τους. Τα δείγματα αποτέλεσαν προϊόντα αλιείας του είδους *Solea solea* από τις γεωγραφικές περιοχές του Ιονίου και του Αιγαίου πελάγους, καθώς και από εσωτερικά ύδατα της χώρας. Πραγματοποιήθηκε επιτυχής απομόνωση DNA στο 72,9% του συνολικού δείγματος. Σε επόμενο βήμα χρησιμοποιήθηκαν universal εκκινητές και πραγματοποιήθηκε PCR. Η PCR κρίθηκε επιτυχημένη σε μετέπειτα ηλεκτροφόρησή σε ποσοστό 75%. Σε επόμενο στάδιο, τα δείγματα αυτά στάλθηκαν για αλληλούχιση με στόχο τη δημιουργία μιας γενετικής βάσης δεδομένων. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης δεν εντόπισαν νοθεία στα αλιεύματα *S.solea* στην Ελληνική αγορά.

Λέξεις κλειδιά: Αυθεντικότητα, Νοθεία, Soleidae, Απομόνωση DNA, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Νοθεία στα τρόφιμα	1
1.1.1. Νοθεία στα αλιεύματα.....	2
1.1.2. Παράνομη, λαθραία και άναρχη αλιεία και απάτη στα αλιεύματα	3
1.1.2. Νομοθεσίες ΕΕ για την νοθεία στα αλιεύματα και ιχθυολασσιμότητα	4
1.3. Οικογένεια Soleidae	8
1.3.1. Συστηματική κατάταξη.....	8
1.3.2. Περιγραφή κοινών χαρακτηριστικών.....	8
1.3.3. Κυριότερα είδη Soleidae	10
1.3.4. Περιπτώσεις νοθείας και είδη αντικατάστασης.....	16
1.4. Μοριακές τεχνικές ανίχνευσης νοθείας.....	18
1.4.1. Μοριακές τεχνικές με βάση την ανάλυση του DNA	19
1.5. Σκοπός.....	22
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	23
2.1. Συνθήκες Πειράματος	23
2.2. Εργαστηριακά μέσα και υλικά	23
2.2. Δείγματα.....	24
2.3. Μέτρηση μορφομετρικών χαρακτηριστικών.....	25
2.4. Απομόνωση DNA.....	26
2.4.1. Προετοιμασία δείγματος	26
2.4.2. Απομόνωση DNA με ΚΙΤ	26
2.4.3. Απομόνωση DNA με CTAB Protocol.....	28
2.4.4. Απομόνωση DNA με Phenol-Chloroform Protocol	29
2.4.5. Έλεγχος απομονώσεων DNA	32
2.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	36
2.5.1. Εκκινητές (Primers).....	36
2.5.2. Μείγμα PCR (Master Mix).....	37
2.5.3. Πρόγραμμα PCR	37
2.5.4. Έλεγχος PCR.....	38
2.6. Αλληλούχιση DNA.....	39
3. Αποτελέσματα	40
3.1. Αποτελέσματα απομόνωσης DNA	40
3.2. Αποτελέσματα PCR.....	41
3.3. Αποτελέσματα αλληλούχισης.....	43

4. Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	44
4.1. Συζήτηση.....	44
4.2. Συμπεράσματα.....	52
5. Βιβλιογραφία.....	53
5.1. Ελληνική.....	53
5.2. Ξενόγλωσση.....	53
5.3. Ηλεκτρονική.....	59
6. Abstract	60
7. Παράρτημα.....	61

1. Εισαγωγή

1.1. Νοθεία στα τρόφιμα

Η ασφάλεια των τροφίμων και η διασφάλιση των συμφερόντων των καταναλωτών αποτελούσε ανέκαθεν ζήτημα κεντρικού ενδιαφέροντος όλων των σχετικών αρμόδιων διοικητικών και ελεγκτικών φορέων τόσο σε εθνικό, όσο και σε ευρωπαϊκό αλλά και διεθνές επίπεδο.

Η νοθεία των τροφίμων είναι ένα ζήτημα που επηρεάζει όλες τις αλυσίδες εφοδιασμού τροφίμων και συνεπώς ολόκληρη τη βιομηχανία τροφίμων, τους πελάτες και τους καταναλωτές. Παρόλο που αυτό το είδος απάτης χρονολογείται από την αρχαία Ρώμη και την Αθήνα όπου υπήρχαν νόμοι σχετικά με τη νοθεία κρασιών με γεύσεις και χρώματα, η ανάγκη για εξελιγμένη πρόληψη και μετριάσμο της νοθείας τροφίμων σήμερα είναι μεγαλύτερη από ποτέ (Robson *et al.*, 2020). Οι αλυσίδες εφοδιασμού τροφίμων γίνονται όλο και πιο ευάλωτες λόγω της παγκοσμιοποίησης και της επιμήκυνσης τους (Lotta & Bogue, 2015).

Πολλοί ήταν οι ερευνητές που προσπάθησαν να ορίσουν την έννοια της νοθείας στη βιομηχανία τροφίμων. Ενδεικτικά, σχετικές έρευνες δημοσιεύτηκαν από τους Spink and Moyer (2011), Everstine *et al.* (2013), Ellis *et al.* (2015), Charlebois *et al.* (2016), Manning (2016), Moyer *et al.* (2017), Spink *et al.* (2017), Bouzembrak *et al.* (2018), Cruse (2019), Manning and Soon (2019) και Spink *et al.* (2019). Ωστόσο τα δεδομένα στην αγορά και την επιστήμη αλλάζουν συνεχώς, με αποτέλεσμα οι ορισμοί αυτοί να αναθεωρούνται και να εμπλουτίζονται τακτικά. Ένας εκτενής και σαφής ορισμός για την απάτη – νοθεία τροφίμων είναι αυτός που έδωσαν οι Spink και συν. το 2019. Έτσι, αυτή η εξαπάτηση αναγνωρίζεται ως ένας συλλογικός όρος που χρησιμοποιείται για να συμπεριλάβει μια εσκεμμένη και σκόπιμη υποκατάσταση,

προσθήκη, αλλοίωση ή παραπλανητική δήλωση συστατικών ή συσκευασίας τροφίμων ή ψευδείς και παραπλανητικές δηλώσεις σχετικά με ένα προϊόν, με σκοπό το οικονομικό όφελος. Ο Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων (ΕΦΕΤ) αναφέρει σχετικά ότι η απάτη στον τομέα των τροφίμων αποτελεί ένα φαινόμενο που περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα δόλιων και παραπλανητικών πρακτικών, οι οποίες δεν περιορίζονται αποκλειστικά και μόνο στο τρόφιμο, αλλά αναφέρονται σε όλο το φάσμα της αγροτοδιατροφικής αλυσίδας. Σε αυτές περιλαμβάνονται πρακτικές, όπως η παραχάραξη, η νόθευση εγγράφων ή προϊόντων, η χρήση μη εγκεκριμένων μεθόδων ή διαδικασιών παραγωγής, η αντικατάσταση (ποιοτικά ή ποσοτικά), η διάλυση, η προσθήκη ή η αφαίρεση ενός συστατικού που οδηγούν στην ποσοτική διαφοροποίηση της σύστασης του τροφίμου οδηγώντας σε παραπλανητική σήμανση.

1.1.1. Νοθεία στα αλιεύματα

Τα αλιεύματα είναι μια κατηγορία τροφίμων υψηλής προστιθέμενης αξίας ενώ παράλληλα αποτελεί σημαντικό τμήμα της ανθρώπινης διατροφής. Ως εκ τούτου έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης νοθείας. Η εξάντληση των ιχθυαποθεμάτων είναι ακόμη ένας παράγοντας που καθιστά τα αλιεύματα επιρρεπή σε δόλια υποκατάσταση. Στην έκθεση (2013) της Επιτροπής Περιβάλλοντος, Δημόσιας Υγείας και Ασφάλειας των τροφίμων της Ευρωπαϊκής ένωσης «Απάτη - νοθεία σε τρόφιμα και δόλιες πρακτικές στην εφοδιαστική αλυσίδα Διαπιστώσεις – προτάσεις αντιμετώπισης» αναφέρεται ότι οι ιχθύες κατατάσσονται δεύτεροι μεταξύ των τροφίμων που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο απάτης.

Η νοθεία στα αλιεύματα έχει εκδηλωθεί με ποικιλία μεθόδων. Μερικές από τις πιο συνήθεις πρακτικές νοθείας εμφανίζονται στις ακόλουθες κατηγορίες: αντικατάσταση (πλήρης ή μερική) ενός είδους με ένα άλλο, μεγαλύτερο ποσοστό

επίπαγου από το νομοθετικά προβλεπόμενο στα κατεψυγμένα, προσθήκη χρωστικών για βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του ιχθύος, λανθασμένη αναγραφή γεωγραφικής προέλευσης (κράτος), παρουσίαση κατεψυγμένων αλιευμάτων (μετά από απόψυξη) ως νωπών, παρουσίαση προϊόντων υδατοκαλλιεργειών ως προϊόντων ανοικτής θάλασσας, κ.ά. (Arvanitoyannis, 2011).

1.1.2. Παράνομη, λαθραία και άναρχη αλιεία και απάτη στα αλιεύματα

Η παράνομη, λαθραία και άναρχη (ΠΛΑ) αλιεία εκτός από την υπονόμηση των βιώσιμων αλιευτικών πρακτικών, συμβάλλει και ευνοεί τις απόπειρες νοθείας αλιευμάτων, δεδομένου ότι τέτοια αλιεύματα εμπορεύονται παράνομα και «ξεπλένονται» μέσω της νόμιμης αλυσίδας εμπορίας ιχθυηρών.

Παρά την μεγάλη πρόοδο που έχει σημειωθεί όσον αφορά τη ρύθμιση της εμπορικής αλιείας μέσω μέτρων παρακολούθησης, ελέγχου και εποπτείας, καθώς και της χρήσης μιας σειράς τεχνολογιών για τον εντοπισμό των παραβάσεων που αφορούν μεμονωμένα σκάφη, τα κενά και η ελλιπής οργάνωση σε θέματα αναγνώρισης των αλιευμάτων (όπως είναι η παράνομη αλιεία) και η απάτη σε ολόκληρη την αλυσίδα εφοδιασμού τροφίμων (όπως η εσφαλμένη επισήμανση των προϊόντων), είναι γεγονός (Di Pinto et al., 2013). Η έκταση της ΠΛΑ αλιείας παγκοσμίως έχει εκτιμηθεί να είναι κάπου μεταξύ 10 και 23 δισεκατομμυρίων USD ετησίως, που αντιστοιχούν σε 11 με 26 εκατομμύρια τόνους (FAO, 2018).

Η ΠΛΑ αλιεία οδηγεί σε παραπλανητικές πρακτικές μάρκετινγκ όσον αφορά τη γεωγραφική προέλευση των αλιευμάτων μέσω λανθασμένης σήμανσης, αντικατάσταση των ειδών ενδιαφέροντος με άλλα χαμηλότερης θρεπτικής ή/και οικονομικής αξίας, παραποίηση εγγράφων καθώς επίσης και σε κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών.

Καθώς η αειφόρος διαχείριση της αλιείας υπονομεύεται, τα ιχθυαποθέματα απειλούνται και τόσο η ασφάλεια των τροφίμων όσο και της οικονομίας στις αναπτυσσόμενες χώρες τίθεται σε κίνδυνο. Οι αναπτυσσόμενες χώρες κινδυνεύουν περισσότερο λόγω της απουσίας κατάλληλων κανονισμών και της κακής πολιτικής επιβολής. Πολλές κυβερνήσεις επενδύουν σε ενισχυμένα ρυθμιστικά μέτρα για την αποτροπή εισαγωγής αλιευμάτων παράνομης αλιείας στην αλυσίδα εμπορίας ψαριών. (FAO, 2018).

1.1.2. Νομοθεσίες ΕΕ για την νοθεία στα αλιεύματα και ιχνηλασιμότητα

Η ποιότητα των τροφίμων που προσφέρονται στους ευρωπαίους πολίτες είναι καίριας σημασίας για τις ευρωπαϊκές αρχές που θέσπισαν ένα μεγάλο αριθμό νόμων, κανονισμών και οδηγιών για τον έλεγχο της παραγωγής τροφίμων. Όπως προαναφέρθηκε μέσα στο φαινόμενο της απάτης στον τομέα του τρόφιμου και συνεπώς και των αλιευμάτων εμπεριέχεται και η οικονομική απάτη, ενώ ως αποτέλεσμα αυτού διακυβεύεται η υγεία των καταναλωτών όπως επίσης και η φυσική ισορροπία και βιωσιμότητα των ειδών που εμπλέκονται (Jose et al, 2019). Επιπλέον, τα αλιευτικά προϊόντα που δεν τηρούν τις απαραίτητες προϋποθέσεις μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στην ανθρώπινη υγεία όταν τοξικά είδη διατίθενται στο εμπόριο (Civera, 2003).

Μεταξύ των νόμων που έχουν θεσπιστεί από την ΕΕ, οι διατάξεις του κανονισμού ελέγχου των αλιευτικών δραστηριοτήτων (άρθρο 58 του Καν. (ΕΕ) 1224/2009 του Συμβουλίου και τα άρθρα 67-68 του εφαρμοστικού Καν. (ΕΕ) 404/2011 της Επιτροπής –με τα Διορθωτικά στο τέλος) επεκτείνουν την απαιτούμενη έως σήμερα από τη γενική ενωσιακή νομοθεσία, διαδοχική ιχνηλασιμότητα για την ασφάλεια των τροφίμων, προβλέποντας ένα συνεκτικό σύστημα ιχνηλασιμότητας για τη διασφάλιση ότι όλες οι παρτίδες προϊόντων αλιείας και υδατοκαλλιέργειας, πρέπει

να είναι ανιχνεύσιμες σε όλα τα στάδια παραγωγής, κατεργασίας και διανομής, από την αλίευση ή την καλλιέργειά τους έως τη λιανική πώληση, καθώς επίσης και να παρέχουν αυτές τις πληροφορίες στις αρμόδιες αρχές, εφόσον ζητηθούν, έτσι ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί κάθε προϊόν, μέχρι την πηγή προέλευσης του. Ως αποτέλεσμα, οι επιχειρηματίες είναι υποχρεωμένοι να υιοθετήσουν δύο συμπληρωματικούς τύπους συστημάτων ιχνηλασιμότητας, την “Εσωτερική ιχνηλασιμότητα”, η οποία αναφέρεται σε ένα ενδο-εταιρικό ή τοπικό σύστημα, αλλά και την “Εξωτερική (αλυσιδωτή) ιχνηλασιμότητα”, που είναι ένα σύστημα που λειτουργεί ανάμεσα σε εταιρίες και χώρες και το οποίο συνδέεται με την ύπαρξη της εσωτερικής ιχνηλασιμότητας σε κάθε στάδιο της αλυσίδας. Εργαλεία “αλυσιδωτής ιχνηλασιμότητας” είναι απαραίτητα για την υλοποίηση της ιχνηλασιμότητας “από το δίκτυο στο πιάτο”.

Η ιχνηλασιμότητα μπορεί να βελτιώσει τη διαχείριση των κινδύνων που σχετίζονται με την ασφάλεια των ψαριών, καθώς και να εγγυηθεί την αυθεντικότητα του προϊόντος, παρέχοντας αξιόπιστες πληροφορίες στους πελάτες, ενισχύοντας τη διαχείριση της προσφοράς και βελτιώνοντας την ποιότητα του προϊόντος (Thompson et al., 2005, Maralit et al., 2013). Οι πληροφορίες που παρέχονται στους καταναλωτές σχετίζονται με τα είδη των ιχθύων που προμηθεύονται, την προέλευση τους, την αυθεντικότητα, τη σύνθεση αλλά και το σύστημα παραγωγής. Η αναγνώριση των ειδών είναι ένα σημαντικό βήμα για την ιχνηλασιμότητα στα θαλασσινά. Η χρήση των μοριακών εργαλείων έχει αποδειχθεί πολύ πιο ακριβής από όλες τις άλλες διαγνωστικές μεθόδους που χρησιμοποιούνταν μέχρι πρότινος (Ferrito & Pappalardo, 2017). Επιπλέον, η ιχνηλασιμότητα των θαλασσινών πρέπει να είναι οικονομικά εφικτή προκειμένου να γίνει αποδεκτή.

