

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

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

Κωνσταντίνος Γεωργάκης

ΒΟΛΟΣ 2021

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

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

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

2) Ιωάννης Μποζιάρης, Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

3) Γεώργιος Γκάφας, Επίκουρος Καθηγητής, Μοριακή Βιολογία της Διατήρησης Θαλάσσιων Θηλαστικών και Ιχθυοαποθεμάτων, 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, κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κυρίους Γεώργιο Γκάφα και Ιωάννη Μποζιάρη, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Ιωάννα Σαραντοπούλου για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, όσον αφορά την προμήθεια εργαστηριακού υλικού καθώς επίσης και την αμέριστη συμπαράστασή της κατά τη διάρκεια του πειράματος.

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

Περίληψη

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στο ζήτημα της νοθείας των αλιευμάτων της οικογένειας *Soleidae* στην Ελληνική αγορά. Στόχο της διατριβής αποτέλεσε ο προσδιορισμός ειδικών μοριακών δεικτών και η επιλογή της κατάλληλης μεθοδολογίας, η οποία θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν αποτελεσματικός έλεγχος της αυθεντικότητας των υπό μελέτη ειδών ιχθύων που έχουν αλιευτεί στις Ελληνικές θάλασσες, συγκριτικά με τα άλλα είδη, χαμηλότερης ποιότητας και οικονομικής αξίας, που διακινούνται στην ελληνική αγορά. Για το σκοπό αυτό δοκιμάστηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα απομόνωσης DNA, αυτό της φαινόλης και χλωροφορμίου, του ειδικού ΚΙΤ απομόνωσης DNA “Extract Me”, και του διαλύματος CTAB lysis buffer. Η απομόνωση με το “Extract Me” ΚΙΤ ήταν αυτή που σημείωσε DNA καλύτερης ποιότητας. Το DNA αυτό χρησιμοποιήθηκε μετέπειτα για τη διενέργεια ανάλυσης PCR, η οποία ωστόσο δεν επέφερε τα αναμενόμενα αποτελέσματα που θα επέτρεπαν αλληλούχιση των δειγμάτων και στην συνέχεια δημιουργία μιας επιτυχούς DNA βιβλιοθήκης των υπό μελέτη ειδών. Σε μελλοντικά στάδια, θα πραγματοποιηθεί σχεδιασμός καινούριων εκκινητών, συμβατών με τα είδη που μελετάμε ώστε να ολοκληρωθεί με επιτυχία η διαδικασία της PCR ανάλυσης.

Λέξεις κλειδιά: οικογένεια *Soleidae*, απάτη, αντικατάσταση, οικονομική και θρεπτική αξία, βιωσιμότητα, απομόνωση DNA, ανάλυση PCR

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Αλιευτική Προσπάθεια.....	7
1.1.1 Παγκόσμια Αλιευτική Προσπάθεια	7
1.1.2 Ευρωπαϊκή και Ελληνική Αλιευτική Προσπάθεια	10
1.2 Οικογένεια Soleidae	12
1.2.1 Συστηματική κατάταξη και περιγραφή Τάξης και Οικογένειας	12
1.2.2 Περιγραφή κυριότερων ειδών Soleidae στη Μεσόγειο.....	13
1.3 Νοθεία και Ιχνηλασιμότητα	16
1.4 Σκοπός.....	18
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	19
2.1 Πειραματική Διαδικασία	19
2.1.1 Συνθήκες και Όργανα πειράματος	19
2.1.2 Απομόνωση DNA	20
2.1.3 PCR	25
3. Αποτελέσματα.....	27
3.1 Αποτελέσματα απομόνωσης DNA.....	27
3.2 Αποτελέσματα PCR	28
4. Συμπεράσματα και Συζήτηση	29
4.1 Συμπεράσματα	29
4.1.1 Μορφομετρικά Χαρακτηριστικά.....	31
4.2 Συζήτηση.....	32
5. Βιβλιογραφία	37
5.1 Ελληνική Βιβλιογραφία	37
5.1 Ξένη Βιβλιογραφία.....	37
5.2 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία.....	39
6. Abstract.....	39

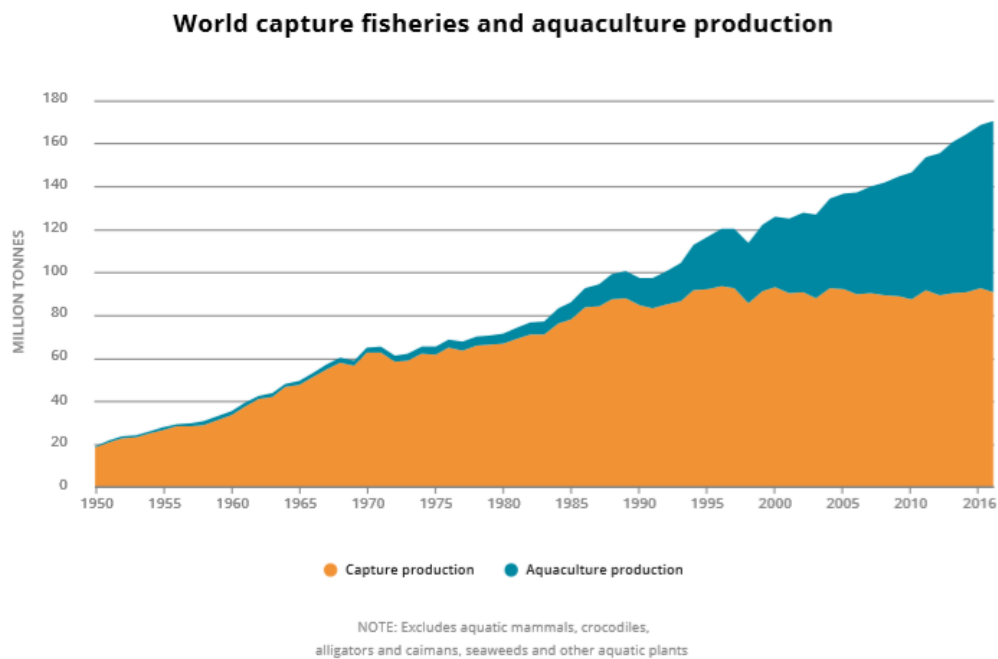
1. Εισαγωγή

1.1 Αλιευτική Προσπάθεια

1.1.1 Παγκόσμια Αλιευτική Προσπάθεια

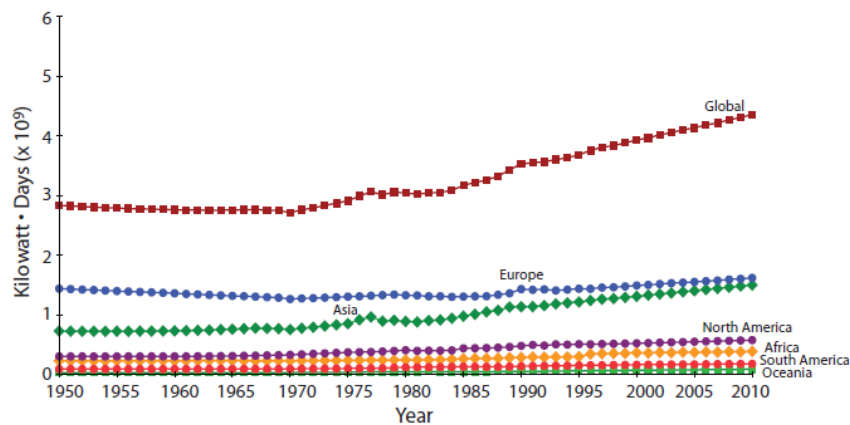
Σύμφωνα με την έκθεση του FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) με τίτλο “The State of World Fisheries and Aquaculture το 2018, από το 1961 η παγκόσμια ετήσια αύξηση της κατανάλωσης ιχθύων ήταν διπλάσια από την αύξηση του πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα, το 2016, το 88% της συνολικής παραγωγής ιχθύων (151 εκατομμύρια από τα 171 εκατομμύρια τόνους) προοριζόταν για άμεση ανθρώπινη κατανάλωση. Το μερίδιο αυτό έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς ήταν 67% στη δεκαετία του 1960. Στην πραγματικότητα, ο ετήσιος ρυθμός αύξησης της κατανάλωσης ιχθύων ως τρόφιμα ξεπέρασε την κατανάλωση κρέατος από όλα τα χερσαία ζώα, σε συνδυασμό. Συνήθως η προτιμώμενη μορφή ιχθύων είναι ζωντανά, φρέσκα ή διατηρημένα με απλή ψύξη και αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μερίδιο ιχθύων για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, 45% το 2016, ακολουθούμενο από κατεψυγμένα (31%), παρασκευασμένα και διατηρημένα με τη μορφή αποξηραμένων, αλατισμένων, σε άλμη, καπνισμένων (12%). Στην ίδια έκθεση ο διεθνής οργανισμός συνεχίζει και αναφέρει πως η κατάψυξη είναι η κύρια μέθοδος επεξεργασίας των ιχθύων και αντιπροσωπεύει το 56% του συνόλου των μεταποιημένων ιχθύων για ανθρώπινη κατανάλωση και το 27% της συνολικής παραγωγής ιχθύων το 2016. Σημαντικές βελτιώσεις στη μεταποίηση καθώς και στην ψύξη, τη δημιουργία πάγου και τη μεταφορά έχουν επιτρέψει την αύξηση της εμπορευματοποίησης και της διανομής των ιχθύων με

