

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Αυθεντικότητα αλιευμάτων»

Γεώργιος Δοξαστάκης

ΒΟΛΟΣ 2018

«Αυθεντικότητα αλιευμάτων»

Διμελής εξεταστική επιτροπή:

1) Ιωάννης Μποζιάρης, Αναπληρωτής καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Επιβλέπων***.

2) Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, αναπληρωτή καθηγητή κ. Ιωάννη Μποζιάρη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο, για τις χρήσιμες συμβουλές του και την καθοδήγησή του καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας, ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Φωτεινή Παρλαπάνη για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της κατά τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας διατριβής, καθώς επίσης και τον καθηγητή κ. Ιωάννη Αρβανιτογιάννη για την αμέριστη συμπαράστασή του και την πολύτιμη βοήθειά του.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αλιεύματα αποτελούν μία πηγή διατροφής με ξεχωριστή θέση στις διατροφικές μας συνήθειες. Η εμπορική αξία των αλιευμάτων είναι εξαιρετικά υψηλή και γι' αυτό το λόγο είναι αναγκαία η αναζήτηση και η εξέλιξη μοριακών τεχνικών ταυτοποίησης. Η βιομηχανία αλιευμάτων στοχεύει στην ορθή επισήμανση των προϊόντων της και στην ολική ιχθυλασιμότητα και οι μοριακές τεχνικές φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενες στην εκπλήρωση των παραπάνω στόχων. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η εκτεταμένη επισκόπηση των μοριακών τεχνικών που βρίσκουν εφαρμογές σε ελέγχους αυθεντικότητας αλιευμάτων, με έμφαση στις γενετικές τεχνικές.

Στο κεφάλαιο της εισαγωγής γίνεται μια αναφορά στην τρέχουσα κατάσταση στον κλάδο της βιομηχανίας αλιευμάτων όσον αφορά την παραγωγή και τη ζήτηση ενώ στη συνέχεια επισημαίνονται οι κινδύνοι που ενδεχομένως να προκύψουν εξαιτίας της νόθευσης των θαλασσινών. Στο ίδιο κεφάλαιο αναφέρονται οι λόγοι για τους οποίους είναι απαραίτητο να πραγματοποιούνται έλεγχοι αυθεντικότητας στα ιχθυρά ενώ γίνεται επίσης μια εκτενής αναφορά στα ισχύοντα νομοθετικά πλαίσια.

Στο επόμενο κεφάλαιο αναλύονται εκτενώς οι μεθοδολογίες και οι μηχανισμοί δράσης των γενετικών τεχνικών όπως η PCR, η RFLP, η SSCP, η AFLP, η RAPD και το DNA barcoding. Το κεφάλαιο των εφαρμογών παρέχει μια περιεκτική επισκόπηση εφαρμογών των γενετικών τεχνικών σε μελέτες αυθεντικότητας αλιευμάτων. Για τις ανάγκες της διατριβής χρησιμοποιήθηκαν επιστημονικά άρθρα που έχουν δημοσιευτεί μέχρι και σήμερα και αφορούν τις περισσότερο δημοφιλείς ομάδες ψαριών όπως είναι οι γαδίδες, οι σολομονίδες, τα σκομβροειδή, τα περκοειδή, τα μικρά πελαγικά ψάρια, οι γαρίδες και τα κεφαλόποδα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ	8
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
2.1 Σύγχρονες τάσεις στην παραγωγή, στην εμπορία και στην κατανάλωση αλιευμάτων.....	10
2.1.1. Αλιεύματα.....	10
2.1.2. Βιομηχανία αλιευμάτων.....	11
2.2. Νοθεία αλιευμάτων.....	13
2.2.1. Μορφές νοθείας στα αλιεύματα.....	14
2.3. Αυθεντικότητα αλιευμάτων.....	15
2.3.1. Αποσαφήνιση του όρου «αυθεντικότητα».....	15
2.3.2. Σημασία του ελέγχου αυθεντικότητας στα αλιεύματα.....	15
2.3.3 Μελέτες αυθεντικότητας στα αλιεύματα.....	15
2.4. Νομοθετικά πλαίσια.....	18
2.5. Ιχνηλασιμότητα αλιευμάτων.....	20
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΥΘΕΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΑΛΙΕΥΜΑΤΑ	23
3.1. Εισαγωγή στις Μοριακές τεχνικές.....	23
3.1.1 Μοριακοί δείκτες.....	23
3.1.2. Μοριακές τεχνικές.....	24
3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)....	25
3.2.1 DNA πολυμεράση.....	27

3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time Polymerase chain reaction, RT-PCR).....	28
3.4. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP).....	31
3.5. Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP).....	33
3.6. DNA barcoding.....	35
3.7. Τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD).....	37
4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	39
4.1. Μελέτες αυθεντικότητας σε είδη της τάξης Gadiformes.....	39
4.2. Μελέτες αυθεντικότητας σε είδη της τάξης Salmoniformes.....	43
4.3. Μελέτες αυθεντικότητας σε είδη της τάξης Perciformes.....	47
4.3.1. Σκομβροειδή.....	47
4.3.2. Περκοειδή.....	51
4.4. Μελέτες αυθεντικότητας σε μικρά πελαγικά ψάρια.....	55
4.5. Μελέτες αυθεντικότητας σε γαρίδες.....	58
4.6. Μελέτες αυθεντικότητας σε κεφαλόποδα.....	62
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	67
6.1. Ξενόγλωσση.....	67
6.2 Ελληνική.....	84
7. ABSTRACT.....	86

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα τρόφιμα είναι ζωτικής σημασίας για τη ζωή του ανθρώπου. Το φαγητό είναι μια θεμελιώδης προσωπική δραστηριότητα που δεν μπορεί να παραλειφθεί. Ως εκ τούτου η τροφή επηρεάζει τις ζωές όλων μας και η πραγματικότητα αυτή καθιστά το τρόφιμο ως ένα θέμα με παγκόσμιο ενδιαφέρον (Anderson, 2000). Τα τελευταία είκοσι χρόνια έχουν γίνει πολλές σημαντικές αλλαγές στη βιομηχανία τροφίμων. Μερικές από αυτές είναι η (σχεδόν) ολική αυτοματοποίηση, τα νέα υλικά συσκευασίας και η διανομή με ολική ιχνηλασιμότητα. Το εμπόριο τροφίμων έχει παγκοσμιοποιηθεί ενώ ο συστηματικός έλεγχος των διαδικασιών της παραγωγής και της διανομής των τροφίμων, καθώς και η ορθή διαχείριση της τροφικής αλυσίδας (food chain management) είναι πλέον αναγκαία (Τσάκνης, 2008). Οι βιομηχανίες τροφίμων και ποτών βασίζονται στις αλυσίδες εφοδιασμού τους για να εξασφαλίσουν την προτίμηση του καταναλωτή, προσιτές τιμές, σταθερή ποιότητα των προϊόντων τους και τον συνεχή ανεφοδιασμό τους. Κάθε αλυσίδα εφοδιασμού, ανεξάρτητα από το πόσο απλή ή σύνθετη μπορεί να είναι, ενδεχομένως να παρουσιάσει κινδύνους οι οποίοι πρέπει να αντιμετωπιστούν καταλλήλως (Food and Drink Federation, 2013).

Το παγκόσμιο εμπόριο τροφίμων αναπτύσσεται εδώ και αρκετά χρόνια και με την έλευση της παγκοσμιοποίησης είναι πλέον εφικτή η διάθεση των τροφίμων σε κάθε γωνιά του πλανήτη ανεξάρτητα από την περιοχή στην οποία παρήχθησαν (Oosterveer and Sonnenfeld, 2012). Η ανάπτυξη του εμπορίου, ωστόσο, έχει επιφέρει ανησυχίες όσον αφορά την ασφάλεια των τροφίμων, την ποιότητά τους, καθώς και τον τρόπο ή τις συνθήκες επεξεργασίας τους (Bureau et al., 2010). Επί του παρόντος οι πρακτικές της αλυσίδας εφοδιασμού των τροφίμων υπόκεινται σε λεπτομερή έλεγχο σύμφωνα με τις ανάγκες και τις απαιτήσεις των καταναλωτών, στα πλαίσια της ισχύουσας νομοθεσίας.

Στη σύγχρονη εποχή, τόσο η βιομηχανία τροφίμων όσο και οι καταναλωτές έχουν εστιάσει την προσοχή τους σε ένα από τα πιο σημαντικά σημεία που αφορούν την ποιότητα των τροφίμων, την αυθεντικότητά τους. Ο προσδιορισμός της αυθεντικότητας τροφίμων είναι ένα σημαντικό ζήτημα στον έλεγχο ποιότητας και ασφάλειας τροφίμων. Τα τελευταία χρόνια πολλές ασθένειες βρέθηκαν να σχετίζονται με την κατανάλωση νοθευμένων τροφίμων, γεγονός που ώθησε την επιστημονική κοινότητα να εργαστεί εκτενώς σε αυτόν τον τομέα.

Όπως συμβαίνει και με πλήθος προϊόντων έτσι και τα αλιεύματα δύναται να νοθευτούν και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραπλάνηση των καταναλωτών. Στο πλαίσιο αυτό, διαφορετικές τεχνικές που επιτρέπουν την ταυτοποίηση των ειδών δύναται να χρησιμοποιηθούν για να προστατέψουν τα δικαιώματα των καταναλωτών και συγχρόνως να επιτρέψουν ένα «πιστό και έντιμο ανταγωνισμό» στη βιομηχανία των αλιευμάτων (Lago et al., 2013).

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Σύγχρονες τάσεις στην παραγωγή, στην εμπορία και στην κατανάλωση αλιευμάτων

2.1.1. Αλιεύματα

Η ζήτηση των καταναλωτών για υγιεινά προϊόντα διατροφής έχει αυξηθεί δραματικά κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών (Jensen et al., 2011; Tarabella & Burchi, 2012) ενθαρρύνοντας τους καταναλωτές να εφιστούν την προσοχή τους στη διατροφή τους και στην ποιότητα των προϊόντων που καταναλώνουν (Ding et al., 2013). Η αυξημένη προβολή και διαφήμιση των ευεργετικών ιδιοτήτων της κατανάλωσης ιχθύων και θαλασσινών, οδήγησε σε αύξηση της ζήτησης των συγκεκριμένων προϊόντων, καθώς οι καταναλωτές επιζητούν μια πιο υγιεινή διατροφή (Khaksar et., 2015).

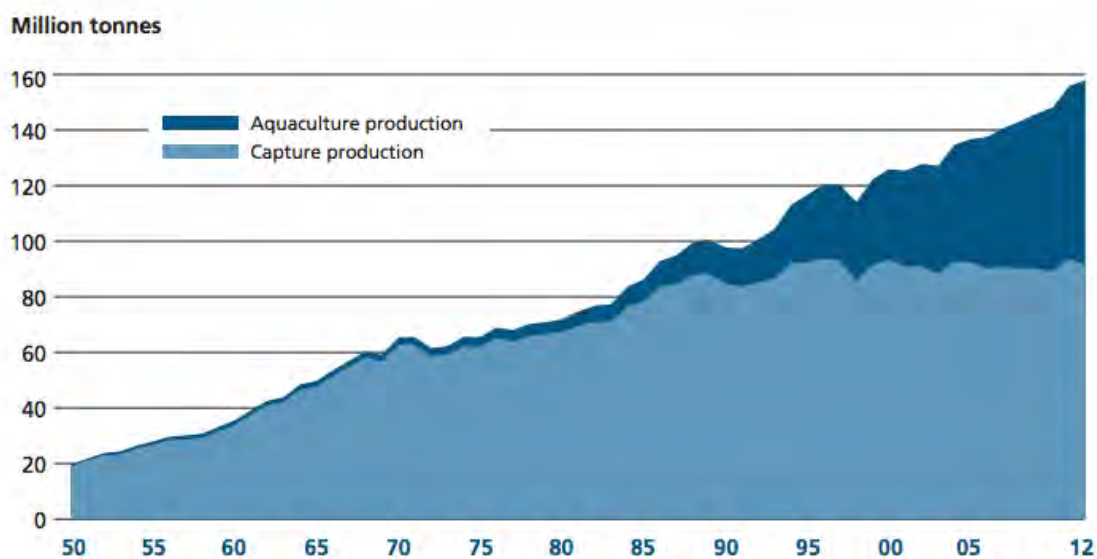
Ο όρος «αλιεύματα» χρησιμοποιείται για να δηλώσει εδώδιμες υδρόβιες μορφές όπως ιχθύες, μαλάκια, καρκινοειδή και εχινόδερμα που είναι διαθέσιμα στο εμπόριο είτε ως ολόκληρα άτομα, είτε ως επεξεργασμένα προϊόντα. Τα ψάρια και τα θαλασσινά έχουν υψηλή θρεπτική αξία όσον αφορά τις ευεργετικές ποσότητες πρωτεΐνης, λιπιδίων και βασικών μικροθρεπτικών συστατικών. Τα αλιεύματα είναι πλούσιες πηγές πρωτεΐνης και έχουν χαμηλότερη θερμιδική πυκνότητα από τα προϊόντα ζωικής προέλευσης. Αξιοσημείωτη είναι επίσης η υψηλή τους περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα λεγόμενα ω-3 και ω-6 (Tacon & Metian, 2013). Τα παραπάνω θρεπτικά συστατικά είναι απαραίτητα για τη σωματική λειτουργία και είναι ευεργετικά για την ανάπτυξη, για τον εγκέφαλο και στο νευρικό σύστημα.

Ισχυροί δεσμοί, συνδέουν την κατανάλωση ιχθύων και θαλασσινών με θετικές επιδράσεις στην υγεία όπως, ο μειωμένος κίνδυνος εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και καρδιαγγειακών παθήσεων, ο μειωμένος κίνδυνος εμφάνισης αρθρίτιδας καθώς και η πρόληψη του καρκίνου, σύμφωνα με αποτελέσματα ερευνών (Hosomi et al., 2012).

2.1.2. Βιομηχανία αλιευμάτων

Τα ψάρια και τα θαλασσινά ανήκουν μεταξύ των περισσότερο εμπορεύσιμων τροφίμων σε παγκόσμιο επίπεδο. Η παραγωγή τους αυξάνεται σταθερά τις τελευταίες δεκαετίες με αξιοσημείωτη εξέλιξη στην υδατοκαλλιέργεια στις τελευταίες δύο δεκαετίες που το 2012 κατάφερε να αντιπροσωπεύει το 42% της συνολικής παραγωγής ιχθύων και θαλασσινών. Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό τροφίμων και γεωργίας (Food and Agriculture Organization, FAO), η παγκόσμια παραγωγή αλιευμάτων το 2012 ήταν 158 εκατομμύρια τόνους (Εικόνα 1) με τους 91,3 εκατομμύρια τόνους να προέρχονται από σύλληψη των ατόμων από εσωτερικά και θαλάσσια ύδατα και τους 66,6 εκατομμύρια τόνους να προέρχονται από υδατοκαλλιέργειες (FAO, 2014).

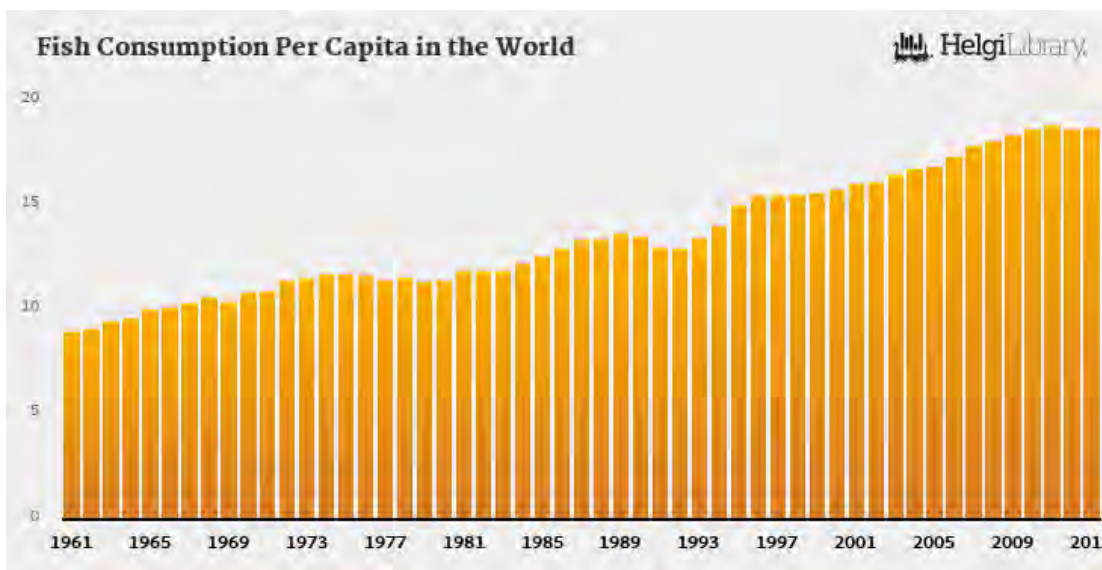
World capture fisheries and aquaculture production



Εικόνα 1. Γραμμική μεταβολή της παγκόσμιας παραγωγής αλιευμάτων στο πέρασμα των χρόνων (FAO, 2014).

Τα τελευταία χρόνια σημειώθηκε τεράστια αύξηση στην κατανάλωση αλιευμάτων εξαιτίας της διαφοροποιημένης στάσης των καταναλωτών για την υγεία και τη

διατροφή. Η κατανάλωση ιχθύων και θαλασσινών αυξήθηκε σημαντικά από κατά μέσο όρο 9.9 κιλά κατ' άτομο το 1960 σε 14,4 κιλά το 1990, σε 19,2 κιλά το 2012 (Εικόνα 2) ενώ για πρώτη φορά ξεπέρασε το όριο των 20 κιλών κατά το έτος 2016 θέλοντας έτσι να δείξει τα υψηλά επίπεδα προτίμησης των καταναλωτών για τη συγκεκριμένη πηγή διατροφής.



Εικόνα 2. Η κατανάλωση αλιευμάτων κατ' άτομο σε παγκόσμιο επίπεδο (Helgi Library).

Η αύξηση του παγκόσμιου εμπορίου αλιευμάτων συνοδεύεται από μεγάλη πολυπλοκότητα στη διάθεση των εμπορευμάτων, με τη διέλευση ορισμένων προϊόντων από πολλαπλά εθνικά σύνορα κατά τη διάρκεια της αλυσίδας εφοδιασμού, συμπεριλαμβανομένων των περιοχών με όχι και τόσο αυστηρές απαιτήσεις ιχθυλασιμότητας (D' Amico et al., 2014).

Λόγω της γρήγορης αλλοίωσής τους, το 50% των προϊόντων αυτών υποβάλλονται σε επεξεργασία πριν διατεθούν στους καταναλωτές και αυτό έχει σαν συνέπεια την απώλεια των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών και έτσι είναι αδύνατη η ταυτοποίησή τους σε όλες τις μορφές τους (Verrez-Bagnis, 2018).

2.2. Νοθεία αλιευμάτων

Πριν από μερικές δεκαετίες, οι περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες κατανάλωναν ψάρια και θαλασσινά που προέρχονταν, σχεδόν αποκλειστικά, από το δικό τους αλιευτικό στόλο και από τις εθνικές τους αλιευτικές περιοχές. Αυτό το γεγονός περιόριζε την κατανάλωση ψαριών σε συγκεκριμένο αριθμό ειδών, τα οποία ήταν οικεία για τους εμπλεκόμενους στον κλάδο. Οι περισσότερες αλιευτικές εκφορτώσεις αποτελούνταν από ολόκληρα άτομα, που δεν είχαν υποστεί καμία μορφή επεξεργασίας. Σήμερα η κατάσταση έχει αλλάξει σημαντικά εξαιτίας ποικίλων παραγόντων όπως, η εξέλιξη των αλιευτικών σκαφών, οι τεράστιες αλλαγές και βελτιώσεις στους τομείς της επεξεργασίας και της συντήρησης, τόσο εν πλω όσο και στη στεριά, η εγκαθίδρυση της σύγχρονης αλιευτικής βιομηχανίας σε ορισμένες αναπτυσσόμενες χώρες όπως επίσης και η παγκοσμιοποίηση της αγοράς. Όλα τα παραπάνω συνέβαλαν στην αύξηση τόσο της ποσότητας όσο και της ποικιλίας των διαθέσιμων νωπών και μεταποιημένων αλιευμάτων (Sotelo & Pérez-Martin, 2003).

Συνεπώς, με την εξάλειψη πολλών εμπορικών φραγμών, δημιουργήθηκε ευνοϊκότερο κλίμα για την ανάπτυξη του εμπορίου των θαλασσινών. Όμως η αυξημένη ζήτηση για άμεσα διαθέσιμα προϊόντα χαμηλότερου κόστους προώθησαν δόλιες πρακτικές όπως η εσφαλμένη επωνυμία και η υποκατάσταση των προϊόντων. Είτε εσκεμμένα είτε ακούσια, είδη χαμηλότερου κόστους πλημμυρίζουν την αγορά και διατίθενται με εσφαλμένη επωνυμία με στόχο την πώλησή τους σε υψηλότερη τιμή. Το πρόβλημα γίνεται ακόμα εντονότερο όταν τα θαλασσινά έχουν υποστεί κάποια μορφή επεξεργασίας όπως για παράδειγμα η φιλετοποίηση, που καθιστά αδύνατη την ταυτοποίηση ειδών με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Από το 2005, έχουν προβληθεί από τα μέσα μαζικής ενημέρωσης, πολυάριθμες περιπτώσεις εξαπάτησης των καταναλωτών με νοθευμένα προϊόντα (Applewhite et al., 2012).

Ανεξάρτητα με την περίπτωση, οποιοδήποτε τρόφιμο παρουσιάζει μεγαλύτερη πιθανότητα να νοθευτεί όταν αυξάνονται η ζήτηση και η τιμή καθώς και όταν εμπλέκονται σύνθετες αλυσίδες εφοδιασμού (Black et al., 2016). Και εφόσον τα αλιεύματα είναι μεταξύ των πιο εμπορεύσιμων προϊόντων διατροφής διεθνώς και σε συνδυασμό με την υψηλή εμπορεύσιμη τιμή τους, θα μπορούσαμε να πούμε ότι πληρούν απόλυτα τα κριτήρια αυτά.

Ως νοθεία ορίζεται «η σκόπιμη αντικατάσταση, προσθήκη, παραποίηση ή παραπλάνηση ενός τροφίμου, ή συστατικών τροφίμων, ή της συσκευασίας τροφίμων, ή ψευδείς ή παραπλανητικές δηλώσεις σχετικά με ένα προϊόν με στόχο το οικονομικό όφελος» (Moore et al., 2012). Η νοθεία τροφίμων με οικονομικό κίνητρο είναι ένα κοινό φαινόμενο εντός της βιομηχανία τροφίμων από τότε που αναπτύχθηκε το εμπόριο (Spink and Moyer 2013) και επιτυγχάνεται με την ολική ή μερική υποκατάσταση ειδών με μεγαλύτερη οικονομική αξία, με παρόμοια είδη χαμηλότερης αξίας. Η νοθεία των αλιευμάτων εκτός από οικονομικά κίνητρα είναι πιθανό να επηρεάσει την υγεία των καταναλωτών (τοξίνες, αλλεργίες κ.α.) και τη βιωσιμότητα των ιχθυοαποθεμάτων (σύλληψη ειδών που προστατεύονται λόγω υπερεκμετάλλευσης).

2.2.1. Μορφές νοθείας στα αλιεύματα.

Τόσο στις εγχώριες όσο και στις διεθνείς αλυσίδες εμπορίας αλιευμάτων, συναντάμε διάφορες μορφές νοθείας. Πρωταρχικό κίνητρο των φαινομένων νοθείας είναι η εξαπάτηση των καταναλωτών με στόχο το οικονομικό όφελος. Ορισμένες από τις πιο κοινές μορφές νοθείας στα αλιεύματα είναι:

- η αντικατάσταση ειδών με μεγάλη οικονομική αξία, από είδη χαμηλότερης οικονομικής αξίας,
- η λανθασμένη επισήμανση των αλιευμάτων με στόχο την απόκρυψη της γεωγραφικής τους προέλευσης ή της παράνομης αλίευσής τους,
- η παράνομη χρήση του εμπορικού ονόματος ορισμένων ειδών σε επισήμανση συγγενικών ειδών,
- η απόκρυψη της χρήσης προσθέτων όπως για παράδειγμα η χρήση παραγόντων δέσμευσης νερού για την παράνομη αύξηση βάρους,
- η προσθήκη νερού σε κατεψυγμένα προϊόντα για την παράνομη αύξηση βάρους,
- η λανθασμένη σήμανση των συστατικών και
- η παράνομη επισήμανση εκτρεφόμενων ειδών ως προϊόντα αλιείας (FAO, 2018).