Στο πλαίσιο εφαρμογής των διατάξεων του κοινοτικού συστήματος ελέγχου της Κοινής Αλιευτικής Πολιτικής, που προβλέπονται στους κανονισμούς Καν. (ΕΚ)

1224/2009, και Καν. (ΕΕ) 404/2011, εκδόθηκε από τη Γενική Διεύθυνση Αλιείας η εγκύκλιος με αριθμό 9354.1/1/11/05-12-2011, η Υπουργική Απόφαση αριθμ. 1750/32219/2015 (ΦΕΚ Β 475) "Συμπληρωματικά μέτρα εφαρμογής των ενωσιακών διατάξεων της Κοινής Οργάνωσης Αγοράς (ΚΟΑ) των προϊόντων αλιείας και υδατοκαλλιέργειας και του Κοινοτικού Συστήματος Ελέγχου της αλιείας, σχετικά με τη διακίνηση και την εμπορία των προϊόντων του τομέα", καθώς και η εγκύκλιος αριθμ. 5873/110709/2015.

Στο νομοθετικό πλαίσιο της ΕΕ, ακόμη μια σημαντική ρύθμιση που αφορά την καταπολέμηση της ΠΛΑ αλιείας και του ελέγχου της αλιείας, αποτελεί ο Καν. ΕΚ 1005/2008 για τη θέσπιση κοινοτικού συστήματος πρόληψης, αποτροπής και εξάλειψης της παράνομης, λαθραίας και μη ρυθμιζόμενης αλιείας, του λεγόμενου «κανονισμού ΙΥΥ», με την καθιέρωση συστήματος πιστοποίησης της παράκτιας αλιείας. Αντίστοιχα, σε διεθνές επίπεδο, άξια αναφοράς δεν παύει να είναι η συμφωνία PSMA (FAO, 2018.), η οποία είναι η πρώτη δεσμευτική διεθνής συμφωνία που στοχεύει συγκεκριμένα στην ΠΛΑ αλιεία. Στόχος του είναι η πρόληψη, η αποτροπή και η εξάλειψη της ΠΛΑ αλιείας εμποδίζοντας τα σκάφη που ασχολούνται με την αυτή να χρησιμοποιούν λιμάνια και να εκφορτώνουν τα αλιεύματά τους. Με αυτόν τον τρόπο, η PSMA μειώνει τα κίνητρα τέτοιων σκαφών να συνεχίσουν να δραστηριοποιούνται, ενώ επίσης εμποδίζει τα αλιευτικά προϊόντα που προέρχονται από την ΠΛΑ αλιεία να φτάσουν στις εθνικές και διεθνείς αγορές. Η αποτελεσματική εφαρμογή της PSMA συμβάλλει τελικά στη μακροπρόθεσμη διατήρηση και βιώσιμη χρήση των ζωντανών θαλάσσιων πόρων και των θαλάσσιων οικοσυστημάτων. Οι διατάξεις της PSMA εφαρμόζονται στα αλιευτικά σκάφη που επιδιώκουν είσοδο σε καθορισμένο λιμένα κράτους που είναι διαφορετικό από το κράτος σημαίας τους.

Το Ευρωπαϊκό Παρατηρητήριο των Αγορών Προϊόντων Αλιείας και Υδατοκαλλιέργειας (EUMOFA) αποτελεί ένα ακόμη έξυπνο εργαλείο για τον τομέα της αλιείας και των υδατοκαλλιεργειών που αναπτύχθηκε από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή. Έχει σκοπό να αυξήσει τη διαφάνεια και την αποτελεσματικότητα στην αγορά, να αναλύσει τη δυναμική των αγορών της ΕΕ, να υποστηρίξει αποφάσεις επιχειρηματικότητας και χάραξης πολιτικής. Η EUMOFA δίνει τη δυνατότητα απευθείας ελέγχου του όγκου, της αξίας και των τιμών των προϊόντων αλιείας και υδατοκαλλιεργειών, από την πρώτη πώληση μέχρι το στάδιο της λιανικής, συμπεριλαμβανομένων των εισαγωγών και των εξαγωγών. Τα δεδομένα συλλέγονται από τις χώρες της ΕΕ, την Ισλανδία, την Νορβηγία, τη Ηνωμένο Βασίλειο και από φορείς της ΕΕ και ενημερώνονται καθημερινά.

Ενεργό ρόλο στην ανάπτυξη των πολιτικών της ΕΕ για την καταπολέμηση της απάτης ως υπηρεσία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής διαδραματίζει επίσης η OLAF. Έτσι, εκτός από το ανεξάρτητο ερευνητικό της έργο, η υπηρεσία βρίσκεται τακτικά στην πρώτη γραμμή της εκπόνησης και της διαπραγμάτευσης νομοθεσίας σχετικά με την προστασία των οικονομικών συμφερόντων της ΕΕ από την απάτη και τη διαφθορά. Χάρη στην στέρεη ερευνητική εμπειρογνωμοσύνη της, η OLAF μπορεί να στηρίζει τα θεσμικά όργανα της ΕΕ στην προώθηση ενός υγιούς νομικού πλαισίου που προσφέρει συνεχώς βελτιωμένη προστασία στον προϋπολογισμό της ΕΕ και στα χρήματα των φορολογουμένων. Οι κύριες δραστηριότητες της OLAF στον τομέα της διαμόρφωσης της πολιτικής για την καταπολέμηση της απάτης επικεντρώνονται στην ανάπτυξη ολοκληρωμένων πολιτικών και νομοθεσιών για την καταπολέμηση της απάτης, στη διενέργεια αναλύσεων για τον εντοπισμό απειλών και τρωτών σημείων, την σύσταση μέτρων για την καταπολέμηση της απάτης στις υπηρεσίες της Επιτροπής, στα θεσμικά όργανα, στα γραφεία και τους οργανισμούς της ΕΕ, και την συλλογή πληροφοριών από

τη δική της επιχειρησιακή εμπειρία και άλλες πηγές με σκοπό την αξιοποίησή τους μέσω βάσεων δεδομένων και εφαρμογών. Τέλος η OLAF ενισχύει τη συνεργασία με χώρες της ΕΕ και τρίτες χώρες και αυξάνει την ευαισθητοποίηση μέσω σεμιναρίων, και συνεδρίων κατάρτισης.

1.3. Οικογένεια Soleidae

1.3.1. Συστηματική κατάταξη

Η συστηματική ταξινόμηση για την οικογένεια Soleidae σύμφωνα με το FISHBASE έχει ορισθεί ως εξής:

Βασίλειο: Animalia

Φύλο: Chordate

Κλάση: Actinopterygii

Τάξη: Pleuronectiformes

Υπόταξη: Soleoidei

Οικογένεια: Soleidae

1.3.2. Περιγραφή κοινών χαρακτηριστικών

Η οικογένεια Soleidae όπως φαίνεται από τη συστηματική της κατάταξη στην προηγούμενη παράγραφο ανήκει στην τάξη των Pleuronectiformes. Τα είδη της τάξης αυτής, γνωστά και ως πλατύψαρα, έχουν πεπλατυσμένο σώμα και στην πλειονότητά τους εμφανίζονται να είναι ιδιαίτερα προσαρμοσμένα στη βενθική ζωή. Η οικογένεια Soleidae αντιπροσωπεύεται από πολλά είδη, τα οποία κατά βάση αποτελούν ιχθύες ευρείας κατανάλωσης και έχουν πολύ υψηλή εμπορική σημασία. (ICES- FishMap).

Χαρακτηριστικό γνώρισμά τους αποτελεί ότι η μία πλευρά τους ακουμπά στον πυθμένα και ονομάζεται τυφλή ή κατώτερη, ενώ η επάνω πλευρά τους ονομάζεται οφθαλμοφόρα ή ανώτερη καθώς φέρει και τους δύο οφθαλμούς (Εικόνα:1), οι οποίοι βρίσκονται περισσότερο ή λιγότερο κοντά ο ένας στον άλλο και συνήθως εμφανίζει χρωματισμό (Νεοφύτου, 2015).



Εικόνα 1. Ανώτερη (οφθαλμοφόρα) και κατώτερη (τυφλή) πλευρά ατόμου *Solea solea*. (Πηγή: www.fao.org)

Τα πλατύψαρα συναντώνται σε όλο τον κόσμο, σε περιοχές που ο βυθός είναι ποικιλόμορφος και μπορούν να κρυφτούν εύκολα. Προτιμούν κυρίως ρηχά, αμμώδη και λασπώδη ενδιαιτήματα, ενώ προκειμένου να μην γίνουν εύκολα αντιληπτά από θηρευτές θάβονται στην άμμο αφήνοντας ακάλυπτα μόνο τα μάτια τους. Σε πιο σκληρούς πυθμένες, όπου δεν μπορούν να θαφτούν, ο μηχανισμός που αναπτύσσουν για κάλυψη από ενδεχόμενο εχθρό είναι η αλλαγή του χρώματός τους. Η ικανότητα προσαρμογής του χρώματός τους μπορεί να εντοπιστεί και στην Εικόνα : 2.



Εικόνα 2. Άτομο *Solea senegalensis* (Jiménez-Prada et al., 2015)

Όπως αναφέρεται στο βιβλίο του Χρίστος Ν. Νεοφύτου με τίτλο «Βιολογία Ιχθύων και Θαλάσσιων Θηλαστικών» (2015), τα είδη της οικογένειας Soleidae βρίσκονται τόσο στα τροπικά όσο και στα εύκρατα κλίματα και συνήθως σε ρηχά νερά, έχουν λεπτό πεπλατυσμένο σώμα και το ραχιαίο πτερύγιό τους ξεκινά από το ύψος του κεφαλιού.

1.3.3. Κυριότερα είδη Soleidae

1.3.3.1. *Solea solea*

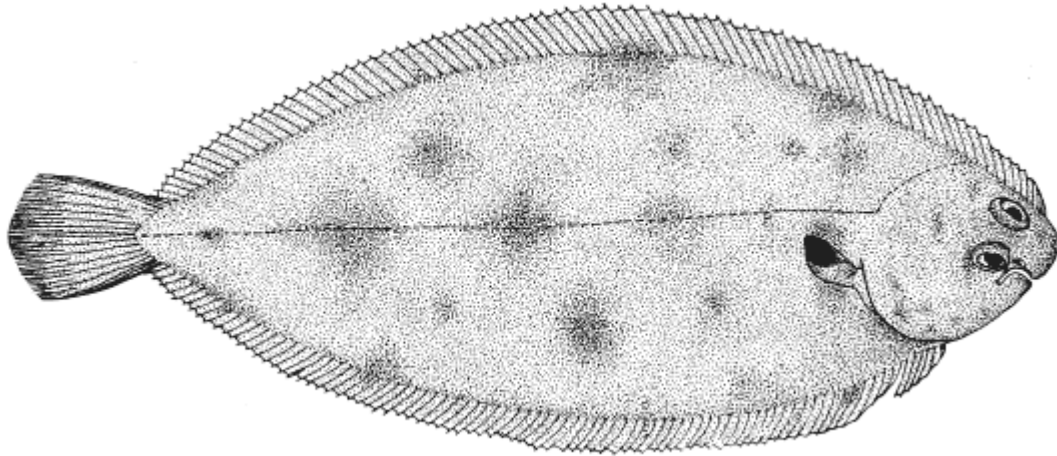
Η κοινή γλώσσα (*Solea solea*) διαθέτει πεπλατυσμένο σώμα ελλειψοειδούς σχήματος (Εικόνα: 3), με μικρό στρογγυλεμένο κεφάλι και στόμα του οποίου τα δόντια είναι περισσότερο ανεπτυγμένα στην τυφλή πλευρά, ενώ οι οφθαλμοί είναι τοποθετημένοι στη δεξιά πλευρά, με αρκετές όμως εξαιρέσεις (Νεοφύτου, 2015). Το χρώμα της πλευράς των ματιών ποικίλλει από γκριζοκαφέ έως κοκκινοκαφέ, με μεγάλες και διάχυτες σκούρες κηλίδες. Η τυφλή πλευρά είναι λευκή (Εικόνα: 1). Το θωρακικό πτερύγιο της πλευράς του ματιού έχει μια μαύρη κηλίδα στο περιφερικό

άκρο, ενώ το πίσω μέρος της ουράς είναι πιο σκούρο από το υπόλοιπο πτερύγιο (www.fao.org).

Το μέσο μήκος των ενηλίκων ατόμων κυμαίνεται μεταξύ των 30 – 40 εκατοστών, ενώ το συνολικό τους μήκος σπάνια ξεπερνά τα 60 εκατοστά, παρόλα αυτά άτομα μήκους μέχρι και 70 εκατοστά έχουν παρατηρηθεί (www.fao.org, ICES- FishMap). Το γρηότερο δείγμα παρατηρήθηκε σε ολλανδική ψαριά και η ηλικία του ήταν 40 έτη. Γενικότερα, τα θηλυκά άτομα του είδους φτάνουν σε μεγαλύτερο μήκος συγκριτικά με τα αρσενικά (ICES- FishMap).

Το είδος αυτό θεωρείται βενθικό που ζει σε αμμώδεις ή λασπώδεις βυθούς, έως τα 200 μέτρα βάθος και σε θερμοκρασία 8 έως 24 βαθμών κελσίου (Νεοφύτου, 2015, FAO). Η γλώσσα επεκτείνεται γεωγραφικά στη Μεσόγειο, στη θάλασσα του Μαρμαρά, στη νοτιο-δυτική Μαύρη θάλασσα καθώς και στον ανατολικό Ατλαντικό ωκεανό, στη Βόρεια θάλασσα, στη δυτική Βαλτική, στα νότια της Σενεγάλης και στο πράσινο ακρωτήρι (Νεοφύτου, 2015, FAO).

Η κοινή γλώσσα κυνηγά την τροφή της κυρίως το βράδυ και το διαιτολόγιο της περιλαμβάνει μικρά καρκινοειδή, οστρακοειδή, μαλάκια και πολύχαιτους. Τα άτομα αυτού του είδους ωριμάζουν κατά το τρίτο με πέμπτο έτος της ηλικίας τους. Κατά την περίοδο της αναπαραγωγής μεταναστεύουν σε βαθύτερα νερά, έτσι ώστε να επικρατεί θερμοκρασία 6 έως 12 βαθμών κελσίου. Οι περιόδοι ωοτοκίας διαφέρουν ανάλογα με τη γεωγραφική θέση: στη Μεσόγειο η ωοτοκία λαμβάνει χώρα μεταξύ Ιανουαρίου και Απριλίου, με δύο αιχμές τον Φεβρουάριο. στον Βισκαϊκό Κόλπο η ωοτοκία συμβαίνει μεταξύ Δεκεμβρίου και Μαΐου και στη Βόρεια Θάλασσα η ωοτοκία συμβαίνει μεταξύ Απριλίου και Ιουνίου.



Εικόνα 3. Κοινή γλώσσα, *Solea solea*. (Πηγή: www.fao.org)

Το είδος *S. solea* θεωρείται σημαντικό για τη θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια λόγω της υψηλής του αξίας στην αγορά και της καταναλωτικής του ζήτησης. Το απόθεμα κινδυνεύει από μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα. Το μέγεθος του αναπαραγωγικού αποθέματος είναι πάνω από το οριακό επίπεδο των 25000 τόνων, αλλά η θνησιμότητα λόγω αλιείας είναι πολύ υψηλή. Ως εκ τούτου, το απόθεμα κινδυνεύει να εκμεταλλευτεί με μη βιώσιμο τρόπο (ICES- FishMap).

Τα πρώτα στοιχεία για την καλλιέργεια του *S. solea* αναφέρθηκαν από τους Fabre-Domergue και Biéatrix τον 19ο αιώνα, με βάση μια έρευνα για την παραγωγή ψαριών στη Γαλλία μεταξύ 1885 και 1905. Από τις αρχές του 20ου αιώνα έως τη δεκαετία του 1960, τόσο η έρευνα όσο και η παραγωγή κοινής γλώσσας εισήλθε σε αργή και επίμονη πτώση, παρά την ενθάρρυνση της γαλλικής κυβέρνησης για την παραγωγή νέων ειδών ψαριών. Υπήρξε μια αναζωπύρωση της παραγωγής *S. solea* στη Γαλλία και το Ηνωμένο Βασίλειο στις αρχές της δεκαετίας του 1970 και έκτοτε έχει σημειωθεί σημαντική αύξηση των μελετών και των ερευνών για τη βελτίωση και την εντατικοποίηση της ατομικής παραγωγής (www.fao.org).

1.3.3.2. *Solea aegyptiaca*

Η Αιγυπτιακή γλώσσα (*S. aegyptiaca*) διαθέτει πεπλατυσμένο και ελλειψοειδούς σχήματος σώμα, με μικρό κεφάλι (Εικόνα: 4). Η απόσταση του πάνω οφθαλμού από την πλάγια όψη του κεφαλιού είναι μικρότερη από τη διάμετρο του. Το συνηθέστερο μήκος που συναντάται είναι περίπου στα 25 εκατοστά, ενώ το μέγιστο φτάνει μέχρι και τα 65 εκατοστά (FISHBASE). Αποτελεί βενθικό είδος της υποτροπικής ζώνης και τρέφεται κυρίως με πολύχαιτους και δίθυρα μαλάκια. Η αναπαραγωγή του είδους αυτού στις αφρικανικές ακτές της Μεσογείου πραγματοποιείται προς το τέλος του φθινοπώρου και κατά τη διάρκεια του χειμώνα.