μια μεγαλύτερη ποικιλία ως προς τη μορφή των προϊόντων κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Ωστόσο, οι αναπτυσσόμενες χώρες εξακολουθούν να χρησιμοποιούν κυρίως ιχθείς σε ζωντανή ή φρέσκια μορφή (53% των ιχθύων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση το 2016), αμέσως μετά την εκφόρτωση ή τη συγκομιδή από την υδατοκαλλιέργεια. Οι απώλειες μεταξύ εκφόρτωσης και κατανάλωσης μειώθηκαν, αλλά αντιπροσωπεύουν περίπου το 27% των εκφορτωθέντων ιχθύων. Στον παρακάτω πίνακα διαφαίνεται η διαφορά ανάμεσα στην παραγωγή της αλιείας άγριων αλιευμάτων και σε αυτή των υδατοκαλλιεργειών, για τις τελευταίες δεκαετίες.



Πίνακας 1 Παγκόσμια παραγωγή αλιείας άγριων αλιευμάτων και υδατοκαλλιέργειας (FAO, 2018). Με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζεται η παραγωγή αλιείας άγριων αλιευμάτων, ενώ με μπλε η παραγωγή υδατοκαλλιεργειών.

Οι εκτιμώμενες συνολικές κιλοβατώρες που ασκούνταν από όλη την αλιεία παγκοσμίως ήταν σχεδόν αμετάβλητες από το 1950 έως το 1960. Από το 1961, υπάρχει μια αυξανόμενη τάση στην αλιευτική προσπάθεια (1,1% ετήσια αύξηση, υπολογίζεται ως ποσοστιαία μεταβολή ανά έτος), με την υψηλότερη αξία, 4,4 δισεκατομμύρια κιλοβατώρες να αποτελεί αύξηση 54% από το 1950 στο 2010 (J.A. Anticamara et.al, 2010). Η Ευρώπη είχε τη μεγαλύτερη αλιευτική προσπάθεια το 1950, αλλά έκτοτε αυξήθηκε μόνο κατά 0,2% ετησίως σε 1,6 δισεκατομμύρια κιλοβατώρες έως το 2010. Η αλιευτική προσπάθεια της Ασίας ήταν η δεύτερη μεγαλύτερη, με αύξηση της τάξεως του 1,2% ετησίως και πλησίαζε ταχύτατα αυτή της Ευρώπης έως το 2010. Η Βόρεια Αμερική παρουσίασε ποσοστό αύξησης 1,1% ετησίως, η Αφρική 0,9%, η Νότια Αμερική 1,1%, ενώ η Ωκεανία παρουσίασε τη μικρότερη αλιευτική προσπάθεια (88 εκατομμύρια κιλοβατώρες έως το 2010), αλλά με μέσο όρο αύξησης 1,7% από το 1950 έως το 2010 (J.A. Anticamara et.al, 2010).

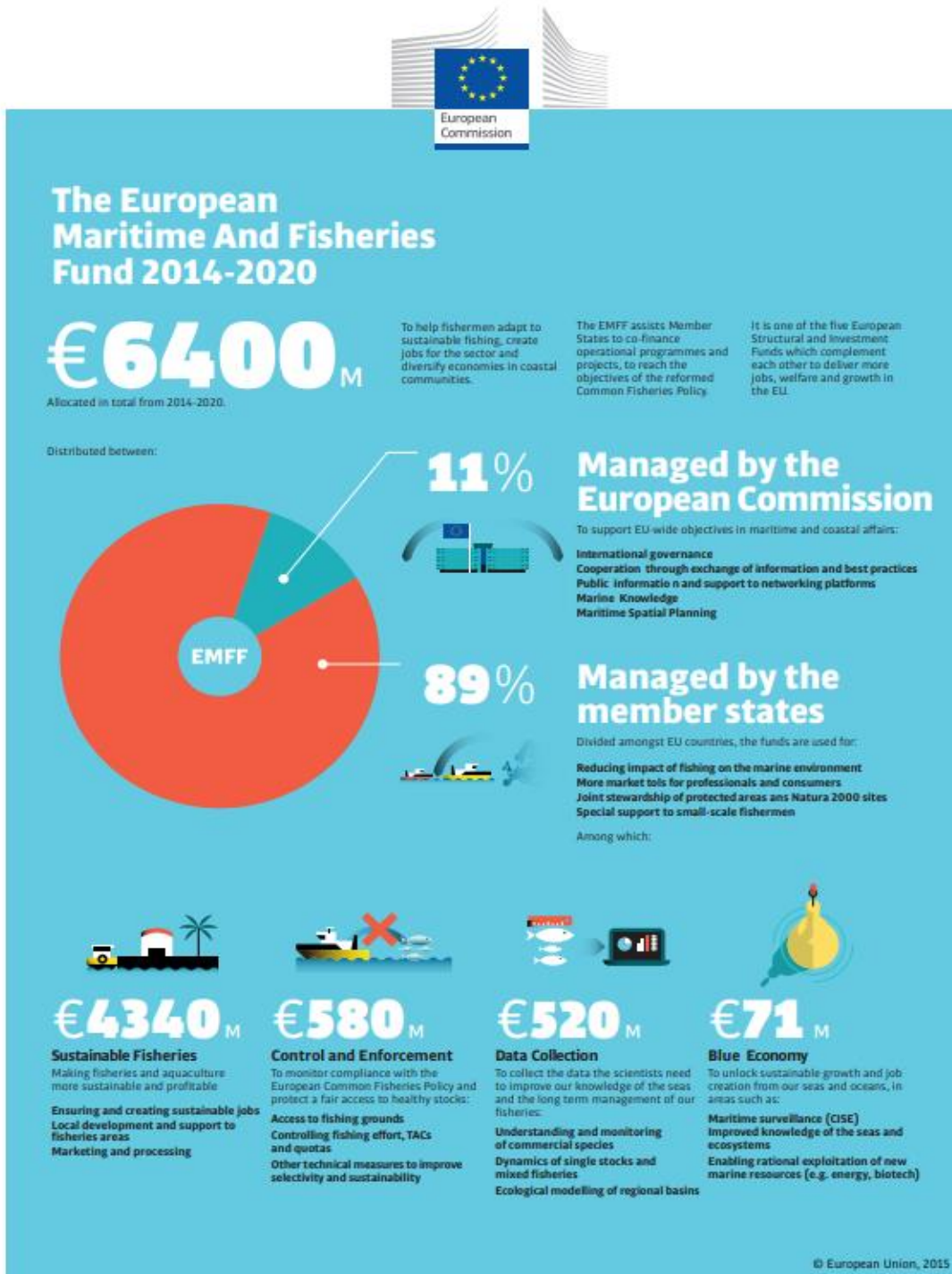


Πίνακας 2. Χρονική σειρά εκτιμήσεων της συνολικής αλιευτικής προσπάθειας που ασκείται από όλες τις χώρες παγκοσμίως και ανά ήπειρο (1950 - 2010) (J.A. Anticamara et.al. 2010)

1.1.2 Ευρωπαϊκή και Ελληνική Αλιευτική Προσπάθεια

Σε Ευρωπαϊκό επίπεδο, τα κράτη μέλη είναι υποχρεωμένα να ακολουθούν μία κοινή πολιτική, την κοινή αλιευτική πολιτική, σχετικά με τις ποσότητες ιχθύων που εξαλιεύονται. Η κοινή αλιευτική πολιτική είναι ένα σύνολο κανόνων για τη διαχείριση των ευρωπαϊκών αλιευτικών στόλων και για τη διατήρηση των αποθεμάτων ιχθύων. Σχεδιασμένη να διαχειρίζεται έναν κοινό πόρο, παρέχει σε όλους τους ευρωπαϊκούς αλιευτικούς στόλους ισότιμη πρόσβαση στα ύδατα της Ευρωπαϊκής ένωσης και στα αλιευτικά πεδία και επιτρέπει στους αλιείς να ανταγωνίζονται δίκαια (*European Commission*).

Σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Ταμείο Ναυτιλίας και Αλιείας (ΕΤΘΑ), η Ελλάδα διαθέτει ακτογραμμή μήκους 15.021 χιλιομέτρων, πολυάριθμα εμπορικά λιμάνια εκ των οποίων τα σημαντικότερα είναι αυτά του Πειραιά, της Θεσσαλονίκης, της Πάτρας, της Καβάλας και του Βόλου. Το 2014 ο Ελληνικός αλιευτικός στόλος αριθμούσε 15.693 σκάφη (εκ των οποίων το 94% ήταν μικρού μεγέθους, λιγότερο από 12 μέτρα) με συνδυαστικό συνολικό τονάζ 76.700, συνολική ισχύ 451.000 kW και μέση ηλικία τα 27 έτη. Για το έτος 2012, ο συνολικός όγκος εκφορτώσεων θαλασσινών ήταν περίπου 108.000 τόνοι και η αξία πρώτης πώλησης έφτασε τα 457.000 εκατομμύρια ευρώ. Αναφορικά με την απασχόληση, 19.396 θέσεις πλήρους απασχόλησης καταγράφηκαν σε αλιευτικά μικρού μεγέθους και 4.548 σε αλιευτικά μεγάλου μεγέθους αντίστοιχα.



Πίνακας 3 (https://ec.europa.eu/oceans-and-fisheries/policy/common-fisheries-policy-cfp_en#ecl-inpage-562)

Θαλάσσιο και Αλιευτικό ταμείο της Ευρωπαϊκής Ένωσης

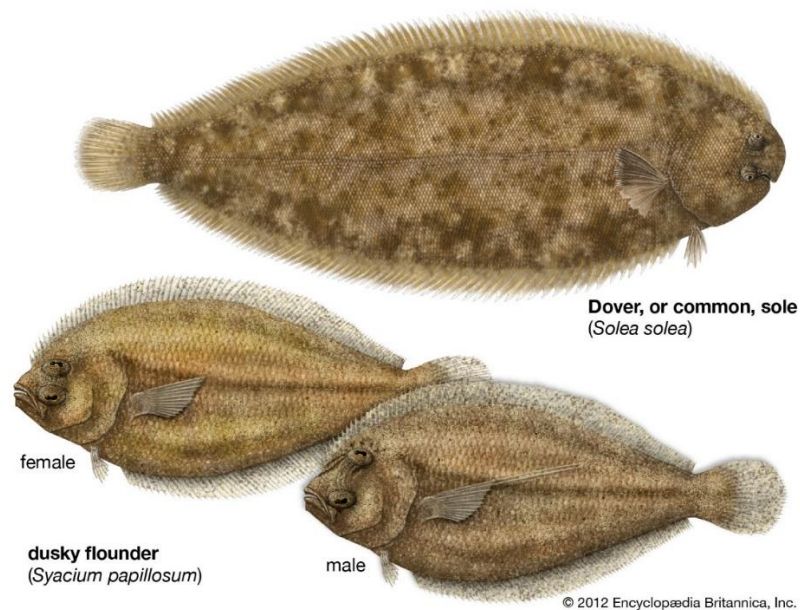
1.2 Οικογένεια Soleidae

1.2.1 Συστηματική κατάταξη και περιγραφή Τάξης και Οικογένειας

Συστηματική κατάταξη:

- Κλάση: Actinopterygii
- Τάξη: Pleuronectiformes
- Υπόταξη: Soleoidei
- Οικογένεια: Soleidae

Τα μέλη της τάξης Pleuronectiformes έχουν πεπλατυσμένο σώμα και συνήθως συναντώνται στον πυθμένα, με τη μία τους πλευρά, η οποία συνήθως ονομάζεται τυφλή ή κατώτερη, να ακουμπά σε αυτόν, ενώ οι οφθαλμοί είναι τοποθετημένοι στην επάνω πλευρά και βρίσκονται περισσότερο ή λιγότερο κοντά ο ένας στον άλλο (Νεοφύτου, 2015).



Εικόνα 1 (Πηγή: <https://www.britannica.com/animal/pleuronectiform>)

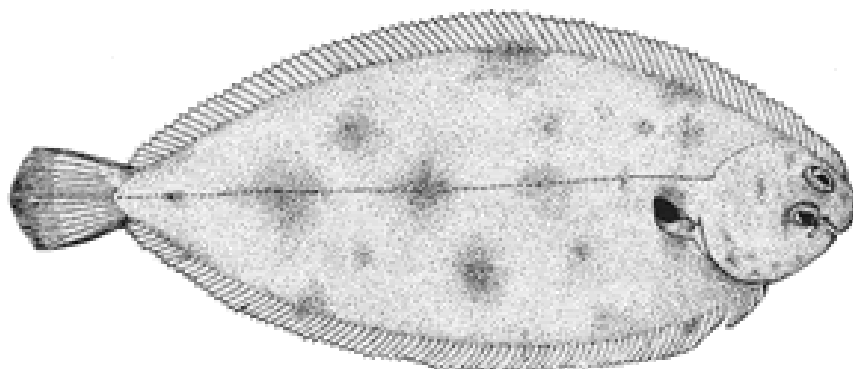
Πιο συγκεκριμένα, όπως αναφέρεται στο βιβλίο του Χρίστος Ν. Νεοφύτου με τίτλο «ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑ» (2015), τα είδη της οικογένειας Soleidae βρίσκονται τόσο στα τροπικά όσο και στα εύκρατα κλίματα και συνήθως σε ρηχά νερά, έχουν λεπτό πεπλατυσμένο σώμα και το ραχιαίο πτερύγιό τους ξεκινά από το ύψος του κεφαλιού. Η οικογένεια αυτή αντιπροσωπεύεται από πολλά είδη. Οι γλώσσες αποτελούν ιχθύες ευρείας κατανάλωσης και έχουν πολύ υψηλή εμπορική σημασία. (ICES- FishMap).

1.2.2 Περιγραφή κυριότερων ειδών Soleidae στη Μεσόγειο

1) Γλώσσα, *Solea solea* (L.) - NE

Η κοινή γλώσσα (*Solea solea*) διαθέτει πεπλατυσμένο σώμα ελλειψοειδούς σχήματος, με μικρό στρογγυλεμένο κεφάλι και στόμα του οποίου τα δόντια είναι περισσότερο ανεπτυγμένα στην τυφλή πλευρά, ενώ οι οφθαλμοί είναι τοποθετημένοι στη δεξιά πλευρά, με αρκετές όμως εξαιρέσεις (Νεοφύτου, 2015). Το συνολικό τους μήκος σπάνια ξεπερνά τα 60 εκατοστά, παρόλα αυτά άτομα μήκους μέχρι και 70 εκατοστά έχουν παρατηρηθεί. Το γρηότερο δείγμα παρατηρήθηκε σε ολλανδική ψαριά και η ηλικία του ήταν 40 έτη. Γενικότερα τα θηλυκά άτομα του είδους φτάνουν σε μεγαλύτερο μήκος συγκριτικά με τα αρσενικά (ICES- FishMap). Το είδος αυτό θεωρείται βενθικό και ζει σε βάθος μέχρι 150 μέτρα, σε θερμοκρασία 8 έως 24 βαθμών κελσίου. Η γλώσσα κυνηγά την τροφή της κυρίως το βράδυ και το διαιτολόγιό της περιλαμβάνει μικρά καρκινοειδή, οστρακοειδή και πολύχαιτους. Τα άτομα αυτού του είδους ωριμάζουν κατά το τρίτο με πέμπτο έτος της ηλικίας τους.