2.3. Αυθεντικότητα αλιευμάτων

2.3.1. Αποσαφήνιση του όρου «αυθεντικότητα»

Η αυθεντικότητα (authenticity) και η ταυτοποίηση (identification) τροφίμων, αποτελούν δύο αναδυόμενα θέματα του κλάδου των τροφίμων (Karoui et al., 2004) με στόχο την αξιολόγηση της ποιότητας και της ασφάλειας των διαθέσιμων προς κατανάλωση προϊόντων (Danezis et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα, η αυθεντικότητα τροφίμων αποτελεί σημαντικό μέσο για την εξασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων, της ποιότητας των τροφίμων, της προστασίας των καταναλωτών καθώς και της συμμόρφωσης με την εθνική νομοθεσία, τα διεθνή πρότυπα και άλλες κατευθυντήριες γραμμές (Johnson, 2014). Είναι μια σημαντική ανησυχία, όχι μόνο των καταναλωτών, αλλά και των παραγωγών και των διανομέων τροφίμων, ενώ δεν αποτελεί σύγχρονο φαινόμενο εφόσον χρονολογείται από την αρχαιότητα (Posudin et al., 2015).

Αν θέλαμε να ορίσουμε την αυθεντικότητα τροφίμων, θα ήταν η διαδικασία κατά την οποία επαληθεύεται ότι το προϊόν συμμορφώνεται με την περιγραφή της ετικέτας του (Dennis, 1998). Ουσιαστικά οι μελέτες αυθεντικότητας ελέγχουν αν τα τρόφιμα είναι πραγματικά εκείνα, που υποστηρίζει η επισήμανση που παρέχεται από εκείνον που το παράγει ή το επεξεργάζεται. Σημαντικές πτυχές αυτής της περιγραφής είναι η προέλευση (είδους, γεωγραφική ή γενετική), η μέθοδος παραγωγής (συμβατική, βιολογική, παραδοσιακή) και η τεχνολογία μεταποίησης (ακτινοβολία, μικροκύματα, κατάψυξη). Στην Ευρώπη η προέλευση είναι μία από τις κύριες ανησυχίες σχετικά με τα τρόφιμα. Η δήλωση συγκεκριμένων προτύπων ποιότητας σε προϊόντα υψηλής αξίας παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι τα προϊόντα αυτά συχνά αποτελούν στόχους δόλιων πρακτικών (Aung & Chang, 2014).

2.3.2. Σημασία του ελέγχου αυθεντικότητας στα αλιεύματα

Το «σκάνδαλο με το κρέας αλόγου» το 2013, που σχετίζεται με τη νόθευση βοδινών μπιφτεκιών με κρέας αλόγου και που έλαβε χώρα σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, αποτελεί τρανό παράδειγμα τροφίμων που βρέθηκαν να εμπεριέχουν είδος, το οποίο δεν αναγράφονταν στην ετικέτα τους (Stoyke et al., 2013).

Τέτοιου είδους αναφορές υπογραμμίζουν ένα θεμελιώδες ζήτημα που είναι η αδυναμία των καταναλωτών να επαληθεύουν με ακρίβεια τι πρόκειται να καταναλώσουν. Η εσφαλμένη επισήμανση των προϊόντων μπορεί να είναι μια ανέντιμη πράξη, ωστόσο σε χειρότερες περιπτώσεις, η νοθεία μπορεί να έχει σημαντικές οικονομικές και νομικές συνέπειες, όπως επίσης και επιπτώσεις στην υγεία των καταναλωτών (Jacquet & Pauly, 2008).

Η εξασφάλιση της αυθεντικότητας των ιχθύων και των θαλασσιών βελτιώνει τις πτυχές που σχετίζονται με την υγεία, οι οποίες συνδέονται με τη σωστή πληροφόρηση των καταναλωτών, ιδίως όσον αφορά την κατανάλωση προϊόντων που περιέχουν αλλεργιογόνες ουσίες (Sharp & Lopata, 2014).

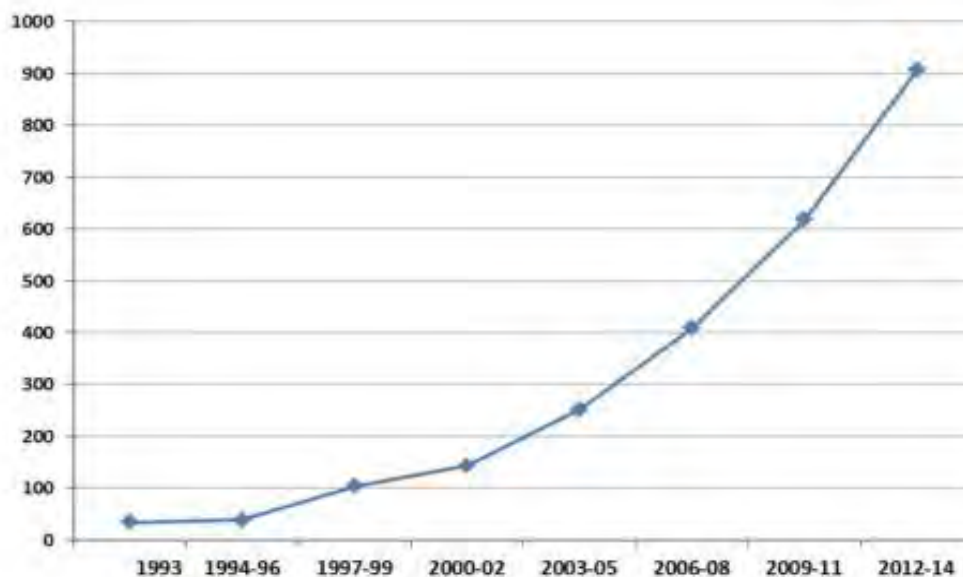
Επιπλέον οι έλεγχοι αυθεντικότητας πρέπει να πραγματοποιούνται και για θρησκευτικούς λόγους, καθώς είναι πιθανό νοθευμένα αλιεύματα να επηρεάσουν την διατροφή ορισμένων ομάδων ανθρώπων η οποία βασίζεται σε αυστηρά θρησκευτικά κριτήρια. Για παράδειγμα φιλέτα γατόψαρου είναι πιθανό να πωληθούν αντί για φιλέτων ειδών με μεγαλύτερη εμπορική αξία, όπως ο οξύρυγχος, γεγονός που μπορεί να εκθέσει τους Μουσουλμάνους στην κατανάλωση, μιας απαγορευμένης για εκείνους, τροφής (Changizi et al., 2013).

Για όλους τους λόγους που είδη αναφέρθηκαν, οι έλεγχοι αυθεντικότητας, σε τρόφιμα όπως τα αλιεύματα, είναι αναγκαίοι για την αποφυγή του αθέμιτου ανταγωνισμού και για την προστασία των καταναλωτών από δόλιες πρακτικές που παρατηρούνται στη βιομηχανία τροφίμων (Asensio et al., 2008). Η ταυτοποίηση ενός είδους είναι δυνατή σε ολόκληρα άτομα βασιζόμενη στα μορφολογικά χαρακτηριστικά αλλά είναι αδύνατη σε επεξεργασμένα άτομα. Για αυτό το λόγο είναι αναγκαία η ανάπτυξη μεθόδων που θα επιτρέψουν την αδιαμφισβήτητη ταυτοποίηση ειδών ανεξάρτητα από το στάδιο ή το βαθμό της επεξεργασίας.

2.3.3. Μελέτες αυθεντικότητας στα αλιεύματα

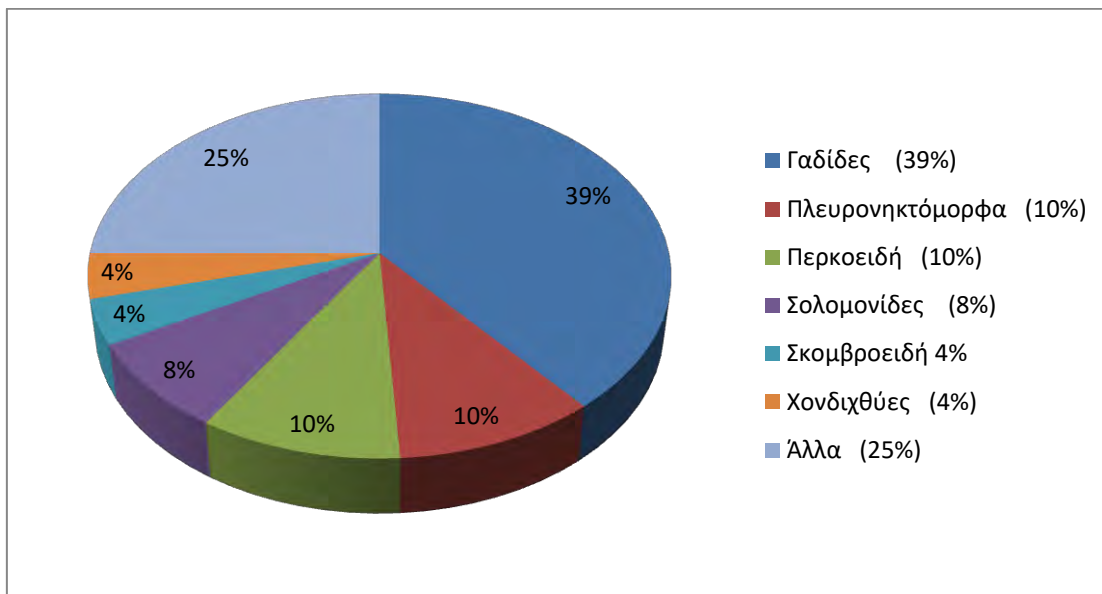
Ο προσδιορισμός της αυθεντικότητας περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα προσεγγίσεων/ τεχνικών ελέγχου. Στο πέρασμα των ετών, διάφορες αναλυτικές τεχνικές

έχουν αξιολογηθεί για την καταλληλότητά τους ως προς τις μελέτες αυθεντικότητας τροφίμων. Οι χρωματογραφικές και μοριακές είναι οι κύριες τεχνικές που παρέχουν απαντήσεις στα ζητήματα αυθεντικότητας τροφίμων. Αυτές οι δύο ομάδες τεχνικών αντιπροσωπεύουν σχεδόν το ήμισυ των δημοσιευμένων εργασιών (Δανέζης, 2016).



Σχήμα 2.1. Χρονική εξέλιξη των δημοσιευμένων εργασιών πάνω στην αυθεντικότητα τροφίμων (Δανέζης, 2016).

Τα ψάρια και τα θαλασσινά ανήκουν στα δέκα πιο επιρρεπή προς νόθευση τρόφιμα (Committee on the Environment, Public Health and Food Safety). Από το σύνολο των εργασιών που πραγματοποιούνται σε παγκόσμιο επίπεδο περίπου το 9% αφορά τα ιχθυρά. Όπως είναι αναμενόμενο για τους ελέγχους αυθεντικότητας στα ιχθυρά, προτιμώνται οι μοριακές τεχνικές. Αυτή η προτίμηση είναι απόλυτα λογική διότι οι μορφές νόθευσης σε αυτά τα προϊόντα πραγματοποιούνται συνήθως με αντικατάσταση των ειδών που αναγράφονται στην ετικέτα, από διαφορετικά είδη ή υποείδη. Ωστόσο η πιθανότητα νόθευσης, διαφέρει από είδος σε είδος όπως και από περιοχή σε περιοχή. Οι έλεγχοι αυθεντικότητας, όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό, πραγματοποιούνται στις περισσότερες επιρρεπείς προς νόθευση ομάδες αλιευμάτων. Στο σχήμα 2.2. παρουσιάζεται η ποσοστιαία κατανομή των ελέγχων αυθεντικότητας με βάση το εξεταζόμενο είδος.



Σχήμα 2.2. Ποσοστιαία κατανομή των ελέγχων αυθεντικότητας με βάση το εξεταζόμενο είδος.

2.4. Νομοθετικά πλαίσια

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία για τα τρόφιμα αποσκοπεί στην διασφάλιση υψηλού επιπέδου προστασίας της ζωής και της υγείας των καταναλωτών μέσω μιας ολοκληρωμένης προσέγγισης αλυσίδας από την παραγωγή στην κατανάλωση, η οποία καλύπτει όλους τους τομείς της αλυσίδας τροφίμων και ζωοτροφών, εγγυάται την ιχνηλασιμότητα καθώς και την πλήρη διαφάνεια των καταναλωτών όσον αφορά την ασφάλεια των τροφίμων και την σωστή και έντιμη πληροφόρησή τους (Di Pinto et al., 2015).

Ο κανονισμός ΕΚ (αριθ) 178/2002) καθορίζει τις γενικές αρχές και απαιτήσεις της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) και τις διαδικασίες σε θέματα ασφαλείας τροφίμων. Αποτελεί τη βάση της Ευρωπαϊκής νομοθεσίας όσον αφορά την τεχνολογία και την ασφάλεια των τροφίμων.

Η επισήμανση των αλιευμάτων έχει σαφέστατα καθοριστεί από το 2002 με τους κανονισμούς ΕΚ (αριθ) 104/2000 και ΕΚ (αριθ) 2065/2001. Ο κανονισμός ΕΚ (αριθ) 104/2000 ,για την κοινή οργάνωση των αγορών των προϊόντων αλιείας και

υδατοκαλλιέργειας καθώς και οι τροποποιήσεις του (ΕΚ 2065/2001), θεσμοθετήθηκε για να προστατέψει τα δικαιώματα των καταναλωτών. Μεταξύ άλλων προβλέπει:

- ◆ τον καθορισμό κανόνων εμπορίας για τα αλιεύματα και ενημέρωσης καταναλωτών,
- ◆ την θέσπιση κανόνων για την εμπορία αλιευμάτων για κράτη μη μέλη της Ε.Ε,
- ◆ την οργάνωση προγραμμάτων παραγωγής και εμπορίας των αλιευτικών προϊόντων,
- ◆ τον καθορισμό τιμών για τα αλιεύματα και διεξαγωγή ελέγχων,
- ◆ τελωνειακές ρυθμίσεις, τιμές αναγωγής και μέτρα διασφάλισης για συναλλαγές με τρίτες χώρες και
- ◆ την λήψη κατάλληλων μέτρων για καταστολή απάτης.

Ο κανονισμός ΕΚ (αριθ) 404/2011 για τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων σχετικά με την εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1224/2009 περί της θέσπισης κοινοτικού συστήματος ελέγχου για την εξασφάλιση της τήρησης των κανόνων της κοινής αλιευτικής πολιτικής, προβλέπει την αναγραφή στην ετικέτα των ιχθύων και των θαλασσινών:

- ◆ της εμπορικής ονομασίας του προϊόντος,
- ◆ της μεθόδου παραγωγής και
- ◆ της περιοχής αλίευσης.

Σήμερα, στις περισσότερες χώρες, η χρήση του επιστημονικού ονόματος του είδους δεν προβλέπεται νομικά. Ωστόσο στην Ευρωπαϊκή Ένωση, ο κανονισμός ΕΚ (αριθ) 1379/2013, ο οποίος:

- ◆ απαιτεί την αναγραφή του επιστημονικού ονόματος είδους στην ετικέτα των προϊόντων αλιείας και ιχθυοκαλλιέργειας που πρόκειται να διατεθούν προς κατανάλωση.
- ◆ Μεταξύ άλλων (σε ισχύ από το 2014) προβλέπει την αναγραφή στην ετικέτα του αλιεύματος τον τύπο και τη μέθοδο αλίευσης.

Ο συγκεκριμένος κανονισμός τροποποιεί τους κανονισμούς (ΕΚ) αριθ. 1184/2006 και (ΕΚ) αριθ 1224/2009 και καταργεί τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 104/2000.

Ωστόσο υπάρχουν ακόμη σημαντικά προβλήματα που αφορούν μεγάλο μέρος της αγοράς με τους κανονισμούς να διαφέρουν από περιοχή σε περιοχή. Διαφορετικά κράτη μέλη μπορούν νόμιμα:

- να ορίσουν επίσημες εμπορικές ονομασίες για τα είδη οι οποίες μπορεί να διαφέρουν από τη μία χώρα στην άλλη,
- να δώσουν ένα συνηθισμένο όνομα για ένα συγκεκριμένο γένος ή/και
- να ομαδοποιήσουν κάποια είδη για εμπορικούς λόγους.

Για τους παραπάνω λόγους οι κανονισμοί επισήμανσης για τα προϊόντα αλιείας πρέπει να γίνονται ολοένα και πιο απαιτητικοί (Lago et al., 2013). Η επισήμανση των θαλασσινών να ρυθμίζεται από κατευθυντήριες γραμμές και οδηγίες σε αν είναι δυνατόν παγκόσμιο επίπεδο, με στόχο πάντα την εξάλειψη της παραπλάνησης των καταναλωτών.

2.5. Ιχνηλασιμότητα αλιευμάτων.

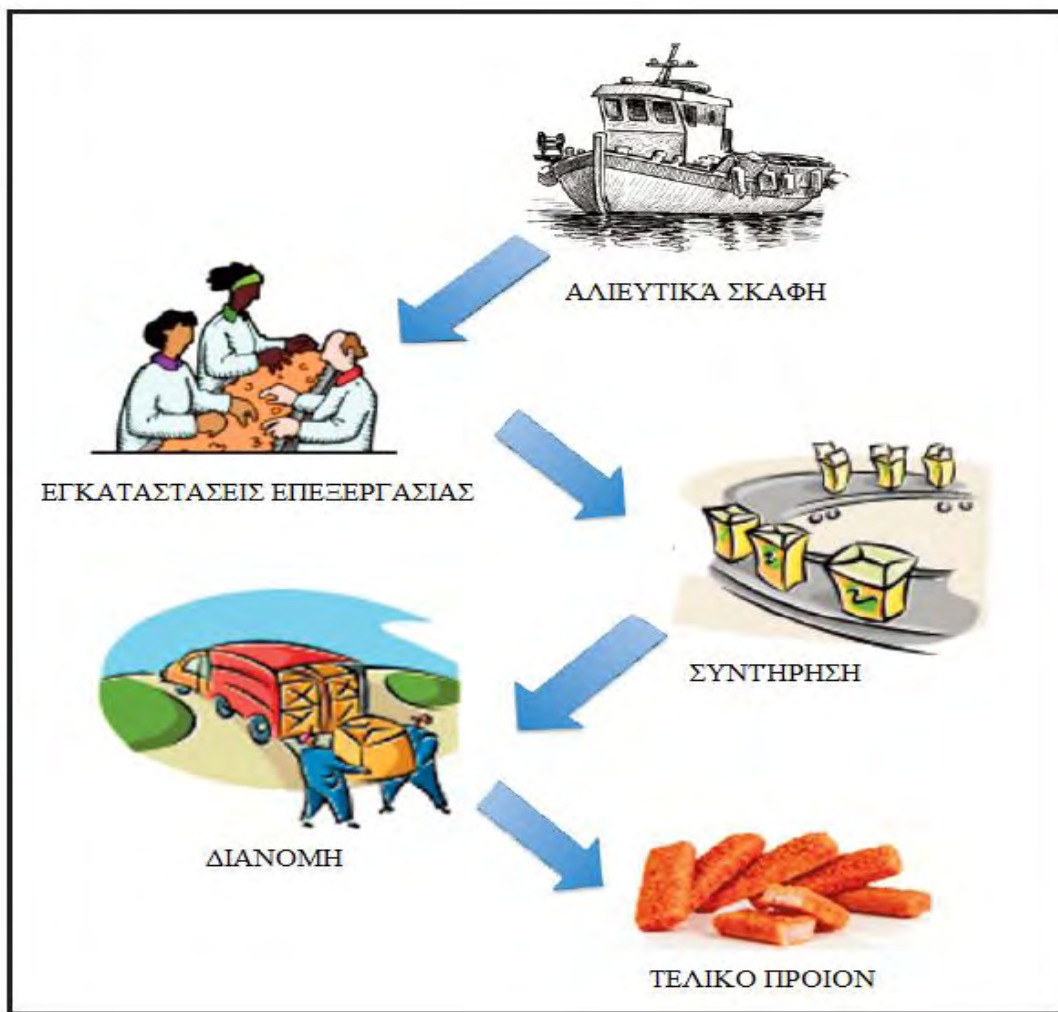
Στις μέρες μας η απόσταση που διανύει ένα τρόφιμο για να πάει από τον παραγωγό στον καταναλωτή έχει αυξηθεί λόγω της παγκοσμιοποίησης του εμπορίου τροφίμων. Ως εκ τούτου η διατήρηση της ασφάλειας και της ποιότητας κατά μήκος της αλυσίδας εφοδιασμού τροφίμων έχει γίνει μια σημαντική πρόκληση. Ένα υψηλό και συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον όσον αφορά την προέλευση των θαλασσινών, έχει ενεργοποιηθεί στη συνείδηση των καταναλωτών που πλέον απαιτούν την διασφάλιση τόσο της ποιότητας όσο και της ασφάλειας των προϊόντων που πρόκειται να καταναλώσουν. Στο πλαίσιο αυτό, η ιχνηλασιμότητα των ψαριών και των θαλασσινών ανταποκρίνεται σε μεγάλο βαθμό στις απαιτήσεις των καταναλωτών.

Η ιχνηλασιμότητα συνδέεται συνήθως με θέματα κινδύνου και ασφάλειας των τροφίμων (Giraud and Amblard, 2003), αλλά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και ως κριτήριο ποιότητας. Πιο συγκεκριμένα η ανιχνευσιμότητα μπορεί να είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την εξακρίβωση της αυθεντικότητας των τροφίμων. Η ιχνηλασιμότητα ή ανιχνευσιμότητα έχει αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία σε σχέση με τα τρόφιμα ιδίως μετά από μια σειρά συμβάντων που αποδόθηκαν σε απουσία ή αδυναμία του συστήματος

ανιχνευσιμότητας (FSA, 2002). Όπως ορίζεται από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 178/2002 του Ευρωπαϊκού κοινοβουλίου και του συμβουλίου, «ανιχνευσιμότητα» είναι η δυνατότητα ανίχνευσης και παρακολούθησης τροφίμων, ζωοτροφών, ζώων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων ή ουσιών που πρόκειται ή αναμένεται να ενσωματωθούν σε τρόφιμα ή σε ζωοτροφές, σε όλα τα στάδια της παραγωγής, μεταποίησης και διανομής τους.

Πιο συγκεκριμένα, η ιχνηθέτηση των προϊόντων είναι η διαδικασία που ακολουθεί το προϊόν από τη σύλληψη έως την κατανάλωση, έτσι ώστε σε κάθε στάδιο της επεξεργασίας να είναι δυνατή η παροχή πληροφοριών. Η ιχνηλάτηση των προϊόντων είναι αντίθετη διαδικασία της αλυσίδας εφοδιασμού τροφίμων και χαρακτηρίζεται από τη συλλογή πληροφοριών σχετικά με την «ιστορία» τους προϊόντος (Εικόνα 3). Ως εκ τούτου, η ιχνηλασιμότητα συμβάλει στη βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με το είδος, την προέλευση, την αυθεντικότητα, την σύσταση και το μέθοδο παραγωγής (για τα προϊόντα ιχθυοκαλλιέργειας) ή τη μέθοδο σύλληψης για τα προϊόντα αλιείας (Ferrito & Pappalardo, 2017).

Τα συστήματα ανιχνευσιμότητας μπορούν να συμβάλλουν στην αναβάθμιση του επιπέδου αξιοπιστίας των πληροφοριών ανιχνευσιμότητας, στη διασφάλιση της διαφάνειας του δικτύου διανομής, στην ταχεία και θετική παροχή πληροφοριών στους καταναλωτές, πελάτες και στις κυβερνητικές υπηρεσίες και στην ενίσχυση της επαληθευσιμότητας της σήμανσης των προϊόντων μέσω της διασφάλισης της πλήρους συμφωνίας μεταξύ του αριθμού ταυτοποίησης και της επισήμανσης (ετικέτας). Από τη σκοπιά του καταναλωτή, η ανιχνευσιμότητα συμβάλει στην αύξηση της εμπιστοσύνης στο σύστημα τροφίμων.



Εικόνα 3. Διάγραμμα ροής της Ιχθυλασιμότητας στη βιομηχανία θαλασσινών. Τα βέλη υποδεικνύουν την ιχθυλάτηση των προϊόντων ή τις διαδικασίες που υπόκειται το προϊόν από την αρχή ως το τέλος (Ferrito & Pappalardo, 2017).