Άτομα του είδους *S. aegyptiaca* συναντώνται στη Μεσόγειο θάλασσα και κυρίως στη θαλάσσια περιοχή της Τυνησίας και του Λιβάνου, στη νότια Αδριατική θάλασσα, καθώς και στη διώρυγα του Σουέζ. Επίσης συναντάται και στη λίμνη Warum της Αιγύπτου (Νεοφύτου, 2015, Mehanna 2007). Εξαίρεση αποτελεί και η αναφορά εύρεσης του στον κόλπο των Λεόντων (She et al. 1987). Στο παρελθόν είχε εσφαλμένα ταυτιστεί με την κοινή γλώσσα (*S. solea*) ωστόσο τώρα αναγνωρίζεται ως ξεχωριστό είδος και μάλιστα στενά συνδεδεμένο με *S. senegalensis* (Ouanes, et al. 2011). Τα δύο είδη έχει αναφερθεί να έρχονται σε επαφή στον Κόλπο της Τύνιδας στη βόρεια Τυνησία, ενώ μελέτες έχουν υποδείξει περιπτώσεις υβριδοποίησης μεταξύ *S. aegyptiaca* και *S. senegalensis* σε σημεία όπου τα δύο αυτά είδη συνυπάρχουν (She et al. 1987, Ouanes, et al. 2011).



Εικόνα 4. Αιγυπτιακή γλώσσα, *Solea aegyptiaca* (Πηγή: www.fishbase.de)

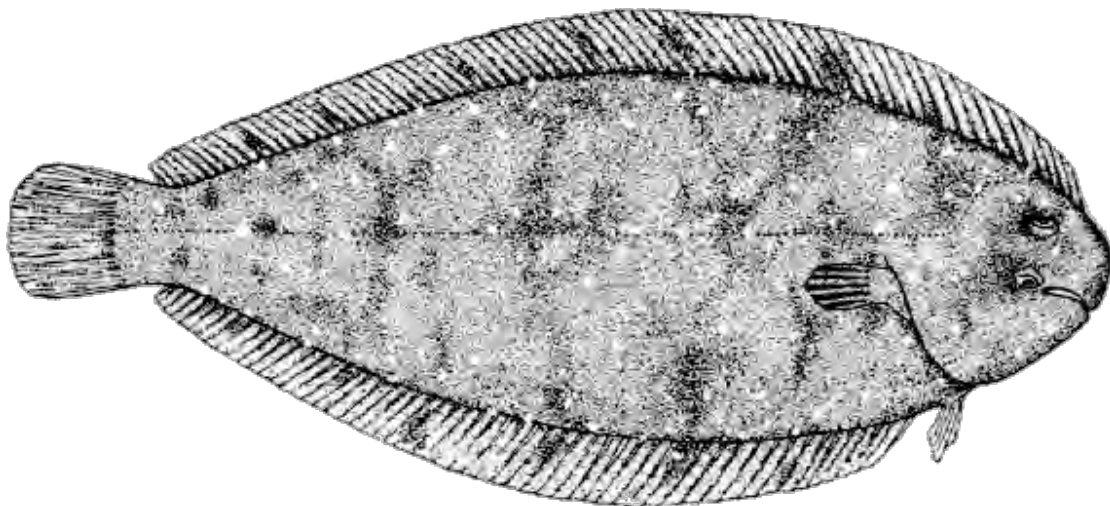
1.3.3.3. *Solea senegalensis*

Η γλώσσα *S. senegalensis* (Εικόνα: 5) διαθέτει πεπλατυσμένο, ωοειδές και ασύμμετρο σώμα, με τα μάτια να βρίσκονται στην δεξιά πλευρά. Διαθέτει μία μεμβράνη μαύρου χρώματος στο θωρακικό πτερύγιο, στην πλευρά των ματιών. Αυτό το χαρακτηριστικό την ξεχωρίζει μορφολογικά από την κοινή γλώσσα (*S. solea*) η οποία έχει μία μεγάλη μαύρη συμπαγή κηλίδα στην οπίσθια πλευρά αυτού του πτερυγίου. Το μέγιστο μήκος φτάνει στα 60cm, με συνηθέστερο περίπου στα 45cm.

Είναι ένα βενθικό είδος που γενικά κατοικεί, όπως οι περισσότερες γλώσσες, σε αμμώδεις ή λασπώδεις βυθούς, οι οποίοι κυμαίνονται από υφάλμυρες λιμνοθάλασσες και ρηχά νερά έως παράκτιες περιοχές βάθους έως 100 μέτρα (FAO). Τα ενήλικα τρέφονται κυρίως με βενθικούς ασπόνδυλους οργανισμούς, όπως λάρβες από πολύχαιτους, δίθυρα μαλάκια, και σε μικρότερο βαθμό με μικρά καρκινοειδή. Η αναπαραγωγή αυτού του είδους συμβαίνει μεταξύ Μαρτίου και Ιουνίου. Αυτό το είδος κατοικεί στη δυτική Μεσόγειο και στον βορειοανατολικό Ατλαντικό φτάνοντας στον στις ακτές της Σενεγάλης (Ouanes, et al. 2011).

Το είδος *S. senegalensis* είναι καλύτερα προσαρμοσμένο από το *S. solea* στα θερμότερα νερά των εύκρατων κλιμάτων και επομένως είναι καταλληλότερο για

παραγωγή σε νερά όπως αυτά κατά μήκος της νότιας ακτής της Ισπανίας και της Πορτογαλίας. Κατά τη δεκαετία του 1980, καλλιεργήθηκε εκτενώς. Έκτοτε, πολλά ερευνητικά προγράμματα στην Πορτογαλία και την Ισπανία έχουν μελετήσει μεθόδους για τη βελτίωση της παραγωγής. Σημείο καμπής προς την επιτυχία της παραγωγής του *S. senegalensis* επιτεύχθηκε το 1991, όταν ο γόνος που φυλάσσονταν στις εγκαταστάσεις του Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA, Κάντιθ, Ισπανία) άρχισε να αναπαράγεται με φυσικό και ελεγχόμενο τρόπο. Επιπλέον, το 1999 αναφέρθηκε από την ερευνητική ομάδα του Κέντρου Θαλάσσιων Επιστημών (CCMAR, Πορτογαλία) ότι πέτυχαν συνεχείς και σταθερές ωοτοκίες από άγριους γόνους, με αποτέλεσμα την παραγωγή γόνιμων και βιώσιμων εμβρύων, χωρίς κανένα περιβαλλοντικό ή ορμονικό χειρισμό. Σήμερα, η φυσική ωοτοκία του γόνου *S. senegalensis* ελέγχεται καλά και μπορεί να πραγματοποιηθεί ακολουθώντας τυπικές διαδικασίες που βασίζονται σε χειρισμούς θερμοκρασίας. Ως συνέπεια, στην Ισπανία, η μαζική παραγωγή του νεαρού *S. senegalensis* ξεκίνησε το 1993 (FAO).



Εικόνα 5. Γλώσσα Σενεγάλης, *Solea senegalensis* (Πηγή: www.fish-it.org)

1.3.4. Περιπτώσεις νοθείας και είδη αντικατάστασης

Τα πλατύψαρα λόγω του υψηλού καταναλωτικού τους ενδιαφέροντος και της αυξημένης αγοραστικής τους αξίας έχουν βρεθεί να είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε περιπτώσεις νοθείας. Άλλος ένας παράγοντας που ενθαρρύνει και ευνοεί το γεγονός ότι αποτελούν από τα πιο συχνά είδη ψαριών στα οποία εντοπίζεται νοθεία, είναι ότι οργανισμοί όπως οι γλώσσες πωλούνται, κατά κύριο λόγο επεξεργασμένα ή σε νοπά/κατεψυγμένα φιλέτα (Sanjuan & Comesana 2002). Στη συνέχεια παρουσιάζονται μερικές από τις μελέτες που έχουν διενεργηθεί ανά τα χρόνια για την ανίχνευση τέτοιων περιστατικών νοθείας κατά μήκος της εφοδιαστικής αλυσίδας ειδών της οικογένειας Soleidae.

Από της κυριότερες περιπτώσεις απάτης στην πώληση πλατύψαρων αναγνωρίζεται η παρουσίαση ψαριών χαμηλότερης τιμής ως ψάρια με υψηλότερο αγοραστικό ενδιαφέρον και υψηλότερη τιμή, όπως η κοινή γλώσσα (*S. solea*). Παραδειγματικά, μελέτη του Tantillo και συν. (2015) στη Νότια Ιταλία, κατέδειξε ποσοστό αντικατάστασης 44,4% σε φιλέτα της κοινής γλώσσας με το είδος *S. senegalensis*.

Υψηλά ποσοστά νοθείας έχουν καταγραφεί και σε άλλους σχετικούς ελέγχους, σε φιλέτα πλατύψαρων με μοριακή ταυτοποίηση. Γενετική ταυτοποίηση των δειγμάτων πλατύψαρων σε έρευνα στην Ισπανία έδειξε ποσοστό αντικατάστασης 43% με το 10% των περιπτώσεων νοθείας να αφορά την αντικατάσταση *S. solea* από *S. senegalensis* και *Microchirius azevia* (Espineira et al., 2008).

Ακόμη μια περίπτωση απάτης που αποκαλύφθηκε αφορά ποσοστό αντικατάστασης 37,5% σε έρευνα των Pappalardo και Ferrito, το 2015, στη Νότια Ιταλία.. Η ταυτοποίηση με DNA barcoding έδειξε ότι το 41% των περιπτώσεων νοθείας

σε φιλέτα πλατύψαρων αφορούσε την αντικατάσταση της κοινής γλώσσας *S. solea*, με το είδος *Arnoglossus laterna*. Τα δύο αυτά είδη ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες και δεν είναι πιθανό να μπερδεύονται τυχαία, λόγω της διαφορετικής τους μορφολογίας. Συγκεκριμένα, το είδος *A. laterna* ανήκει στην οικογένεια Bothidae. Τα Soleidae είναι πλατύψαρα με τα μάτια στη δεξιά πλευρά και τα Bothidae έχουν τα μάτια στην αριστερή πλευρά. Επομένως, η αντικατάσταση της κοινής γλώσσας από *A. laterna* θεωρείται δόλια.

Άλλες μελέτες διαπίστωσαν ότι η κοινή γλώσσα συχνά αντικαθίσταται από φθηνότερα, αλλά παρόμοια σε μορφολογία είδη με την οικογένεια Soleidae (Luque and Donlan, 2019), όπως τα *Cynoglossus senegalensis*, *S. senegalensis*, *Synaptura lusitanica* και *Pegusa lascaris*, αλλά και με λιγότερο παρόμοια είδη όπως το *Pangasius sp.*, *Lepidopsetta polyxstra* και *Limanda aspera* (Bénard-Capelle et al., 2015; Christiansen et al., 2018; Herrero et al., 2012).

Απάτη με υποκατάσταση του είδους *S. solea* βρέθηκε να συμβαίνει κατά 17% σε διαφορετικά στάδια κατά μήκος της βελγικής αλυσίδας εφοδιασμού τροφίμων. Η νοθεία συνέβαινε κυρίως παρόμοια μορφολογικά υποκατάστατα, όπως τα *Cynoglossus sp.* και *S. senegalensis.*, όσον αφορούσε τα «καθαρά» φιλέτα γλώσσας. Ωστόσο, αρκετά άλλα είδη (*L. aspera*, *P. hypophthalmus*, *L. polyxstra* και *M. kitt*) χρησιμοποιήθηκαν ως υποκατάστατα όταν τα φιλέτα είχαν υποβλήθει σε περαιτέρω επεξεργασία, δηλ. τυλίχθηκαν σε ρολό και καλύφθηκαν με σάλτσα (Deconinck et al., 2020). Όσον αφορά την ίδια έρευνα το ποσοστό 8% υποκατάστασης που βρέθηκε να συμβαίνει στην εστίαση είναι συγκρίσιμο με το 11% που περιγράφεται από τους Christiansen et al. (2018) για το Βέλγιο, αλλά σημαντικά χαμηλότερο από το 50% που εντοπίστηκε στη Γερμανία (Kappel, 2016). Επίσης στη Γερμανία, κοινές εναλλακτικές

λύσεις υποκατάστασης για τη γλώσσα αποτελούσαν το *L. aspera* και το *Cynoglossus senegalensis* (Kappel, 2016; Rehbein, 2008).

1.4. Μοριακές τεχνικές ανίχνευσης νοθείας

Η κύρια πτυχή του ελέγχου ταυτότητας θαλασσινών είναι η πιστοποίησή της αυθεντικότητας του εκάστοτε προϊόντος, η οποία διατηρεί την ποιότητα των τροφίμων και παρέχει διασφάλιση για τη διαφάνεια της αγοράς, αποφεύγοντας έτσι την απάτη. Η πιστοποίηση της σωστής ταυτότητας επιβεβαιώνει ότι η εμπορική και επιστημονική ονομασία που αναγράφεται στην ετικέτα ανήκει όντως στο είδος που περιλαμβάνεται στο προϊόν. Για χρόνια, η αναγνώριση των ειδών ψαριών συνδεόταν στενά με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, και η ταυτοποίηση γινόταν με τη χρήση υπάρχοντων ταξινομικών κλειδιών για την αναγνώριση και διαφοροποίηση του ενός είδους από το άλλο. Αδιαμφισβήτητα μια τέτοια μέθοδος ταυτοποίησης έχει αρκετά πλεονεκτήματα, ωστόσο, κατά τα διάφορα στάδια επεξεργασίας ενός προϊόντος, η εξωτερική του μορφολογία μπορεί να αλλάξει εντελώς, καθιστώντας την ταυτοποίηση του με αυτή τη μέθοδο δύσκολη έως και εντελώς αδύνατη (Lago et al., 2013).

Για την καταπολέμηση αυτού του προβλήματος έχουν αναπτυχθεί διάφορες μοριακές τεχνικές που βασίζονται στα εγγενή συστατικά ιστών και είναι ανεξάρτητες από μορφολογικούς χαρακτήρες. Οι μοριακές τεχνικές που επιτρέπουν τον έλεγχο ταυτότητας ψαριών μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες ομάδες, ανάλογα με τον μοριακό δείκτη στον οποίο στοχεύουν. Έτσι, οι μοριακές τεχνικές χωρίζονται σε αυτές που βασίζονται στον έλεγχο των πρωτεϊνών και σε αυτές που βασίζονται στον έλεγχο του DNA.

Το DNA έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις πρωτεΐνες. Αν και το DNA μπορεί να αλλοιωθεί κατά τις διάφορες διαδικασίες επεξεργασίας των τροφίμων, είναι πολύ πιο ανθεκτικό και σταθερό στη θερμότητα από ότι μια πρωτεΐνη, έτσι είναι είναι δυνατό να ενισχυθούν μικρές περιοχές του που είναι επαρκείς για να καταστεί δυνατή η ταυτοποίηση ακόμη και σε κατακερματισμένο DNA (Lago et al., 2013)..

Υπάρχει μια τεράστια ποικιλία διαθέσιμων μεθόδων βασισμένων στο DNA για την αναγνώριση ειδών ψαριών. Οι κύριες διαφορές μεταξύ αυτών είναι το εύρος εφαρμογής, η πολυπλοκότητα και το κόστος τους, παράγοντες που είναι σημαντικοί για την επιλογή συγκεκριμένης μεθοδολογίας. Στη επόμενη παράγραφο αναλύονται κάποιες από τις πιο βασικές μοριακές τεχνικές ανίχνευσης με βάση τον έλεγχο του DNA.

1.4.1. Μοριακές τεχνικές με βάση την ανάλυση του DNA

PCR

Η PCR είναι μια αναλυτική μέθοδος που βασίζεται στην ανίχνευση και την ενίσχυση συγκεκριμένων θραυσμάτων DNA μέσω ειδικών εκκινητών που χρησιμοποιούνται. Οι εκκινητές είναι ένα ζεύγος μικρών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που περιορίζουν την προς ενίσχυση περιοχή.

Η βασική αντίδραση της PCR είναι μια διαδοχή κύκλων που εμπεριέχει τη μετουσίωση του DNA για τον διαχωρισμό των δύο αλυσίδων, την ευθυγράμμιση εκκινητή με το πρότυπο DNA και τον πολυμερισμό για τη σύνθεση ενός νέου μορίου DNA μεταξύ των δύο εκκινητών. Από εκεί και πέρα επιστρέφει στο βήμα της μετουσίωσης για να ξεκινήσει ένας νέος κύκλος. Ειδικοί εκκινητές χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση θραυσμάτων DNA που, αφού διαχωριστούν και οπτικοποιηθούν με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την

αναγνώριση ειδών. Αυτή η ειδικότητα προκύπτει επειδή οι εκκινητές κατασκευάζονται από εξαιρετικά διατηρημένες περιοχές του DNA που έχουν πολύ λίγους πολυμορφισμούς μεταξύ πολλών ειδών. Επομένως, απαιτείται και προηγούμενη γνώση του γονιδίου που θα ενισχυθεί.