Κατά την περίοδο της αναπαραγωγής μεταναστεύουν σε βαθύτερα νερά, έτσι ώστε να επικρατεί θερμοκρασία 6 έως 12 βαθμών κελσίου. Η γλώσσα επεκτείνεται γεωγραφικά στη Μεσόγειο, στη θάλασσα του Μαρμαρά, στη νοτιο-δυτική Μαύρη θάλασσα καθώς και στον ανατολικό Ατλαντικό ωκεανό, στη Βόρεια θάλασσα, στη δυτική Βαλτική, στα νότια της Σενεγάλης και στο πράσινο ακρωτήρι (*Νεοφύτου, 2015, FAO*).



Εικόνα 2 *Solea solea* (<http://www.fao.org/fishery/species/3367/en>)

2) Αιγυπτιακή Γλώσσα, *Solea aegyptiaca* Chabanaud, 1927 - NE

Η Αιγυπτιακή γλώσσα διαθέτει σώμα πεπλατυσμένο, ελλειψοειδούς σχήματος, με μικρό κεφάλι. Η απόσταση του πάνω οφθαλμού από την πλάγια όψη του κεφαλιού είναι μικρότερη από τη διάμετρο του. Το συνηθέστερο μήκος που συναντάται είναι περίπου στα 25 εκατοστά, ενώ το μέγιστο φτάνει μέχρι και τα 65 εκατοστά. Αποτελεί βενθικό είδος της υποτροπικής ζώνης και τρέφεται κυρίως με πολύχαιτους και δίθυρα μαλάκια.

Η αναπαραγωγή του είδους αυτού στις αφρικανικές ακτές της Μεσογείου πραγματοποιείται προς το τέλος του φθινοπώρου και κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Η Αιγυπτιακή γλώσσα συναντάται στη Μεσόγειο θάλασσα και κυρίως στη θαλάσσια περιοχή της Τυνησίας και του Λιβάνου, στη νότια Αδριατική θάλασσα, στον κόλπο των

Λεόντων, καθώς και στη διώρυγα του Σουέζ. Επίσης συναντάται και στη λίμνη Warum της Αιγύπτου (Νεοφύτου, 2015).



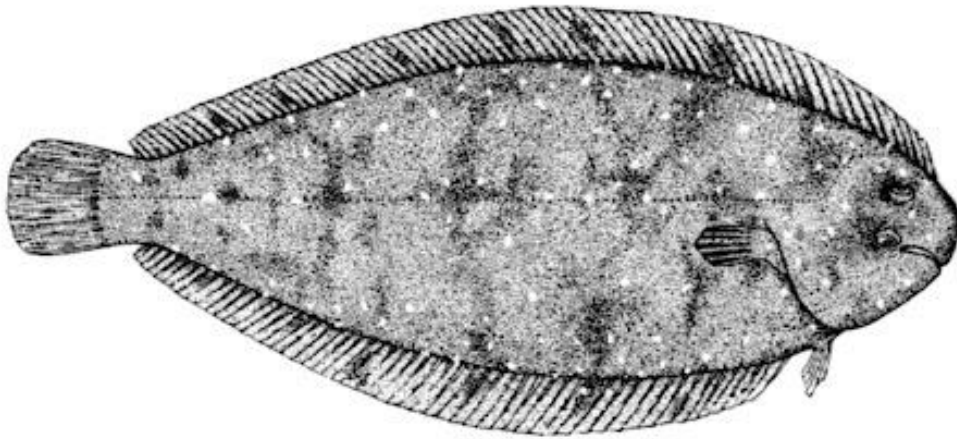
Εικόνα 3 *Solea aegyptiaca*

(https://www.researchgate.net/publication/233842856_Range_extension_of_Egyptian_sole_Solea_aegyptiaca_Soleidae_Pleuronectiformes_in_the_Red_Sea)

3) *Solea senegalensis* Kaup, 1858

Η γλώσσα *Solea senegalensis* διαθέτει πεπλατυσμένο σώμα, ωσειδές και ασύμμετρο σώμα, με τα μάτια να βρίσκονται στην δεξιά πλευρά. Διαθέτει μία μεμβράνη μαύρου χρώματος στο θωρακικό πτερύγιο, στην πλευρά των ματιών. Αυτό το χαρακτηριστικό την ξεχωρίζει από την κοινή γλώσσα (*Solea solea*) η οποία έχει ένα μεγάλο μαύρο συμπαγές σημείο στην οπίσθια πλευρά αυτού του πτερυγίου. Το μέγιστο μήκος φτάνει στα 60cm, με συνηθέστερο περίπου στα 45cm. Είναι ένα βενθικό, κυρίως παραλιακό, είδος, που γενικά κατοικεί σε αμμώδεις ή λασπώδεις βυθούς, με εύρος βάθους από 12 έως 65 μέτρα και τρέφεται κυρίως με βενθικούς ασπόνδυλους οργανισμούς, όπως λάρβες από πολύχαιτους.

Η αναπαραγωγή αυτού του είδους συμβαίνει μεταξύ Μαρτίου και Ιουνίου. Η *Solea senegalensis* συναντάται στη δυτική Μεσόγειο και τη Μαύρη θάλασσα, στον ανατολικό Ατλαντικό ωκεανό (Fishbase, Castanheira et.al, 2020).



Εικόνα 4 *Solea senegalensis*

(https://www.researchgate.net/publication/233842856_Range_extension_of_Egyptian_sole_Solea_aegyptiaca_Soleidae_Pleuronectiformes_in_the_Red_Sea)

1.3 Νοθεία και Ιχνηλασιμότητα

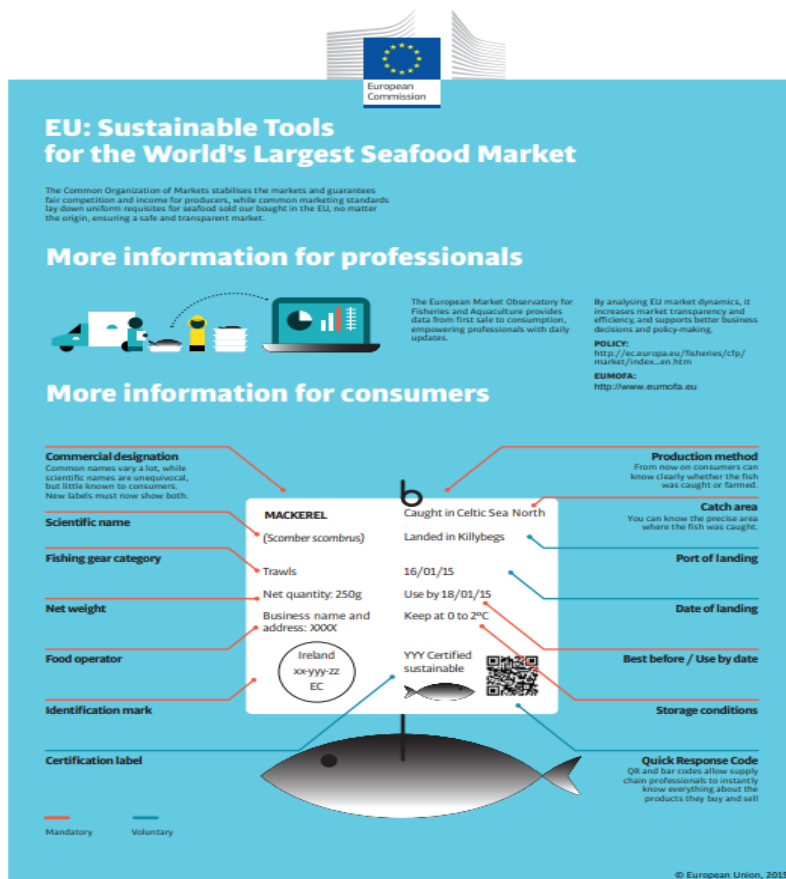
Η απάτη στα τρόφιμα, αν και δεν είναι ένα νέο φαινόμενο, έχει έρθει στο προσκήνιο τα τελευταία χρόνια. Ως επακόλουθο από το σκάνδαλο του κρέατος πουλερικών του 2013 στην Ευρωπαϊκή Ένωση, το οποίο έδειξε την ευαισθησία των διεθνών τροφικών αλυσίδων στην απάτη και το οργανωμένο έγκλημα, πολλές πρωτοβουλίες βρίσκονται σε εξέλιξη από τις κυβερνήσεις και τη βιομηχανία για την καταπολέμηση της απάτης στον τομέα των τροφίμων. Στην έκθεση (2013) της Επιτροπής Περιβάλλοντος, Δημόσιας Υγείας και Ασφάλειας των τροφίμων της Ευρωπαϊκής ένωσης «Απάτη - νοθεία σε τρόφιμα και δόλιες πρακτικές στην εφοδιαστική αλυσίδα Διαπιστώσεις – προτάσεις