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΥΘΕΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΑΛΙΕΥΜΑΤΑ

3.1. Εισαγωγή στις Μοριακές τεχνικές

3.1.1 Μοριακοί δείκτες

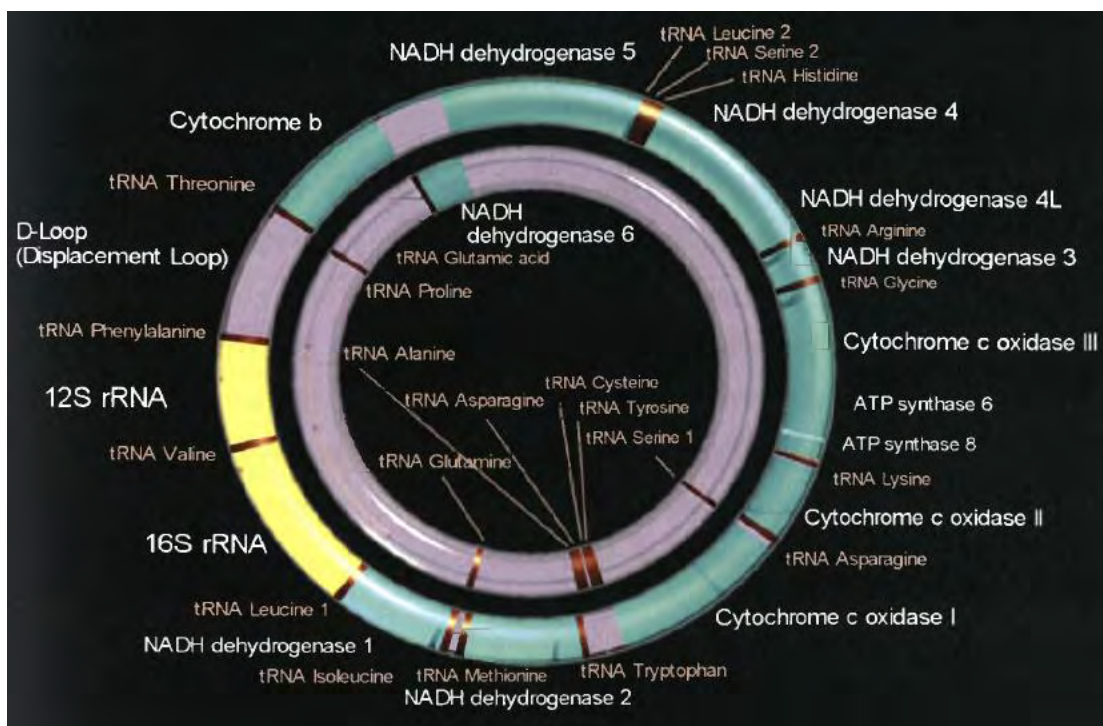
Η χρήση μοριακών δεικτών είναι ευρέως διαδεδομένη σε διάφορους κλάδους της επιστήμης και οι μέθοδοι ανάλυσης των γενετικών δεδομένων βελτιώνονται ταχύτατα. Η εξέλιξη των μεθόδων μοριακής ανάλυσης, είχε σαν αποτέλεσμα να προκύψουν δείκτες για την ανάλυση της παραλλακτικότητας σε επίπεδο DNA. Συνεπώς, εντοπίστηκαν διαφορές, τόσο μεταξύ ολόκληρων τμημάτων DNA, όσο και μεταξύ αλληλουχιών νουκλεοτιδίων σε μια συγκεκριμένη περιοχή.

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι απλοειδές, δίκλωνο κυκλικό μόριο, το μέγεθος του οποίου ποικίλει αρκετές χιλιάδες βάσεις μεταξύ των διάφορων οργανισμών. Στα ψάρια όμως, το μέγεθός του είναι αρκετά σταθερό και κυμαίνεται από 15,2 έως 18,8 χιλιάδες βάσεις (Billington & Hebert, 1991). Ο φυσικός διαχωρισμός του από το πυρηνικό DNA, καθιστά εύκολη την απομόνωση του mtDNA από δισεκατομμύρια άλλα νουκλεοτίδια του γονιδιώματος.

Το εξωκυτταρικό αυτό σύστημα είναι προικισμένο με την ικανότητα να συνθέτει πρωτεΐνες με έναν ημι-αυτόνομο μηχανισμό. Έτσι, το μιτοχονδριακό DNA των σπονδυλωτών (Εικόνα 4) περιλαμβάνει συνολικά 37 γονίδια και χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη σταθερότητα. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν 22 μόρια t-RNA, 2 μόρια rRNA (το *12S* και το *16S* rRNA) και 13 μόρια mRNA, που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι το κυτόχρωμα b (*cytb*), επτά υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5 και 6), τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (*COI*, *COII* και *COIII*) και δύο υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (*ATPase* 6 και 8) (Gyllensten & Wilson, 1987).

Τα τμήματα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος έχουν αποδειχθεί χρήσιμα στις μελέτες αυθεντικότητας των προϊόντων αλιείας (Bossier, 1999). Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι του πυρηνικού στις διαγνωστικές μελέτες λόγω της

μεγαλύτερης αφθονίας στα εξαγόμενα δείγματα του υψηλότερου αριθμού αντιγράφων (Albert et al., 1994). Επιπλέον το μιτοχondριακό γονιδίωμα μητρικής προέλευσης συνεπώς αλληλεπιδράσεις αλληλουχίας από ετερόζυγους γονότυπους, θεωρητικά αποφεύγονται.



Εικόνα 4. Το μιτοχondριακό DNA

3.1.2. Μοριακές τεχνικές

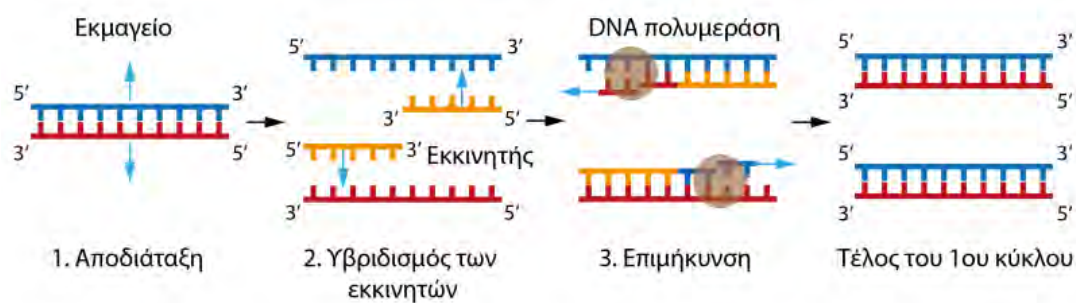
Οι μοριακές διαγνωστικές τεχνικές έχουν αποδειχθεί ως αποτελεσματικά εργαλεία ταυτοποίησης ειδών, ικανές να παρακάμψουν τα εγγενή προβλήματα των μορφολογικών μεθόδων ταυτοποίησης. Παρόλο που, τόσο πρωτεϊνικές μέθοδοι όσο και γενετικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί με στόχο την ανίχνευση αντικατάστασης είδους σε ψάρια και θαλασσινά, οι γενετικές μέθοδοι φαίνεται να είναι πιο συμφέρουσες και επί του παρόντος ευρέως διαδεδομένες στον κλάδο της ταυτοποίησης των ειδών (Rasmussen & Morrissey, 2008). Η γενετική ταυτοποίηση των ειδών βασίζεται στην αρχή του πολυμορφισμού του DNA ή των γενετικών παραλλαγών που πηγάζουν ως

αποτέλεσμα της φυσικής εμφάνισης μεταλλάξεων στο γενετικό κώδικα (Liu & Cordes, 2004).

Οι αναλυτικές τεχνικές που βασίζονται στην ανάλυση πρωτεϊνών (ηλεκτροφοριστικές, χρωματογραφικές και ανοσολογικές τεχνικές) είναι περιορισμένες στη διάκριση των ειδών και ειδικά αν βασίζονται σε αντισώματα (Lockey & Bardsley, 2000). Για παράδειγμα οι πρωτεΐνες που αναλύονται, συχνά μετουσιώνονται κατά τη διάρκεια της θέρμανσης και/ή της επεξεργασίας, είναι από συγκεκριμένους ιστούς και είναι επιρρεπείς σε μολύνσεις (Patterson & Jones, 1990).

3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) είναι ίσως η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος της μοριακής βιολογίας, με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο και είναι αυτή που έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο, ιδιαίτερα για την ανίχνευση της προέλευσης και την ταυτοποίηση των ειδών στα τρόφιμα (Dalmasso et al. 2004). Το 1984, ο Αμερικανικής καταγωγής βιοχημικός Kary Mullis επινόησε μία ευφύεστατη μέθοδο πολλαπλασιασμού ειδικών αλληλουχιών DNA που ονομάστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) (Berg et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα, είναι μια μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την *in vitro* ενίσχυση (δημιουργία πολλών αντιγράφων) ενός τμήματος DNA. Η PCR επιτρέπει σε μια μικρή ποσότητα DNA να αντιγράψει πολλές φορές ώστε να είναι αρκετή και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση. Η τεχνική αυτή βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών απλών αντιδράσεων οι οποίες διαφέρουν στη θερμοκρασία και στο χρόνο (Mullis et al., 1994).



Εικόνα 2. Μηχανισμός δράση της PCR

- A. Διαχωρισμός των αλυσίδων. Στο πρώτο στάδιο γίνεται αποδιάταξη του γονικού μορίου DNA με θέρμανση σε θερμοκρασία από 92°C έως 96°C. Με αυτόν τον τρόπο σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών κλώνων του DNA.
- B. Υβριδοποίηση των εκκινητών. Στο δεύτερο στάδιο με απότομη μείωση της θερμοκρασίας (περίπου 54°C) επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών (primers) με τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA. Ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο άκρο 3' του στόχου της μίας αλυσίδας και ο άλλος στο 3' του στόχου της συμπληρωματικής αλυσίδας. Προσθέτοντας εκκινητές σε περίσσεια αποφεύγεται η υβριδοποίηση του γονικού DNA με τον εαυτό του. Οι εκκινητές συνήθως έχουν μήκος 20 έως 30 νουκλεοτίδια.
- C. Σύνθεση του DNA. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο της διαδικασίας, αυξάνεται η θερμοκρασία στους 72°C, στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει και τους δύο εκκινητές προς την κατεύθυνση της αλληλουχίας στόχου, διότι η κατεύθυνση της σύνθεσης του DNA είναι από το άκρο 5' προς το άκρο 3'. Η σύνθεση του DNA πραγματοποιείται και στις δύο αλυσίδες αλλά προεκτείνεται και πέρα από την αλληλουχία-στόχο (Berg et al., 2010).

Όταν ο πρώτος κύκλος της σύνθεσης έχει ολοκληρωθεί, έχουν παραχθεί δύο νέα δίκλινα μόρια DNA με βάση το αρχικό τους μόριο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές. Επομένως 30 κύκλοι πολλαπλασιάζουν μια αλληλουχία πάνω από 1 δισεκατομμύριο φορές. Η ποιότητα του αποτελέσματος της PCR εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση του DNA υπό εξέταση και από το ποσοστό κατακερματισμού

(fragmentation) του. Όσο μεγαλύτερη η αρχική συγκέντρωση DNA και μικρότερος ο βαθμός κατακερματισμού του, τόσο πιο γρήγορα και αποτελεσματικά η αλληλουχία στόχος πολλαπλασιάζεται με την PCR. Το πρόβλημα του κατακερματισμένου DNA παρουσιάζεται κυρίως όταν εξετάζονται τρόφιμα που έχουν υποστεί πολύ υψηλή επεξεργασία. Συνίσταται να ελέγχεται βαθμός κατακερματισμού πριν ξεκινήσει η PCR (Gryson, 2010).

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR, δηλαδή των προϊόντων εφαρμόζεται η διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης μαζί με μοριακούς δείκτες των οποίων τα μεγέθη θα είναι γνωστά (molecular markers). Σε ορισμένες περιπτώσεις που απαιτείται μεγάλη ακρίβεια στο διαχωρισμό των μορίων DNA (π.χ αλληλούχιση) προτιμάται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Dieffenbach & Dveksel, 2003). Έτσι μπορούμε να διαπιστώσουμε αν το προϊόν της PCR έχει το αναμενόμενο μέγεθος. Τα προϊόντα της PCR γίνονται ορατά με την βαφή του Βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium bromide) το οποίο φθορίζει έντονα κάτω από υπεριώδεις ακτίνες UV όταν συγκεντρώνεται στις περιοχές DNA προϊόντων της PCR, εφόσον παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών των βάσεων του διπλόκλωνου DNA (Hunt, 2006). Το βρωμιούχο αιθίδιο μπορεί να ενσωματωθεί στη πηκτή αγαρόζης πριν την ηλεκτροφόρηση ή να εμβαπτιστεί η πηκτή σε διάλυμα του μετά την ηλεκτροφόρηση.

3.2.1. DNA πολυμεράση

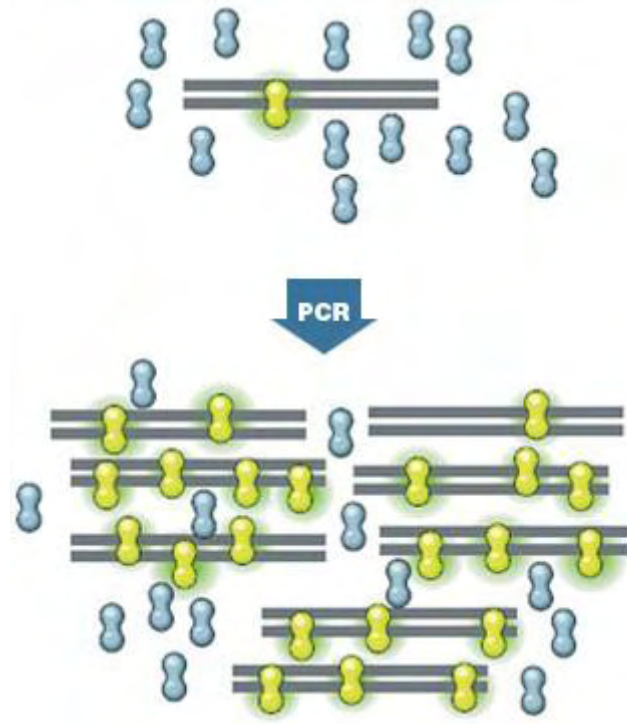
Η επιμήκυνση των εκκινητών είναι αποτέλεσμα της δράσης της DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιεί ως εκμάγειο τις αλυσίδες στόχους. Με τον όρο DNA πολυμεράση, αναφερόμαστε ουσιαστικά σε μία σειρά από ένζυμα που κατασκευάζουν μόρια DNA, συναρμολογώντας τα από νουκλεοτίδια. Καταλύουν δηλαδή τον πολυμερισμό το ξεοξιριβονουκλετιδίων σε μια αλυσίδα DNA. Η DNA πολυμεράση μπορεί να προσθέσει δεοξυριβονουκλεοτίδια μόνο στο 3' άκρο της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας επομένως η επιμήκυνση της νέας αλυσίδας γίνεται με προσανατολισμό 5' -> 3'. Επειδή καμία πολυμεράση δεν μπορεί να ξεκινήσει από μόνη της την σύνθεση μιας νέας αλυσίδας, χρησιμοποιούνται οι εκκινητές.

Θεωρητικά, οποιαδήποτε DNA πολυμεράση είναι κατάλληλη να χρησιμοποιηθεί στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Nicholl, 2008). Στην αρχική τεχνική της PCR χρησιμοποιήθηκε η DNA πολυμεράση της *Escherichia coli*, αλλά εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών που έπρεπε να χρησιμοποιηθούν για να επιτευχθεί η αποδιάταξη των δίκλωνων αντιγράφων του DNA, γινόταν επίσης αποδιάταξη και της ίδιας της πολυμεράσης, με αποτέλεσμα να χρειάζεται επαναπλήρωσή της σε κάθε κύκλο. Αυτό έτεινε να περιορίσει τον αριθμό των κύκλων που μπορούσαν να πραγματοποιηθούν και ανέβαζε το κόστος. Το πρόβλημα λύθηκε με τη χρήση μιας DNA πολυμεράσης ανθεκτικής στις υψηλές θερμοκρασίες, η όποια απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η συγκεκριμένη πολυμεράση, γνωστή και ως πολυμεράση *Taq*, διατηρείται σταθερή στους 95°C και έτσι δεν επηρεάζεται κατά το βήμα της αποδιάταξης που απαιτείται στην αντίδραση PCR. Η χρησιμοποίηση της *Taq* πολυμεράσης κατέστησε ικανή την αυτοματοποίηση της PCR. Επίσης το προϊόν της είναι πιο ομοιογενές από εκείνο που λαμβάνεται με τη χρήση ενζύμου της *E. coli*, αφού σε υψηλές θερμοκρασίες μειώνεται σημαντικά η πιθανότητα τυχαίας υβριδοποίησης των εκκινητών με DNA δεν είναι συμπληρωματικό. Το πρόβλημα της *Taq* πολυμεράσης είναι ότι δεν διαθέτει μηχανισμό διορθωτικής ανάγνωσης, συνεπώς κάνει περισσότερα λάθη από το ένζυμο της *E. coli* (Madigan et al., 2010).

3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time Polymerase chain reaction, RT-PCR)

Μια καινοτόμα γενετική τεχνική για την ταυτοποίηση των ειδών, είναι η εφαρμογή συγκεκριμένων ιχνηθετών DNA μέσω της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Σε αντίθεση με τις συνηθισμένες τεχνικές PCR, η PCR πραγματικού χρόνου έχει πρόσφατα εξελιχθεί ως τεχνική για μελέτες αυθεντικότητας σε τρόφιμα. Αυτή η μεθοδολογία βασίζεται στον υβριδισμό ενός ιχνηθέτη ,που σχεδιάστηκε για συγκεκριμένο είδος, με το DNA στα υπό ανάλυση δείγματα. Μόνο το DNA που είναι συμπληρωματικό του συγκεκριμένου ιχνηθέτη, υβριδίζεται με αυτόν (Herrero et al., 2010). Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιείται για να μετρήσει με ακρίβεια την συγκέντρωση (ποσότητα) μιας DNA αλληλουχίας στόχου σε ένα δείγμα ενώ η διαδικασία γίνεται παρουσία μιας ενώσεως

που φθορίζει μόνο όταν δεσμεύεται σε δίκλωνο DNA και επομένως όσο περισσότερο συντίθεται η συγκεκριμένη αλληλουχία-στόχος στο δείγμα, τόσο αυξάνεται ο φθορισμός. Έτσι η PCR πραγματικού χρόνου είναι η συνεχής συλλογή σήματος φθορισμού από μία ή περισσότερες αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης σε μία σειρά κύκλων. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου είναι η μετατροπή των σημάτων φθορισμού από κάθε αντίδραση αριθμητική τιμή για κάθε δείγμα (Shiple, 2006). Ο φθορισμός που εκπέμπεται αυξάνεται ανάλογα με τη συγκέντρωση του νεοσυντιθέμενου DNA και καταγράφεται σε ένα σύστημα H/Y. Σχεδιάζεται μια πρότυπη καμπύλη της ποσότητας φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της PCR με δείγματα γνωστής αρχικής συγκέντρωσης DNA και ορίζεται ένα όριο φθορισμού. Καταμετράται ο αριθμός των κύκλων PCR που χρειάζεται ένα δείγμα προκειμένου να περάσει το όριο φθορισμού και ορίζεται ως Ct. Όσο πιο γρήγορα ένα δείγμα υπερβεί το όριο Ct, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της DNA αλληλουχίας στόχου που περιέχεται στο δείγμα (Μπατρίνου, 2011). Τα στάδια της ενίσχυσης και της ανάλυσης πραγματοποιούνται μέσα σε κλειστό σωλήνα, ώστε να μη χρειάζονται περαιτέρω τεχνικές ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού των προϊόντων ενίσχυσης (amplicons). Μία από τις χρωστικές που χρησιμοποιούνται είναι η Sybr green η οποία έχει το χαρακτηριστικό να προσκολλάται μόνο σε διπλή έλικα DNA και ο εκπεμπόμενος φθορισμός είναι ανάλογος της ποσότητας DNA που υπάρχει (εικόνα 3).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση του εκπεμπόμενου σήματος για κατανόηση του τρόπου δράσης της μεθόδου (RT-PCR).

Αυτή η τεχνική αποκτά όλο και μεγαλύτερη σημασία λόγω της ευρωστίας της και της ευαισθησίας της και της ταχύτητάς της, ειδικά στην περίπτωση της ταχείας PCR πραγματικού χρόνου (fast real-time PCR), ενώ έχει περάσει από σχεδόν αποκλειστική μέθοδο της μικροβιολογίας, σε μέθοδο που κυρίως χρησιμοποιείται στην ταυτοποίηση ιχθύων (Bayha, 2008). Τα στάδια μετά την PCR χαρακτηρίζονται από αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης και η ποσοτικοποίηση με ηλεκτροφόρηση είναι δύσκολη, ανακριβής και απαιτεί μεγάλη εμπειρία. Ανάμεσα λοιπόν στα πλεονεκτήματά της PCR πραγματικού χρόνου είναι και το γεγονός ότι επιτρέπει με τη χρήση φθορισμού την εξαλείψη κάποια στάδια της κλασικής PCR όπως η ηλεκτροφόρηση πηκτής και η χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο του DNA στόχου, διευκολύνοντας έτσι την αυτοματοποίηση της διαδικασίας και την επεξεργασία δείγματος μεγάλης κλίμακας (Herrero et al., 2011a). Σε σύγκριση πάλι με την κλασική PCR η PCR πραγματικού χρόνου χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη πιθανότητα ανάμιξης του DNA στόχου με το μίγμα της PCR, διότι οι σωλήνες αντίδρασης παραμένουν κλειστοί καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Επίσης ο κύκλος ορίου (Ct) παρατηρείται όταν η ενίσχυση της PCR είναι ακόμη σε εκθετική φάση και κανένα από τα συστατικά της αντίδρασης δεν είναι

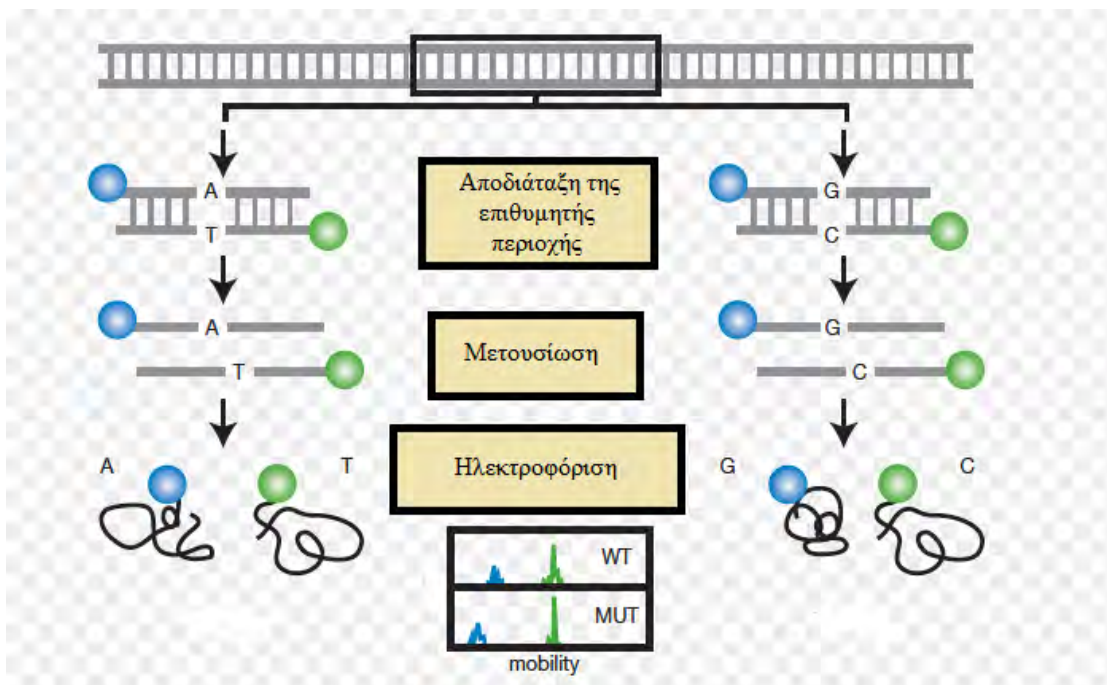
περιορισμένο (Heid et al., 1996). Ένα ακόμη πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι εκτός από την πιθανή αυτοματοποίηση, ότι μπορεί να εφαρμοστεί από όλα τα εργαστήρια ελέγχου χωρίς απαραίτητα μεγάλες επενδύσεις σε εξοπλισμό (Herrero et al., 2011b).