FINS

Η τεχνική FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing) βασίζεται στον πολλαπλασιασμό μια συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης και στη συνέχεια σύγκριση με γνωστές αλληλουχίες από τις τράπεζες δεδομένων και τη χρήση φυλογενετικής ανάλυσης για να εκτιμηθούν οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των αλληλουχιών. Το γονίδιο που χρησιμοποιείται ευρύτατα είναι το μιτοχondριακό *cytb* ή τα: 12sr RNA, 16s rRNA ATPase 6 και η ρυθμιστική περιοχή D-Loop, τα οποία εμφανίζουν μικρότερη ομολογία αλληλουχιών μεταξύ των πληθυσμών του ίδιου είδους.

PCR-RFLP

Η PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) είναι μια πιο οικονομική και τεχνικά απλή εναλλακτική του FINS, η οποία χρησιμοποιείται εφόσον έχει καθοριστεί η αλληλουχία μιας περιοχής και απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη σημείων πέψης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες, τα οποία διαφέρουν μεταξύ του δείγματος αναφοράς και των άλλων δειγμάτων υπό έλεγχο. Το προϊόν της αντίδρασης PCR, υπόκειται σε πέψη με το κατάλληλο ένζυμο και ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης. Το πρότυπο των ζωνών που εμφανίζονται είναι χαρακτηριστικό για το είδος και επιτρέπει την αναγνώρισή του.

Multiplex PCR

Είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται εκτεταμένα για τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό πολλών αλληλουχιών στόχων σε μια αντίδραση PCR. Σε μια τέτοια δοκιμή χρησιμοποιούνται διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, τα οποία θα πρέπει να είναι σχεδιασμένα να λειτουργούν στην ίδια θερμοκρασία υβριδοποίησης. Το πλεονέκτημά της είναι η μείωση του κόστους και η μεγαλύτερη αξιοπιστία λόγω της ταυτόχρονης εξέτασης πολλαπλών γενετικών δεικτών στο ίδιο δείγμα. Το πρότυπο των προϊόντων του PCR θα πρέπει να διαφέρει μεταξύ του δείγματος αναφοράς και των υπό εξέταση δειγμάτων.

Real time PCR

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας σε πραγματικό χρόνο και παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης, λόγω της χρήσης φθορίζοντων μορίων. Ως στόχοι για τον πολλαπλασιασμό χρησιμοποιούνται μιτοχονδριακά γονίδια σύμφωνα με τα αποτελέσματα από το DNA Barcoding και τη FINS (π.χ. COI, cytb, 12s rRNA, 16s rRNA, ATPase 6). Με την παρούσα τεχνική υπάρχει η δυνατότητα εντοπισμού διαφορετικών αλληλουχιών με τη χρήση κατάλληλα σημασμένων μορίων.

HRM

Κατά την HRM (High Resolution Melting) πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας στόχου και στη συνέχεια τήξη του προϊόντος. Η θερμοκρασία τήξης (T_m) ενός μορίου DNA εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση της αλληλουχίας του σε γουανίνη G και κυτοσίνη C (GC content) και διαφέρει ανάλογα με τη σύσταση της αλληλουχίας που ελέγχεται. Η παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης γίνεται με

τη χρήση φθοριζόντων χρωστικών, που δίνουν τη δυνατότητα διάκρισης ακόμα και σε μικρές διαφορές μεταξύ των αλληλουχιών.

1.5. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας έρευνας όπως αναγράφεται και στην προκήρυξη του προγράμματος «ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ ΣΤΗΝ ΑΛΙΕΙΑ» ΑΡΘΡΟ 26 & 44 παρ. 3, Καν. 508/2014, είναι η ταυτοποίηση ειδών ιχθύων που αλιεύονται στις Ελληνικές θάλασσες, χρησιμοποιώντας καινοτόμες τεχνικές και μοριακούς δείκτες (markers) για την καταπολέμηση της εσφαλμένης σήμανσης και νοθείας των αλιευμάτων στην ελληνική αγορά. Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα πτυχιακή διατριβή εξετάστηκαν είδη της οικογένειας Soleidae.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Συνθήκες Πειράματος

Το πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής διεξήχθη από το Μάρτιο του 2022 έως και τον Ιανουάριο του 2023 στις εγκαταστάσεις του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και ειδικότερα στο Εργαστήριο Ιχθυολογίας – Υδροβιολογίας (εΥΙ). Το εΥΙ είναι πλήρως πιστοποιημένο από το 2020 κατά ISO 9001:2015 για τον ερευνητικό εξοπλισμό του, το ανθρώπινο στελεχιακό δυναμικό του και την οργάνωση-λειτουργία των εργαστηριακών χώρων του. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, διαφυλάχθηκαν όλοι οι κανόνες ορθής εργαστηριακής πρακτικής. Ακολουθήθηκαν προσεκτικά τα εργαστηριακά πρωτόκολλα και πραγματοποιήθηκε πλήρης αποστείρωση των εργαλείων και των πάγκων εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν, καθόλα τα στάδια του πειράματος, με σκοπό να εξασφαλισθεί όσο το δυνατόν περισσότερο η αποτροπή τυχούσας επιμόλυνσης.

2.2. Εργαστηριακά μέσα και υλικά

Τα εργαστηριακά μέσα και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Ποτήρια ζέσεως
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Γυάλινες φιάλες τύπου Duran διαφόρων όγκων
- Επιτραπέζιος ζυγός ακριβείας
- Αυτόκαυστο / Αποστειρωτής ατμού υπό πίεση
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Εκμαγείο πηκτής αγαρόζης

- Μεμβράνη παραφίνης
- Αποστειρωμένα ρύγχη για τις πιπέτες
- Ταινία αποστείρωσης
- Θάλαμος αποστείρωσης UV
- Λαβίδες και Νυστέρια
- Τρυβλία petri
- Ιχθυόμετρο
- Πιπέτες ακριβείας διαφόρων όγκων
- ΚΙΤ απομόνωσης DNA (INVITROGEN, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Υδατόλουτρο (WiseBath Fuzzy Control System, WITEG Labortechnik, Wertheim, Germany)
- Σωληνάρια Eppendorf
- Θερμοκυκλοποιητής
- Ηλεκτρονικός Υπολογιστής
- Κάμερα UV και Ειδικό Λογισμικό (DNR, Mini Bis Bio-Imaging Systems, Israel)
- Φυγόκεντρος (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Germany)
- Συσκευή Ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης
- Θερμοαντιδραστήρας (Thermoblock)

2.2. Δείγματα

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής μελετήθηκαν συνολικά 70 δείγματα τα οποία ανήκαν στην οικογένεια Soleidae.

Τα δείγματα αποτέλεσαν προϊόντα αλιείας από τις γεωγραφικές περιοχές του Ιονίου και του Αιγαίου πελάγους, καθώς και από εσωτερικά ύδατα της χώρας. Πιο συγκεκριμένα, οι περιοχές προέλευσης των δειγμάτων εντοπίζονται στον Αμβρακικό κόλπο (Αρτα), την Αλεξανδρούπολη, τον Θερμαϊκό κόλπο, την Κυλλήνη και την Κρήτη. Σε κάθε δείγμα δόθηκε ένας μοναδικός κωδικός και καταγράφηκαν όλες οι πληροφορίες (ονομασία είδους, τόπος και χρονολογία προέλευσης, μορφομετρικά χαρακτηριστικά).

2.3. Μέτρηση μορφομετρικών χαρακτηριστικών

Πριν την κοπή τμήματος ιστού για απομόνωση DNA, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις μορφομετρικών χαρακτηριστικών σε όλα τα άτομα γλώσσας που μελετήθηκαν. Οι μετρήσεις λήφθηκαν βάσει συγκεκριμένου πρωτοκόλλου.



Εικόνα 6. Στιγμιότυπο από την μέτρηση μορφομετρικών παραγόντων των ατόμων που μελετήθηκαν

Τα στοιχεία τα οποία ελήφθησαν από κάθε άτομο ήταν: ολικό μήκος, μεσουραίο μήκος, πλάτος σώματος, συνολικό βάρος, μήκος πλευρικού πτερυγίου, μήκος ραχιαίου πτερυγίου, μήκος βάσης εδρικού πτερυγίου, πάχος ουραίου μίσχου και μήκος κεφαλής.

2.4. Απομόνωση DNA

2.4.1. Προετοιμασία δείγματος

Για την απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα μυϊκού ιστού. Ανάλογα με το πρωτόκολλο απομόνωσης χρησιμοποιήθηκε η απαιτούμενη ποσότητα ιστού η οποία αποκόπηκε προσεκτικά και με αποστειρωμένα εργαλεία (νυστέρια, λαβίδες και τρυβλία petri) για την αποφυγή οποιασδήποτε επιμόλυνσης.

2.4.2. Απομόνωση DNA με ΚΙΤ

Για την συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό ΚΙΤ απομόνωσης DNA της INVITROGEN (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) (Εικόνα: 7).



Εικόνα 7. ΚΙΤ απομόνωσης DNA της INVITROGEN (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

Κατά τη διάρκεια των εργαστηριακών δοκιμών ακολουθήθηκε πιστά το πρωτόκολλο του κατασκευαστή όπως αναγράφεται παρακάτω:

Λύση ιστού

- Κοπή \approx 1mg ιστού με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και λαβίδας
- Προσθήκη 180 μ L ρυθμιστικού διαλύματος πέψης (digestion buffer)
- Προσθήκη 20 μ L πρωτεΐνάσης K (prK)
- Επάση των δειγμάτων στους 55°C -65 °C για τουλάχιστον 4 ώρες

Καθαρισμός DNA

- Φυγοκέντρηση 14000rpm για 3 λεπτά (σε θερμοκρασία περιβάλλοντος)
- Μεταφορά υπερκείμενου σε νέα Eppendorf
- Προσθήκη 20 μ l RNase A, και vortex
- Επάση για 2 λεπτά (σε θερμοκρασία δωματίου)
- Προσθήκη 200 μ L lysis buffer, και vortex
- Προσθήκη 200 μ L EtOH
- Μεταφορά \approx 640 μ L σε column tubes
- Φυγοκέντρηση 10000/12000rpm για 1min (σε θερμοκρασία περιβάλλοντος)
- Προσθήκη 500 μ L washing Buffer 1
- Φυγοκέντρηση 10000/12000rpm για 1min (σε θερμοκρασία περιβάλλοντος)
- Προσθήκη 500 μ L washing Buffer 2
- Φυγοκέντρηση 14000rpm για 3min (σε θερμοκρασία περιβάλλοντος)

- Προσθήκη 25 μL Elution buffer
- Επώαση για 2 min (σε θερμοκρασία περιβάλλοντος)
- Φυγοκέντρηση 14000rpm για 3min (σε θερμοκρασία περιβάλλοντος)
- Αποθήκευση στους -20°C

2.4.3. Απομόνωση DNA με CTAB Protocol

Για την απομόνωση DNA με το πρωτόκολλο CTAB ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

Λύση ιστού

- Κοπή 25 mg πολύ καλά τεμαχισμένου ιστού με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και λαβίδας
- Προσθήκη 500 μL CTAB lysis buffer (0.1 M TrisHCl-pH=8.0, 20mM EDTA-pH=8.0, 1.4M NaCl, 2% CTAB w/v)
- Προσθήκη 30 μL πρωτεϊνάσης K
- Προσθήκη 1 μL β -mercaptoethanol
- Επώαση στους $56-60^{\circ}\text{C}$ για τουλάχιστον 3 ώρες

Καθαρισμός DNA

- Παραμονή στον εργαστηριακό πάγκο μέχρι τα δείγματα να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Προσθήκη 500 μl Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1)
- Χειροκίνητη ανάδευση για 10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση 12.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C
- Μεταφορά 2/3 του υπερκειμένου σε νέα eppendorf

- Προσθήκη 300 μL isopropanol
- Χειροκίνητη ανάδευση για 10 λεπτά (πιθανότητα σχηματισμού κρυστάλλων κατά το συγκεκριμένο στάδιο)
- Επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Φυγοκέντρηση 12.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C
- Αφαίρεση isopropanol
- Προσθήκη 200 μL 75% παγωμένης EtOH
- Φυγοκέντρηση 12.000rpm για 5 λεπτά στους 4°C
- Αφαίρεση EtOH
- Προσθήκη 200 μL 75% παγωμένης EtOH
- Φυγοκέντρηση 12.000rpm για 5 λεπτά στους 4°C
- Αφαίρεση EtOH
- Στέγνωμα σε συσκευή Thermoblock
- Προσθήκη 25 μL 5 mM Tris-HCl buffer (pH = 8.5)
- Αποθήκευση στους -20°C

2.4.4. Απομόνωση DNA με Phenol-Chloroform Protocol

Για την απομόνωση DNA με το πρωτόκολλο φαινόλης-χλωροφορμίου ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

Λύση ιστού

- Κοπή 10mg ιστού
- Προσθήκη 500 μL TNE (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTA)
- Προσθήκη 80 μL SDS (80%)
- Προσθήκη 30 μL πρωτεϊνάσης K, και vortex

- Επώαση στους 56-60°C για τουλάχιστον 3 ώρες (προτιμότερο περίπου 16 ώρες).

Καθαρισμός DNA

- Προσθήκη 300 μL φαινόλης
- Χειροκίνητη ανάδευση για 10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση 12.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C
- Προσθήκη 300 μL φαινόλης
- Προσθήκη 300 μL διαλύματος χλωροφορμίου/ισο-αμυλικής αλκοόλης (24:1)
- Χειροκίνητη ανάδευση για 10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση 12.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέα eppendorf
- Προσθήκη ίσου όγκου ($\approx 600 \mu\text{L}$) διαλύματος χλωροφορμίου/ισο-αμυλικής αλκοόλης (24:1)
- Χειροκίνητη ανάδευση για 10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση 12.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέα eppendorf ($\approx 400-500 \mu\text{L}$)
- Προσθήκη 1mL EtOH
- Προσθήκη 15 μL πυκνού διαλύματος οξικού νατρίου (3M)
- Μεταφορά τους στους -20 °C για τουλάχιστον 30 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση 12.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C
- Αφαίρεση περίσσειας αλκοόλης (Σημ: Παρουσία ιζήματος ως ένδειξη DNA - απουσία ιζήματος δεν σημαίνει κατ'ανάγκη μηδενική ποσότητα DNA).
- Προσθήκη 200 μL 70% παγωμένης EtOH
- Φυγοκέντρηση 12.000rpm για 5 λεπτά στους 4°C

- Αφαίρεση EtOH
- Προσθήκη 200 μL 75% παγωμένης EtOH
- Φυγοκέντρηση 12.000rpm για 5 λεπτά στους 4°C
- Αφαίρεση EtOH
- Στέγνωμα σε συσκευή Thermoblock
- Προσθήκη 35 μL TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)
- Αποθήκευση στους -20°C



Εικόνα 8. Στιγμιότυπο από την τοποθέτηση δειγμάτων πριν την φυγοκέντρησή τους.

2.4.5. Έλεγχος απομονώσεων DNA

Για τον έλεγχο της ποιότητας του απομονωμένου DNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα-τζελ αραρόζης (0,8%).