αντιμετώπισης» αναφέρεται ότι οι ιχθύες κατατάσσονται δεύτεροι μεταξύ των τροφίμων που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο απάτης. Μέσα στο φαινόμενο της απάτης στον τομέα του τρόφιμου εμπεριέχεται και η οικονομική απάτη, ενώ ως αποτέλεσμα αυτού διακυβεύεται η υγεία των καταναλωτών όπως επίσης και η φυσική ισορροπία και βιωσιμότητα των ειδών που εμπλέκονται (Jose et al, 2019). Παραδειγματικά, σύμφωνα με την μελέτη των Filonzi et al. (2010) στην οποία μελετήθηκαν επεξεργασμένα προϊόντα ιχθύων από τις Ιταλικές αγορές, διαπιστώθηκε πως από τα είδη που μελετήθηκαν το 26% αποτελούσαν περιπτώσεις σοβαρής απάτης από οικονομικής αλλά και διατροφικής άποψης. Μάλιστα σε κάποιες περιπτώσεις οι απάτες αφορούσαν είδη των οποίων η διατήρηση είναι μεγάλης σημασίας σύμφωνα με τους καταλόγους IUCN και CITES.

Η ιχνηλασιμότητα συμβάλλει στη βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων, δίνοντας πληροφορίες για τα είδη των ζώων που μας ενδιαφέρουν, την προέλευση τους, την αυθεντικότητα, τη σύνθεση αλλά και το σύστημα παραγωγής. Η αναγνώριση των ειδών είναι ένα σημαντικό βήμα για την ιχνηλασιμότητα στα θαλασσινά. Η χρήση των μοριακών εργαλείων έχει αποδειχθεί πολύ πιο ακριβής από όλες τις άλλες διαγνωστικές μεθόδους που χρησιμοποιούνταν μέχρι πρότινος (Ferrito et al, 2017).

1.4 Σκοπός

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



Πίνακας 4 (<https://ec.europa.eu/oceans-and-fisheries/publications/sustainable-tools-worlds-largest-seafood-market-el>) Βιώσιμα εργαλεία για τη μεγαλύτερη αγορά θαλασσινών στον κόσμο.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πειραματική Διαδικασία

2.1.1 Συνθήκες και Όργανα πειράματος

Το πειραματικό μέρος της διπλωματικής διατριβής έλαβε χώρα στο πιστοποιημένο με ISO Εργαστήριο Υδροβιολογίας Ιχθυολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από τον Οκτώβριο του 2020 έως και τον Ιούνιο του 2021. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων τηρήθηκαν όλα τα προβλεπόμενα εργαστηριακά πρωτόκολλα και διαφυλάχθηκαν όλοι οι κανόνες ορθής εργαστηριακής πρακτικής. Τα εργαστηριακά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Ποτήρια Ζέσεως
- Ογκομετρικές Φιάλες
- Ζυγός Ακριβείας
- Λαβίδες και Νυστέρια
- Πιπέτες ακριβείας διαφόρων χωρητικοτήτων
- Υδατόλουτρο
- Σωληνάρια Eppendorf
- Θάλαμος αποστείρωσης UV
- Θερμοκυκλοποιητής
- Ηλεκτρονικός Υπολογιστής
- Κάμερα UV και Ειδικό Λογισμικό (DNR, Mini Bis Bio-Imaging Systems)
- Φυγόκεντρος (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Germany)
- Φούρνος αποξήρανσης

- Φούρνος Μικροκυμάτων
- Σκεύος κατασκευής Γέλης

Συνολικά για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 31 δείγματα της οικογένειας *Soleidae*, τα οποία προήλθαν από 8 διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας (Στόμιο, Αμβρακικός Κόλπος, Αλεξανδρούπολη, Λίμνη Βόλβη, Άρτα, Κρήτη, Ιόνιο Πέλαγος, Κυλλήνη) από ψαράδες ή ερευνητικά ιδρύματα. Τμήματα ιστού μεταφέρθηκαν με τη χρήση αποστειρωμένων λαβίδων και νυστεριών σε δοχεία μεγέθους 1.5 ml τα οποία περιείχαν διάλυμα DESS και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

2.1.2 Απομόνωση DNA

2.1.2.1 Πρωτόκολλα απομόνωσης DNA

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά πρωτόκολλα. Το πρώτο εκ των τριών είναι βασισμένο στο συνδυασμό φαινόλης και χλωροφορμίου:

1. Κοπή μικρού τμήματος ιστού περίπου 25 γραμμαρίων και τοποθέτηση του σε νέο Eppendorf
2. Προσθήκη 500μl TNE, 100μl Tris-HCl συγκέντρωσης 1M, 80μl SDS 10%, 10μl Proteinase K 20mg/μl
3. Τοποθέτηση των Eppendorf σε υδατόλουτρο στους 60 βαθμούς κελσίου και επώαση μέχρι την επόμενη ημέρα

4. Αφαίρεση των δειγμάτων από το υδατόλουτρο και προσθήκη 300μl φαινόλης και 300μl μείγματος χλωροφορμίου – ισοαμλικής αλκοόλης σε αντιστοιχία 24:1
5. Ανάδευση για 10 λεπτά
6. Φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 12.000 στροφές
7. Μεταφορά υπερκείμενου υγρού ποσότητας περίπου 650μl σε νέο Eppendorf
8. Προσθήκη 300μl φαινόλης και 300μl μείγματος χλωροφορμίου – ισοαμλικής αλκοόλης σε αντιστοιχία 24:1
9. Ανάδευση για 10 λεπτά
10. Φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 12.000 στροφές
11. Μεταφορά υπερκείμενου ποσότητας περίπου 500μl σε νέο Eppendorf
12. Προσθήκη 1ml καθαρής αλκοόλης
13. Προσθήκη 15μl Sodium Acetate συγκέντρωσης 3M
14. Τοποθέτηση στην κατάψυξη για 30 λεπτά
15. Φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 12.000 στροφές
16. Αφαίρεση αιθανόλης και προσθήκη 200μl παγωμένης αλκοόλης 70%
17. Φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 12.000 στροφές
18. Αφαίρεση αλκοόλης
19. Τοποθέτηση σε φούρνο ξήρανσης για περίπου 30 λεπτά

Στο δεύτερο πρωτόκολλο έγινε χρήση ειδικού ΚΙΤ απομόνωσης DNA της εταιρίας “Extract Me”, όπου και ακολουθήθηκαν πιστά όλα τα βήματα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για το τρίτο πρωτόκολλο έγινε χρήση του διαλύματος CTAB lysis buffer που αποτελείται από Tris – HCl με PH=8 σε συγκέντρωση 0.1M, EDTA με PH=8 συγκέντρωσης 20mM, NaCl συγκέντρωσης 1,4M και CTAB 2% βάρος/όγκο. Για την προετοιμασία του δείγματος πραγματοποιήθηκε:

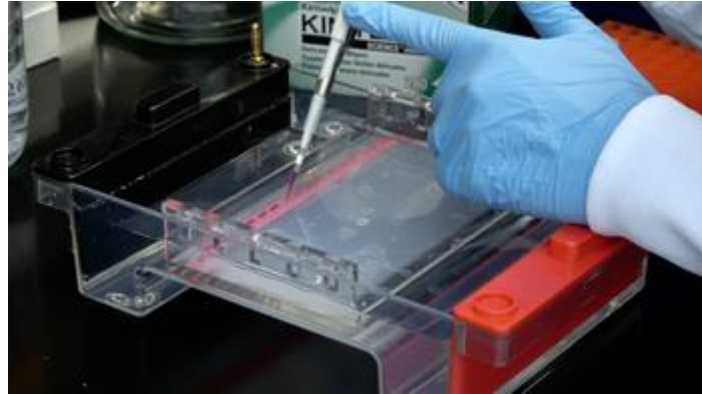
- Κοπή μικρού τμήματος ιστού περίπου 25 γραμμαρίων και τοποθέτηση του σε νέο Eppendorf
- Προσθήκη 500μl CTAB lysis buffer
- Προσθήκη 30μl Proteinase K 20mg/ml
- Προσθήκη 1μl β-μερκαπτοαιθανόλης
- Επώαση στους 56-60 βαθμούς κελσίου για 3 περίπου ώρες
- Αφαίρεση από υδατόλουτρο και τοποθέτηση για περίπου 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 500μl μείγματος χλωροφορμίου – ισοαμυλικής αλκοόλης σε αντιστοιχία 24:1
- Ανάδευση για 10 λεπτά
- Φυγοκέντριση στα 12.000g για 15 λεπτά στους 4° C
- Μεταφορά υπερκείμενου διαλύματος σε νέο Eppendorf
- Προσθήκη ισοπροπανόλης σε ποσότητα ίση με τα 2/3 του όγκου του υπερκείμενου υγρού
- Ανάδευση
- Επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντριση στα 12.000g για 15 λεπτά στους 4° C
- Αφαίρεση ισοπροπανόλης
- Διπλός καθαρισμός με χρήση παγωμένης αιθανόλης 75%

- Προσθήκη Tris-HCl με PH=8.5 και συγκέντρωση 5mM

2.1.2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA

Για τον έλεγχο της ποιότητας του απομονωμένου DNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1%. Το διάλυμα του TAE 1% αραιωνόταν από ένα stock buffer TAE 50% (242 g Tris-HCl, 57 ml Acetic Acid, 0,05 M EDTA pH 8). Για την κατασκευή πηκτής αγαρόζης γινόταν χρήση 0.48 γραμμάρια αγαρόζης όπου προστίθεντο 60ml TAE 1% και κατόπιν ακολουθούσε η χρήση φούρνου μικροκυμάτων για τη διάλυση της αγαρόζης μέσω θέρμανσης για 2 λεπτά στους 90 °C. Στη συνέχεια και αφού ψυχόταν η κωνική φιάλη γινόταν προσθήκη 3ml Βρωμιούχου Αιθιδίου 1% και ανακινούνταν η φιάλη ελαφρώς για την επίτευξη καλύτερης κατανομής του βρωμιούχου αιθιδίου σε όλο το μίγμα. Στη συνέχεια, το διάλυμα τοποθετούνταν σε τετράγωνο Plexiglas μήκους 10 cm. Το Plexiglas είχε 2 εσοχές (1 cm) εκατέρωθεν του πάνω μέρους των δύο πλευρικών τοιχωμάτων του όπου εφάρμοζαν 2 «χτενάκια» για τη δημιουργία των υποδοχών (πηγάδια). Το κάθε «χτενάκι» δημιουργούσε 16 πηγάδια όγκου 14 μl. Μετά την πάροδο 20 λεπτών, η πηκτή αγαρόζη είχε δημιουργηθεί και μετά την αφαίρεση των χτενιών υπήρχαν και οι μορφοποιημένες θέσεις. Στον χρόνο που παρήλθε μέχρι την πήξη της αγαρόζης τα δείγματα προετοιμαζόταν για ηλεκτροφόρηση. Το κάθε δείγμα θα φορτωνόταν με την τεχνική «by pipetting» και η ποσότητα ήταν 6.5 μl, εκ των οποίων 5μl DNA και 1.5 μl χρωστικής (Bluebromophenol, Invitrogen). Η χρωστική κρίνεται απαραίτητη κατά την ηλεκτροφόρηση για τον διαχωρισμό των προϊόντων. Το Plexiglas τοποθετούνταν μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και έπειτα προσθετόταν ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1%.

Στη συνέχεια, πραγματοποιούταν η φόρτωση των δειγμάτων μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα.



Εικόνα 5 Φόρτωση δειγμάτων στο gel ηλεκτροφόρησης

(<https://www.addgene.org/protocols/gel-electrophoresis/>)

Μόλις ολοκληρωνόταν όλες οι παραπάνω προεργασίες, εφαρμόζονταν τάση (60 volt) από το τροφοδοτικό (CONSORT E143) στη συσκευή (SCIE-PLAS) για 30 λεπτά. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετούνταν φωτογραφική μηχανή (DNR, Mini Bis Bio-Imaging Systems) υπό υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), όπως φαίνεται στην Εικόνα.

Κατόπιν, τάση των 100 volt εφαρμόζονταν από κατάλληλο τροφοδοτικό στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για περίπου 30 λεπτά. Αφού ολοκληρωνόταν η διαδικασία, το gel τοποθετούνταν σε φωτογραφική μηχανή υπό υπεριώδους ακτινοβολίας. Σε περίπτωση που κάποιο δείγμα δεν εμφανιζόταν στη φωτογραφική απεικόνιση, είτε λόγω κακής ποιότητας είτε λόγω μικρής ποσότητας αυτού, η διαδικασία επαναλαμβανόταν σε αυτά τα άτομα με το ίδιο ή και διαφορετικό πρωτόκολλο απομόνωσης.

2.1.3 PCR

Για τις ανάγκες της PCR κατασκευάστηκε ένα μητρικό διάλυμα (master mix) το οποίο περιείχε το ειδικό διάλυμα (Buffer), διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου $MgCl_2$, διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTP's), ένα ζεύγος εκκινητών (forward και reverse primers), διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO), θερμοσταθερή Taq DNA πολυμεράση, ποσότητα αποστειρωμένου νερού και το μόριο του DNA. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται αναλυτικά οι ποσότητες:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
DNA	1μl
BUFFER	2μl
DNTP'S	0.2μl
PRIMERS	1.5μl + 1.5μl
DMSO	1μl
TAQ	0.2μl
H ₂ O	7.6μl

Πίνακας 5 Για κάθε αντιδραστήριο πέραν του μορίου DNA, η ποσότητα που προσθέταμε στο master mix

πολλαπλασιαζόταν επί του αριθμού των δειγμάτων +1

Η PCR πραγματοποιήθηκε σε ειδικό μηχάνημα (θερμοκυκλωποιητής) και διακρίνεται: στη μετουσίωση της διπλής έλικας (denaturation), την υβριδοποίηση (annealing) των ειδικών εκκινητών με τις απλές έλικες και την επέκταση (extension) των εκκινητών. Για τον καθορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας για τους primer που χρησιμοποιήθηκαν (CO1), αρχικά πραγματοποιήθηκε βαθμωτή (gradient) PCR στις θερμοκρασίες

48°C, 50.6°C, 52°C, 53.7°C, 56.2°C. Ο χρόνος της κάθε φάσης, καθώς και ο αριθμός των κύκλων παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ
95°C	15'
95°C	1'
48°C	45''
72°C	45''
75°C	10'
10°C	∞

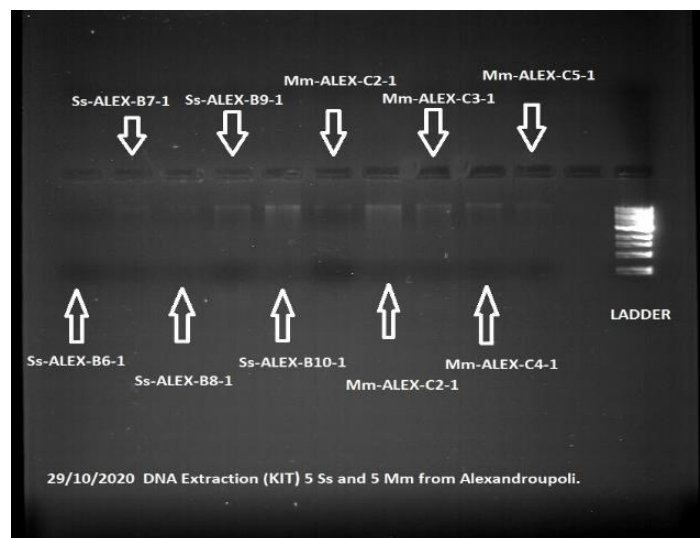
Πίνακας 6. Θερμοκρασίες και χρόνος κύκλων διαδικασίας PCR. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι που απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα επαναλαμβάνονται συνολικά για 35 κύκλους

Για την απεικόνιση της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση.

3. Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα απομόνωσης DNA

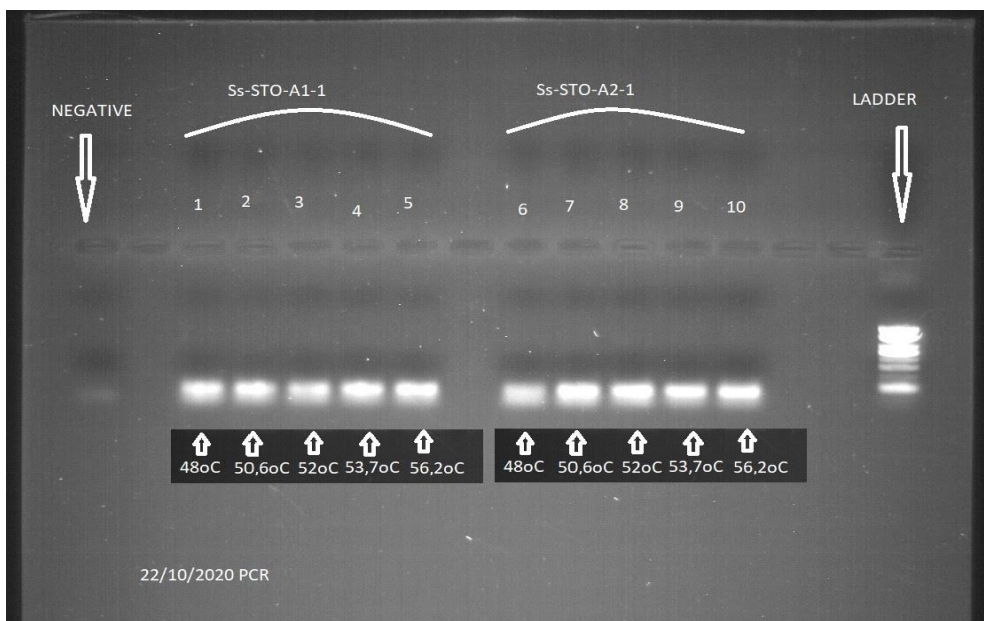
Στη φάση της απομόνωσης DNA τα πρώτα δύο πρωτόκολλα έδειξαν θετικά αποτελέσματα στην ηλεκτροφόρηση αλλά δεν είχαν σταθερά αποτελέσματα στις επαναλήψεις της διαδικασίας που πραγματοποιήθηκαν. Το δεύτερο πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε έδωσε τα καλύτερα και πιο σταθερά αποτελέσματα.



Εικόνα 6 Ηλεκτροφόρηση απομόνωσης DNA με τη χρήση του kit Extract Me (όπου Ss = *Solea solea* και Mm = *Merluccius merluccius*)

3.2 Αποτελέσματα PCR

Τα δείγματα με την καλύτερη ποιότητα αποθηκεύτηκαν προσωρινά σε συνθήκες ψύξης και στη συνέχεια επιλέχθηκαν για διενέργεια PCR. Το ζεύγος primer που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτό του universal primer CO1. Τα αποτελέσματα της PCR δεν ήταν επιτυχή σε καμία από τις θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν παρά την επανάληψη του πειράματος.



Εικόνα 8 Ανεπιτυχή αποτελέσματα PCR με χρήση Primer CO1

4. Συμπεράσματα και Συζήτηση

4.1 Συμπεράσματα

Οι περιπτώσεις δόλιων πρακτικών (food fraud) και νοθείας των τροφίμων συνίστανται στην αντικατάσταση ακριβότερων ειδών με άλλα φθηνότερα, εσφαλμένη σήμανση προέλευσης (εγχώρια ή εισαγόμενα) και προσμίξεις ή αντικαταστάσεις σε μεταποιημένα/κατεψυγμένα προϊόντα (ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΛΙΕΙΑΣ & ΘΑΛΑΣΣΑΣ 2014 – 2020). Από το 2010 έως το 2012, το πρόγραμμα Oceana διεξήγαγε μία από τις μεγαλύτερες έρευνες για την καταπολέμηση της απάτης στον κόσμο, μέχρι σήμερα, συγκεντρώνοντας πάνω από 1.200 δείγματα από 674 καταστήματα λιανικής πώλησης σε 21 κράτη, για να διαπιστώσει αν τα προϊόντα αυτά ήταν ορθώς επισημασμένα. Ο έλεγχος DNA έδειξε ότι το ένα τρίτο ή το 33% των 1.215 δειγμάτων θαλασσινών είχε εσφαλμένη σήμανση, σύμφωνα με τις οδηγίες της αμερικανικής υπηρεσίας τροφίμων και φαρμάκων (FDA). Στην έκθεση (2013) της Επιτροπής Περιβάλλοντος, Δημόσιας Υγείας και Ασφάλειας των τροφίμων της ΕΕ «Απάτη - νοθεία σε τρόφιμα και δόλιες πρακτικές στην εφοδιαστική αλυσίδα Διαπιστώσεις – προτάσεις αντιμετώπισης» αναφέρεται ότι τα ψάρια κατατάσσονται δεύτερα μεταξύ των τροφίμων που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο απάτης.

Έρευνα στην Ιταλία (Di Pinto et al., 2015) αποκάλυψε ότι οι ετικέτες μόνο 32/200 δειγμάτων φιλέτων ψαριών είχαν πλήρεις πληροφορίες σχετικά με την εμπορική ονομασία, την επιστημονική επωνυμία, τη γεωγραφική περιοχή, τη μέθοδο παραγωγής και το εάν έχουν προηγουμένως καταψυχθεί.

Συγκεκριμένα, η επιστημονική ονομασία, η οποία πρέπει να αναφέρεται από την 1η Ιανουαρίου 2012, σύμφωνα με το άρθρο 68 του εκτελεστικού κανονισμού της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Νο. 404/2011, παραλείφθηκε σε 157/168 δείγματα και η γεωγραφική περιοχή έλειπε σε 152/168 δείγματα. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων με μοριακές τεχνικές αποκάλυψαν μια μεγάλη εμφάνιση λανθασμένης δήλωσης των ειδών, σε όχι λιγότερο από 164/200 (82%) προϊόντα φιλέτων ψαριών. Για το λόγο αυτό κρίνεται σκόπιμος, ο έλεγχος της αυθεντικότητας των αλιευμάτων, καθώς και η διερεύνηση του προβλήματος της νοθείας στην Ελληνική αγορά με χρήση μοριακών τεχνικών και προσεγγίσεις φυλογενετικής ανάλυσης.