Από την άλλη, η ακρίβεια αυτής της μεθόδου μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες, όπως από την απόδοση του DNA των δειγμάτων η οποία μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με το στάδιο επεξεργασίας του αλιεύματος και από το γεγονός ότι το υλικό δειγματοληψίας μπορεί να υποβληθεί σε θερμική επεξεργασία με διάφορους τρόπους. Εξάλλου, λόγω του κόστους της διαδικασίας, η τεχνική προτιμάται σε προϊόντα με αξιοσημείωτη οικονομική αξία (Gil, 2007). Ωστόσο, παρόλο που η τεχνική αυτή έχει μεγαλύτερο κόστος από την «παραδοσιακή PCR, το γεγονός αυτό αντισταθμίζεται με την μεταγενέστερη εξοικονόμηση χρόνου και χρημάτων.

3.4. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP).

Συνήθως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης συνδυάζεται με άλλες τεχνικές, ικανές να εντοπίσουν τις διαφορές στην αλληλουχία των προϊόντων που παρέχονται από την ενίσχυση της PCR. Μέχρι τώρα, η ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας ήταν μια πολύ συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική, για αυτό το σκοπό (Rehbein et al., 1997). Η SSCP χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1989. Στηρίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει μικρών διαφορών στην αλληλουχία τους, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας διαφορετικής δευτεροταγούς δομής, η οποία προκαλεί διαφορά στη κινητικότητα των μορίων αυτών μέσα σε πήκτωμα ακόμα και αν διαφέρουν κατά μία βάση. Η κινητικότητα των δίκλωνων μορίων DNA μέσα σε ένα ηλεκτροφορητικό πήκτωμα εξαρτάται από το μέγεθος και το μήκος του μορίου και είναι σχετικά ανεξάρτητη από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του. Εν τούτοις, στα μονόκλιωνα μόρια DNA η κινητικότητα επηρεάζεται αισθητά όταν συμβαίνουν μικρές αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία. Αυτό συμβαίνει λόγω της ασταθούς φύσης του

μονόκλωνου DNA απουσία συμπληρωτικού κλώνου, καθώς το μονόκλωνο μόριο δύναται να σχηματίσει ενδομοριακούς δεσμούς, οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αναδιπλώσεων και θηλειών, προσδίδοντάς του μία χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή. Η μέθοδος SSCP εκμεταλλεύεται ακριβώς αυτή την ιδιότητα του μονόκλωνου DNA (Orita et al., 1989). Έτσι, τμήματα DNA του ίδιου γονιδίου που έχουν ενισχυθεί με PCR, από διαφορετικά άτομα και που παρουσιάζουν νουκλεοτιδικές διαφορές, θα έχουν και διαφορετική κινητικότητα κατά την ηλεκτροφόρηση και επομένως θα είναι δυνατή η διάκρισή τους.



Εικόνα 4. Μηχανισμός δράσης της ανάλυσης SSCP.

Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τρία στάδια:

- ♦ την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR,
- ♦ την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και
- ♦ τη χρώση της πηκτής.

Η ανάλυση SSCP, επιτρέπει την ταχεία και ταυτόχρονη ανίχνευση διάφορων νουκλεοτιδικών παραλλαγών, με ποσοστό ανίχνευσης που πλησιάζει το 100% γεγονός που αποκαλύπτει πως πρόκειται για μία ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό της γενετικής ποικιλομορφίας (Πατρινός, 2008). Επίσης η τεχνική επιτρέπει με ασφαλή τρόπο την άμεση παρατήρηση φυσιολογικής ή μη ζώνης του DNA και μπορεί να προσδιορίσει με μια ανάλυση άγνωστες μεταλλάξεις. Πρόκειται για μία σύντομη, πολύ απλή, πρακτική και εύκολη τεχνική εφόσον αναπτυχθεί σε ένα εργαστήριο (Saubusse et al., 2007). Ένα ακόμη πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ότι με την εξέταση των μεταλλάξεων πριν από την ανάλυση της αλληλουχίας, μπορεί να μειωθεί το κόστος και ο χρόνος ταυτοποίησης των μεταλλάξεων. Ακόμη, η ποσότητα του DNA που απαιτείται, είναι πολύ μικρή. (Fernández et al., 2002; Céspedes et al., 1999).

Από την άλλη οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι πολύ ευαίσθητες και συχνά παρατηρείται αδυναμία πρόβλεψης της κινητικότητας των ζωνών. Στις αδυναμίες τις μεθόδου θα μπορούσαν να προστεθούν επίσης η ανάγκη για δεδομένα αλληλουχίας για το σχεδιασμό εκκινητών PCR και η αναγκαιότητα εξαιρετικά σταθεροποιημένων ηλεκτροφορητικών συνθηκών προκειμένου να επιτευχθούν αναπαραγωγίμα αποτελέσματα (Hayashi, 1992). Επιπλέον μερικές μεταλλάξεις μπορεί να παραμείνουν μη ανιχνεύσιμες και συνεπώς δεν μπορεί να αποδειχθεί η απουσία μετάλλαξης. Ένα ακόμη μειονέκτημα της PCR-SSCP είναι η ανάγκη της χρήσης ραδιοϊσοτόπων (Iwahana & Itakura, 1998).

3.5. Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP)

Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα RFLPs (Botstein et al., 1980). Πρόκειται για μοριακό δείκτη, ο οποίος βασίζεται στην παραγωγή διαφορετικού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων μετά από πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα (Williams et al., 1990).

Πιο συγκεκριμένα, ο όρος RFLP προέρχεται από τα αρχικά των λέξεων Restriction Fragment Length Polymorphism, που μεταφράζεται ως Πολυμορφισμός Μήκους

Θραύσματος εκ Περιορισμού. Η χρήση ενζύμων περιορισμού επιτρέπει την κατάτμηση του DNA. Τα θραύσματα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για διάφορους σκοπούς μεταξύ των οποίων και η ανάλυση γενετικών διαφορών. Δύο ομόλογα τμήματα DNA (με την ίδια αλληλουχία βάσεων) έχουν τις ίδιες θέσεις τομής ποιοτικά και ποσοτικά και επομένως τα θραύσματα που προκύπτουν μετά από την κατεργασία τους με το ίδιο ένζυμο, έχουν το ίδιο μέγεθος.

Όλα τα βακτήρια συνθέτουν εξειδικευμένες ενδονουκλεάσες που λέγονται περιοριστικά ένζυμα ή ενδονουκλεάσες περιορισμού ή περιοριστικές ενδονουκλεάσες και μπορούν να προκαλούν εγκοπές σε ειδικές θέσεις του δίκλωνου DNA. Τα περιοριστικά ένζυμα καταλύουν τη διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών σε συγκεκριμένες θέσεις αλληλουχιών στόχων που αναγνωρίζουν, μήκους 4 με 6 bp τις περισσότερες φορές (η αντίδραση αυτή αναφέρεται συνήθως και ως «πέψη»). Τα περιοριστικά ένζυμα κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες (I και II). Η κατηγορία I αναγνωρίζει ειδικές θέσεις αλληλουχιών του DNA με την εγκοπή να μη γίνεται ακριβώς στις θέσεις αυτές αλλά κάπου εκεί κοντά. Αντίθετα η κατηγορία II αναγνωρίζει και σπάει ακριβώς στη θέση αναγνώρισης. Οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων είναι συμμετρικές αλληλουχίες δίκλωνου DNA ενώ τα προϊόντα θραύσης αποκαλούνται πολυμορφικού μεγέθους περιοριστικά τμήματα RFLPs (Αλαχιώτης, 2011).

Τα RFLPs είναι ζώνες που αντιστοιχούν σε τμήματα DNA συνήθως με μέγεθος 2-10 kb. Τα τμήματα του DNA διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και ανιχνεύονται με υβριδισμό στυπώματος κατά Southern με τη χρήση επισημασμένου ιχνηλάτη DNA. Η επισήμανση του ιχνηλάτη μπορεί να πραγματοποιηθεί με ένα ραδιενεργό ισότοπο ή εναλλακτικά με μη ραδιενεργές χρώσεις. Υπάρχουν βάσεις δεδομένων που περιλαμβάνουν χιλιάδες απομονωμένες και χαρακτηρισμένες ενδονουκλεάσες περιορισμού (Roberts et al., 2007). Σημειακές μεταλλάξεις είναι δυνατό να προκαλέσουν τη δημιουργία ή απώλεια θέσεων κοπής, οδηγώντας στη δημιουργία προτύπων ικανών να διακρίνουν πληθυσμούς ή ταξινομικές ομάδες (Baxevanis et al., 2005). Η ανάλυση RFLP είναι μία από τις μεθόδους που μπορούν να συμπληρώσουν τις εφαρμογές PCR για τον προσδιορισμό διαφορών στην νουκλεοτιδική αλληλουχία μεταξύ προϊόντων PCR. Έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί με

επιτυχία στην εύρεση της γενετικής ποικιλομορφίας και της μοριακής ταυτοποίησης διαφόρων οργανισμών και φυσικά στα αλιεύματα.

Η τεχνική PCR-RFLP βασίζεται στη χρήση ηλεκτροφόρησης πηκτής και χρώσης, οι οποίες μπορεί να είναι χρονοβόρες, δυνητικά επικίνδυνες και μερικές φορές μπορεί να παράγουν μεταβλητά αποτελέσματα.

3.6. DNA barcoding

Τα τελευταία χρόνια η αυξανόμενη ανάγκη και ζήτηση για μοριακά συστήματα ιχνηλασιμότητας έχει οδηγήσει στην υιοθέτηση διάφορων προσεγγίσεων βασισμένων στο DNA. Μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους είναι το DNA barcoding (Galimberti et al., 2016). Η βασική ιδέα του DNA barcoding, προτάθηκε για πρώτη φορά από τον ερευνητή στο πανεπιστήμιο Guelph του Καναδά, Paul Hebert. Πρόκειται ουσιαστικά για τη χρήση μιας σχετικά μικρής αλληλουχίας DNA, από μία συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος με στόχο την ταυτοποίηση των ειδών. Το DNA barcoding βασίζεται στην αρχή ότι μία μικρή και καθορισμένη ακολουθία DNA μπορεί να διακρίνει τα άτομα ενός είδους εφόσον η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των ειδών υπερβαίνει την ποικιλομορφία των ατόμων του ίδιου είδους (Hebert et al., 2003). Πλήθος ερευνών έχει εξακριβώσει την αποτελεσματικότητα αυτής της προσέγγισης σε αρκετές και μεγάλες ομάδες ζώων και φυσικά στα ψάρια (Ward et al., 2005). Το εγχείρημα αυτό, οδήγησε στη δημιουργία του CBOL (Consortium of Barcode of Life), μιας παγκόσμιας σύμπραξης, που στοχεύει στην παροχή DNA barcodes για όλα τα είδη. Ο CBOL περιλαμβάνει περισσότερα από 120 μέλη από 45 χώρες, συμπεριλαμβανομένων μουσείων, βοτανικών μουσείων, ζωολογικών κήπων, ερευνητικών εργαστηρίων και ιδρυμάτων, κυβερνητικών αλλά και μη κυβερνητικών οργανισμών καθώς και άλλων οργανισμών που συσχετίζονται με ταξινομική έρευνα και θέματα βιοποικιλότητας. Τα μέλη του CBOL υποβάλλουν τις αλληλουχίες DNA barcode τους καθώς και πιστοποιημένες πληροφορίες για το είδος στο οποίο ανήκει η εν λόγω αλληλουχία σε δημόσια βάση δεδομένων, ώστε να είναι προσβάσιμες από όλους (www.barcodeoflife.org) (Waugh, 2007). Το DNA barcoding project δε φιλοδοξεί να κατασκευάσει το δέντρο της ζωής ούτε να οδηγήσει σε μοριακή

ταξινόμηση. Στόχος του είναι ο σχεδιασμός ενός απλού διαγνωστικού εργαλείου βασισμένο στην ήδη υπάρχουσα ταξινομική γνώση (Frezal & Leblois, 2008). Η πρόσβαση σε μία δημόσια βάση δεδομένων που παραπέμπει σε ταξινομικές ομάδες και αλληλουχίες, και κατ' επέκταση επιτρέπει την ταυτοποίηση μεγάλου εύρους ειδών είναι ωφέλιμη σε μελέτες που απαιτείται αξιόπιστη αναγνώριση ειδών συμπεριλαμβανομένων των μελετών αυθεντικότητας και ταυτοποίησης ψαριών και θαλασσινών καθώς και για την παρακολούθηση της αλιείας.

Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι αρκετά απλή. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της ανάλυσης της μεταβλητότητας ενός ή περισσότερων μοριακών δεικτών, είναι δυνατή η διάκριση βιολογικών οντοτήτων. Οι αλληλουχίες DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση ειδών με τον ίδιο τρόπο που ένας σαρωτής σούπερ μάρκετ χρησιμοποιεί το γραμμωτό κώδικα για να προσδιορίσει οποιαδήποτε αγορά. Ωστόσο, για να είναι πετυχημένη η διάκριση θα πρέπει το τμήμα από να μην παρουσιάζει πολυμορφισμό μέσα στο ίδιο είδος. Συνεπώς η ιδανική ανάλυση DNA barcoding αντικατοπτρίζει τις κατανομές της ενδοειδικής και διαειδικής ποικιλομορφίας οι οποίες διαχωρίζονται από μία απόσταση που είναι γνωστή ως «χάσμα DNA barcoding (DNA barcoding gap)» (Meyer & Paulay, 2005; Wiemers & Fielder, 2007).

Οι κύριες περιοχές που εξετάζονται με αυτή τη μέθοδο είναι το μιτοχondριακό γονίδιο *coxI* και το ριβωσωμικό γονίδιο 16s RNA. Αυτές οι μικρές αλληλουχίες που συχνά καλούνται «barcodes» θα πρέπει να ενισχυθούν με τη χρήση γενετικών εκκινητών (Hajibabaei et al., 2007). Ένας μοριακός δείκτης πρέπει να πληροί ορισμένα κριτήρια για να κριθεί κατάλληλος, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως barcode. Αρχικά, πρέπει να είναι ικανοποιητικά πολυμορφικός ώστε να μπορεί να διακρίνει τα διαφορετικά είδη και παράλληλα επαρκώς συντηρημένος ώστε να είναι μην εμφανίζει πολυμορφισμό σε άτομα του ίδιου είδους. Δεύτερον, για την αξιόπιστη ενίσχυση του τμήματος του DNA που λειτουργεί ως δείκτης, οι εκατέρωθεν αλληλουχίες που θα υβριδίζονται οι εκκινητές θα πρέπει να είναι συντηρημένες μεταξύ των ειδών. Έτσι, στην περίπτωση που το δείγμα αποτελείται από μίγμα ειδών, να είναι δυνατή η αναγνώρισή τους χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό αυτών, αφού οι εκκινητές αυτοί αναγνωρίζουν αλληλουχίες σε όλα τα είδη και δεν είναι απαραίτητη η χρήση ειδικών εκκινητών για το κάθε είδος. Επιπλέον, το τμήμα του DNA-δείκτη θα πρέπει να φέρει φυλογενετικό σήμα (δηλαδή

το κατάλληλο επίπεδο πολυμορφισμού) ικανό να ταξινομεί τα υπό μελέτη είδη στις κύριες ταξινομικές βαθμίδες. Τέλος, η ενίσχυση και αλληλούχηση του γονιδίου πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο εφικτή γίνεται κάτω από τις συνήθεις εργαστηριακές συνθήκες, ενώ πρέπει να είναι δυνατή η στοίχιση των αλληλουχιών του γονιδίου ακόμα και μεταξύ ειδών που ανήκουν σε απομακρυσμένες ταξινομικές ομάδες (Vences et al., 2005).

3.7. Τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD).

Μία άλλη μέθοδος που στηρίζεται στην ανάλυση του πολυμορφικού DNA αναπτύχθηκε ταυτόχρονα σε δύο εργαστήρια, το 1990 (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990). Η μέθοδος αυτή ονομάστηκε τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA, γιατί βασίζεται στην ενίσχυση ενός τυχαίου τμήματος DNA με απλούς και μικρού μήκους εκκινητές, οι οποίοι έχουν τυχαία νουκλεοτιδική αλυσίδα. Οι εκκινητές δεν σχεδιάζονται για να ενισχύσουν συγκεκριμένα θραύσματα DNA. Αντίθετα διασκορπίζονται ανασυνδυασμένοι σε ολόκληρο το γονιδίωμα (Grosberg et al., 1996). Για αυτό το λόγο δεν είναι απαραίτητη η ύπαρξη δεδομένων σχετικά με τις αλληλουχίες των ομάδων ψαριών και θαλασσινών που μελετώνται. Πρόκειται για μια απλή μέθοδο που με συγκεκριμένη διαδικασία μετά την ενίσχυση.

Η μέθοδος αυτή απαιτεί έναν ή ζεύγος εκκινητών, που έχει τυχαία αλληλουχία, και ενισχύει το DNA στόχο με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Αν οι θέσεις που έχει υβριδίζει ο εκκινητής, στις αντίθετες αλυσίδες DNA, είναι σε απόσταση 200-2000 βάσεων περίπου ο ένας από τον άλλο, τότε παράγεται ένα προϊόν DNA. Αυτό το προϊόν ενισχύεται σε κάθε κύκλο PCR. Αρχικά η σύνθεση μπορεί να συνεχίσει και πέραν της συμπληρωματικής αλληλουχίας του εκκινητή, αλλά με κάθε κύκλο θέρμανσης και ψύξης, το ποσό του DNA στην περιοχή που συνορεύει με κάθε εκκινητή θα αυξάνεται εκθετικά ενώ οι μεγαλύτερες σε μήκος αλληλουχίες θα συσσωρεύονται μόνο με γραμμικό τρόπο, δηλώνοντας ότι το αρχικό ποσό του DNA, βρίσκεται τώρα σε περιορισμένη ποσότητα. Έτσι μετά από αρκετούς κύκλους το επικρατέστερο προϊόν της

αντίδρασης θα είναι το τμήμα του DNA το οποίο οριοθετείται από τους εκκινητές και θα περιλαμβάνει και τους ίδιους τους εκκινητές.

Οι κύκλοι της θέρμανσης και της ψύξης μπορούν να επαναληφθούν και το DNA θα συνεχίσει να συσσωρεύεται εκθετικά μέχρις ότου ένα από τα αντιδραστήρια εξαντληθούν ή το ένζυμο (πολυμεράση) δεν μπορεί πια να συνθέσει ένα DNA αρκετά γρήγορα. Σε υψηλές συγκεντρώσεις του DNA, αυτό μπορεί να αρχίσει μόνο του να υβριδίζει με αποτέλεσμα να εμφανίζονται μη εξειδικευμένα προϊόντα. Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για την καλύτερη ενίσχυση εξαρτάται από το ποσό του αρχικού υλικού και από την αποτελεσματικότητα κάθε βήματος. Ένα τελευταίο βήμα επώασης, για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, στη θερμοκρασία επέκτασης έχει σαν αποτέλεσμα την ολοκλήρωση των διπλών αλυσίδων από όλα τα παραγόμενα προϊόντα (Singh, 1997). Μετά το στάδιο της ενίσχυσης ακολουθούν συγκεκριμένες διαδικασίες όπως ο διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση (αγαράζη, πολυακρυλαμίδιο) και η ανίχνευση (βρωμιούχο αιθίδιο ή silver staining). Αυτά τα πρότυπα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση ειδών ή πληθυσμών.

Κύριος περιορισμός αυτής της τεχνικής είναι η επαναληψιμότητά της. Ορισμένα ακόμη μειονεκτήματα είναι η υψηλή της ευαισθησία στις μεταβολές της ποιότητας και της ποσότητας του DNA, η συσκευή PCR που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση, οι συνθήκες και οι διακυμάνσεις κυκλοποίησης, πολυμερισμού, διαχωρισμού και ανίχνευσης. Όλες αυτές οι παράμετροι απαιτούν σταθεροποίηση και τυποποίηση προκειμένου να επιτευχθούν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα (Martíñez & Daniëlsdoättir, 2000).

4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

4.1. Μελέτες αυθεντικότητας σε είδη της τάξης Gadiformes

Σε μια πρόσφατη έρευνα του FAO υπολογίστηκε ότι το 2011 περίπου το 18% στις παγκόσμιας αλιείας, που αντιστοιχεί σε 5,9 εκατομμύρια τόνους, προέρχεται από την τάξη Gadiformes (FAO 2014). Η τάξη αυτή περιλαμβάνει τις τέσσερις οικογένειες Gadidae, Phycidae, Lotidae και Merlucciidae και περιλαμβάνουν τα είδη που συχνά αναφέρονται ως γαδίδες (gadoids). Πολλά εμπορεύσιμα είδη ανήκουν στις γαδίδες και πλήθος μελετών έχουν πραγματοποιηθεί για την ταυτοποίησή τους.

Τα είδη που ανήκουν στο γένος *Merluccius* είναι περίπου 12 με 15 ωστόσο συχνά διατίθενται στην αγορά με την ίδια ονομασία (Μπακαλιάρος). Αυτό το γεγονός έχει εστιάσει την προσοχή των ερευνητών που χρησιμοποιούν συχνά μοριακές τεχνικές για την διαφοροποίηση και ταυτοποίηση των παραπάνω ειδών. Οι Quinteiro et al., 2001 κατάφεραν να αναγνωρίσουν με επιτυχία την προέλευση 11 δειγμάτων μπακαλιάρου με τη βοήθεια της τεχνικής PCR-RFLP. Η τεχνική εφαρμόστηκε σε ένα μικρό τμήμα (197bp) του μιτοχονδριακού γονιδίου. Παρά τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, οι Perez et al., (2004) ισχυρίστηκαν ότι η συγκεκριμένη τεχνική ενδέχεται να παρουσιάσει προβλήματα όσον αφορά την αναπαραγωγικότητά της λόγω του υψηλού ενδο-ειδικού πολυμορφισμού του μιτοχονδριακού γονιδίου. Σε μια μεταγενέστερη μελέτη η μέθοδος PCR σε συνδυασμό με μικροδορυφόρους χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς στην ταυτοποίηση τριών ειδών μπακαλιάρου. Οι μικροδορυφόροι με εξειδικευμένους σε μέγεθος και συχνότητα πολυμορφισμούς, αναγνωρίστηκαν στους ιστούς δειγμάτων και χρησιμοποιήθηκαν στην ταυτοποίηση κατεψυγμένων και επεξεργασμένων δειγμάτων (Castillo et al., 2003). Η ενίσχυση με PCR του πυρηνικού γονιδίου *5S rRNA* ήταν αποτελεσματική στη διαφοροποίηση 7 από τα 9 είδη που εξετάστηκαν από τους Perez & Garcia-Vazquez, (2004). Τα άλλα 2 είδη δεν ήταν δυνατόν να διαχωριστούν παρά μόνο με περαιτέρω εφαρμογή της τεχνικής PCR-RFLP στο μιτοχονδριακό γονίδιο *cytb*. Ο συγκεκριμένος δείκτης έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε μελέτες αυθεντικότητας της οικογένειας Merlucciidae. Σε μια πρόσφατη μελέτη από τους Perez et al., (2018), χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός

μεθόδων ταυτοποίησης σε δείγματα του γένους *Merluccius*. Η διαγνωστική ικανότητα της PCR-RFLP με δείκτες τα γονίδια *cytb* και *ITS 1* ήταν 83% και 89% αντίστοιχα, ωστόσο όταν υπήρξε συνδυασμός των δεικτών η διαγνωστική ικανότητα εκτοξεύτηκε στο 97%.

Πίνακας 4.1. Μελέτες αυθεντικότητας σε είδη της οικογένειας Merlucciidae.