Η αραρόζη αποτελεί έναν πολυσακχαρίτη που προέρχεται από θαλάσσια φύκη και παρουσιάζει την ιδιότητα να πολυμερίζεται στους 100⁰C δημιουργώντας ένα κολλώδες διάλυμα, το οποίο πήζει ~ 45⁰C σχηματίζοντας πόρους στο εσωτερικό του, μέσα από τους οποίους μπορούν να κινηθούν τα μόρια DNA. Όταν εφαρμόσουμε ηλεκτρική τάση στο πήκτωμα αραρόζης, η μια άκρη του αποκτά αρνητικό φορτίο και η άλλη θετικό, οπότε φορτισμένα μόρια θα μεταναστεύσουν/μετακινηθούν προς τον αντίθετο πόλο από το φορτίο τους, όπως τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα προς τον θετικό πάντα πόλο. Τα μικρότερου μεγέθους μόρια κινούνται πιο γρήγορα μέσα από τους πόρους του πηκτώματος από τα μεγαλύτερου μεγέθους και έτσι μεταναστεύουν σε μεγαλύτερη απόσταση μέσα στο πήκτωμα. Η συγκέντρωση της αραρόζης στο πήκτωμα καθορίζει το μέγεθος των πόρων, το οποίο με τη σειρά του καθορίζει το μέγεθος των μορίων DNA που θα το διαπεράσουν

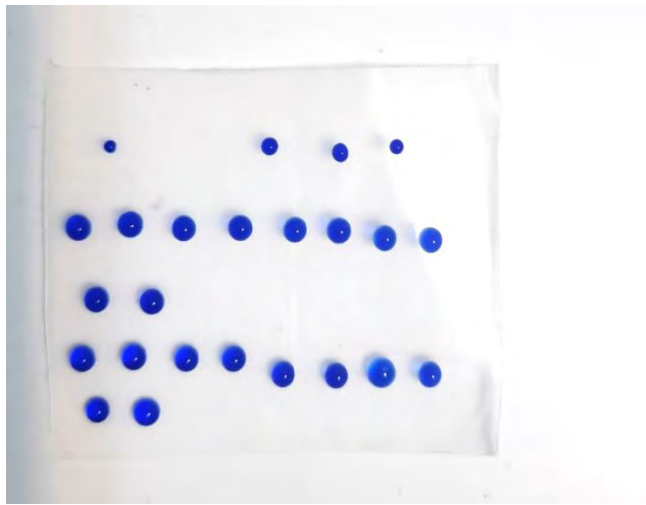
2.4.5.1. Προετοιμασία του πηκτώματος αραρόζης και ηλεκτροφόρηση του DNA

Για την παρασκευή πηκτώματος πραγματοποιούνταν ζύγιση της απαιτούμενης ποσότητας σκόνης αραρόζης αναλόγως με τον επιθυμητό τελικό όγκο πηκτώματος έτσι ώστε η περιεκτικότητα σε αραρόζη να παραμένει στο 0,8%. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιούνταν ήταν TBE 1x. Το διάλυμα του TBE 1x προέκυπτε από την αραιώση stock buffer TBE 100x (108 g tris base, 55 g Boric Acid, 900 mL δις απεσταγμένο νερό, 40 mL 0,5 M EDTA pH 8).

Η απαιτούμενη ποσότητα σκόνης μετρούνταν με την χρήση ζυγού ακριβείας (τριών δεκαδικών) και μεταφερόταν προσεκτικά σε κωνική φιάλη, όπου γινόταν προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος ύστερα από μέτρησή του σε ογκομετρικό κύλινδρο. Ακολουθούσε χειροκίνητη ανάδευση, όμως η διάλυση της αγαρόζης πραγματοποιούνταν με θέρμανση. Για τον σκοπό αυτό γινόταν χρήση φούρνου μικροκυμάτων, στον οποίο τοποθετούταν η κωνική φιάλη για περίπου 2-3 λεπτά, έως ότου το διάλυμα να γίνει τελείως διαυγές. Στη συνέχεια και αφού η κωνική φιάλη κρύωνε κάτω από τρεχούμενο νερό γινόταν προσθήκη 1,5 μL βρωμιούχου αιθιδίου 1% και ήπια ανακίνηση της κωνικής φιάλης για την επίτευξη καλύτερης κατανομής του βρωμιούχου αιθιδίου σε όλο το διάλυμα. Σημειώνεται πως λόγω της τοξικότητας του βρωμιούχου αιθιδίου (η ουσία έχει μεταλλαξιογόνο και τερατογόνο δράση), η προσθήκη διενεργήθηκε στον απαγωγό αερίων ενώ η απόρριψη του ρύγχους που χρησιμοποιείται γίνεται σε ειδικό χώρο απορριμμάτων.

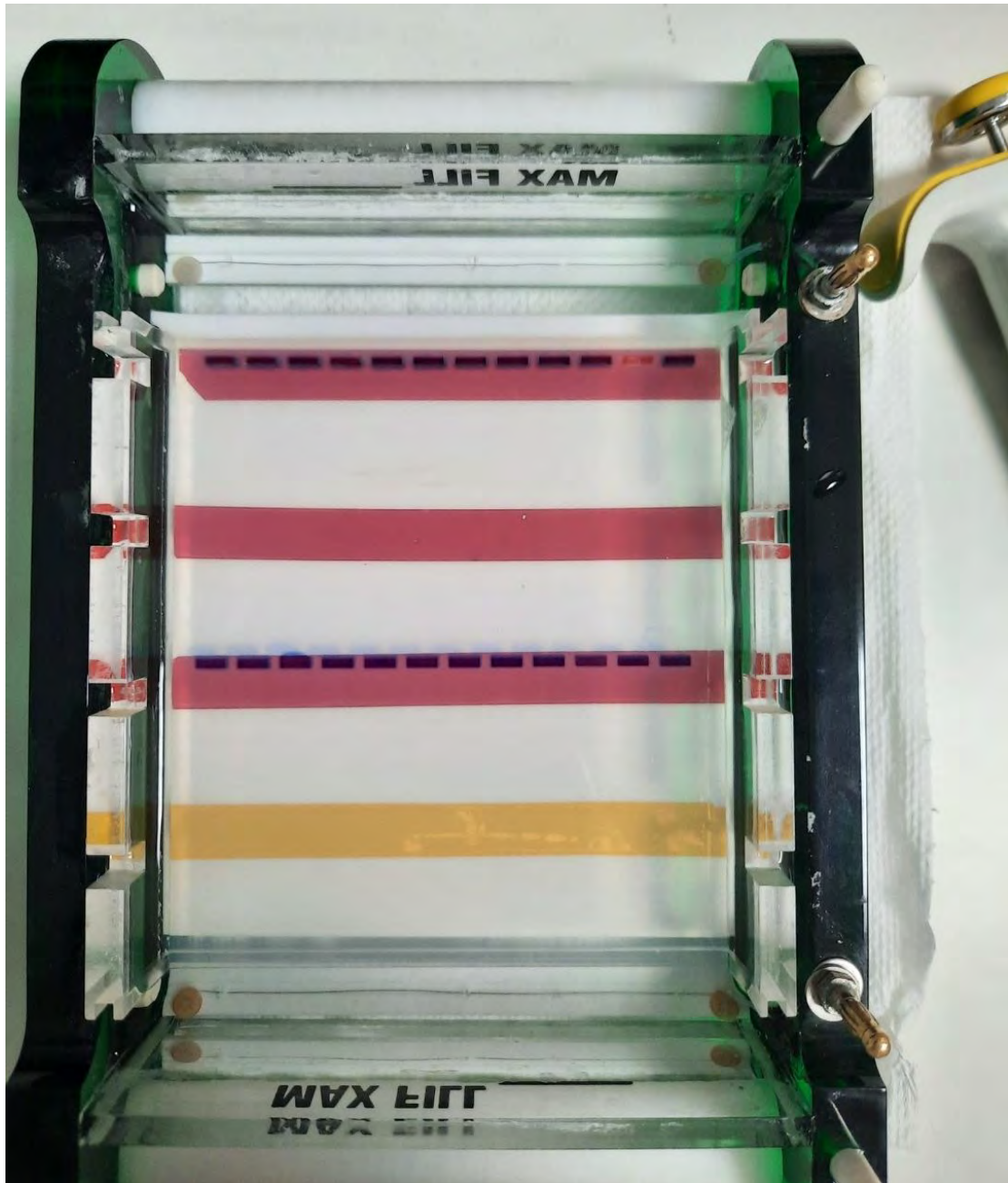
Στη συνέχεια, το διάλυμα τοποθετούνταν σε εκμαγείο της μηχανής ηλεκτροφόρησης. Το εκμαγείο έχει προετοιμαστεί κλείνοντας τις ανοικτές πλευρές του με χαρτοταινία και τοποθετώντας εκατέρωθεν των δύο πλευρικών τοιχωμάτων του 2 «χτενάκια» για τη δημιουργία θέσεων υποδοχής των δειγμάτων όγκου 14 μL. Μετά την πάροδο 20 λεπτών, το διάλυμα είχε αποκτήσει τη μορφή τζελ και μετά την αφαίρεση των χτενιών υπήρχαν και οι μορφοποιημένες θέσεις. Το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στη δεξαμενή προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή του) σε ποσότητα ώστε να υπερκαλύψει το πήκτωμα κατά περίπου 1 mm. Κατά την πλήρωση της δεξαμενής εξασφαλίζεται ότι δεν έχει παγιδευτεί αέρας στο εσωτερικό των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων. Στον χρόνο που παρήλθε μέχρι την πήξη της αγαρόζης τα δείγματα προετοιμαζόταν για ηλεκτροφόρηση, με την ανάμιξή τους με διάλυμα «φόρτωσης»

(χρωστική). Στο κάθε δείγμα γινόταν εφαρμογή της τεχνικής «by pipetting» και κατά την απόσπασή του από το αρχικό Eppendorf στο οποίο βρισκόταν και κατά μίξη του με την χρωστική. Η τελική ποσότητα φόρτωσης για το κάθε δείγμα ήταν 6.5 μL , εκ των οποίων 5 μL DNA και 1.5 μL χρωστικής (Bluebromophenol, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Η χρωστική κρίνεται απαραίτητη κατά την ηλεκτροφόρηση για τον οπτικό διαχωρισμό των υλικών.



Εικόνα 9. Στιγμιότυπο από την προετοιμασία - ανάμιξη των δειγμάτων DNA με τη χρωστική σε παραφίλμ πριν την φόρτωσή τους στο πήκτωμα αγαρόζης.

Πέρα από τα δείγματα που εισάγονται, μια οπή χρησιμοποιείται για την εισαγωγή 1 μL DNA Ladder 1kb, του οποίου ο ρόλος είναι η παροχή πληροφοριών για το μήκος (σε ζεύγη βάσεων, bp) και την ποσότητα (σε ng) των μορίων των εισακτέων δειγμάτων. Το μήκος καθορίζεται από το σημείο στο οποίο σχηματίζεται η μπάντα στο κάθετο άξονα και η ποσότητα από τη φωτεινότητα της μπάντας.



Εικόνα 10. Στιγμιότυπο από την φόρτωση των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρησή τους.

Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής εφαρμοζόταν το καπάκι της συσκευής, έτσι ώστε τα ηλεκτρόδια του τροφοδοτικού να συνδεθούν στους πόλους της δεξαμενής ηλεκτροφόρησης. Το θετικό ηλεκτρόδιο (κάθοδος) τοποθετείται πάντα απέναντι από τις θέσεις υποδοχής των δειγμάτων προκειμένου τα μόρια του DNA να μετακινηθούν κατά τη σωστή φορά στο πήκτωμα

Τέλος, σειρά είχε η εφαρμογή της κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης (100volt) στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης για τη βέλτιστη χρονική περίοδο (30 λεπτά) για τον διαχωρισμό των μορίων DNA.

2.4.5.2. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης

Για την παρατήρηση του πηκτώματος το πήκτωμα τοποθετούνταν προσεκτικά σε ειδικό μηχάνημα με κάμερα UV και Ειδικό Λογισμικό (DNR, Mini Bis Bio-Imaging Systems, Israel). Με την έκθεσή τους σε υπεριώδη ακτινοβολία τα μόρια του DNA φθορίζουν και γίνονται ορατά ως φθορίζουσες ζώνες.

Η φωτογράφιση του πηκτώματος γινόταν με τη βοήθεια του ειδικού εξοπλισμού παρατήρησης DNR που προαναφέρθηκε και ο οποίος επιτρέπει τη λήψη και αποθήκευση φωτογραφιών απευθείας σε ψηφιακή μορφή.

Τα διάφορα τμήματα DNA εμφανίζονται ως φωτεινές ζώνες, λόγω της χρωστικής παρεμβολής φθορίζουν και η χρήση του μάρτυρα τμημάτων DNA γνωστού μεγέθους, μας επιτρέπει τον προσδιορισμό του μεγέθους τμημάτων DNA των δειγμάτων.

2.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

2.5.1. Εκκινητές (Primers)

Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν universal *COI* primers. Το *COI* είναι ένα γονίδιο μιτοχονδριακού DNA που χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες γραμμικής κωδικοποίησης DNA, ενώ οι universal εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου *COI*, είναι σχεδιασμένοι για να λειτουργούν σε ένα ευρύ φάσμα ζωικών ειδών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι universal *COI* primers από Folmer et al., 1994.

2.5.2. Μείγμα PCR (Master Mix)

Για τις ανάγκες της PCR κατασκευάστηκε ένα ενιαίο-μητρικό μείγμα (Master Mix) με τις απαραίτητες ποσότητες αντιδραστηρίων το οποίο θα προστεθεί σε κάθε δείγμα απομονωμένου DNA πριν την εισαγωγή στον θερμικό κυκλοποιητή. Για την παρασκευή του Master Mix απαιτείται προσθήκη ενός (τουλάχιστον) ζεύγους εκκινητών (Forward, Reverse), DNA πολυμεράσης, τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), ρυθμιστικού διαλύματος για τη επίτευξη σωστής λειτουργίας της πολυμεράσης και τέλος υπερκάθαρου ύδατος (ddH₂O). Επιπλέον το Master Mix που δημιουργήθηκε περιέχει διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου MgCl₂. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας: 1) αναγράφονται αναλυτικά οι ποσότητες:

Πίνακας 1. Συσταση MasterMix

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (μL)
Buffer	5
dNTP's	0.2
Primer F	1
Primer R	1
Tak Polymerase	0.2
MgCl ₂	2
ddH ₂ O	9.6

2.5.3. Πρόγραμμα PCR

Η PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο δείγματος 20 μL που αποτελούνταν από 19 μL Master Mix (όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.5.2.) και από 1 μL DNA. Για τις ανάγκες της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε ειδικό μηχάνημα

(θερμοκυκλοποιητής) ενώ τα στάδια κατά τα οποία διενεργήθηκε διακρίνονται: στη μετουσίωση της διπλής έλικας (denaturation), την υβριδοποίηση (annealing) των ειδικών εκκινητών με τις απλές έλικες και την επέκταση (extension) των εκκινητών.

Για τον καθορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας για τους primer που χρησιμοποιήθηκαν, αρχικά πραγματοποιήθηκε βαθμωτή (gradient) PCR στις θερμοκρασίες 48°C, 50.6°C, 52°C, 53.7°C, 56.2°C. Η θερμοκρασία η οποία έδωσε τα βέλτιστα αποτελέσματα για τους primers ήταν 50°C. Έτσι, διαμορφώθηκε συγκεκριμένο πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε. Ο χρόνος της κάθε φάσης, καθώς και ο αριθμός των κύκλων παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας: 2) :

Πίνακας 2. Πρόγραμμα PCR

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ
95°C	15'
95°C	1' (30 κύκλοι)
50°C	45'' (30 κύκλοι)
72°C	45'' (30 κύκλοι)
72°C	10'
10°C	∞

2.5.4. Έλεγχος PCR

Για την αξιολόγηση της επιτυχίας της PCR και για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης εφαρμόστηκε ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης.

Έτσι, με το πέρας του προγράμματος η αλυσιδωτή αντίδραση έχει υλοποιηθεί και τα δείγματα εξέρχονται και ετοιμάζονται για παρατήρηση με τη μέθοδο

ηλεκτροφόρησης πηκτής ακριβώς όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.5., με μόνες διαφορές ότι στην περίπτωση του ελέγχου των αποτελεσμάτων της PCR η συγκέντρωση του πηκτώματος σε αγαρόζη ανερχόταν στο 1,2%, ενώ ο ladder που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο ήταν 100 kb.

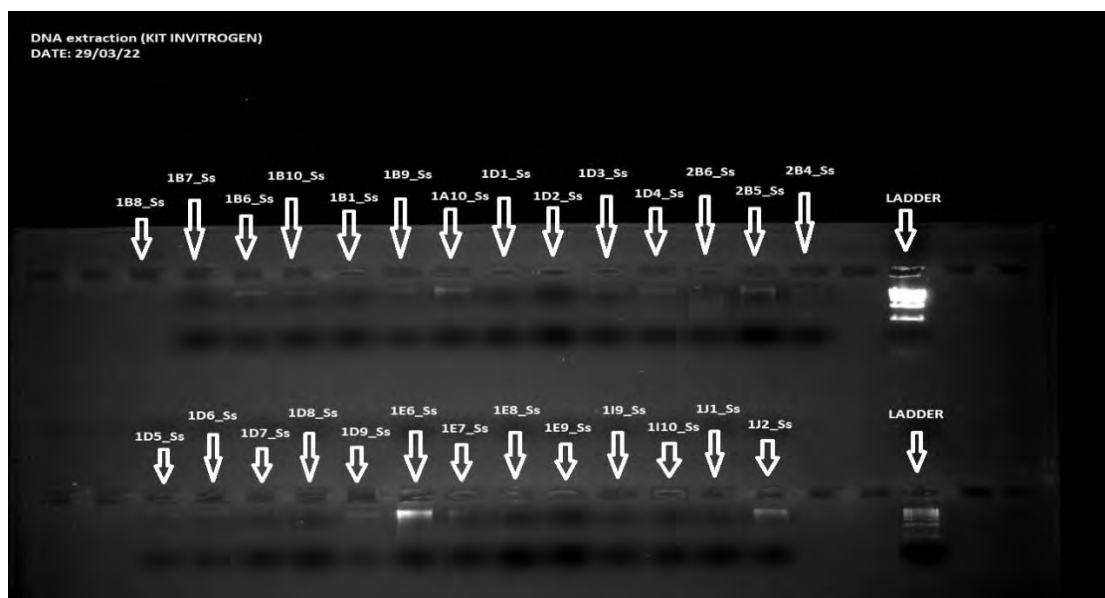
2.6. Αλληλούχιση DNA

Μετά την ενίσχυση, όλα τα επιτυχημένα προϊόντα της PCR στάλθηκαν σε συνεργαζόμενο εργαστήριο για καθαρισμό και αλληλούχιση. Η προκύπτουσα αλληλουχία DNA στη συνέχεια συγκρίθηκε με μια βάση δεδομένων γνωστών αλληλουχιών COI για την αναγνώριση του είδους του οργανισμού.

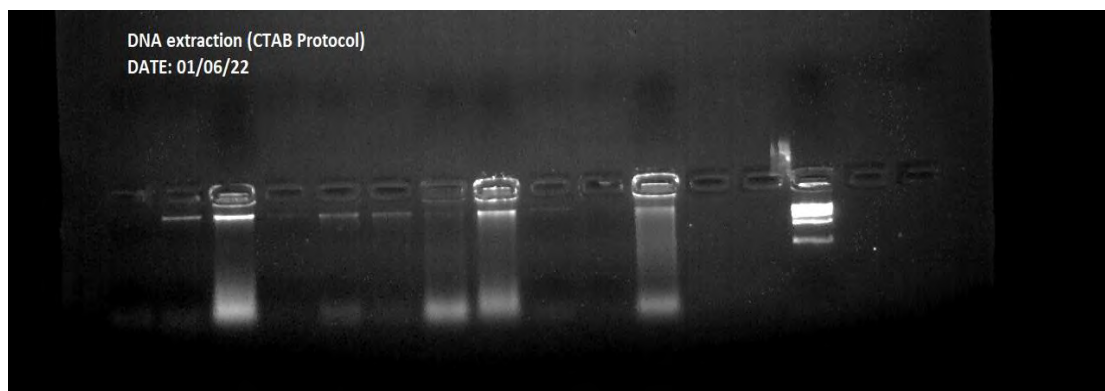
3. Αποτελέσματα

3.1. Αποτελέσματα απομόνωσης DNA

Επιτυχής απομόνωση DNA σημειώθηκε στα 51 από τα 70 (72.9%) συνολικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της δεδομένης μεταπτυχιακής διατριβής. Τα πρωτόκολλα απομόνωσης που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται με λεπτομέρεια στην παράγραφο 2.4. Ακολουθούν εικόνες από τις ηλεκτροφόρησεις σε πήκτωμα-τζελ αгарόζης.



Εικόνα 11. Απεικόνιση αποτελεσμάτων απομόνωσης DNA με KIT, μέσω κάμερας UV.



Εικόνα 12. Απεικόνιση αποτελεσμάτων απομόνωσης DNA με CTAB, μέσω κάμερας UV.

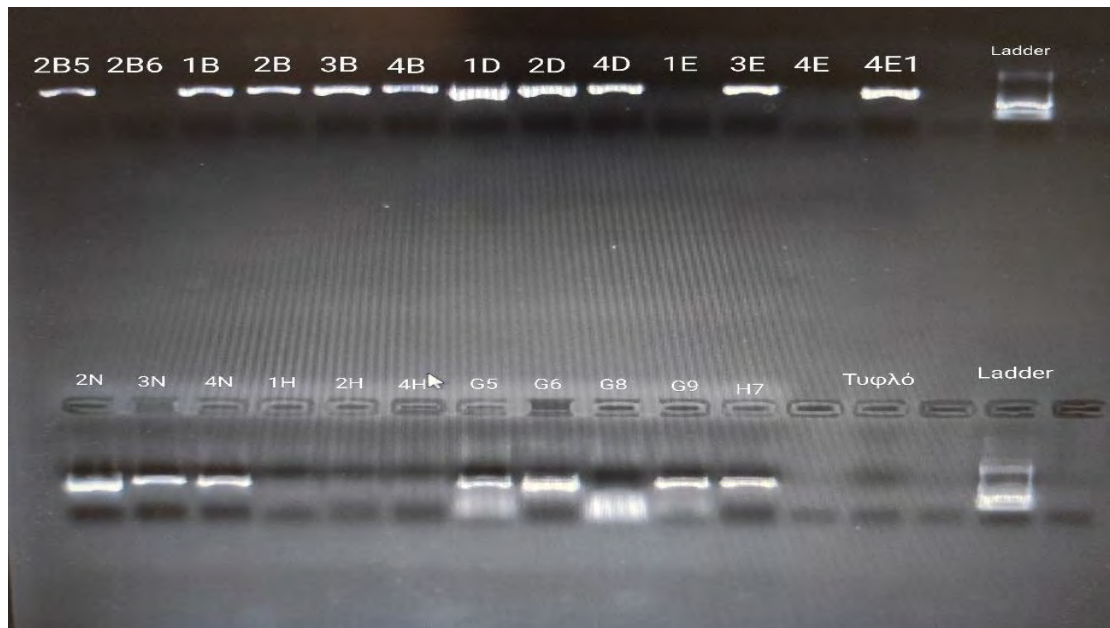


Εικόνα 13. Απεικόνιση αποτελεσμάτων απομόνωσης DNA με Phenol-Chloroform, μέσω κάμερας UV.

Παρόλο που επιτυχία στην απομόνωση του DNA σημειώθηκε και με τα τρία πρωτόκολλα, αυτό που παρουσίασε τα ποιοτικότερα και πιο σταθερά αποτελέσματα στο στάδιο της απομόνωσης ήταν το CTAB Protocol (Εικόνα:12). Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης DNA, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη.

3.2. Αποτελέσματα PCR

Στο σύνολο των επιτυχημένων απομονώσεων διενεργήθηκε ανάλυση PCR με universal primers από το γονίδιο *COI*. Η επιτυχία της ενίσχυσης του απομοωμένου DNA αξιολογήθηκε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτώματα αγαρόζης και με επακόλουθη οπτικοποίηση υπό υπεριώδες φως, όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες. Τα αποτελέσματα της PCR ήταν επιτυχημένα στην πλειοψηφία των δειγμάτων (75%).



Εικόνα 14. Απεικόνιση αποτελεσμάτων PCR με universal *COI* primer, μέσω κάμερας UV.



Εικόνα 15. Απεικόνιση αποτελεσμάτων PCR με universal *COI* primer, μέσω κάμερας UV.

3.3. Αποτελέσματα αλληλούχισης

Μετά την ενίσχυση, τα προϊόντα PCR καθαρίστηκαν και αλληλουχήθηκαν . Η προκύπτουσα αλληλουχία DNA στη συνέχεια συγκρίθηκε με μια βάση δεδομένων γνωστών αλληλουχιών COI για την αναγνώριση του είδους *S.solea*. Μετά την σύγκριση με αλληλουχίες αναφοράς, προσδιορίστηκε η ταξινομική ταυτότητα των δειγμάτων ως *S.solea*. Αλληλουχίες που προέκυψαν από τα δείγματα που αναλύθηκαν στα πλαίσια της δεδομένης ερευνητικής εργασίας δίνονται στο Παράθεμα.

4. Συζήτηση – Συμπεράσματα

4.1. Συζήτηση

Η βιομηχανία τροφίμων αδιαμφισβήτητα βρίσκεται συχνά στη δυσχαιρή θέση να πέφτει θύμα διατροφικής απάτης, ενώ ταυτόχρονα ευθύνεται και η ίδια πολλές φορές για περιστατικά απάτης σε διάφορα προϊόντα τροφίμων (Wisniewski & Buschulte, 2019). Αν και είναι ένα γνωστό πρόβλημα εδώ και πολλά χρόνια, μόνο μετά το μεγάλης κλίμακας και ευρέως δημοσιευμένο «σκάνδαλο με το κρέας αλόγου» του 2013, στο οποίο διαπιστώθηκε ότι προϊόντα βόειου κρέατος ήταν νοθευμένα με κρέας αλόγου, η διεθνής βιομηχανία τροφίμων άρχισε να ενεργεί με συλλογικό τρόπο για την αντιμετώπιση του ζητήματος. Έκτοτε, η βιομηχανία τροφίμων έχει συζητήσει και εφαρμόσει μια σειρά μέτρων που έχουν σχεδιαστεί για την ελαχιστοποίηση της εμφάνισης απάτης στα τρόφιμα. Αυτά τα μέτρα περιλαμβάνουν νέες ρυθμιστικές απαιτήσεις για την πρόληψη της απάτης στα τρόφιμα στις ΗΠΑ και αλλαγές στα πρότυπα ασφάλειας των τροφίμων σε άλλα μέρη του κόσμου. Ο FAO παρακολουθεί προσεκτικά αυτήν την κατάσταση και συμμετέχει σε μια σειρά από δραστηριότητες για να συμβάλει στην προετοιμασία των χωρών να αποτρέψουν την απάτη στα τρόφιμα ή για τον μετριασμό των επιπτώσεών της.

Η νοθεία των αλιευμάτων είναι πλέον πραγματικότητα σε παγκόσμιο επίπεδο και έχει συνέπειες τόσο στο καταναλωτικό κοινό όσο και στο παγκόσμιο εμπόριο, ενώ η καταπολέμηση της είναι μια αδιάκοπη πρόκληση λόγω της συνεχούς εξέλιξης των δόλιων πρακτικών (Acutis et.al, 2019). Τα φαινόμενα της νοθείας μπορεί να εμφανιστούν σε οποιοδήποτε σημείο της εφοδιαστικής αλυσίδας των ιχθύων, ξεκινώντας από τους διεθνείς εισαγωγείς και καταλήγοντας σε εστιατόρια ή ιχθυοπώλες.

Παλαιότερα, η ταυτοποίηση μπορούσε να επιτευχθεί με την αξιολόγηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών (όπως το σχήμα, το μέγεθος και το χρώμα σε διαφορετικά μέρη του σώματος, κλπ.) ή με τεχνικές βασισμένες σε πρωτεΐνες (ηλεκτροφορητικές, χρωματογραφικές ή ανοσολογικές). Ωστόσο, όταν ένα ψάρι απογυμνώνεται από τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά, γίνεται αδύνατο αναγνωριστεί με το μάτι (Deconinck et al., 2023). Ακόμη, εάν ένα δείγμα έχει υποστεί κατεργασία ή είναι μαγειρεμένο, αφενός οι ειδικοί στην ταξινόμηση μπορεί να μην είναι σε θέση να αναγνωρίσουν το δείγμα και αφετέρου οι πρωτεΐνες να έχουν μετουσιωθεί. Επιπλέον, οι πολύπλοκες αλυσίδες εφοδιασμού διευκολύνουν την απάτη να περάσει απαρατήρητη (Deconinck et al., 2023). Χρειάζονται, λοιπόν, τα κατάλληλα εργαλεία για την ανίχνευση πιθανής εξαπάτησης σε αλιευτικά προϊόντα οποιασδήποτε μορφής.

Η χρήση των μοριακών εργαλείων έχει αποδειχθεί πολύ πιο ακριβής από όλες τις άλλες διαγνωστικές μεθόδους που χρησιμοποιούνταν (Ferrito and Pappalardo, 2017). Ειδικότερα, παρά το γεγονός ότι έχουν αναπτυχθεί διάφορες επιτυχημένες μοριακές μέθοδοι για τον εντοπισμό ειδών ψαριών και τον εντοπισμό απάτης σε προϊόντα τροφίμου, η γραμμική κωδικοποίηση DNA δείχνει να αποτελεί την πιο δημοφιλή χάρη στα ακριβέστερα αποτελέσματα που προσφέρει (Minoudi et al., 2020).

Οι μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική πρόταση για την ανάλυση των δειγμάτων βασίζονται στην ταυτοποίηση του γενετικού υλικού (DNA) με στόχο τη δυνατότητα διασταύρωσης στοιχείων με βιοπληροφορική. Καθορίζοντας τη μοριακή ταυτότητα κάθε είδους, προκύπτει μια σειρά αποτελεσματικών μεθόδων για την εκτίμηση της γενετικής αυθεντικότητας και της γενετικής ανίχνευσης τόσο των ιχθύων όσο και των υπόλοιπων αλιευμάτων. Το

πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών συνίσταται στο γεγονός ότι μπορεί να γίνει ταυτοποίηση σε δείγματα οποιασδήποτε μορφής: ωμά, μαγειρεμένα, επεξεργασμένα, κατεψυγμένα.

Όσον αφορά τις περιπτώσεις νοθείας σε πλατύψαρα και πιο συγκεκριμένα για το είδος *S. solea* ο FAO (2018) αναφέρει ότι έχουν εντοπιστεί απάτες με την αντικατάσταση του κυρίως με το είδος *S. senegalensis*, το οποίο αποτελεί φυσικό πληθυσμό της δυτικής αλλά πλέον και ανατολικής μεσογείου καθώς έχει εισαχθεί προς εκτροφή από Ισπανικές και Ελληνικές υδατοκαλλιεργητικές μονάδες ευρείας κλίμακας.

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο της Εισαγωγής όπου αναφέρονται διάφορες περιπτώσεις απάτης σε πλατύψαρα η αγορά κατεψυγμένων θαλασσινών στην Ιταλία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε αντικατάσταση των νωπών και κατεψυγμένων φιλέτων πλατύψαρων. Σε έρευνα των Pappalardo & Ferrito αγοράστηκαν σαράντα δείγματα νωπών και κατεψυγμένων φιλέτων με σήμανση ως ευρωπαϊκή χωματίδα (*Pleuronectes platessa*) και κοινή γλώσσα (*S. solea*) από διάφορα καταστήματα στη Σικελία και την Καλαβρία. Έγινε προσδιορισμός 660 bp της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας γραμμοκώδικα COI από τα φιλέτα και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τις αλληλουχίες μιας βιβλιοθήκης αναφοράς γραμμοκώδικα COI που κατασκευάστηκε προηγουμένως, χρησιμοποιώντας 20 δείγματα των μορφολογικά επικυρωμένων ειδών 35 *Pleuronectiformes* και 43 επιπρόσθετων αλληλουχιών COI πλατύψαρων από τη βάση δεδομένων GenBank. Η έρευνα αυτή υπέδειξε λανθασμένη σήμανση στο 35% και 41% του αρχικού δείγματος των προϊόντων *P. platessa* και *S. solea*, αντίστοιχα. Το *P. platessa* αντικαταστάθηκε από τον *Platichthys flesus*, *Limanda limanda* και *Pangasius hypophthalmus*. Το *S. solea* αντικαταστάθηκε από τον *Arnoglossus laterna* (Pappalardo & Ferrito, 2015).

Οι Tantillo et al., ερεύνησαν επίσης την επικράτηση της λανθασμένης σήμανσης φιλέτων της γλώσσας (*S solea*), της ευρωπαϊκής χωματίδας (*P. platessa*), και κάποιων άλλων ειδών ιχθύων από αγορές και σουπερμάρκετ που βρίσκονται στην νότια Ιταλία χρησιμοποιώντας τον γραμμοκώδικα DNA. Η πιο συχνή εξαπάτηση και με ποσοστό 44,4% παρατηρήθηκε σε φιλέτα της κοινής γλώσσας που αντικαταστάθηκαν με το είδος *S senegalensis*. Επιπλέον, το 46,4% των ατόμων *P. platessa* ταυτοποιήθηκαν ως *Pangasius hypophthalmus*. (Tantillo et al., 2015).

Σε έρευνα που διενεργήθηκε στη βόρεια και κεντρική Ιταλία (Filonzi et al. 2010) αποκαλύφθηκε ψευδής επισήμανση στο 32% των υπό μελέτη δειγμάτων (φρέσκα και κατεψυγμένα φιλέτα ψαριών). Από οικονομικής άποψης η απάτη ήταν μεγάλη, καθώς η εμπορική αξία των δηλωθέντων ειδών στην ιταλική αγορά κατά την περίοδο της έρευνας ήταν της τάξης των 19,90-40,00 ευρώ / kg, ενώ η αξία των ειδών που χρησιμοποιήθηκαν για υποκατάσταση τους κυμαινόταν μεταξύ 8,90 και 11,20 ευρώ / kg (Filonzi et al. 2010). Στην ίδια έρευνα επισημαίνεται επίσης ότι οι περισσότεροι από τους ιχθύες που χρησιμοποιούνται για υποκατάσταση προέρχονται από χώρες εκτός Ευρώπης, όπου οι έλεγχοι των θέσεων εκτροφής, των παθογόνων παραγόντων και της βιοσυσσώρευσης βαρέων μετάλλων είναι ανύπαρκτοι, με αυτό να αυξάνει τις πιθανότητες οι ιχθύες αυτοί να προέρχονται από ρυπασμένα νερά (Filonzi et al. 2010).