Είδη που εξετάστηκαν	Μέθοδος	DNA στόχος	Μήκος DNA	Πηγή
11 είδη του γένους <i>Merluccius</i>	PCR-RFLP (4ένζυμο) + Sequencing	Συγκεκριμένη περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδίου	197bp	Quinteiro et al., 2001
<i>M. merluccius</i> <i>M. bilinearis</i> <i>M. hubbsi</i>	PCR + Microsatellite			Castillo et al., 2003
9 είδη της οικογένειας Merlucciidae	PCR	Πυρηνικό 5S <i>rRNA</i>	Συγκεκριμένο για το κάθε είδος	Perez and Garcia-Vazquez, 2004
	PCR-RFLP (1 ένζυμο)	<i>cytb</i>	354-404bp	
<i>M. australis</i> <i>M. hubbsi</i>	PCR-RFLP (1 ένζυμο)	<i>cytb</i>	464bp	Perez et al., 2004
6 είδη της οικογένειας Merlucciidae και 1 υβρίδιο	PCR-RFLP	<i>ITS 1</i>	602-659bp	Perez et al., 2018
		<i>cytb</i>	464-465bp	

Οι οικογένειες Gadidae και Lotidae περιλαμβάνουν είδη ψαριών με μεγάλη οικονομική σημασία εφόσον τα άτομά της αλιεύονται σε μεγάλη κλίμακα και έχουν σπουδαία εμπορική σημασία. Μερικά από τα είδη που ανήκουν στις συγκεκριμένες οικογένειες

είναι ο μπακαλιάρος του Ατλαντικού (*Gadus morhua*), ο μπακαλιάρος του Ειρηνικού (*Gadus macrocephalus*), ο γάδος της Γροιλανδίας (*Gadus ogac*), η μουρούνα (*Molva molva*), η διπτερύγιος μουρούνα (*Molva dypterygia*), ο μαύρος μπακαλιάρος (*Pollachius virens*), ο εγκλεφίνος (*Melanogrammus aeglefinus*), ο μπακαλιάρος της Αλάσκας (*Theragra chalcogramma*), το προσφυγάκι (*Micromesistius poutassou*) και το ταούκι (*Merlangius merlangus*). Τα περισσότερα από τα είδη έχουν παρόμοια εμφάνιση και σε συνδυασμό με τα διάφορα στάδια επεξεργασίας τους καθιστούν, σχεδόν αδύνατη τη μορφολογική τους ταύτιση (Wetten et al., 2012).

Ο μοριακός δείκτης *cytb* του μιτοχονδριακού DNA με τη βοήθεια της τεχνικής PCR-RFLP, είναι αποτελεσματικός στη διαφοροποίηση επεξεργασμένων προϊόντων μπακαλιάρου της Αλάσκας και μπακαλιάρου του Ειρηνικού. Σε μια πρόσφατη μελέτη με στόχο την ταυτοποίηση του μπακαλιάρου του Ατλαντικού, του μπακαλιάρου της Αλάσκας και του μπακαλιάρου του Ειρηνικού, οι ερευνητές βασίστηκαν στους πολυμορφισμούς των τμημάτων (558bp) του γονιδίου *cytb* των τριών ειδών. Η PCR-RFLP που εφαρμόστηκε, προτάθηκε ως γρήγορη, απλή και αξιόπιστη στην ταυτοποίηση των τριών ειδών (Aranishi et al., 2005). Μια βελτίωση της παραπάνω τεχνικής προτάθηκε από τους ίδιους ερευνητές οι οποίοι πραγματοποίησαν εξαγωγή του DNA από το χαβιάρι των δύο ειδών, γεγονός που μείωσε το χρόνο ταυτοποίησης (Aranishi et al., 2006). Οι Comi et al., (2005) σύγκριναν τις ικανότητες ταυτοποίησης τριών διαφορετικών τεχνικών (PCR-RFLP, PCR-SSCP και DGGE) και συμπέραναν ότι η ηλεκτροφόρηση πηκτής βαθμιαίας μετουσίωσης ήταν η μόνη μέθοδος που κατάφερε να διαφοροποιήσει και τα 8 είδη της οικογένειας Gadidae που εξετάστηκαν.

Μια εναλλακτική τεχνική για την ταυτόχρονη ταυτοποίηση τριών ειδών της οικογένειας Gadidae είναι η RT-PCR. Η συγκεκριμένη τεχνική χαρακτηρίζεται με περισσότερο από 98% ακρίβεια ταυτοποίησης των δειγμάτων και μπορεί να αποδειχθεί ένα ισχυρό εργαλείο σε μελέτες αυθεντικότητας (Hird et al., 2005). Αυτή η τεχνική είναι αποτελεσματική τόσο σε νωπά όσο και σε ελαφρώς επεξεργασμένα προϊόντα, ωστόσο δεν ήταν αξιόπιστη στην ταυτοποίηση προϊόντων που είχαν υποστεί μεγάλο βαθμό επεξεργασίας.

Αν και οι παραπάνω τεχνικές μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμες στην ανίχνευση νοθείας στα θαλασσινά, παρουσιάζουν ορισμένους περιορισμούς όσον αφορά τον αριθμό των

ειδών που μπορούν ταυτόχρονα να διαφοροποιήσουν. Για αυτό το λόγο οι Calo-Mata et al., (2003) επιχείρησαν να χαρακτηρίσουν τις γενετικές διαφορές ανάμεσα σε 16 είδη γαδίδων. Χρησιμοποιώντας την ανάλυση FINS σε τμήματα μήκους 464bp του μιτοχondριακού γονιδίου *cytb* κατάφεραν να διαφοροποιήσουν τα 14 από τα 16 είδη που εξέτασαν. Η πληροφορία σχετικά με την αλληλουχία των 16 ειδών επέτρεψαν ωστόσο την εξέλιξη ενός πρωτοκόλλου PCR-RFLP, ικανό να διαφοροποιήσει 15 από τα παραπάνω είδη και ταχύτερα και με χαμηλότερο κόστος από τη FINS.

Πίνακας 4.2. Μελέτες αυθεντικότητας σε είδη της τάξης Gadiformes

Είδη που εξετάστηκαν	Μέθοδος	DNA στόχος	Μήκος DNA	Πηγή
16 είδη γαδίδων	PCR-RFLP (3 ένζυμα) + FINS	<i>cytb</i>	464bp	Calo-Mata et al., 2003
<i>Theragra chalcogramma</i> , <i>Gadus macrocephalus</i>	PCR-RFLP (1 ένζυμο)		558bp	Aranishi et al., 2005
8 είδη της οικογένειας Gadidae	PCR-RFLP (7 ένζυμα) PCR-SSCP και DGGE	<i>cytb</i>	<400bp	Comi et al., 2005
3 είδη της οικογένειας Gadidae	RT-PCR	Πυρινικό γονίδιο <i>Transferrin</i>		Hird et al., 2005
Ποικιλία ειδών της τάξης Gadiformes	Species-Specific primers PCR	Πυρινικό 5S <i>rRNA</i>		Moran & Garcia-Vazquez, 2006

21 είδη γαδίδων	RT-PCR	<i>COI</i>	140bp	Herrero et al., 2010
17 είδη γαδίδων	PCR+ FINS + SNP	<i>cytb</i>	464bp και 263bp (για τα επεξεργασμένα)	Lago et al., 2013

4.2. Μελέτες αυθεντικότητας σε είδη της τάξης Salmoniformes.

Τα πιο εμπορεύσιμα είδη της οικογένειας Salmonidae είναι ο ροζ σολομός (*Oncorhynchus gorbuscha*), ο σολομός του Ατλαντικού (*Salmo salar*), ο σολομός κέτα (*Oncorhynchus keta*) και η ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*). Δεδομένης της μεγάλης διαφοροποίησης των τιμών μεταξύ των σολομονιδών είναι πιθανή η σκόπιμη υποκατάσταση των ειδών με στόχο το οικονομικό κέρδος. Σύμφωνα με το υπουργείο γεωργίας των ΗΠΑ είναι πιθανή η εσφαλμένη επισήμανση των προϊόντων σολομού, όπως η διάθεση στην αγορά του εκτρεφόμενου ως άγριου και η αντικατάσταση του κέτα σολομού από ροζ σολομό καθώς και η επισήμανση της ιριδίζουσας πέστροφας ως σολομός (USFDA, 2006).

Η τεχνική PCR-RFLP έχει αναφερθεί ως μία αποτελεσματική μέθοδος για τη διαφοροποίηση του σολομού του Ατλαντικού και της ιριδίζουσας πέστροφας τόσο σε νωπά όσο και σε καπνιστά προϊόντα. Επιτυχείς αναλύσεις έγιναν με τη χρήση τμημάτων των μιτοχονδριακών γονιδίων *COII* (464bp) (Carrera et al., 1999a) και *16S rRNA* (950bp) (Carrera et al., 1999b) και του πυρινικού γονιδίου *p53* (518-532bp) (Carrera et al., 2000). Σε μεταγενέστερη μελέτη η εφαρμογή της PCR-RFLP σε τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb* επέτρεψε τη διαφοροποίηση 10 ειδών σολομού (Russell et al., 2000). Η ίδια τεχνική χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό του σολομού του Ατλαντικού και της ιριδίζουσας πέστροφας αλλά με την προσθήκη της τεχνολογίας «lab-on-a-chip» (Dooley et al., 20005). Στην περίπτωση αυτή απομονώθηκε το μιτοχονδριακό γονίδιο *cytb* (464bp) από νωπά δείγματα των δύο ειδών. Η ανάλυση αναφέρθηκε ως πιο ταχεία και ευαίσθητη από την παραδοσιακή ηλεκτροφόρηση πηκτής, επιτρέποντας την ανίχνευση πολύ μικρών θραυσμάτων DNA (~25bp). Οι

Horstkotte & Rehbein (2003) ανέφεραν επίσης τη χρήση της PCR-RFLP σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) στη διαφοροποίηση 3 ειδών σολομού και ενός είδους πέστροφας. Η ενίσχυση της PCR πραγματοποιήθηκε σε τμήματα του μιτοχondριακού γονιδίου *cytb* (462-463bp). Τα θραύσματα που προκλήθηκαν από τη δράση των δύο περιοριστικών ενζύμων διαχωριστήκαν με τη βοήθεια της HPLC αντί για την παραδοσιακή ηλεκτροφόρηση πηκτής. Σε σύγκριση με την ηλεκτροφόρηση πηκτής η HPLC αναφέρθηκε ως πιο σύντομη, με μικρότερα όρια ανίχνευσης και με ανάγκη για μικρότερο αριθμό δειγμάτων.

Άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η PCR-SSCP. Η εφαρμογή της συγκεκριμένης τεχνικής σε μικρά τμήματα του γονιδίου *cytb* (123bp-1274bp) είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή εξειδικευμένων προτύπων μονόκλωνου DNA που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην ταυτοποίηση σολομονιδών (Rehbein et al., 1997). Η PCR-SSCP έχει επίσης αναφερθεί ως μία πιθανή μέθοδος για τη διαφοροποίηση 10 ειδών σολομού. Ωστόσο η μέθοδος αυτή ήταν αποτελεσματική σε νωπά η ελαφρά επεξεργασμένα προϊόντα αλλά όχι σε προϊόντα κονσερβοποίησης (Rehbein, 2005).

Μια καινοτόμα προσέγγιση για τη διαφοροποίηση του σολομού του Ατλαντικού και της ιριδίζουσας πέστροφας είναι η χρήση της τεχνικής PCR-AFLP. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε σε τμήμα DNA (349bp) και επέτρεψε της ταυτοποίηση νωπών, μαριναρισμών και καπνιστών προϊόντων σολομού και πέστροφας (Zhang & Cai, 2006). Η μέθοδος αυτή είχε μεγαλύτερη ευαισθησία από εκείνη που χρησιμοποίησαν οι Dooley et al., (2005a) .

Οι Rasmussen-Hellberg et al., (2011), ισχυρίστηκαν ότι η RT-PCR είναι μια αξιόπιστη μέθοδος για την ταυτοποίηση ειδών σολομού και πέστροφας σύμφωνα με τα αποτελέσματα ελέγχων που πραγματοποιήθηκαν σε τρία ανεξάρτητα εργαστήρια. Η ταυτοποίηση ήταν δυνατή σε όλα τα δείγματα και στο 96% των δειγμάτων που είχαν υποστεί θερμότητα αποστείρωσης. Το γονίδιο *ITS 1* που βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων *18S rDNA* και *5.8S rDNA* απεδείχθη κατάλληλο για τον έλεγχο αυθεντικότητας του σολομού του Ατλαντικού με τη βοήθεια της RT-PCR (Herrero et al., 2011).

Από την άλλη μεριά η ενίσχυση, τη βοήθεια της PCR, του πυρηνικού γονιδίου και συγκεκριμένα του 5S φάνηκε αποτελεσματική μέθοδος για τη διαφοροποίηση ειδών σολομού και πέστροφας (Pendas et al., 1995).

Το DNA barcoding είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνική για τον έλεγχο της αυθεντικότητας των εμπορεύσιμων θαλασσιών (ιχθύες, μαλάκια και καρκινοειδή). Η συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόστηκε με επιτυχία σε τμήμα του μιτοχondριακού γονιδίου COI με αποτέλεσμα την ανίχνευση νόθευσης του σολομού του Ειρηνικού από άλλα είδη (Cline, 2012). Η ίδια τεχνική εφαρμόστηκε και από τους Tinacci et al., 2018 σε 5 είδη της οικογένειας Solomonidae για να εξακριβωθεί αν η επισήμανσή τους συμμορφώνεται με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία. Η τεχνική στόχευε και πάλι το γονίδιο COI μήκους 655bp. Ωστόσο οι Pollack et al., 2018 εξέλιξαν την παραπάνω τεχνική με τη χρησιμοποίηση μικρότερου τμήματος του ίδιου γονιδίου (208-226bp) με σκοπό την ταυτοποίηση του σολομού του Ατλαντικού. Το «mini-barcoding» βρέθηκε να πλεονεκτεί έναντι του «full-barcoding» στην ταυτοποίηση κονσερβοποιημένου σολομού του Ατλαντικού.

Πίνακας 4.3. Μελέτες αυθεντικότητας σε είδη της τάξης Salmoniformes.

Είδη που εξετάστηκαν	Μέθοδος	DNA στόχος	Μήκος DNA	Πηγή
<i>Salmo salar</i> , <i>Salmo trutta</i> και υβρίδιά τους	PCR	Πυρηνικό 5S <i>rRNA</i>	Συγκεκριμένο για κάθε είδος	Pendas et al., 1995
<i>S. salar</i> , <i>S. trutta</i> , <i>O. mykiss</i> , <i>Salvelinus fontinalis</i>	PCR-SSCP	<i>cytb</i>	123bp, 148bp, 358bp, 1007bp-1273bp respectively	Rehbein et al., 1997

<i>S. salar</i> και <i>O. Mykiss</i>	PCR-RFLP (2 ένζυμα)	<i>COII</i>	464bp	(Carrera et al., 1999a)
	PCR-RFLP (2 ένζυμα)	<i>16S rRNA</i>	950bp	Carrera et al., 1999b
	PCR-RFLP (2 ένζυμα)	Πυρινικό <i>p53</i>	(518-532bp)	Carrera et al., 2000
10 είδη σολομονιδών	PCR-RFLP (6 ένζυμα)	<i>cytb</i>	464bp	Russel et al., 2000
<i>S. salar</i> , <i>S. trutta</i> , <i>O. keta</i> , <i>O. kisutch</i>	PCR-RFLP (2 ένζυμα) +HPLC	<i>cytb</i>	463-464bp	Harstkotte & Rehbein, 2003
10 είδη σολομονιδών	PCR-SSCP	<i>cyt b</i> πυρινική παρβαλβουμίνη και πυρινηκή GH	300-460bp	Rehbein, 2005
<i>S. salar</i> και <i>O. Mykiss</i>	PCR-AFLP	Εξειδικευμένος δείκτης για κάθε είδος	349bp	Zhang & Cai, 2006
11 είδη σολομονιδών	RT-PCR	<i>ITS 1</i>		Herrero et al., 2011
6 είδη σολομονιδών	DNA barcoding	<i>COI</i>	Συγκεκριμένο για κάθε είδος	Cline, 2012

<i>Salmo salar</i> , <i>O. keta</i> , <i>O. gorbuscha</i> , <i>O. kisutch</i> , <i>O. mykiss</i>	DNA barcoding	<i>COI</i>	655bp	Tinacci et al., 2018.
<i>Salmo salar</i>	Full barcoding Mini Barcoding	<i>COI</i> <i>COI</i>	655bp 208-226bp	Pollack et al., 2018

4.3. Μελέτες αυθεντικότητας σε είδη της τάξης Perciformes.

4.3.1 Σκομβροειδή

Τα σκομβροειδή ανήκουν στην τάξη Perciformes και περιλαμβάνουν τις οικογένειες Scombridae, Trichiuridae, Istiophoridae και Xiphiidae. Η πλειοψηφία των γενετικών ερευνών ταυτοποίησης στα σκομβροειδή έχει πραγματοποιηθεί στην οικογένεια Scombridae, ωστόσο αρκετές μελέτες έχουν διαξαχθεί και σε είδη των υπόλοιπων οικογενειών. Η οικογένεια Scombridae περιλαμβάνει 51 είδη τόνων, σκουμπριών και παλαμίδων (Nelson 1994). Αυτά τα ψάρια εντοπίζονται κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές θάλασσες και ποικίλουν σημαντικά ως προς το μέγεθος και την οικονομική αξία. Γενετικές μέθοδοι ταυτοποίησης έχουν πραγματοποιηθεί εκτενώς στα σκομβροειδή με στόχο την πρόληψη της οικονομικής απάτης αλλά και της ανίχνευση της παράνομης αλιείας και εμπορίας των προστατευόμενων αποθεμάτων (Takeyama et al., 2001).

Η ταυτοποίηση των ειδών σε κονσερβοποιημένα και σε βαρέως επεξεργασμένα δείγματα είναι εξαιρετικά δύσκολη εξαιτίας της υποβάθμισης του DNA. Λαμβάνοντας υπόψη αυτό τον παράγοντα οι Unseld et al., (1995) προσπάθησαν να ταυτοποιήσουν 11 είδη σκομβροειδών με την ανάλυση δύο τμημάτων του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb*, το ένα μήκους 123bp (59bp χωρίς εκκινητές) και το άλλο μήκους 464bp (402bp χωρίς

εκκινητές). Μετά την ενίσχυση με PCR οι ερευνητές ήταν ικανοί να ανιχνεύσουν τα θραύσματα μήκους 123bp, αλλά όχι εκείνα που είχαν μήκος 464bp. Με την αλληλούχιση των θραυσμάτων που ανιχνεύτηκαν ήταν δυνατή η διαφοροποίηση των 10 από τα 11 είδη που εξετάστηκαν.

Επειδή η αλληλούχιση είναι μια χρονοβόρα διαδικασία, οι μετέπειτα μελέτες επικεντρώθηκαν στη χρήση εναλλακτικών μεθόδων όπως η PCR-RFLP και PCR-SSCP. Οι Ram et al., (1996) χρησιμοποίησαν την τεχνική PCR-RFLP σε θραύσμα μήκους μικρότερου των 123bp του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb* και κατάφεραν να ταυτοποιήσουν με επιτυχία 5 είδη νωπών και κονσερβοποιημένων σκομβροειδών. Ανάλογη επιτυχία είχε και η μελέτη των Rehbein et al., (1996) που χρησιμοποίησαν την μέθοδο PCR-SSCP σε θραύσματα μήκους 123bp του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb* για τη διαφοροποίηση 8 ειδών σκομβροειδών.

Η τεχνική PCR-RFLP σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), εφαρμόστηκε σε θραύσμα μήκους 179bp του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb* για την ανάλυση τεσσάρων κονσερβοποιημένων δειγμάτων τόνου. Μετά τη δράση των δύο περιοριστικών ενζύμων και την ανάλυση με HPLC, ήταν δυνατή η διαφοροποίηση όλων των δειγμάτων (Horstkotte & Rehbein, 2003).

Οι Lin & Hwang (2007) αναφέρθηκαν επίσης στην επιτυχία της τεχνικής species-specific PCR στη διαφοροποίηση 8 σκομβροειδών σε κονσερβοποιημένα προϊόντα. Στην συγκεκριμένη μελέτη το θραύσμα μήκους 376bp του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb* δεν κατάφερε να ενισχυθεί και συνεπώς δεν ήταν δυνατή η διαφοροποίηση των ειδών, ωστόσο η επιτυχημένη ενίσχυση μικρότερων θραυσμάτων (126 και 146bp) του ίδιου γονιδίου επέτρεψε την διαφοροποίηση όλων των ειδών.

Πρόσφατα, υπήρξε μια τάση προς την ανάπτυξη τεχνικών όπως η RT-PCR και η multiplex PCR στην ταυτοποίηση σκομβροειδών. Οι δύο αυτές τεχνικές έχουν χαμηλότερες απαιτήσεις σε χρόνο από την PCR-RFLP και προσφέρουν την δυνατότητα ταυτοποίησης πολλών ειδών και με λιγότερα σφάλματα (Rasmussen & Marrissey, 2008). Το 2005 έγινε μια πρώτη προσέγγιση με τη χρήση της RT-PCR για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση δύο ειδών του γένους *Thunnus* (Lopez & Pardo, 2005). Σε αυτή τη μελέτη αναπτύχθηκαν τρία συστήματα TaqMan που στόχευαν τμήματα

μήκους μικρότερου των 100bp του γονιδίου *16S rRNA*. Με αυτό τον τρόπο ήταν δυνατή η ταυτοποίηση κονσερβοποιημένων προϊόντων τόνου και οι ερευνητές επεσήμαναν την καταλληλότητα εφαρμογής της μεθόδου σε μελέτες ανίχνευσης νοθείας τόνου. Έκτοτε η εφαρμογή της RT-PCR αναφέρθηκε στην επιτυχημένη διαφοροποίηση τεσσάρων ειδών τόνου (Dalmasso et al., 2007). Βασισμένη σε ένα θραύσμα μήκους 208bp του γονιδίου *ATPase 6*, η τεχνική αυτή ήταν αποτελεσματική στην ταυτοποίηση των 4 ειδών τόσο σε νωπά όσο και σε επεξεργασμένα προϊόντα.

Η χρήση της multiplex PCR έχει αναφερθεί στη διαφοροποίηση τριών σκομβροειδών από τους Micheline et al., 2007. Στη μελέτη αυτή έλαβε χώρα ενίσχυση PCR τριών θραυσμάτων μήκους 113bp, 246bp και 262bp του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb* και επέτρεψε τη διαφοροποίηση 3 ειδών του γένους *Thunnus*. Οι Lin & Hwang (2008) χρησιμοποίησαν επιτυχώς την species-specific PCR για τη διαφοροποίηση 5 σκομβροειδών. Οι εξειδικευμένοι εκκινητές που αναπτύχθηκαν για κάθε είδος, είχαν τη δυνατότητα να ενισχύσουν θραύσματα του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb* με μήκη που κυμαίνονταν από 110bp έως 156bp.

Ένας τρόπος για να ξεπεραστούν οι δυσκολίες με τους πολυμορφισμούς εντός των ειδών θα μπορούσε να επιτευχθεί τη χρήση της τεχνικής PCR-AFLP. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε από τους Han & Ely, (2002). Η χρησιμοποίηση 23 εκκινητών ήταν αποτελεσματική στην ταυτοποίηση 3 στενά συγγενικών ειδών της οικογένειας *Scombridae*.

Μια πιο εκτεταμένη μελέτη στη διαφοροποίηση και ταυτοποίηση σκομβροειδών πραγματοποιήθηκε από τους Espiñeira et al., (2009), με τον συνδυασμό μεθόδων PCR και FINS. Η δημοσίευσή τους αφορούσε την ταυτοποίηση 33 ειδών μέσω της χρήσης του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb* ως μοριακό δείκτη και είχε ως στόχο τον εντοπισμό υποκατάστασης και εσφαλμένης επισήμανσης σε προϊόντα σκομβροειδών.

Οι πολλά υποσχόμενες τεχνικές DNA barcoding και NGS έχουν βρει εφαρμογή και στα σκομβροειδή. Η εφαρμογή της NGS σε μικρά θραύσματα του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb* ήταν επιτυχής στην ανίχνευση προσμίξεων διαφόρων ειδών σε προϊόντα τόνου (Kappel et al., 2017). Από την άλλη μεριά η χρήση του γονιδίου *COI* στην τεχνική DNA barcoding δεν ήταν αποτελεσματική στη διαφοροποίηση μεταξύ ειδών του γένους

Thunnus λόγω της εξαιρετικά μεγάλης ομοιότητας των γονιδίων τους (Abdullah & Rehbein, 2014).