Η εσφαλμένη σήμανση προκαλεί επίσης ανησυχίες για τα συστήματα πιστοποίησης («οικολογική σήμανση») που βασίζονται σε αξιόπιστα στοιχεία αναγνώρισης των ειδών και της προέλευσης τους για την υποστήριξη της καταναλωτικής ζήτησης για «βιώσιμα» προϊόντα (Di Pinto et al. 2015). Προηγούμενες μελέτες διαπίστωσαν εκτεταμένη χρήση απειλούμενων ειδών που συμπεριλαμβάνονται στην κόκκινη λίστα του IUCN (2014), για την αντικατάσταση άλλων ακριβότερων εμπορικών ειδών (Di Pinto et al. 2015). Η Ευρωπαϊκή και εθνική νομοθεσία σχετικά

με την ιχνηλασιμότητα και την επισήμανση των τροφίμων συνέβαλε στην πρόληψη και τον έλεγχο των απατών. Τα νομοθετικά αυτά μέσα σε ευρωπαϊκό επίπεδο αντιπροσωπεύονται από γενικούς νόμους, όπως ο κανονισμός 178/2002 και ο κανονισμός 1169/2011, καθώς και συγκεκριμένους νόμους, όπως ο Κανονισμός 1379/2013, που παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την επισήμανση των προϊόντων θαλασσινών, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην προέλευση και το όνομα των ειδών (Pier Luigi Acutis et. al, 2019, EE, 2002, EE, 2011, EE, 2013).

Πρόσφατη έρευνα των Deconinck et al., το 2023, σύγκρινε ως προς την απόδοση και την τιμή, τρία διαφορετικά πρωτόκολλα εξαγωγής DNA. Αναλυτικότερα, η έρευνα πραγματοποιήθηκε για την εξαγωγή DNA από ιστό ατόμων *S. solea* και η απόδοση των πρωτοκόλλων έγινε με βάση ένα έτοιμο εμπορικό κιτ εξαγωγής DNA. Από τα τρία πρωτόκολλα που δοκιμάστηκαν η αλκαλική μέθοδος ήταν αυτή που εμφάνισε τα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα με τον χαμηλότερο χρόνο, αλλά και το λιγότερο κόστος. Συγκεκριμένα, ο συνδυασμός της αλκαλικής μεθόδου με την ανάλυση LAMP βρέθηκε ότι ανιχνεύει την κοινή γλώσσα (*S. solea*) εντός μιας ώρας στο πεδίο και με κόστος λιγότερο από μισό ευρώ. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε σε αυτή τη μελέτη είναι εφαρμόσιμη σε μεγάλης κλίμακας ελέγχους μεμονωμένων προϊόντων (Deconinck et al., 2023).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Minoudi et al., το 2020, και η οποία στόχευε στην αξιολόγηση του ποσοστού εσφαλμένης σήμανσης προϊόντων ψαριών στην Ελλάδα, εντοπίστηκαν αποκλίσεις μεταξύ των δηλωθέντων και των ταυτοποιημένων ειδών σε ποσοστό 12,9% του συνολικού επιτυχώς αναλυμένου δείγματος (263 προϊόντα) και ως εκ τούτου τα προϊόντα αυτά χαρακτηρίστηκαν ως εσφαλμένα. Τα πλατύψαρα (τάξη Pleuronectiformes) παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά λανθασμένης επισήμανσης (28,3%) ακολουθούμενο από τα gadiformes (τάξη

Gadiformes) με 13,7%. Αν και, σε ορισμένες περιπτώσεις, η υποκατάσταση μπορεί να θεωρήθηκε ακούσια λόγω παρόμοιων μορφολογικών χαρακτηριστικών και γεωγραφικής κατανομής μεταξύ των ειδών, στο 55,7% των δειγμάτων με λάθος σήμανση το υποκατεστημένο είδος ήταν χαμηλότερης ποιότητας με αποτέλεσμα αναπόφευκτα και το οικονομικό κέρδος (Minoudi et al., 2020).

Μέχρι σήμερα, ωστόσο, φαίνεται να είναι ελάχιστα τα δεδομένα στις τράπεζες αλληλουχιών (BOLD, MITOFISH, GENBANK) για τα είδη της οικογένειας Soleidae στις Ελληνικές Θάλασσες. Με τη χρήση των τεχνικών DNA barcoding και FINS, που βασίζονται στον πολλαπλασιασμό και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας DNA, θα καταγραφούν οι αλληλουχίες-δείκτες μιτοχονδριακών γονιδίων για τα άτομα που έχουν αλιευθεί στις Ελληνικές θάλασσες. Οι αλληλουχίες θα αναλυθούν ως προς την ομολογία τους με ήδη καταγεγραμμένες αλληλουχίες ατόμων: (α) του ίδιου είδους διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης και (β) συγγενικών ειδών. Οι νέες αλληλουχίες θα κατατεθούν στις τράπεζες αλληλουχιών συμβάλλοντας στην καταγραφή της βιοποικιλότητας των ελληνικών πληθυσμών για τα είδη αυτά. Τα DNA barcodes μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό διαφορετικών ειδών, με τον ίδιο τρόπο που ένας σαρωτής σούπερ μάρκετ χρησιμοποιεί τις γνωστές μαύρες λωρίδες του γραμμωτού κώδικα UPC για να εντοπίσει τα προϊόντα.

Παράλληλα, σε επόμενο στάδιο του προγράμματος πρόκειται να συλλεχθούν δείγματα από νωπά, επεξεργασμένα ή κατεψυγμένα προϊόντα που διατίθενται στην Ελληνική αγορά, παρουσιάζουν ελλιπή σήμανση και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις νοθείας των υπό μελέτη ειδών. Στα δείγματα αυτά θα γίνει ταυτοποίηση τους με DNA sequencing-barcoding και στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη των μεθόδων ανίχνευσης της νοθείας με τεχνικές

PCR. Κάθε καινούργια αλληλουχία που θα προκύψει από τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, θα καταχωρηθεί στο σύστημα Barcode of Life Data Systems (BOLD) database – το οποίο περιλαμβάνει μια βιβλιοθήκη αναφοράς με DNA barcodes και χρησιμοποιείται για να ταυτοποιεί άγνωστα δείγματα.

Το σύστημα BOLD είναι μια τράπεζα δεδομένων, η οποία περιέχει εκτός από τις αλληλουχίες, εικόνες και άλλα στοιχεία (τοποθεσία συλλογής, δείγματος, ερευνητική ομάδα που το ταυτοποίησε), που χρειάζονται στην ιχνηλασιμότητα ενός δείγματος. Η σύγχρονη τάση ταυτοποίησης των αλιευμάτων με τεχνικές που βασίζονται στο DNA sequencing αντικατοπτρίζεται και στην τράπεζα δειγμάτων αναφοράς (Reference Standard Sequence Library -RSSL for Seafood Identification) του οργανισμού FDA, στα οποία αποδίδεται αριθμός ID με τον κωδικό «FDA». Οι τεχνικές που βασίζονται στο DNA sequencing (Sanger) παρέχουν το υψηλότερο περιεχόμενο σε πληροφορία και μπορεί να ταυτοποιηθεί ένα μεγάλο εύρος ειδών. Όμως, είναι χρονοβόρες, για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων απαιτείται ειδικά εκπαιδευμένο επιστημονικό προσωπικό και έχουν σχετικά υψηλό κόστος ανά δείγμα. Συνεπώς, είναι δύσκολη η εφαρμογή τους σε συστηματικούς ελέγχους της αγοράς, όπου για τον εντοπισμό πιθανής νοθείας θα χρειάζεται να συλλέγεται και να εξετάζεται μεγάλος αριθμός δειγμάτων. Για το λόγο αυτό κρίνεται σκόπιμη η επιλογή κάποιας τεχνικής PCR, η οποία θα δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης της νοθείας με υψηλή διακριτική ικανότητα, ταυτόχρονης σάρωσης πολλών δειγμάτων, χαμηλότερο κόστος και ταχύτητα έκδοσης των αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια, μπορεί να γίνει DNA sequencing για τον προσδιορισμό του είδους που χρησιμοποιήθηκε για αντικατάσταση μόνο στα δείγματα που πραγματικά ανιχνεύτηκε νοθεία.

Στο εν λόγω πείραμα οι universal *COI* primers που χρησιμοποιήθηκαν, λειτούργησαν με επιτυχία. Η PCR έδωσε θετικά αποτελέσματα σε μετέπειτα

ηλεκτροφόρησή σε ποσοστό 75%. Σε επόμενο στάδιο, τα δείγματα αυτά στάλθηκαν για αλληλούχιση και έτσι επιχειρήθηκε η ανίχνευση της νοθείας του συνολικού δείγματος αλιευμάτων στο οποίο πραγματοποιήθηκε επιτυχής απομόνωση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης ήταν ενθαρρυντικά καθώς τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν ως *S. Solea* και επομένως δεν ανιχνεύθηκε νοθεία. Σημειώνεται, επίσης, σχετικά με την επιτυχή εφαρμογή των universal primer στο γονίδιο *COI* σε ποσοστό 75% του δείγματος, ότι ανάλογη δοκιμή primer σε οποιοδήποτε άλλο μέρος του γονιδίου ή και σε οποιοδήποτε άλλο γονίδιο αναμένεται να δώσει τα ίδια αποτελέσματα. Τέλος, σε επόμενη φάση της έρευνας θα σχεδιαστούν εξειδικευμένοι εκκινητές συγκεκριμένα για το γονιδίωμα του οργανισμού στόχου. Οι εξειδικευμένοι primers έχοντας υψηλή διακριτική ικανότητα αναμένεται να συμβάλλουν στην ολοκληρωμένη μελέτη του αρχικού δείγματος συμπεριλαμβανομένου και του 25% που δεν ταυτοποιήθηκε σε πρώτη φάση.

4.2. Συμπεράσματα

Η εξακρίβωση της αυθεντικότητας των τροφίμων στον τομέα της αλιείας μπορεί να επιτρέψει μια πιο σωστή διαχείριση της περιβαλλοντικής βιωσιμότητας. Ειδικότερα, η ταυτοποίηση των ειδών ιχθύων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη στήριξη των ερευνών και την αποτροπή της παράνομης, λαθραίας και άναρχης αλιείας και της απάτης σε τρόφιμα, βελτιώνοντας τη διαχείριση της αλιείας και, συνεπώς, τη βιωσιμότητα των φυσικών πόρων.

Παρά το γεγονός ότι στη δεδομένη εργασία δεν εντοπίστηκε υποκατάσταση σε μεγάλο βαθμό στην ελληνική αγορά μέχρι τώρα, βάσει της επικρατούσας κατάστασης παγκοσμίως και του σημαντικού αριθμού άλλων δημοσιευμένων ερευνών που αναφέρουν νοθεία τόσο στα πλατύψαρα όσο και σε άλλα είδη ιχθύων, υπογραμμίζεται η ανάγκη της ιχθυοβιομηχανίας να αναπτύξει και να εφαρμόσει συστήματα για την αξιολόγηση της τρωτότητας της απάτης των ψαριών, προκειμένου να εντοπιστούν οι πιθανές πηγές απάτης στις αλυσίδες εφοδιασμού και να δώσει προτεραιότητα στα μέτρα ελέγχου για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου παραλαβής δόλιων ή νοθευμένων πρώτων υλών ή συστατικών.

5. Βιβλιογραφία

5.1. Ελληνική

Νεοφύτου Χ. (2015). Βιολογία Ιχθύων και Θαλάσσιων Θηλαστικών. Σελ. 405-409, Θεσσαλονίκη, UNIVERSITY STUDIO PRESS

5.2. Ξενόγλωσση

Arvanitoyannis I.S. (2011). TRACEABILITY – AUTHENTICITY OF FISH AND SEAFOOD. 4th International Conference of Hydrobiology – Fisheries, University of Thessaly, School of Agricultural Sciences, Department of Ichthyology and Aquatic Environment, <http://www.apae.uth.gr/conferences/images/stories/papers/oral/O43.pdf>

Bénard-Capelle, J., Guillonneau, V., Nouvian, C., Fournier, N., Le Loët, K., Dettai, A., 2015. Fish mislabelling in France: substitution rates and retail types. PeerJ 2, e714. <https://doi.org/10.7717/peerj.714>

Bouzembrak Y, Steen B, Neslo R, Linge J, Mojtahed V, Marvin HJP (2018). Development of food fraud media monitoring system based on text mining, Food Control, 93 (2018), pp. 283-296, [10.1016/j.foodcont.2018.06.003](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.003)

Céspedes, Ana & Garcia, Teresa & Carrera, Esther & Gonzalez Alonso, Isabel & Fernández, Alicia & Asensio, Luis & Hernandez, Pablo & Martín, Rosario. (2000). Genetic differentiation between sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR–RFLP analysis of a 12S rRNA gene fragment. Journal of the Science of Food and Agriculture.

Civera T, 2003. Species identification and safety of fish products. Vet Res Commun 27:481-9.

Charlebois S, Schwab A, Henn R, Huck CW (2016). Food fraud: An exploratory study for measuring consumer perception towards mislabeled food products and influence on self-authentication intentions. *Trends in Food Science & Technology*, 50 (2016), pp. 211-218, 10.1016/j.tifs.2016.02.003

Christiansen, H., Fournier, N., Hellemans, B., Volckaert, F.A.M., (2018). Seafood substitution and mislabeling in Brussels' restaurants and canteens. *Food Control* 85, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.005>

Cruse C. (2019). Food fraud and the food, drug, and cosmetic act: Bridging a disconnect *Food & Drug LJ*, 74 (2019), p.322

Deconinck, D., Robbens, J., Volckaert, F.A.M., Derycke, S., (2023). Rapid and low-cost identification of common sole (*Solea solea*) in the field using a fast DNA isolation protocol and loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 118, 2023, 105166, ISSN 0889-1575

Deconinck, D., Volckaert, F. A. M., Hostens, K., Panicz, R., Eljasik, P., Faria, M., Derycke, S. (2020). A high-quality genetic reference database for European commercial fishes reveals substitution fraud of processed Atlantic cod (*Gadus morhua*) and common sole (*Solea solea*) at different steps in the Belgian supply chain. *Food and Chemical Toxicology*, 111417. doi:10.1016/j.fct.2020.111417

Ellis DI, Muhamadali H, Haughey SA, Elliott CT, Goodacre R (2015). Point-and-shoot: Rapid quantitative detection methods for on-site food fraud analysis—moving out of the laboratory and into the food supply chain, *Anal. Methods*, 7 (22) pp. 9401-9414, 10.1039/C5AY02048D

- Espineira, M., Gonzalez-Lavin, N., Vieites, J.M., Santaclara, F.J., 2008. Development of a method for the genetic identification of flatfish species on the basis of mitochondrial DNA sequences. *J. Agric. Food Chem.* 56: 8954–8961.
- Everstine K, Spink J, Kennedy S (2013). Economically motivated adulteration (EMA) of food: Common characteristics of EMA incidents, *Journal of Food Protection*, 76 (4), pp. 723-735, 10.4315/0362-028X.JFP-12-399
- FAO. (2018). Overview of food fraud in the fisheries sector, by Alan Reilly. *Fisheries and Aquaculture Circular No. 1165*. Rome, Italy.
- Ferrito V and Pappalardo AM (2017). Seafood species identification by DNA barcoding, a molecular tool for food traceability.
- Filonzi L, Chiesa S, Vaghi M, Marzano FN (2010). Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy.
- Folmer, Ole & Black, Mb & Wr, Hoeh & Lutz, R & Vrijenhoek, Robert. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*. 3. 294-9.
- Herrero, B., Lago, F.C., Vieites, J.M., Espiñeira, M., 2012. Real-time PCR method applied to seafood products for authentication of European sole (*Solea solea*) and differentiation of common substitute species. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 29, 12– 18.
<https://doi.org/10.1080/19440049.2011.623682>

Jiménez Prada, P., Hachero Cruzado, I. y Guerra García, J.M. (2015). Importancia de los anfipodos en la dieta de especies de interés acuícola del litoral andaluz. *Zoologica baetica*, 26, 3-29.

Jose L. Horreoa,*, Patrick S. Fitze, Alberto Jiménez-Valverde, Jorge Ari Noriega, Maria L. Pelaez (2019). Amplification of 16S rDNA reveals important fish mislabeling in Madrid restaurant.