Πίνακας 4.4. Μελέτες αυθεντικότητας στα Σκομβροειδή

Είδη που εξετάστηκαν	Μέθοδος	DNA στόχος	Μήκος DNA	Πηγή
11 σκομβροειδή	PCR + Sequence analysis	<i>cytb</i>	123bp (κονσερβ.) 464bp (νωπά)	Unsel et al., 1995
5 σκομβροειδή	PCR-RFLP (4 ένζυμα)	<i>cytb</i>	<123bp	Ram et al., 1996
8 σκομβροειδή	PCR-SSCP	<i>cytb</i>	123bp	Rehbein et al., 1999
<i>T. albacares</i> , <i>T. alalunga</i> και <i>T. thynnus</i>	PCR-AFLP		200-1000bp	Han & Ely, 2002
3 σκομβροειδή	PCR-RFLP (2 ένζυμα) + HPLC	<i>cytb</i>	179bp	Horstkotte & Rehbein 2003
<i>T. alalunga</i> και <i>T. albacares</i>	RT-PCR	<i>16S rRNA</i>	<100bp	Lopez & Pardo, 2005
8 σκομβροειδή	PCR-RFLP (5 ένζυμα)	<i>cytb</i>	126bp 146bp 376bp	Lin & Hwang, 2007
4 είδη του	RT-PCR	<i>ATPase 6</i>	208bp	Dalmasso et

γένους <i>Thunnus</i>				al., 2007
3 σκομβροειδή	Multiplex PCR	<i>cytb</i>	113-262bp	Michelini et al., 2007
5 σκομβροειδή	Species-specific PCR	<i>cytb</i>	110-156bp	Li & Hwang, 2008
33 σκομβροειδή	PCR + FINS	<i>cytb</i>	569bp (εκτός από 1 είδος 570bp)	Espiñeira et al., 2009
7 σκομβροειδή	DNA barcoding	<i>COI</i>	655bp	Abdullah & Rehbein, 2014
5 σκομβροειδή	PCR + NGS	<i>cytb</i>	188-372bp	Kappel et al., 2017

4.3.2. Περκοειδή

Τα είδη που ανήκουν στην υποτάξη Percoidae της τάξης Perciformes συχνά καλούνται με τον όρο περκοειδή. Τα περκοειδή είναι μια ομάδα ψαριών με μεγάλη εμπορική και οικονομική σημασία λόγω της εκτεταμένης αλίευσης και της εντατικής εκτροφής τους. Κάποια από τα είδη που ανήκουν σε αυτή την ομάδα ιχθύων είναι το κοκκινόψαρο, το σαβρίδι, η τσιπούρα, το λαβράκι, το μυλοκόπι, η πέρκα και ο ροφός.

Οι Cocolin et al., (2000) προσπάθησαν με την τεχνική PCR-RFLP να ταυτοποιήσουν γενετικά, φιλέτα των ειδών *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι), *Sparus aurata* (τσιπούρα), *Umbrina cirrosa* (μυλοκόπι) και *Dentex dentex* (συναγρίδα). Για τις ανάγκες της ταυτοποίησης χρησιμοποίησαν θραύσμα μήκους 359bp του μιτοχondριακού γονιδίου

cytb και δύο περιοριστικά ένζυμα ωστόσο δεν αναφέρθηκε πολυμορφισμός μεταξύ των ειδών. Η ίδια μέθοδος αναπτύχθηκε και από τους Asensio et al., (2000) για τη διαφοροποίηση των ειδών *Lates niloticus* (πέρκα του Νείλου), *Epinephelus guaza* (ροφός) και *Polyprion americanus* (βλάχος) με τη διαφορά ότι ο μοριακός δείκτης σε αυτή τη μελέτη ήταν θραύσμα του μιτοχονδριακού γονιδίου 12S rRNA μήκους 436bp. Σε μεταγενέστερες μελέτες οι ίδιοι ερευνητές εφάρμοσαν άλλες δύο τεχνικές για τη διαφοροποίηση των συγκεκριμένων ειδών με απόλυτη επιτυχία. Στην πρώτη χρησιμοποίησαν την τεχνική PCR-RAPD με δύο διαφορετικούς εκκινητές (Asensio et al., 2001) και στην δεύτερη χρησιμοποίησαν multiplex PCR στο πυρηνικό γονίδιο 5S rRNA (Asensio et al., 2002). Μια πιο εκτεταμένη multiplex PCR χρησιμοποιήθηκε από τους Trotta et al., (2005) για τη διαφοροποίηση 8 ειδών (*Lates niloticus*, *Polyprion Americana*, *Epinephelus aeneus*, *Epinephelus caninus*, *Epinephelus costae*, *Epinephelus marginatus*, *Mycteroperca fusca* και *Mycteroperca rubra*). Εκτός από τη συμβατική ανάλυση των θραυσμάτων με ηλεκτροφόρηση πηκτής, οι ερευνητές παρουσίασαν μια δεύτερη προσέγγιση με τη χρήση της RT-PCR, η οποία επέτρεψε την ενίσχυση και την ανάλυση των θραυσμάτων ταυτόχρονα.

Τα είδη του γένους *Trachurus* είναι 15 ωστόσο 3 είναι εκείνα που έχουν μεγάλη οικονομική σημασία. Τα είδη αυτά παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες και έτσι είναι δύσκολη η μορφολογική τους διαφοροποίηση. Για αυτό το λόγο οι Karaiskou et al., (2003) χρησιμοποίησαν την τεχνική PCR για την διαφοροποίηση των ειδών *Trachurus trachurus* (γκριζοσάβριδο), *Trachurus mediterraneus* (ασπροσάβριδο) και *Trachurus picturatus*. Η μελέτη τους βασίστηκε στους πολυμορφισμούς των μιτοχονδριακών γονιδίων *cytb* και *16S rRNA*. Στην διαφοροποίηση 13 ειδών του γένους *Trachurus* εργάστηκαν και οι Lago et al., (2011) οι οποίοι συνδύασαν την PCR με ανάλυση FINS και έτσι τους επιτράπηκε η διαφοροποίηση όλων των ειδών.

Τα τελευταία χρόνια τα αποθέματα της κιτρινόπερκας (*Perca flavescens*) έχουν μειωθεί ενώ παράλληλα η τιμή της αυξάνεται. Αυτό το γεγονός έχει οδηγήσει συχνά την αντικατάσταση της κιτρινόπερκας σε φιλέτα ψαριού από την ευρωπαϊκή πέρκα που είναι χαμηλότερης αξίας. Αυτό το γεγονός επιβεβαιώνεται μεταξύ άλλων και από την μελέτη των Strange & Stepien, (2007) οι οποίοι με τη βοήθεια της PCR και της

αλληλούχισης του μιτοχondριακού γονιδίου *cytb* εντόπισαν αντικατάσταση 40% της κιτρινόπερκας από της ευρωπαϊκή πέρκα στα δείγματα που ανέλυσαν.

Οι οικογένεια Lutjanidae περιλαμβάνει περισσότερα από 300 είδη, ωστόσο τα πιο σημαντικά ανήκουν στο γένος *Lutjanus*. Το κοκκινόψαρο (*Lutjanus purpureus*) είναι ένα από τα πιο σημαντικά είδη από οικονομικής πλευράς, ωστόσο ο όρος «κοκκινόψαρο» συχνά χρησιμοποιείται εμπορικά και για άλλα συγγενικά είδη. Στη μελέτη των Marko et al., (2004) βρέθηκε ότι 17 από τα 22 δείγματα που αναλύθηκαν μέσω της PCR και της αλληλούχισης του γονιδίου *cytb*, είχαν λανθασμένη επισήμανση. Παρόμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε και από τους Logan et al., (2008) για την εσφαλμένη επισήμανση προϊόντων ως κοκκινόψαρο. Σε μια πρόσφατη μελέτη από τους Veneza et al., (2014) εξετάστηκε η ικανότητα δύο διαφορετικών γονιδίων στη διάκριση ειδών της οικογένειας Lutjanidae. Με τη βοήθεια του DNA barcoding στο πυρηνικό γονίδιο *5S rDNA* και στο μιτοχondριακό γονίδιο *COI*, οι ερευνητές προσπάθησαν να διαφοροποιήσουν 7 είδη της οικογένειας Lutjanidae. Το πυρηνικό *5S rDNA* δεν ήταν κατάλληλο στη διάκριση των ειδών σε αντίθεση με το *COI* που ήταν εξαιρετικά αποτελεσματικό.

Η τεχνική PCR-SSCP σε συνδυασμό με IEF είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την ταυτοποίηση ειδών της οικογένειας Sparidae σύμφωνα με τη μελέτη των Schiefenhövel & Rehbein, (2013).

Πίνακας 4.5. Μελέτες αυθεντικότητας στα περκοειδή

Είδη που εξετάστηκαν	Μέθοδος	DNA στόχος	Μήκος DNA	Πηγή
<i>D. labrax</i> <i>S. aurata</i> <i>U. cirrosa</i> <i>D. dentex</i>	PCR-RFLP (2 ένζυμα)	<i>cytb</i>	359bp	Cocolin et al., 2000
<i>L. niloticus</i>	PCR-RFLP	<i>12S rRNA</i>	436bp	Asensio et al.,

<i>E. guaza</i> <i>p. americanus</i>	(2 ένζυμα)			2000
<i>L. niloticus</i> <i>E. guaza</i> <i>p. americanus</i>	Multiplex PCR	Πυρινικό <i>5S rRNA</i>	Συγκεκριμένο για κάθε είδος	Asensio et al., 2001
<i>L. niloticus</i> <i>E. guaza</i> <i>p. americanus</i>	PCR-RAPD		Ποικιλία μηκών	Asensio et al., 2002
<i>T. trachurus</i> <i>T.</i> <i>mediterraneus</i> <i>T. picturatus</i>	PCR + sequencing	<i>16S rRNA</i> <i>cytb</i>	570bp 340bp	Karaiskou et al., 2003
<i>L. purpureus</i>	PCR + sequencing	<i>cytb</i>	953bp	Marko et al., 2004
8 Περκοειδή	Multiplex PCR + RT-PCR	<i>16S rRNA</i>	140-300bp	Trotta et al., 2005
<i>P. flavescens</i> <i>P. fluviatilis</i>	PCR + sequencing	<i>cytb</i>	~400bp	Strang & Stepien, 2007
Περκοειδή από 3 οικογένειες	PCR + sequencing	<i>cytb</i>	758bp	Logan et al., 2008
13 είδη του γένους <i>Trachurus</i>	PCR + FINS	<i>cytb</i>	239bp	Lago et al., 2011
7 είδη της οικογένειας <i>Lutjanidae</i>	DNA barcoding	<i>COI</i>	1131bp	Veneza et al., 2014

7 είδη της οικογένειας Sparidae	PCR-SSCP + IEF	<i>cytb</i>	464bp	Schiefenhövel & Rehbein, 2013
---------------------------------	----------------	-------------	-------	-------------------------------

4.4 Μελέτες αυθεντικότητας σε μικρά πελαγικά ψάρια.

Τα μικρά πελαγικά ψάρια, ανήκουν στην τάξη Clupeiformes. Οι οικογένειες Engraulidae (γάυρος) και Clupeidae (σαρδέλα, ρέγγα, παπαλίνα), αντιπροσωπεύουν μεγάλο μέρος των αποθεμάτων της παγκόσμιας αλιείας και πολλά από αυτά κατατάσσονται στα 20 κορυφαία είδη που αλιεύονται σε παγκόσμια κλίμακα (Johnson, 2007). Ο μεγάλος αριθμός ειδών των παραπάνω οικογενειών σε συνδυασμό με τα παρόμοια μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, δημιουργεί προβλήματα στην εμπορία τους, καθώς έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου κονσερβοποιημένα προϊόντα περιέχουν πολλά είδη. Για αυτό το λόγο, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες στη γενετική ταυτοποίηση αυτών των ειδών για την αποφυγή της παραπλάνησης των καταναλωτών.

Οι Sebasto et al., (2001) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο PCR-RFLP σε θραύσμα μήκους 376bp του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb*, κατάφεραν με επιτυχία να διακρίνουν δείγματα γάυρου (*Engraulis encrasicolus*) και φρίσσας (*Sardinella aurita*). Η ίδια τεχνική εφαρμόστηκε επίσης για τη διάκριση 9 μικρών πελαγικών ψαριών, ωστόσο τα θραύσματα μήκους 142 και 147bp του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb*, δεν ήταν αποτελεσματικά στη διάκριση όλων των εξεταζόμενων ειδών (Jerome et al., 2003a). Γι αυτό το λόγο οι ίδιοι ερευνητές σε συνέχεια της προσπάθειάς του, προχώρησαν σε νέα μελέτη όπου χρησιμοποίησαν την ανάλυση FINS. Ωστόσο και πάλι υπήρξαν προβλήματα στην ταυτοποίηση των κονσερβοποιημένων ειδών (Jerome et al., 2003b). Από την άλλη μεριά, η τεχνική PCR-RFLP σε συνδυασμό με την ανάλυση FINS, απεδείχθη ικανή στη διάκριση 4 ειδών του γένους *Engraulis* (Santaclara et al., 2006). Τα θραύσματα μήκους 284bp του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb* δεν ήταν ικανά να

διακρίνουν 2 από τα παραπάνω είδη, ωστόσο με την ανάλυση FINS διακρίθηκαν και τα 4 είδη.

Μεγάλη σημασία για την ταυτοποίηση μικρών πελαγικών ψαριών, έχει η επιλογή του σωστού μοριακού δείκτη. Η ανάλυση του μιτοχondριακού γονιδίου *16S rDNA* είναι αποτελεσματική για την ταυτοποίηση μικρών πελαγικών ψαριών. Η αλληλούχιση και η φυλογενετική ανάλυση αυτού του γονιδίου επέτρεψε τη διάκριση 16 ειδών από τις τάξεις Clupeiformes και Salmoniformes (Akasaki et al., 2006). Οι Jerome et al., (2008) εφάρμοσαν την PCR και αλληλούχιση σε 3 διαφορετικούς μοριακούς δείκτες για τον έλεγχο αυθεντικότητας σε κονσερβοποιημένα προϊόντα γαύρου. Οι μοριακοί δείκτες που αναλύθηκαν ήταν τα γονίδια *cytb*, *16s RNA* και *COI*. Παρόλο που η διάκριση ήταν δυνατή με την ανάλυση ενός από τους 3 μοριακούς δείκτες, οι ερευνητές πρότειναν τον συνδυασμό και των 3 δεικτών έτσι ώστε να αυξηθεί η εξειδίκευση και η δυναμική της ανάλυσης. Ο δείκτης *5.8S rRNA* είναι επίσης αποτελεσματικός στον έλεγχο αυθεντικότητας σε προϊόντα σαρδέλας με τη βοήθεια της RT-PCR (Herrero et al., 2011). Ένας άλλος μοριακός δείκτης που έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στη διάκριση 4 ειδών της οικογένειας Engraulidae είναι το μιτοχondριακό γονίδιο *5S rDNA* (Chari & Rebordinos, 2014). Η εφαρμογή της μεθόδου multiplex PCR σε θραύσμα του παραπάνω γονιδίου ήταν αποτελεσματική για τη διάκριση όλων των ειδών.

Η μέθοδος DNA barcoding, σε συνδυασμό με τη μέθοδο PCR-RFLP, αναφέρθηκε από τους Pappalardo & Ferrito, (2005) ως ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την ανίχνευση νοθείας σε επεξεργασμένα προϊόντα γαύρου. Η ανάλυση του μιτοχondριακού γονιδίου *COI* επέτρεψε την ανίχνευση νοθείας 14% με αντικατάσταση του είδους *Engraulis encrasicolus* από άλλα είδη των οικογενειών Engraulidae και Clupeidae. Παρόλο που το DNA barcoding φαίνεται να είναι αποτελεσματικό σε ελέγχους αυθεντικότητας, στην οικογένεια Engraulidae παρουσιάζει κάποιους περιορισμούς καθώς σύμφωνα με τους Chang et al., (2016) από τα 140 είδη που περιλαμβάνει η οικογένεια μόνο τα 76 έχουν καταχωρημένες αλληλουχίες στο σύστημα BOLD (The Barcode of Life Data System).

Πίνακας 4.6. Μελέτες αυθεντικότητας σε μικρά πελαγικά ψάρια.

Είδη που εξετάστηκαν	Μέθοδος	DNA στόχος	Μήκος DNA	Πηγή
<i>Engraulis encrasicolus</i> <i>Sardinella aurita</i>	PCR-RFLP (4 ένζυμα)	<i>cytb</i>	376bp	Sebastio et al., 2001
9 μικρά πελαγικά ψάρια	PCR-RFLP (2 ένζυμα)	<i>cytb</i>	<150bp	Jerome et al., 2003a
14 μικρά πελαγικά ψάρια	FINS	<i>cytb</i>	103bp	Jerome et al., 2003b
<i>E. encrasicolus</i> <i>E. anchoita</i> <i>E. ringens</i> <i>E. japonicus</i>	PCR-RFLP (2 ένζυμα) + FINS	<i>cytb</i>	284bp (RFLP) 540bp (FINS)	Santaclara et al., 2006
16 μικρά πελαγικά ψάρια	Sequencing και φυλογενετική ανάλυση	<i>16S rDNA</i>	606bp	Akasaki et al., 2006
15 μικρά πελαγικά ψάρια	PCR sequencing	<i>cytb</i> <i>16S rRNA</i> <i>COI</i>	212-274bp	Jerome et al., 2008
<i>Sardina pilchardus</i> <i>Sardinella aurita</i>	RT-PCR	<i>5.8S rRNA</i>	182bp -> <i>S. pilchardus</i> 203bp -> <i>S. aurita</i>	Herrero et al., 2011
4 είδη της	Multiplex PCR	<i>5S rDNA</i>	120bp	Chari &

οικογένειας Engraulidae				Rebordinos, 2014
<i>E. encrasicolus</i>	PCR-RFLP + DNA barcoding	<i>COI</i>	654bp	Papparlado & Ferrito, 2015
3 μικρά πελαγικά ψάρια	DNA barcoding	<i>COI</i>	650bp	Chand et al., 2016

4.5. Μελέτες αυθεντικότητας σε γαρίδες.

Οι γαρίδες αποτελούν ένα σημαντικό πόρο για πολλές χώρες, είτε προέρχονται από υδατοκαλλιέργεια είτε από εμπορική αλιεία. Αντιπροσωπεύουν το 30% της παγκόσμιας κατανάλωσης θαλασσινών (Rorenberry, 2001). Η μεγάλη ζήτηση και η δημοτικότητα των προϊόντων γαρίδας έχουν οδηγήσει στην υποκατάσταση ορισμένων ειδών στην εμπορική αγορά. Το 2014, μία έρευνα από την ομάδα Ocean Conservation Group (2015), αποκάλυψε ότι το 15% των γαρίδων διατίθενται με λανθασμένη επισήμανση, είτε λόγω διαφορετικού είδους, είτε λόγω μεθόδου παραγωγής (εκτρεφόμενες διατίθενται ως άγριες). Έτσι η αυθεντικότητα των ειδών γαρίδας έχει γίνει μια σημαντική ανησυχία στη βιομηχανία θαλασσινών.

Μοριακές τεχνικές που στοχεύουν τις πρωτεΐνες και το DNA, έχουν αποδειχθεί ως σημαντικά εργαλεία για την ταυτοποίηση καρκινοειδών. Ωστόσο οι γενετικές τεχνικές προτιμούνται έναντι των πρωτεϊνικών λόγω της σταθερότητας, της εξειδίκευσης, της ευαισθησίας και της αξιοπιστίας τους. Από τις γνώσεις μας η πρώτη γενετική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την διαφοροποίηση δύο ειδών γαρίδας ήταν η αλληλούχηση του μιτοχondριακού γονιδίου *16S rRNA* (Machado et al., 1993). Το μιτοχondριακό *16s rDNA* θεωρείται καλύτερος δείκτης ταυτοποίησης ειδών γαρίδας σε σχέση με τους δείκτες *COI* και *cytb*. Ο δείκτης *COI* παρουσιάζει μικρή μεταβλητότητα στις γαρίδες (8-24%) γεγονός που καθιστά δύσκολη τη διαφοροποίηση των ειδών γαρίδας (Baldwin et al., 1998).

Η τεχνική PCR-RFLP χρησιμοποιήθηκε στην ανίχνευση και ταυτοποίηση DNA καρκινοειδών σε προϊόντα διατροφής με στόχο τον εντοπισμό πιθανών αλλεργιογόνων πρωτεϊνών. Η ενίσχυση του θραύσματος μήκους 205bp που προήλθε από το περιοριστικό ένζυμο *DraI* δεν ήταν αποτελεσματική στην ανίχνευση και ταυτοποίηση καρκινοειδών σε επίπεδο ειδών (Brzezinski, 2005). Αναλύσεις PCR-RFLP και SSCP πραγματοποιήθηκαν επίσης και από τους Khamnamtong et al., (2005), για την ταυτοποίηση 5 ειδών γαρίδας στοχεύοντας τα μιτοχονδριακά *COI*, *COII* και *16s rDNA*. Τμήματα μήκους 356bp του γονιδίου *cytb* του μιτοχονδριακού DNA ενισχύθηκαν για να εξεταστούν οι γενετικές διαφορές 4 ειδών γαρίδας από τους Hisar et al., (2008). Για τις ανάγκες της τεχνικής χρησιμοποιήθηκαν 4 περιοριστικά ένζυμα (*DdeI*, *MboI*, *MbII* και *MseI*), ωστόσο δεν ήταν εφικτή η διάκριση των ειδών όταν τα εξεταζόμενα ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν μεμονωμένα παρά μόνο όταν υπήρχε συνδυασμός των ενζύμων.. Η τεχνική PCR-RFLP χρησιμοποιήθηκε το 2018 από τους Wilwet et al., και στόχευε το μιτοχονδριακό *16s rRNA/ tRNA^{val}* τόσο νωπών όσο και επεξεργασμένων γαρίδων. Η περιοχή *16s rRNA/ tRNA^{val}* βρέθηκε να έχει περισσότερες πληροφορίες και επέτρεψε την διαφοροποίηση των ειδών γαρίδας (Wilwet et al., 2018).

Η χρησιμοποίηση της τυχαίας ενίσχυσης πολυμορφικού DNA (RAPD) σε συνδυασμό με την PCR ήταν αποτελεσματική στην ταυτοποίηση δύο ειδών γαρίδας τόσο από τους Meruane et al., (1997) όσο και αργότερα από τους Jong-Man et al., (2005).

Αργότερα, οι Calo-Mata et al., (2009) χρησιμοποίησαν αλληλούχιση και FINS για τον διαχωρισμό 19 ειδών γαρίδας. Το μήκους 530bp τμήμα της περιοχής *16s rRNA/ tRNA^{val}* ενισχύθηκε επιτυχώς και βρέθηκε να παρουσιάζει μεγαλύτερη μεταβλητότητα (56%) σε σχέση με τα τμήματα των περιοχών *16S rRNA* (33,4%) και *COI* (42,7%). Συνεπώς ο δείκτης *16s rRNA/ tRNA^{val}* επέτρεψε τη διαφοροποίηση και των 19 ειδών γαρίδας που εξετάστηκαν.

Οι πιο πρόσφατες μέθοδοι DNA είναι κατά κύριο λόγο οι species-specific primers PCR και multiplex PCR. Η multiplex PCR είναι μια παραλλαγή της κλασικής PCR που στοχεύει στην ενίσχυση πολλαπλών θραυσμάτων DNA με τη χρήση πολλών εκκινητών σε μία μόνο αντίδραση. Οι Alvarado-Bremer et al., (2010) ανέπτυξαν την συγκεκριμένη τεχνική για την ταυτοποίηση τεσσάρων ειδών γαρίδας από τον κόλπο του Μεξικού και ενός είδους από υδατοκαλλιέργεια, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές για

καθένα από τα είδη. Σε μια πρόσφατη μελέτη σχεδιάστηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές για ταυτόχρονη ταυτοποίηση των ειδών *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei* και *Penaeus indicus*, που αντιπροσωπεύουν το 80% των γαρίδων υδατοκαλλιέργειας και δύνανται να αντικατασταθούν με άλλα είδη χαμηλότερης αξίας. Αυτοί οι εξειδικευμένοι εκκινητές οι οποίοι ενίσχυσαν τα μιτοχονδριακά θραύσματα του γονιδίου *16S rRNA*, επέτρεψαν την άμεση ταυτοποίηση των δειγμάτων (Pascoal et al., 2011).

Πίνακας 4.7. Μελέτες αυθεντικότητας σε γαρίδες.

Είδη που εξετάστηκαν	Μέθοδος	DNA στόχος	Μήκος DNA	Πηγή
<i>Farfantepenaeus notialis</i> , <i>Penaeus schmitti</i>	DNA sequencing	<i>16s rRNA</i>		Machado et al., 1993
<i>Marsupenaeus japonicus</i> , <i>Metapenaeus ensis</i>	RAPD-PCR			Meruane et al., 1997
13 είδη γαρίδας	PCR	<i>COI</i>	558bp	Baldwin et al., 1998
5 είδη γαρίδας	PCR-RFLP	<i>COI-COII</i> ,	1550bp	Khamnamtong et al., 2005
		<i>16S rDNA</i>	560bp	
	PCR-SSCP	<i>16S rDNA</i>	560bp	
9 είδη γαρίδας	PCR-RFLP (1 ένζυμο)	<i>16S rRNA</i>	205bp	Brzezinski, 2005

Fenneropenaeus chinensis, Palaemon gravieri	RAPD-PCR			Jong-Man et al., 2005
4 είδη γαρίδας	PCR-RFLP (4 ένζυμα)	<i>cytb</i>	356bp	Hisar et al., 2008
19 είδη γαρίδας	Sequencing + phylogenetic analysis (FINS)	<i>16s rRNA/ tRNA^{val}</i>	530bp	Calo-Mata et al., 2009
		<i>COI</i>	449bp	
		<i>16S rRNA</i>	476bp	
5 είδη γαρίδας	Species-Specific primers PCR and Multiplex PCR	<i>16s rRNA</i>	475bp	Alvarado Bremer et al., 2010
<i>Penaeus monodon</i> , <i>Litopenaeus vannamei</i> <i>Penaeus indicus</i>	Species-Specific primers PCR and Multiplex PCR	<i>16s rRNA</i>	362bp	Pascoal et al., 2011
			151bp	
			213bp	
4 είδη γαρίδας	PCR-RFLP (1 ένζυμο)	<i>16s rRNA/ tRNA^{val}</i>	530bp	Wilwet et al., 2018
13 είδη γαρίδας	DNA barcoding	<i>COI</i>	~650bp	Kundu et al., 2018

4.6. Μελέτες αυθεντικότητας σε κεφαλόποδα.

Τα μαλάκια είναι μια πολύ μεγάλη ομάδα οργανισμών που αριθμεί περισσότερα από 100.000 είδη (Ruppert, 1994). Τα κεφαλόποδα, ανήκουν στα υδρόβια μαλάκια, αριθμούν λιγότερα από 1000 είδη και τα πιο γνωστά είναι τα θράψαλα, τα καλαμάρια, οι σουπιές και τα χταπόδια. Τα επεξεργασμένα κεφαλόποδα είναι αδύνατο να ταυτοποιηθούν, διότι πολλά μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, απομακρύνονται κατά τα στάδια της επεξεργασίας τους.

Διάφορες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την εξακρίβωση της σωστής επισήμανσης κεφαλόποδων, μεταξύ άλλων και η PCR-RFLP. Θραύσματα μήκους 600 έως 700bp του μιτοχονδριακού γονιδίου *16S rRNA* αναλύθηκαν με την παραπάνω τεχνική ωστόσο η χρήση ενός περιοριστικού ενζύμου δεν έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα και απέτυχε η ταυτοποίηση των 3 από τα 5 είδη που εξετάστηκαν (Colombo et al., 2002). Η χρήση του μιτοχονδριακού γονιδίου *16S rRNA* χαρακτηρίζεται προβληματική στη ταυτοποίηση κεφαλόποδων αφού σε μεταγενέστερη ανάλυση του ίδιου μοριακού δείκτη με τη μέθοδο FINS ήταν αποτυχημένη στη διάκριση 2 ειδών του γένους *Illex* (Chapela et al., 2002). Για αυτό το λόγο οι ίδιοι ερευνητές μελέτησαν την καταλληλότητα του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb* έναντι του μιτοχονδριακού γονιδίου *16S rRNA* στην ταυτοποίηση κεφαλόποδων. Αυτή τη φορά χρησιμοποίησαν τόσο τη μέθοδο PCR-RFLP όσο και την ανάλυση FINS σε θραύσμα μήκους 297bp του γονιδίου *cytb*. Παρόλο που η ταυτοποίηση στα περισσότερα είδη ήταν επιτυχής, η διάκριση των 2 ειδών του γένους *illex* ήταν και πάλι αδύνατη (Chapela et al., 2003).

Η χρήση εναλλακτικών γενετικών μεθόδων ή μοριακών δεικτών φαίνεται να είναι αναγκαία για την επιτυχημένη διάκριση κεφαλόποδων. Σε μια μετέπειτα μελέτη η χρήση της μεθόδου PCR-RFLP και της ανάλυσης FINS αναφέρθηκε ως αποτελεσματική στη διάκριση περισσότερων από 20 κεφαλόποδων. Το μήκος του μιτοχονδριακού γονιδίου *cytb* που χρησιμοποιείται ως μοριακός δείκτης, φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ταυτοποίηση των ειδών αφού το θραύσμα μήκους 651bp κατάφερε να διακρίνει 12 από τα 23 είδη που αναλύθηκαν ενώ όταν χρησιμοποιήθηκε θραύσμα μήκους 208bp με ανάλυση FINS, ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς όλα τα είδη (Santaclara et al., 2007). Το μιτοχονδριακό γονίδιο *cytb* έχει αναφερθεί επίσης ως αποτελεσματικός δείκτης για την ταυτοποίηση κεφαλόποδων και από τους

Espiñeira et al., (2010). Στη μελέτη τους αξιολογήθηκαν επίσης δύο διαφορετικά μήκη του γονιδίου *cytb* για τη διάκριση 30 ειδών από τις οικογένειες Octopodidae, Sepiidae και Sepiolidae. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσίαζαν πολύ σημαντική ομοιότητα ωστόσο το θραύσμα μήκους 208bp φάνηκε να υπερτερούσε έναντι του θραύσματος μήκους 651bp, επειδή το πρώτο μπορούσε να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στη διάκριση κονσερβοποιημένων προϊόντων.

Η RT-PCR είναι μια απλή, γρήγορη και ευαίσθητη τεχνική για την εξακρίβωση της ορθής επισήμανσης του προϊόντα του είδους (*Octopus vulgaris*) (Espiñeira & Vieites, 2012). Το κοινό χταπόδι είναι ένα προϊόν το οποίο χρόνο με το χρόνο αλιεύεται σε μεγαλύτερο βαθμό λόγω της τεράστιας ζήτησής του και για αυτό το λόγω η RT-PCR μπορεί να αποτελέσει ένα αποτελεσματικό εργαλείο σε μελέτες αυθεντικότητας των προϊόντων του.

Όπως έχει είδη αναφερθεί, το γονίδιο *16S rRNA* εμφανίζει ορισμένους περιορισμούς στην ταυτοποίηση κεφαλόποδων γι αυτό και έχει χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικός μοριακός δείκτης (Wen et al., 2017). Στη μελέτη για τη ταυτοποίηση 95 δειγμάτων από προϊόντα κεφαλόποδων, βασικός μοριακός δείκτης ανάλυσης με τη βοήθεια του DNA barcoding ήταν το *COI* το οποίο μπόρεσε να διακρίνει επιτυχώς τα 78 δείγματα ενώ τα υπόλοιπα 17 ταυτοποιήθηκαν από το *16S rRNA*.

Πίνακας 4.8. Μελέτες αυθεντικότητας σε κεφαλόποδα

Είδη που εξετάστηκαν	Μέθοδος	DNA στόχος	Μήκος DNA	Πηγή
5 κεφαλόποδα	PCR-RFLP (1 ένζυμο)	<i>16S rRNA</i>	600 έως 700bp	Colompo et al., 2002
10 κεφαλόποδα	FINS	<i>16S rRNA</i>	200bp	Chapela et a., 2002
8 κεφαλόποδα	FINS και PCR-RFLP (2 ένζυμα)	<i>cytb</i>	297bp	Chapela et al., 2003

23 κεφαλόποδα	FINS και PCR-RFLP (3 ένζυμα)	<i>cytb</i>	208bp και 651bp	Santaclara et al., 2007
30 κεφαλόποδα	FINS	<i>cytb</i>	208bp και 651bp	Espiñeira et al., 2010
5 κεφαλόποδα	RT-PCR	<i>16S rRNA</i> <i>COIII</i>		Espiñeira & Vieites, 2012
10 κεφαλόποδα	DNA barcoding	<i>COI</i> <i>16S rRNA</i>	526 έως 658bp 503 έως 513bp	Wan et al., 2017

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αναφαίρετο δικαίωμα του κάθε καταναλωτή είναι να γνωρίζει επακριβώς όλα τα στοιχεία και τις παραμέτρους των προϊόντων που πρόκειται να καταναλώσει. Ευρέως αποδεκτό είναι επίσης τα προϊόντα αυτά να είναι ποιοτικά και ασφαλή για την υγεία του. Παρόλα αυτά οι νοθείες τροφίμων είναι σχεδόν άπειρες και σε ορισμένες περιπτώσεις είναι πιο επικίνδυνες και από τους παραδοσιακούς κινδύνους ασφάλειας τροφίμων. Ο προσδιορισμός του προβλήματος και η κατανόηση της φύσης του κινδύνου, αποτελούν τα πρώτα βήματα για την μετάβαση από την παρέμβαση και την αντιμετώπιση, στην πρόληψη, προκειμένου να διασφαλιστεί η προστασία των καταναλωτών (Spink & Moyer, 2011). Η αυθεντικότητα των τροφίμων και ειδικά των αλιευμάτων είναι ένα ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο, κυρίως λόγω του ενδιαφέροντος και της ανησυχίας των καταναλωτών σχετικά με την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων. Η διαδικασία του ελέγχου αυθεντικότητας στα αλιεύματα είναι ιδιαίτερης σημασίας λόγω του προφίλ των προϊόντων αυτών και της υψηλής προστιθέμενης αξίας για είδη με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ποιότητας. Ως εκ τούτου υπάρχει ανάγκη για ανάπτυξη μεθόδων μοριακής ταυτοποίησης που δύναται να αποτελούν απαραίτητα εργαλεία για τη βιομηχανία αλιευμάτων στη συμμόρφωση με την ιχνηλασιμότητα και τη ορθή επισήμανση των προϊόντων (Δανέζης, 2016).

Η ανάπτυξη νέων και ολοένα πιο εξελιγμένων τεχνικών ταυτοποίησης αλιευμάτων, συνεχίζεται με γοργούς ρυθμούς σε συνδυασμό με την αύξηση της ευαισθητοποίησης των καταναλωτών σε θέματα ασφάλειας και αυθεντικότητας. Η αυθεντικότητα, δεν είναι μόνο μια ανησυχία των καταναλωτών, αλλά και των μεταποιητών οι οποίοι δεν επιθυμούν να εμπλακούν σε αθέμιτο ανταγωνισμό με τους αδίστακτους μεταποιητές, που αποκτούν οικονομικά πλεονέκτημα, διαστρεβλώνοντας τα προϊόντα που πωλούν (Reid et al., 2006). Οι εξελίξεις στις τεχνολογίες μοριακής βιολογίας παρουσίασαν νέες κατευθύνσεις στον τομέα της ασφάλειας τροφίμων, προσφέροντας νέους αναλυτικούς ελέγχους για την ενίσχυση της ασφάλειας και της αυθεντικότητας των τροφίμων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Όσον αφορά την αυθεντικότητα των αλιευμάτων, τα νέα εργαλεία που παρέχονται από τις μοριακές τεχνικές επιτρέπουν την

ταυτοποίηση των ειδών με μεγάλη αξιοπιστία και ευαισθησία, δεδομένου ότι βασίζονται στη μελέτη των γονιδίων τα οποία χαρακτηρίζονται για τη μοναδικότητά τους σε όλα τα έμβια όντα (Pappalardo & Ferrito, 2015). Οι διαθέσιμες αναλυτικές μέθοδοι που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) όπως οι PCR-sequencing, multiplex-PCR, PCR-RFLP, PCR-SSCP, RAPD, Real-Time PCR, προσαρμόζονται ιδανικά στους ελέγχους αυθεντικότητας ιχθύων και θαλασσινών διότι είναι εξαιρετικά γρήγορες, ευαίσθητες και εξειδικευμένες και αποτελούν σημαντικά εργαλεία τόσο για την προστασία των καταναλωτών ενάντια σε δόλιες πρακτικές της βιομηχανίας αλιευμάτων όσο και για την επιβολή των εθνικών νομοθετικών πλαισίων (Gil et al., 2007). Η καινοτόμα τεχνική του DNA barcoding θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως πολλά υποσχόμενη αφού έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην ταυτοποίηση ιχθύων και θαλασσινών στο παρελθόν ωστόσο είναι επιτακτική ανάγκη η ενημέρωση της βάσης δεδομένων αφού απουσιάζουν γενετικές πληροφορίες από μεγάλο αριθμό ειδών (Khaksar et al., 2015).

Ιδιαίτερη σημασία στην επιλογή της εκάστοτε μοριακής τεχνικής έχει το εκτιμώμενο κόστος που ειδικά για στις γενετικές τεχνικές είναι ιδιαίτερα υψηλό και πρέπει να λαμβάνεται υπόψη (Griffiths et al., 2014). Σημαντικές προκλήσεις για την αυθεντικότητα των αλιευμάτων μεταξύ άλλων είναι η βελτιστοποίηση απλών, γρήγορων και χαμηλού κόστους μεθοδολογιών που θα επιτρέπουν αναλύσεις ρουτίνας τόσο σε νωπά όσο και σε προϊόντα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό επεξεργασίας, η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση πολλαπλών ειδών σε δείγματα τροφίμων και η χρησιμοποίηση ολοένα και μικρότερων θραυσμάτων γενετικού υλικού (Ortea et al., 2012). Έτσι μια συλλογική δράση, με συνεχή παρακολούθηση σε συνδυασμό με βελτιωμένες μεθόδους ανίχνευσης και αυστηρότερους κανονισμούς για τους παραβάτες, σίγουρα θα ελαχιστοποιήσουν ή ακόμα και θα εξαλείψουν τα προβλήματα αυθεντικότητας στο μέλλον (Premanandh, 2013).

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1. Ξενόγλωσση

- [USFDA] U.S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition (2006). Seafood substitution. College Park, Md.: U.S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- Abdullah, A. and Rehbein, H. (2014). Authentication of raw and processed tuna from Indonesian markets using DNA barcoding, nuclear gene and character-based approach. *European Food Research and Technology*, 239:695-706.
- Akasaki, T., Saruwatari, T., Tomonaga, H., Sato, S. and Watanabe, Y. (2006). Identification of imported Chirimen at the genus level by a direct sequencing method using mitochondrial partial 16S rDNA region. *Fish Science*, 72:686–692.
- Albert, B., Lewis, D., Raff, J., Roberts, K. and Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, New York.
- Alvarado-Bremer, J. R., Ditty, J. G., Turner, J. S. and Saxton, B. L. (2010). Molecular species identification of commercially important penaeid shrimp from the Gulf of Mexico using a multiplex haplotype-specific PCR assay. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38:715-721.
- Anderson, W.A. (2000). The future relationship between the media, the food industry and the consumer. *British Medical Bulletin*, 56:254-268.
- Applewhite, L., Rasmussen, R. and Morrissey, M. (2012). Species identification of Seafood. [In] Granata, L. A., Flick, G. J. and Martin, R. E (eds) *The Seafood Industry. Species, Products, Processing and Safety*, Wiley-Blackwell, pp:193-219.
- Aranishi, F., Okimoto, T., Ohkubo, M. and Izumi, S. (2005). Molecular identification of commercial spicy pollack roe products by PCR-RFLP analysis. *Journal of Food Science*, 70(4):235–238.

- Aranishi, F., Okimoto, T. and Ohkubo, M. (2006). A short-cut DNA extraction from cod caviar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86:425–428.
- Asensio, L., Gonzalez, I., Fernandez, A., Cespedes, A., Hernandez, P. E., Garcia, T. and Martin, R. (2000). Identification of Nile perch (*Lates niloticus*), grouper (*Epinephelus guaza*), and wreck fish (*Polyprion americanus*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of a 12S rRNA gene fragment. *Journal of Food Protection*, 63(9):1248–1252.
- Asensio, L., Gonzalez, I., Fernandez, A., Cespedes, A., Rodriguez, M. A., Hernandez, P. E., Garcia, T. and Martin, R. (2001). Identification of Nile perch (*Lates niloticus*), grouper (*Epinephelus guaza*), and wreck fish (*Polyprion americanus*) fillets by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *Journal of AOAC International*, 84(3):777–781.
- Asensio, L., Gonzalez, I., Fernandez, A., Rodriguez, M. A., Lobo, E., Hernandez, P. E., Garcia, T. and Martin, R. (2002). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for identification of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*), and Nile perch (*Lates niloticus*) fillets. *Journal of Food Protection*, 65(2):432–435.
- Asensio, L., González, I., Pavón, M. A., García, T and Martín, R. (2008). Application of an indirect ELISA and a PCR technique to detect grouper (*Epinephelus marginatus*) adulteration in the fish market. *Food Additives and Contaminants*, 25(6):677-683.
- Aung, M. M. and Chang, Y. S. (2014). Traceability in food supply chain: Safety and quality perspectives. *Food Control*, 39:172-184.
- Baldwin, J. D., Bass, A. L., Bowen, B. W., and Clark, W. H. (1998). Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10, 399–407.
- Baxevanis, A. D., Triantaphyllidis, G. V., Kappas, I., Triantafyllidis, A., Triantaphyllidis, C. D. and Abatzopoulos, T. J. (2005). Evolutionary assessment of *Artemia tibetiana* (Crustacea, Anostraca) based on morphometry and 16S rRNA RFLP analysis. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43: 189-198.

- Bayha, K. M., Graham, W. M. and Hernandez, F. J. (2008). Multiplex assay to identify eggs of three fish species from the northern Gulf of Mexico, using locked nucleic acid Taqman real-time PCR probes. *Aquatic Biology*, 4, 65–73.
- Berg, J.M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L. (2010). Exploring Genes and Genomes. [In] Berg, J.M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L. (eds) *Biochemistry* 7th Edition. W. H. Freeman and Company, New York, pp:139-172.
- Billington, N. and Hebert, P. D. N. (1991). Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48:80-94.
- Black, C., Haughey, S. A., Chevallier, O. P., Galvin-King, P. and Elliott, C. T. (2016). A comprehensive strategy to detect the fraudulent adulteration of herbs: The oregano approach. *Food Chemistry*, 210:552-557.
- Bossier, P. (1999). Authentication of seafood products by DNA patterns. *Journal of Food Science*, 64: 189–193.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M. and Davis, R. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American journal of Human Genetics*, 32(3):314- 319
- Brzezinski, J. (2005). Detection of crustacean DNA and species identification using a PCR-restriction fragment length polymorphism method. *Journal of Food Protection*, 68, 1866–1873.
- Bureau, J-C., Jones, W., Gozlan, E. and Marette, S. (2010). Issues in demand for quality and trade. [In] Krissoff, B., Bohman, M. and Caswell, J.A. (eds) *Global food trade and consumer demand for quality*. Springer, pp. 3-32.
- Calo-Mata, P., Sotelo, C. G., Perez-Martin, R. I., Rehbein, H., Hold, G. L., Russell, V. J., Pryde, S., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., Rosa, C. and Santos, A. T. (2003). Identification of gadoid fish species using DNAbased techniques. *European Food Research and Technology*, 217:259–64.
- Calo-Mata, P., Pascoal, A., Fernandez-No, I., Bohme, K., Gallardo, J. M., & Barros-Velazquez, J. (2009). Evaluation of a novel 16S rRNA/tRNAVal mitochondrial marker for the identification and phylogenetic analysis of shrimp species belonging to the super family Penaeoidea. *Analytical Biochemistry*, 391. 127-13.

- Carrera, E., Garcia, T., Cespedes, A., Gonzalez, I., Fernandez, A., Asensio, L. M., Hernandez, P. E. and Martin, R. (2000). Identification of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using PCR-restriction fragment length polymorphism of the *p53* gene. *Journal of AOAC International*, 83(2):341–346.
- Carrera, E., Garcia, T., Cespedes, A., Gonzalez, I., Fernandez, A., Hernandez, P. and Martin, R. (1999a). PCR-RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: a simple method for discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79:1654–1658.
- Carrera, E., Garcia, T., Cespedes, A., Gonzalez, I., Fernandez, A., Hernandez, P.E. and Martin, R. (1999b). Salmon and trout analysis by PCR-RFLP for identity authentication. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 64(3):410–413.
- Castillo, A.G., Martinez, J. L. and Garcia-Vazquez, E. (2003). Identification of Atlantic hake species by a simple PCR-based methodology employing microsatellite loci. *Journal of Food Protection*, 66(11):2130–2134
- Céspedes, A., García, T., Garrera, E., González, I., Fernández, A., Hernández, P. E. and Martin, R. (1999). Application of Polymerase Chain Reaction–Single Strand Conformational Polymorphism (PCR–SSCP) to Identification of Flatfish Species. *Food Composition and Additives*, 82(4):903-907.
- Chang, C-H., Lin, H-Y., Ren, Q., Lin, Y-S. and Shao, K-T. (2016). DNA barcode identification of fish products in Taiwan: Government-commissioned authentication cases. *Food Control*, 66:38-43.
- Changizi, R., Farahmand, H., Soltani, M., Asarch, R. and Ghiasvand, Z. (2013). Species identification reveals mislabeling of important fish products in Iran by DNA barcoding. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(4):783-791.
- Chapela, M. J., Sotelo, C. G., Calo-Mata, P., Perez-Martin, R. I., Rehbein, H., Hold, G. L., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., Rosa, C. and Santos, A. T. (2002). Identification of cephalopod species (Ommastrephidae and Loliginidae) in seafood products by forensically informative nucleotide sequencing (FINS). *Journal of Food Science*, 67(5):1672–1676.

- Chapela, M. J., Sotelo, C. G. and Perez-Martin, R.I. (2003). Molecular identification of cephalopod species by FINS and PCR-RFLP of a cytochrome b gene fragment. *European Food Research and Technology*, 217:524–529.
- Chari, H. and Rebordinos, L. (2014). A Rapid Method for Differentiating Four Species of the Engraulidae (Anchovy) Family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62:2803-2808.
- Cline, E. (2012). Marketplace substitution of Atlantic salmon for Pacific salmon in Washington State detected by DNA barcoding. *Food Research International*, 45:388-393.
- Cocolin, L., D'Agaro, E., Manzano, M., Lanari, D. and Comi, G. (2000). Rapid PCR-RFLP method for the identification of marine fish fillets (seabass, seabream, umbrine, and dentex). *Journal of Food Science*, 65(8):1315–1317.
- Colombo, F., Cerioli, M., Colombo, M. M., Marchisio, E., Malandra, R. and Renon, P. (2002). A simple polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for the differentiation of cephalopod mollusc families Loliginidae from Ommastrephidae, to avoid substitutions in fishery field. *Food Control*, 13:185–90.
- Comi, G., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cantoni, C. and Cocolin, L.. (2005). Molecular methods for the differentiation of species used in production of cod-fish can detect commercial frauds. *Food Control*, 16(1):37–42.
- D'Amico, P., Armani, A., Castigliengo, L., Sheng, G., Gianfaldoni, D. and Guidi, A. (2014). Seafood traceability issues in Chinese food business activities in the light of the European provisions. *Food Control*, 35(1):7–13.
- Dalmaso, A., Fontanella, E., Piatti, P., S., & Bottero, M. T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes*, 18, 81-87.
- Dalmaso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Secchi, C and Bottero, M. T. (2007). Identification of 4 tuna species by means of real-time PCR and melting curve analysis. *Veterinary Research Communications*, 31:355–7.
- Danezis, G., Tsagkaris, A. S., Camin, F., Brusich, V. and Georgiou, C. A. (2016). Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *Trends in Analytical Chemistry*, 85:123-132.

- Dennis, M. J. (1998). Recent developments in food authentication. *Analyst*, 123:151-156.
- Di Pinto, A., Marchetti, P., Mottola, A., Bozzo, G., Bonerba, E., Ceci, E., Bottaro, M. and Tantillo, G. (2015). Species identification in fish fillet products using DNA barcoding. *Fisheries Research*, 170:9-13.
- Dieffenbach, C. W. and Dveksler, G. S. (2003). PCR primer: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Protocols.
- Ding, Y., Veeman, M. M., & Adamowicz, W. L. (2013). The influence of trust on consumer behavior: an application to recurring food risks in Canada. *Journal of Economic Behavior & Organization*, 92:214-223.
- Dooley, J. J., Sage, H. D., Brown, H. M. and Garrett, S. D. (2005). Improved fish species identification by use of lab-on-a-chip technology. *Food Control*, 16:601–607.
- Espiñeira, M. and Vieites, J. M. (2012). Rapid method for controlling the correct labeling of products containing common octopus (*Octopus vulgaris*) and main substitute species (*Eledone cirrhosa* and *Disidicus gigas*) by fast real-time PCR. *Food Chemistry*, 135:2439-2444.
- Espiñeira, M., Gonzalez-Lavín, N., Vietes, J. M. and Santaclara, F. J. (2009). Development of a method for the identification of scombroid and common substitute species in seafood products by FINS. *Food Chemistry*, 117:698-704
- Espiñeira, M., Vieites, J. M. and Santaclara, F. J. (2010). Species authentication of octopus, cuttlefish, bobtail and bottle squids (families Octopodidae, Sepiidae and Sepiolidae) by FINS methodology in seafoods. *Food Chemistry*, 121:527-532.
- FAO (2018). Overview of food fraud in the fisheries sector. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome, Italy
- FAO. (2014). The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and Challenges. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome, Italy
- Fernández, A., García, I., Asensio, L., Rodríguez, M.A., González, I., Lobo, E., Hernández, P.E. and Martín, R. (2002). Genetic differentiation between the clam species *Ruditapes Decussatus* (grooved carpet shell) and *Veverupis pullastra*

(pullet carpet shell) by PCR-SSCP analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82:881-885.