Kappel, K., 2016. Substitution of high-priced fish with low-priced species : Adulteration of common sole in German restaurants 59, 478–486.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.024>

Lago, F. C., Alonso, M., Vieites, J. M., & Espiñeira, M. (2013). *Fish and Seafood Authenticity-Species Identification. Seafood Processing*, 419–452. doi:10.1002/9781118346174.ch16

Lotta F, Bogue J., (2015). Defining food fraud in the modern supply chain, *Eur. Food & Feed L. Rev.*, 10, p. 114

Luque, G.M., Donlan, C.J., 2019. The characterization of seafood mislabeling: A global meta-analysis. *Biol. Conserv.* 1–15.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.04.006>

Manning L. (2016). Food fraud: Policy and food chain *Current Opinion in Food Science*, 10, pp. 16-21, 10.1016/j.cofs.2016.07.001

Manning L, Soon JM (2019). Food fraud vulnerability assessment: Reliable data sources and effective assessment approaches, *Trends in Food Science & Technology*, 91, pp. 159-168, 10.1016/j.tifs.2019.07.007

Maralit, B.A., Aguila, R.D., Ventolero, M.F.H., Perez, S.K.L., Willette, D.A., Santos, M.D., 2013. Detection of mislabeled commercial fishery byproducts in the Philippines using DNA barcodes and its implications to food traceability and safety. *Food Control* 33: 109–125.

Mehanna SF (2007) Stock assessment and management of the Egyptian Sole *Solea aegyptiaca* Chabanaud, 1927 (Osteichthyes: Soleidae), in the Southeastern Mediterranean, Egypt. *Turkish Journal of Zoology*, 31, 379–388.

Minoudi S, Karaiskou N, Avgeris M, Gkagkavouzis K, Tarantili P, Triantafyllidou D, Palilis L, Avramopoulou V, Tsikliras A, Barmperis K, Triantafyllidis A, (2020). Seafood mislabeling in Greek market using DNA barcoding, *Food Control*, Volume 113, 2020, 107213, ISSN 0956-7135, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107213>.

Moyer DC, DeVries JW, Spink J (2017). The economics of a food fraud incident—Case studies and examples including Melamine in Wheat Gluten *Food Control*, 71, pp. 358-364, [10.1016/j.foodcont.2016.07.015](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.015)

Ouanes, K., Bahri-Sfar, L., Ben Hassine, O. K., & Bonhomme, F. (2011). *Expanding hybrid zone between Solea aegyptiaca and Solea senegalensis: genetic evidence over two decades. Molecular Ecology*, 20(8), 1717–1728. doi:10.1111/j.1365-294x.2011.05034.x

Pappalardo AM., Ferrito V., 2015. DNA barcoding species identification unveils mislabeling of processed flatfish products in southern Italy markets. *Fisheries Research* 164: 153–158.

Robson, Kelsey & Dean, Moira & Haughey, Simon & Elliott, Christopher (2020). A comprehensive review of food fraud terminologies and food fraud mitigation guides. *Food Control*. 120. 107516. [10.1016/j.foodcont.2020.107516](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107516).

Sanjuan A, Comesaña AS. Molecular identification of nine commercial flaffish species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a segment of the cytochrome b region. *J Food Prot.* 2002 Jun;65(6):1016-23. doi: 10.4315/0362-028x-65.6.1016.

She JX, Autem M, Kotoulas G, Pasteur N, Bonhomme F (1987) Multivariate analysis of genetic exchanges between *Solea aegyptiaca* and *Solea senegalensis* (Teleosts, Soleidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 32, 357–371.

Spink, J., Bedard, B., Keogh, J., Moyer, D.C., Scimeca, J. and Vasan, A. (2019), International Survey of Food Fraud and Related Terminology: Preliminary Results and Discussion. *Journal of Food Science*, 84: 2705-2718.

<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14705>

Spink, J. and Moyer, D.C. (2011), Defining the Public Health Threat of Food Fraud. *Journal of Food Science*, 76: R157-R163. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02417.x>

Spink J, Ortega DL, Chen C, Wu F (2017). Food fraud prevention shifts the food risk focus to vulnerability, *Trends in Food Science & Technology*, 62 (2017), pp. 215-220, [10.1016/j.tifs.2017.02.012](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.012)

Tantillo G., Marchetti P., Mottola A., Terio V., Bottaro M., Bonerba E., Bozzo G., Di Pinto A., 2015. Occurrence of Mislabeling in Prepared Fishery Products in Southern Italy. *Italian Journal of Food Safety* 4(3): 5358. doi:10.4081/ijfs.2015.5358.

Thompson, M., Sylvia, G., Morrissey, M.T., 2005. Seafood traceability in the UnitedStates: current trends system design and potential applications. *Compr. Rev.Food Sci.* 1: 1–7

Priesnitz, A.& Buschulte, A. (2019). EFFL 1|2019 1 Dealing with Food Fraud
Dealing with Food Fraud -Part 1 A Review of Existing Definitions and Strategies for
the Prevention of Food Fraud, Established in Legal Regulations Focusing on
Germany's Major Trading Partners. European Food and Feed Law Review. 14. 6.

5.3. Ηλεκτρονική

<https://www.efet.gr/index.php/el/consumers/paraplanisi-notheia>

<https://www.fishbase.se/search.php>

<https://www.fishbase.de/summary/Solea-aegyptiaca.html>

https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/solea_spp/en

<http://www.alieia.minagric.gr/node/113>

<http://www.alieia.minagric.gr/node/46>

<https://www.eumofa.eu/el/home>

https://anti-fraud.ec.europa.eu/policy/policies-prevent-and-deter-fraud_el?etrans=el

<https://www.ices.dk/about-ICES/projects/EU-RFP/Pages/ICES-FIshMap.aspx>

http://www.fish-it.org/hcmr/fish.php?species_id=19

<https://www.fao.org/port-state-measures/en>

<https://oceans-and-fisheries.ec.europa.eu/system/files/2016->

[09/information_note01_en.pdf](https://oceans-and-fisheries.ec.europa.eu/system/files/2016-09/information_note01_en.pdf)

6. Abstract

Seafood is a major part of the human diet, and it is a category of high-added-value food products that is prone to fraudulent activities such as species substitution. In the present work, we investigated the authenticity and adulteration of the Soleidae family flatfishes in the Greek market with molecular technics. 70 samples were studied and checked for authenticity. The samples were *Solea solea* catches from the Ionian and Aegean Seas, as well as from Greek internal waters. DNA extraction was successful in 72.9% of the samples. Universal *COI* primers were used to for the PCR reaction. The PCR assay was found to be 75% successful on subsequent electrophoresis. PCR products were sent for sequencing to create a genetic database. Adulteration was not found through the sample.

Key words: Authenticity, Adulteration, Soleidae, DNA extraction, Polymerase Chain Reaction (PCR)

7. Παράρτημα

Αλληλουχίες *S.solea* των δειγμάτων που αναλύθηκαν.

>IONO-1

```
GGGCATCRGGGACGATCAATCTATAATGTTGTCGTTACTGCACATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAG
TAATACCAGTAATGATTGGAGGCTTCGGAAACTGACTCATCCCCCTAATGATCGGAGCCCCGATATAGC
ATTTCCCGAATAAATAACATAAGTTTTTGGACTCCTCCCCCTGCTTTCCTGCTACTTCTCACCTCATCC
GTTGTTGAAGCCGGGGCCGGACAGGATGAACTGTCTACCCCCCTCTATCAAGTAACCTCGCCCATGCAG
GTGCATCCGTCGACCTAACAACTTCTCCCTCCACCTCGCCGGAGTGTCTCAATCCTTGGGGCAATTA
CTTTATCACAACCATCATTAATATGAAACCTGCCACTATAACAATATACCAAATACCCCTATTTGTTTGA
TCTGTGTTAATTWCCGCTTGTCTTCTACTTCTATCCCTACCAGTCTTAGCTGCGGGTATTACAATACTT
CTGACCGACCGAAACCTAAATACMACCTTCTTTGACCCTGC
```

>IONIO-2

```
GGCATCRGGGAAMGATCAATCTATAATGTTGTCGTTACTGCACATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAG
TAATACCAGTAATGATTGGAGGCTTCGGAAACTGACTCATCCCCCTAATGATCGGAGCCCCGATATAGC
ATTTCCCGAATAAATAACATAAGTTTTTGGACTCCTCCCCCTGCTTTCCTGCTACTTCTCACCTCATCC
GTTGTTGAAGCCGGGGCCGGACAGGATGAACTGTCTACCCCCCTCTATCAAGTAACCTCGCCCATGCAG
GTGCATCCGTCGACCTAACAACTTCTCCCTCCACCTCGCCGGAGTGTCTCAATCCTTGGGGCAATTA
CTTTATCACAACCATCATTAATATGAAACCTGCCACTATAACAATATACCAAATACCCCTATTTGTTTGA
TCTGTGTTAATTAYKCTGTCTTCTACTTCTATCCCTACCAGTCTTAGCTGCGGGTATTACAATACTTC
TGACCGACCGAAACCTAAATACAACCTTCTTTGACCCTGCAA
```

>AIFAIO-1

```
GGCGCRKGGGCGATCAATCTATAATGTTGTCGTTACTGCACATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTA
ATACCAGTAATGATTGGAGGCTTCGGAAACTGACTCATCCCCCTAATGATCGGAGCCCCGATATAGCAT
TTCCCGAATAAATAACATAAGTTTTTGGACTCCTCCCCCTGCTTTCCTGCTACTTCTCACCTCATCCGT
TGTGTTGAAGCCGGGGCCGGACAGGATGAACTGTCTACCCCCCTCTATCAAGTAACCTCGCCCATGCAGGT
GCATCCGTCGACCTAACAACTTCTCCCTCCACCTCGCCGGAGTGTCTTCAATCCTTGGGGCAATTAAC
TTATCACAACCATCATTAATATGAAACCTGCCACTATAACAATATACCAAATACCCCTATTTGTTTATC
TGTGTTAATATTTTTTGTCTTCTACTTCTATCCCTACMGCTTAGCTGCGGGTATTACAATWACTTCT
KRACSRACSRAAMCYWAAWCMACCTTCYTTKGACCCTGCAA
```

>AIFAIO-2

```
GCCRRGGAACGATCAAACTATAATGTTGTCGTTACTGCACATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGT
AATACCAGTAATGATTGGAGGCTTCGGAAACTGACTCATCCCCCTAATGATCGGAGCCCCGATATAGCA
TTCCCGAATAAATAACATAAGTTTTTGGACTCCTCCCCCTGCTTTCCTGCTACTTCTCACCTCATCCG
TGTGTTGAAGCCGGGGCCGGACAGGATGAACTGTCTACCCCCCTCTATCAAGTAACCTCGCCCATGCAGG
TGCATCCGTCGACCTAACAACTTCTCCCTCCACCTCGCCGGAGTGTCTTCAATCCTTGGGGCAATTAAC
TTTATCACAACCATCGTTAATATGAAACCTGCCACTATAACAATATACCAAATACCCCTATTTGTTTAT
CTGTGTTAATTACCGCTGTCTTCTACTTCTATCCCTACCAGTCTTAGCTGCGGGTATTACAATACTTCT
GACCGACCGAAACCTAAATACAACCTTCTTTGACCCTGC
```

>AIFAIO-3

```
GCGCRGGAACGATCAATCTATAATGTTGTCGTTACTGCACATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTAA
TACCAGTAATGATTGGAGGCTTCGGAAACTGACTCATCCCCCTAATGATCGGAGCCCCGATATAGCATT
TCCCGAATAAATAACATAAGTTTTTGGACTCCTCCCCCTGCTTTCCTGCTACTTCTCACCTCATCCGT
GTTGTTGAAGCCGGGGCCGGACAGGATGAACTGTCTACCCCCCTCTATCAAGTAACCTCGCCCATGCAGGT
CATCCGTCGACCTAACAACTTCTCCCTCCACCTCGCCGGAGTGTCTTCAATCCTTGGGGCAATTAAC
TATCACAACCATCATTAATATGAAACCTGCCACTATAACAATATACCAAATACCCCTATTTGTTTATC
GTGTTAATTACCGCTGTCTTCTACTTCTATCCCTACCAGTCTTAGCTGCAGGTATTACAATACTTCTGA
CCGACCGAAACCTAAATACAACCTTCTTTGACCCTGC
```

>AIFAIO-4

```
GCGTAKGGAACGATCAATCTATAATGTTGTCGTTACTGCACATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTG
ATACCAGTAATGATTGGAGGCTTCGGAAACTGACTCATCCCCCTAATGATCGGAGCCCCGATATAGCAT
TTCCCGAATAAATAACATAAGTTTTTGGACTCCTCCCCCTGCTTTCCTGCTACTTCTCACCTCATCCGT
TGTGTTGAAGCCGGGGCCGGACAGGATGAACTGTCTACCCCCCTCTATCAAGTAACCTCGCCCATGCAGGT
GCATCCGTCGACCTAACAACTTCTCCCTCCACCTCGCCGGAGTGTCTTCGATCCTTGGGGCAATTAAC
TTATCACAACCATCATTAATATGAAACCTGCCACTATAACAATATACCAAATACCCCTATTTGTTTATC
TGTGTTAATTACCGCTGTCTTCTACTTCTATCCCTACCAGTCTTAGCTGCGGGTATTACAATACTTCTG
ACCGACCGAAACCTAAATACAACCTTCTTTGACCCTGC
```

Φωτογραφίες ειδών που έχουν εντοπιστεί σε περιπτώσεις απάτης που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Microchirus azevia



Πηγή: https://v3.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=86799

Arnoglossus laterna



Πηγή: <https://allabout.fish/arnoglossa/>

Cynoglossus senegalensis



Πηγή: <https://fishsources.com/product/tongue-sole/>

Synaptura lusitanica



Πηγή: http://www.ictieterm.es/nombre_cientifico.php?nc=185

Pegusa lascaris



Πηγή: <https://adriaticnature.com/archives/2416>

Lepidopsetta polyxystra



Πηγή: <https://wdfw.wa.gov/species-habitats/species/lepidopsetta-polyxystra>

Limanda aspera



Πηγή: <https://www.specieshunters.com/menstest.asp>

Microstomus kitt



Πηγή: <https://www.fishbase.se>

Pleuronectes platessa



Πηγή: <https://www.monaconatureencyclopedia.com/pleuronectes-platessa/?lang=en>

Platichthys flesus



Πηγή: <https://psl.brc.ac.uk/photo/platichthys-flesus-flounder>

Pangasius hypophthalmus

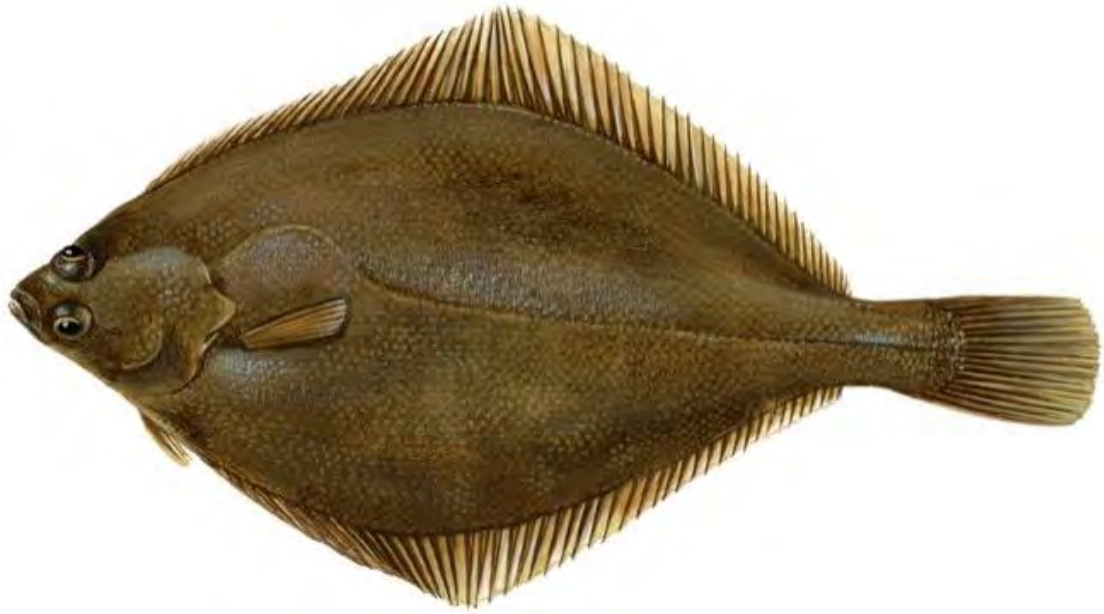


Source: Scandinavian Fishing Year Book

Φιλέτο *Pangasius hypophthalmus*



Limanda limanda



Πηγή: https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/species_el?sn=20627