- Ferrito, V. and Pappalardo, A. M. (2017). Seafood species identification by DNA barcoding, a molecular tool for food traceability. *Biodiversity Journal*, 8(1):65-72.
- Frézal L. and Leblois R., (2008). Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution* Volume 8, Issue 5.
- FSA (2002). Traceability in the food chain a preliminary study. Food Standard Agency, UK.
- Galimberti, A., Sandionigi, A., Bruno, A., Bruni, I., Barbuto, M., Csiraghi, M. and Labra, M. (2016). Towards a Universal Molecular Approach for the Quality Control of New Foodstuffs. [In] Ravishankar, R. V. (ed) *Advances in Food Biotechnology*, Wiley-Blackwell, pp:33-60.
- Gil, L. A. (2007). PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science & Technology*, 18:558-566.
- Giraud, G. and Amblard, C. (2003). What does traceability mean for beef meat consumer. *Food Science*, 23(1)40-64.
- Griffiths, A. M., Sotelo, C. G., Mendes, R., Pérez-Martín, R. I., Schröder, U., Shorten, M., Silva, H. A., Verrez-Bagnis, V. and Mariani, S. (2014). Current methods for seafood authenticity testing in Europe: is there a need for harmonisation? *Food Control*, 45:95–100.
- Grosberg, R. K., Levitan, D.R. and Cameron, B. B. (1996). Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR markers: a random primer for the novice and nervous. [In] Ferraris, J. D., Palumbi, S. R. (eds) *Molecular Zoology. Advances, strategies and protocols.*, Wiley-Liss, Inc.
- Gryson, N. (2010). Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 396(6):2003-2022.
- Gyllensten, U. and Wilson, A. C. (1987). Mitochondrial DNA of salmonoids : inter- and intraspecific variability detected with restriction enzymes. [In] Ryman, N. and Utter, F. (eds), *Population Genetics and Fishery Management*. University of Washington, Seattle, pp: 301-317.

- Hajibabaei, M., Singer, G. A., Clare, E. L. and Hebert, P. D. N. (2007). Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biotechnology*, 5(24): 1-7.
- Han, K. and Ely, B. (2002). Use of AFLP analyses to assess genetic variation in *Morone* and *Thunnus* species. *Marine Biotechnology*, 4(2):141–145.
- Hayashi, K. (1992). PCR-SSCP: A Method for Detection of Mutations. *Genetic Analysis: Techniques and Application*, 9:73-79.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. and deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270:313-321.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6:986-994.
- Herrero, B., Lago, F. C., Vieites, J. M. and Espiñeira, M. (2011a). Development of a rapid simple molecular identification methodology for true sardines (*Sardina pilchardus*) and false sardines (*Sardinella aurita*) based on the real-time PCR technique. *European Food Research and Technology*, 233:851-857.
- Herrero, B., Mardíñan, M., Vieites, J.M. and Espiñeira, M. (2010). Authentication of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Using Real Time PCR. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58:4794-4799.
- Herrero, B., Vieites, J. M. Espiñeira, M. (2011b). Authentication of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using real-time PCR. *Food Chemistry*, 127:1268-1272.
- Hird, H. J., Hold, G. L., Chisholm, J., Reece, P., Russell, V. J., Brown, J., Goodier, R. and MacArthur, R. (2005). Development of a method for the quantification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) in commercial products using real-time PCR. *European Food Research and Technology*, 220:633–637.
- Hisar, A. S., Aksakal, E., Hisar, O., Yanik, T., & Suhendan, M. (2008). Discrimination of Penaeid Shrimps with PCR-RFLP analysis. *Journal of Shell Fish Research*, 4,917–920.
- Horstkotte, B. and Rehbein, H. (2003). Fish species identification by means of restriction fragment length polymorphism and high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Science*, 68(9):2658–2666.

- Hosomi, R., Yoshida, M. and Fukunuga, K. (2012). Seafood Consumption and Components for Health. *Global Journal of Health Science*, 4(3):72-86.
- Hunt, D. E., Klepac-Ceraj, V., Acinas, S. G., Gautier, C., Bertilsson, S. and Polz, M. F. (2006). Evaluation of 23S rRNA PCR Primers for Use in Phylogenetic Studies of Bacterial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3):2221-2225.
- Iwahana, H. and Itakura, M. (1998). Multiple Fluorescence Based PCR-SSCP Analysis with Primer-, Post-, and Internal-Labeling. [In] Lo, Y. M. D. (eds) *Clinical Application of PCR*, Humana Press, New Jersey, pp:51-60.
- Jacquet, J. L. and Pauly, D. (2008). Trade secrets: renaming and mislabeling of seafood. *Marine Policy*, 32:309-318.
- Jensen, K. O. D., Denver, S. and Zanolli, R. (2011). Actual and potential development of consumer demand on the organic food market in Europe. *Journal of Life Sciences*, 58(3-4):79-84.
- Jerome, M., Lemaire, C., Bautista, J. M., Fleurence, J. and Etienne, M. (2003a). Molecular phylogeny and species identification of sardines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1):43–50.
- Jerome, M., Lemaire, C., Verrez-Bagnis, V. and Etienne, M. (2003b). Direct sequencing method for species identification of canned sardine and sardine-type products. *Agricultural and Food Chemistry*, 51(25):7326–7332.
- Jerome, M., Martinsohn, J. T., Ortega, D., Carreau, P., Verrez-Bagnis, V. and Mouchel, O. (2008). Toward fish and seafood traceability: anchovy species determination in fish products by molecular markers and support through a public domain database. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56(10):3460–3469.
- Johnson, H. M. (2007). Annual Report on the United States Seafood Industry. 14th ed. Jacksonville, Oreg.: H.M. Johnson & Associates, pp:101
- Johnson, R. (2014). Food Fraud and "Economically Motivated Adulteration" of Food and Food Ingredients. Congressional Research Service, pp:10-19.
- Kappel, K., Haase, I., Käppel, C., Sotelo, C. G. and Schröder, M. (2017). Species identification in mixed tuna samples with next-generation sequencing

- targeting two short cytochrome b gene fragments. *Food Chemistry*, 234:212-219.
- Karaiskou, N., Apostolidis, A. P., Triantafyllidis, A., Kouvatsi, A. and Triantaphyllidis, C. (2003). Genetic identification and phylogeny of 3 species of the genus *Trachurus* based on mitochondrial DNA analysis. *Marine Biotechnology*, 5(5):493–504.
 - Karoui, R., Dufour, È., Pillonel, L., Picque, D., Cattenoz, T. and Bosset, J-O. (2004). Determining the geographic origin of Emmental cheeses produced during winter and summer using a technique based on the concatenation of MIR and fluorescence spectroscopic data. *European Food Research and Technology*, 219(2):184-189.
 - Khaksar, R., Carlson, T., Schaffner, D. W., Ghorashi, M., Best, D., Jandhyala, S., Traverso, J. and Amini, S. (2015). Unmasking seafood mislabeling in U.S. markets: DNA barcoding as a unique technology for food authentication and quality control. *Food Control*, 56:71-76
 - Khamnamtong, B., Klinbunga, S., and Menasveta, P. (2005). Species identification of five penaeid shrimps using PCR-RFLP and SSCP analyses of 16S ribosomal DNA. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38:491–499.
 - Kundu, S., Rath, S., Tyagi, K., Chakraborty, R. and Kumar, V. (2018). Identification of penaeid shrimp from Chilika Lake through DNA barcoding. *Mitochondrial DNA Part B*, 3(1):161-165.
 - Lago, F. C., Herrero, B., Vieties, J. M. and Espiñeira, M. (2011). Genetic Identification of Horse Mackerel and Related Species in Seafood Products by Means of Forensically Informative Nucleotide Sequencing Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:2223-2228.
 - Lago, F. C., Vietes, J. M. and Espiñeira, M. (2013). Authentication of gadoids from highly processed products susceptible to include species mixtures by means of DNA sequencing methods. *European Food Research and Technology*, 236:171-180.
 - Lin, W. F. and Hwang, D. F. (2007). Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. *Food Control*, 18:1050–1057.

- Lin, W. F. and Hwang, D. F. (2008). Application of species-specific PCR for the identification of dried bonito product (katsuobushi). *Food Chemistry*, 106:390–6.
- Liu, Z. J. and Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238:1–37.
- Lockey, A. K. and Bardsley, R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology*, 11:67-77.
- Logan, C. A., Alter, S. E., Haupt, A. J., Tomalty, K. and Palumbi, S. R. (2008). An impediment to consumer choice: overfished species are sold as Pacific red snapper. *Biological Conservation*, 141:1591–1599.
- Lopez, I. and Pardo, M. A. (2005). Application of relative quantification TaqMan real-time polymerase chain reaction technology for the identification and quantification of *Thunnus alalunga* and *Thunnus albacares*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(11):4554–4560
- Machado, E. G., Dennebouy, N., Suarez, M. O., Mounolou, J-C. and Monnerot, M. (1993). Mitochondrial 16S rRNA Gene of Two Species of Shrimps: Sequence Variability and Secondary Structure. *Crustaceana*, 63(3):279-286.
- Marko, P. B., Lee, S. C., Rice, A. M., Gramling, J. M., Fitzhenry, T. M., McAlister, J. S., Harper, G. R. and Moran, A. L. (2004). Fisheries: mislabelling of a depleted reef fish. *Nature* 430(6997):309–310.
- Martiane, I., Daniaelsdoattir, A. K. (2000). Identification of marine mammal species in food products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:52-33.
- Meruane, J., Takagi, M. and Taniguchi, N. (1997). Species Identification and Polymorphisms Using RAPD-PCR in Penaeid Prawns *Penaeus japonicus* and *Metapenaeus ensis*. *Fisheries Science*, 63(1):149-150.
- Meyer, C. P. and Paulay, G. (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS biology*, 3(12):2229-2238.
- Michelini, E., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Simoni, P., Baraldini, M., De Laude, L. and Roda, A. (2007). One-step triplex-polymerase chain reaction assay for the authentication of yellowfin (*Thunnus albacares*), bigeye (*Thunnus obesus*), and skipjack (*Katsuwonus pelamis*) tuna DNA from fresh, frozen, and

- canned tuna samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(19):7638–7647.
- Moore, J. C., Spink, J., and Lipp. (2012). Development and application of a database on food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980-2010. *Journal of Food Science*, 77:118-126.
 - Moran, P. and Garcia-Vazquez, E. (2006). Identification of highly prized commercial fish using a PCR-based methodology. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 34(2):121–124.
 - Mullis, K. B., Ferce, F. and Gibbs, R. A. (1994). The polymerase chain reaction. Birchauser.
 - Nelson JS. 1994. Fishes of the world 3rd edition. New York: John Wiley & Sons, Inc, pp:600.
 - Nicholl, D. S. T. (2008). An Introduction to Genetic Engineering (3rd edition). Cambridge University Press, pp:116-131.
 - Ocean Conservation Group, Oceana USA. Seafood fraud (2015).
 - Oosterveer, P. and Somenfeld, D.A. (2012). Food, Globalization and Sustainability. Earthscan, pp.1-12.
 - Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5(4):874-879.
 - Ortea, I., Pascoal, A., Cañas, B., Gallardo, J. M., Barros-Velázquez, J. Calomata, P. (2012). Food authentication of commercially-relevant shrimp and prawn species: From classical methods to Foodomics. *Electrophoresis*, 33:2201-2211.
 - Pappalardo, A. M. and Ferrito, V. (2015a). A COIBar-RFLP strategy for the rapid detection of *Engraulis encrasicolus* in processed anchovy products. *Food Control*, 57:385-392
 - Pappalardo, A. M. and Ferrito, V. (2015b). DNA barcoding species identification unveils mislabeling of processed flatfish products in southern Italy markets. *Fishery Research*, 164:153-158.
 - Pascoal, A., Barros-Velázquez, J., Ortea, I., Cepeda, A. and Gallardo, J. M. (2011). Molecular identification of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*),

the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and the Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) by PCR targeted to the 16S rRNA mtDNA. *Food Chemistry*, 125:1457-1461.

- Patterson, R. L. S. and Jones, S. J. (1990). Review of current techniques for verification of the species origin of meat. *Analyst*, 115:501-506.
- Pendas, A. M., Moran, P., Martinez, J. L. and Garcia-Vazquez, E. (1995). Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. *Molecular Ecology*, 4(2):275-476.
- Perez, J. and Garcia-Vazquez, E. (2004). Genetic identification of 9 hake species for detection of commercial fraud. *Journal of Food Protection*, 67(12):2792-2796.
- Perez, M., Alvarez, C., Balado, M., Cabado, A. G., Vieites, J. M. and Presa, P. (2004). Identification of South Atlantic hakes (*Merluccius australis* and *Merluccius hubbsi*) in processed foods by PCR-RFLPs of cytochrome *b* gene. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13(2):59-67.
- Pérez, M., Santafé-Muñoz, A. M., Balado, M. and Presu, P. (2018). Methodological evaluation of DNA-based molecular keys to identify categories of mislabelling in commercial products from genus *Merluccius* spp. *Food Chemistry*, 239:640-648.
- Pollack, S. J., Kawalek, M. D., Williams-Hill, D. M. and Hellberg, R. S. (2018). Evaluation of DNA barcoding methodologies for the identification of fish species in cooked products. *Food Control* 84:297-394.
- Posudin, Y. I., Peiris, K. H. S. and Kays, S. J. (2015). Non-destructive detection of food adulteration to guarantee human health and safety. *Ukrainian Food Journal*, 4(2):207-260.
- Premanandh, J. (2013). Horse meat scandal- A wake-up call for regulatory authorities. *Food Control*, 34:568-569.
- Quinteiro J, Vidal R, Izquierdo M, Sotelo CG, Chapela MJ, Perez-Martin RI, Rehbein H, Hold GL, Russell VJ, Pryde SE, Rosa C, Santos AT, Rey-Mendez M. 2001. Identification of Hake species (*Merluccius* Genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11):5108-5114.

- Ram, J. L., Ram, M. L. and Baidoun, F. F. (1996). Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:2460–7.
- Rasmussen, R. S. and Morrissey, M. T. (2008). DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7:280–95.
- Rehbein, H., Kress, G. and Schmidt, T. (1997). Application of PCR-SSCP to species identification of fishery products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74:35–41.
- Rehbein, H., Mackie, I. M., Pryde, S., Gonzales-Sotelo, C., Medina, I., Perez-Martin, R. I., Quinteiro, J. and Rey-Mendez, M. (1999). Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. *Food Chemistry*, 64(2):263–268.
- Rehbein, H. (2005). Identification of the fish species of raw or cold-smoked salmon and salmon caviar by single-stranded conformation polymorphism (SSCP) analysis. *European Food Research and Technology*, 220:625–632.
- Rehbein, H., Kress, G., & Schmidt, T. (1997). Application of PCRSSCP to species identification of fishery products. *Journal of Agriculture and Food Science*, 74, 35–41.
- Reid, L.M., O'Donnell, C.P. and Downey, G. (2006). Recent technological advances for the determination of food authenticity. *Trends in Food Science and Technology*, 17:344-353.
- Roberts R.J., Vincze T., Posfai J. and Macelis D. (2007) REBASE-enzymes and genes for DNA restriction and modification. *Nucleic Acids Research*, 35:269-270.
- Rosenberry, B. (2001). World shrimp farming. San Diego, California: Shrimp News International.
- Ruppert, E. E. (1994). Invertebrate zoology. Fort Worth, Texas: Saunders College Publishing, pp:1056.

- Russel, V.J., Hold, G.L., Pryde, S.E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., Sotelo, C. G., Perez-Martin, R. I., Santos, A. T. and Rosa, C. (2010). Use of Restriction Fragment Length Polymorphism To Distinguish between Salmon Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6):2184-2188.
- Santaclara FJ, Cabado AG, Vieites JM. 2006a. Development of a method for genetic identification of 4 species of anchovies: *E. encrasicolus*, *E. anchoita*, *E. ringens* and *E. japonicus*. *European Food Research and Technology*, 223:609–614.
- Santaclara, F. J., Espiñeira, M. and Vieites, J. M. (2007). Genetic identification of squids (families *Ommastrephidae* and *Loliginidae*) by PCR-RFLP and FINS methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(24):9913–9920.
- Saubusse, M., Millet, L., Delbès, C., Callon, C. and Montel, M. C. (2007) Application of single strand conformation polymorphism – PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1):126–135.
- Schiefenhövel, K. and Rehbein, H. (2013). Differentiation of Sparidae species by DNA sequence analysis, PCR-SSCP and IEF on sarcoplasmic proteins. *Food Chemistry*, 138:154-160.
- Sebastio, P., Zanelli, P. and Neri, T. M. (2001). Identification of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) and gilt sardine (*Sardinella aurita*) by polymerase chain reaction, sequence of their mitochondrial cytochrome b gene, and restriction analysis of polymerase chain reaction products in semipreserves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3):1194–1199.
- Sharp, M. F. and Lopata, A.L. (2014). Fish allergy: in review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 46:258–271.
- Shipley, G. L. (2006). An introduction to real-time PCR. [In] Dorak, M.T (ed) Real-time PCR. Taylor & Francis, New York, pp:1-38.
- Singh, B. (1997). Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal of Parasitology*, 27:1135-1145.
- Sotelo, C. G. & Pérez-Martin, R. I. (2003). Species identification in processed seafoods. [In] Lees, M. (ed) Food authenticity and traceability, CRC Press, New York, pp:323-346.

- Spink, J. and Moyer, D. C. (2011). Defining the Public Health Threat of Food Fraud. *Journal of Food Science*, 76(9):167-163.
- Spink, J. and Moyer, D. C. (2013). Understanding and combating food fraud. *Food Technology*, 67:30-35.
- Stoyke, M., Hamann, F., Radeck, W. and Cowik, P. (2013). Tasks of the NRLs with respect to crisis management: contribution of the EURL/NRL at the BVL as exemplified by the horse meat scandal. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 8:91-100.
- Strange, R. M. and Stepien, C. A. (2007). Yellow (*Perca flavescens*) and Eurasian (*P. fluviatilis*) perch distinguished in fried fish samples by DNA analysis. *Fishery Bulletin*, 105:292–295
- Tacon, A. G. J., and Metian, M. (2013). Fish matters: importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 21: 22–38.
- Takeyama, H., Chow, S., Tsuduki, H. and Matsunaga, T. (2001). MitochondrialDNA sequence variation within and between *Thunnus* tuna species and its application to species identification. *Journal of Fish Biology*, 58(6):1646–1657.
- Tarabella, A., and Burchi, B. (2012). The role of nutrition and health claims in consumers' perception. Creating educational paths to resolve information asymmetries caused by promotion and marketing activities regarding foodstuffs. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 46:2173-2177.
- Tinacci, L. Stratev, D., Vashin, I., Chiavaccini, I., Susini, F., Guidi, A. and Armani, A. (2018). Seafood labelling compliance with European Legislation and species identification by DNA barcoding: A first survey on the Bulgarian market. *Food Control*, 90:180-188.
- Trotta, M., Schonhuth, S., Pepe, T., Cortesi, M. L., Puyet, A. and Bautista, J. M. (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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6):2039–2045.

- Unsel, M., Beyermann, B., Brandt, P. and Hiesel, R. (1995). Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR Methods and Applications*, 4(4):241–243.
- Vences, M., van der Meijden, T. M., Chiari, Y. and Vieites, D. R. (2005). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 16(2):1-5.
- Veneza, I., Felipe, B., Oliveira, J., Silva, R., Sampaio, I., Schneider, H. and Gomes, G. (2014) A barcode for the authentication of the snappers (Lutjanidae) of the western Atlantic: rDNA 5S or mitochondrial COI? *Food Control*, 34:116-123
- Verrez-Bagnis, V. (2018). Advances in Authentication Methods for Seafood Species Identification in Food Products. [In] Montet, D. and Ray, R. C. (ed). Food Traceability and Authenticity Analytical Techniques. CRC Press, pp:196-215.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, R. H., Last, P. R. and Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society Publishing*, 360:1847-1857.
- Waugh, J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*, 29(2):188-197.
- Welsh, J. and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18:7213-7218.
- Wen, J., Tinacci, L., Acuti, P. L., Riina, M. V., Xu, Y., Zeng, L., Ying, X., Chen, Z., Guardone, L., Chen, D., Sun, Y., Zhao, J., Guidi, A. and Armani, A. (2017). An insight into the Chinese traditional seafood market: Species characterization of cephalopod products by DNA barcoding and phylogenetic analysis using *COI* and *16S rRNA* genes. *Food Control*, 82:333-342.
- Wetten, O. F., Wilson, R. C., & Andersen, Ø. (2012). High-resolution melting analysis of common and recombinant genotypes of the Atlantic cod (*Gadus morhua*) hemoglobin b1 gene in transatlantic populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 69, 525–531

- Wiemers, M. and Fielder, K. (2007). Does the DNA barcoding gap exist? A case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology*, 4(8):1-16.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. A., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22):6531-6535.
- Williams, J., Kubelic, A., Livak, K., Rafalski, J., Tingey, S. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22): 6531.
- Wilwet, L., Jeyasekaran, G., Shakila, R. J., Sivaraman, B. and Padmavathy, P. (2018). A single enzyme PCR-RFLP protocol targeting 16s rRNA/ tRNA^{val} region to authenticate four commercially important shrimp species in India. *Food Chemistry*, 239:169-376.
- Zhang J, Cai Z. 2006. Differentiation of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Atlantic salmon (*Salmo salmar*) by the AFLP-derived SCAR. *European Food Research and Technology*, 223:413–7.

6.2. Ελληνική

- Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. (2010). Βιολογία των μικροοργανισμών (1 Τόμος). Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, σελ.364-365.
- Αλαχιώτης, Σ. Ν. (2011). Εισαγωγή στη Γενετική. Εκδοτικός οίκος Λιβάνη, σελ.397-423.
- Δανέζης, Γ. Π. (2016). Αυθεντικότητα τροφίμων: Ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό σπανίων γαιών ως δείκτη γεωγραφικής προέλευσης. Διδακτορική Διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. σελ.23.
- Μπατρινού, Α. Μ. (2011). Σύγχρονη Βιοτεχνολογία Τροφίμων: Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα. Εκδόσεις Πασχαλίδης, σελ.162-173.
- Πατρινός Γ. Π. (2008). Μοριακή Διαγνωστική, σελ.4.

- Τσάκνης, Γ. (2008). Διασφάλιση ποιότητας τροφίμων. Εκδόσεις Παπασωτηρίου, σελ.1-3.

7. ABSTRACT

Seafood is a food source with a special position in our dietary habits. The commercial value of some fishery products is exceptionally high. Thus there is a need for developing molecular identification methods that may provide the administration and the seafood industry with the tools necessary to comply with labeling and traceability at species level. The aim of this thesis was to provide an extensive and updated overview of the molecular methodologies used in seafood authenticity, emphasizing in DNA based methods applicability. These methods, along with common gene target were described and compared due to their ability on fisheries identification.

The introductory chapter provides an evaluation of worldwide fisheries field, highlighting the current status on the field and the potential hazards of seafood mislabeling. Explanation on why seafood authenticity is necessary and a related updated legislation is also provided. In the following chapter, DNA-based methods including PCR, RFLP, RAPD, AFLP, SSCP and DNA barcoding have been analyzed and compared due to their abilities or dissabilities on commercial fish and seafood species identification.

The chapter of applications, provides a comprehensive survey of the application of these DNA-based methods to the discovery of fish and seafood substitution on the commercial market. Popular food uses and peer-reviewed research articles published to date were discussed for all major species groups of concern, including gadoids, salmonids, scombroids, percoids, small pelagic fish, shrimps, prawns and cephalodods were discussed.