Το καταναλωτικό ενδιαφέρον παγκοσμίως για τα ψάρια της οικογένειας Soleidae είναι ιδιαίτερα αυξημένο. Σε μεγάλο βαθμό πωλούνται επεξεργασμένα ή νωπά/κατεψυγμένα φιλέτα (Rodger 2006) με αποτέλεσμα να αποτελούν από τα πιο συχνά είδη ψαριών στα οποία εντοπίζεται νοθεία (Sanjuan & Comesana 2002). Έτσι σε πολλές περιπτώσεις πλατύψαρα χαμηλότερης τιμής παρουσιάζονται ως ψάρια με υψηλότερο αγοραστικό ενδιαφέρον και υψηλότερη τιμή, όπως η κοινή γλώσσα (*Solea solea*) (Cespedes et al. 2000). Η πιο συχνή εξαπάτηση και με ποσοστό 44,4% έχει παρατηρηθεί στη Βόρειο Ιταλία σε φιλέτα της κοινής γλώσσας που αντικαταστάθηκαν με το είδος *Solea senegalensis* (Tantillo et al. 2015). Υψηλά ποσοστά νοθείας έχουν καταγραφεί και σε άλλες μελέτες σχετικές με ελέγχους σε φιλέτα πλατύψαρων με μοριακή ταυτοποίηση, όπως 37,5% των δειγμάτων στη Νότια Ιταλία (Pappalardo & Ferrito 2015) και 43% στην Ισπανία (Espineira et al. 2008). Η ταυτοποίηση με DNA barcoding έδειξε ότι το 41% των περιπτώσεων νοθείας σε φιλέτα πλατύψαρων στην έρευνα στη Νότια Ιταλία (Pappalardo & Ferrito 2015) αφορούσε την αντικατάσταση της κοινής γλώσσας *Solea solea* (Soleidae) με ένα είδος αρνόγλωσσας, *Arnoglossus laterna* (Bothidae). Τα δύο αυτά είδη

ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες και δεν είναι πιθανό να μπερδεύονται τυχαία. Τα Soleidae είναι πλατύψαρα με τα μάτια στη δεξιά πλευρά και τα Bothidae έχουν τα μάτια στην αριστερή πλευρά. Επομένως, η αντικατάσταση της κοινής γλώσσας από αρνόγλωσσα θεωρείται δόλια. Επίσης, γενετική ταυτοποίηση των δειγμάτων πλατύψαρων στην έρευνα στην Ισπανία (Espineira et al. 2008) έδειξε ότι το 10% των περιπτώσεων νοθείας αφορούσε την αντικατάσταση της *Solea solea* από *Solea senegalensis* και *Microchirius azevia*.

4.1.1 Μορφομετρικά Χαρακτηριστικά

Για τα δείγματα που ήρθαν με τη μορφή ολόκληρου κατεψυγμένου ψαριού, λήφθηκαν και μορφομετρικά χαρακτηριστικά πριν διενεργηθούν οι υπόλοιπες αναλύσεις. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν έγιναν σύμφωνα με τους Serpil et al. (2020).



Εικόνα 9 Φωτογραφία Δείγματος από Ιόνιο Πέλαγος



Εικόνα 10 Φωτογραφία Δείγματος από Αμβρακικό Κόλπο

4.2 Συζήτηση

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

Μέχρι πρόσφατα τα βιολογικά δείγματα μπορούσαν να ταυτοποιηθούν και να ταξινομηθούν χρησιμοποιώντας μορφολογικά χαρακτηριστικά (όπως το σχήμα, το

μέγεθος και το χρώμα σε διαφορετικά μέρη του σώματος, κλπ.) ή με τεχνικές βασισμένες σε πρωτεΐνες (ηλεκτροφορητικές, χρωματογραφικές ή ανοσολογικές). Ωστόσο, εάν ένα δείγμα έχει υποστεί κατεργασία, βλάβη ή είναι μαγειρεμένο, αφενός οι ειδικοί στην ταξινόμηση μπορεί να μην είναι σε θέση να αναγνωρίσουν το δείγμα και αφετέρου οι πρωτεΐνες να έχουν μετουσιωθεί. Πολλά από αυτά τα παραπάνω είδη πωλούνται ως ακέφαλα, απολεπισμένα ψάρια ή κατεψυγμένα φιλέτα, ή διακινούνται σε νεαρά στάδια ανάπτυξης, καθιστώντας αδύνατη την αναγνώριση του είδους μορφολογικά. Χρειάζονται λοιπόν τα κατάλληλα εργαλεία για την ανίχνευση πιθανής εξαπάτησης σε αλιευτικά προϊόντα οποιασδήποτε μορφής.

Οι μοριακές τεχνικές και φυλογενετικές αναλύσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική πρόταση για την ανάλυση των δειγμάτων βασίζονται στην ταυτοποίηση του γενετικού υλικού (DNA) και τη δυνατότητα διασταύρωσης στοιχείων με βιοπληροφορική. Καθορίζοντας τη μοριακή ταυτότητα κάθε είδους, προκύπτει μια σειρά αποτελεσματικών μεθόδων για την εκτίμηση της γενετικής αυθεντικότητας και της γενετικής ανίχνευσης τόσο των ιχθύων όσο και των υπόλοιπων αλιευμάτων. Το πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών συνίσταται στο γεγονός ότι μπορεί να γίνει ταυτοποίηση σε δείγματα οποιασδήποτε μορφής: ωμά, μαγειρεμένα, επεξεργασμένα, κατεψυγμένα. Οι οικονομικές επιπτώσεις της νοθείας στον τομέα της αλιείας είναι σημαντικές.

Σε έρευνα που διενεργήθηκε στη βόρεια και κεντρική Ιταλία (Filonzi et al. 2010) αποκαλύφθηκε μη ορθή επισήμανση στο 32% των δειγμάτων (φρέσκα και κατεψυγμένα φιλέτα ψαριών). Από οικονομικής άποψης η απάτη ήταν μεγάλη, καθώς η εμπορική αξία των δηλωθέντων ειδών στην ιταλική αγορά κατά την περίοδο της έρευνας ήταν της τάξης

των 19,90-40,00 ευρώ / kg, ενώ η αξία των ειδών που χρησιμοποιήθηκαν για υποκατάσταση τους κυμαινόταν μεταξύ 8,90 και 11,20 ευρώ / kg (Filonzi et al. 2010).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι περισσότεροι από τους ιχθύες που χρησιμοποιούνται για υποκατάσταση προέρχονται από χώρες εκτός Ευρώπης, όπου οι έλεγχοι των θέσεων εκτροφής, των παθογόνων παραγόντων και της βιοσυσσωρευσης βαρέων μετάλλων είναι ανύπαρκτοι, με αυτό να αυξάνει τις πιθανότητες οι ιχθύες αυτοί να προέρχονται από ρυπασμένα νερά (Filonzi et al. 2010). Η εξακρίβωση της αυθεντικότητας των τροφίμων στον τομέα της αλιείας μπορεί να επιτρέψει μια πιο σωστή διαχείριση της περιβαλλοντικής βιωσιμότητας. Ειδικότερα, η ταυτοποίηση των ειδών ιχθύων θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί για τη στήριξη των ερευνών και την αποτροπή της παράνομης, λαθραίας και άναρχης (IUU: Illegal, Unreported and Unregulated) αλιείας και της απάτης σε τρόφιμα, βελτιώνοντας τη διαχείριση της αλιείας και, συνεπώς, τη βιωσιμότητα των φυσικών πόρων.

Η εσφαλμένη σήμανση προκαλεί επίσης ανησυχίες για τα συστήματα πιστοποίησης («οικολογική σήμανση») που βασίζονται σε αξιόπιστα στοιχεία αναγνώρισης των ειδών και της προέλευσης τους για την υποστήριξη της καταναλωτικής ζήτησης για «βιώσιμα» προϊόντα (Di Pinto et al. 2015). Προηγούμενες μελέτες διαπίστωσαν εκτεταμένη χρήση απειλούμενων ειδών που συμπεριλαμβάνονται στην κόκκινη λίστα του IUCN (2014), για την αντικατάσταση άλλων ακριβότερων εμπορικών ειδών (Di Pinto et al. 2015). Η Ευρωπαϊκή και εθνική νομοθεσία σχετικά με την ιχθυοαλιεία και την επισήμανση των τροφίμων συνέβαλε στην πρόληψη και τον έλεγχο των απατών. Τα νομοθετικά αυτά μέσα σε ευρωπαϊκό επίπεδο αντιπροσωπεύονται από γενικούς νόμους, όπως ο κανονισμός 178/2002 και ο κανονισμός 1169/2011, καθώς και συγκεκριμένους νόμους, όπως ο Κανονισμός 1379/2013, που παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την

επισήμανση των προϊόντων θαλασσινών, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην προέλευση και το όνομα των ειδών (Pier Luigi Acutis et. al, 2019, EE, 2002, EE, 2011, EE, 2013).

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

Παράλληλα σε επόμενο στάδιο του προγράμματος θα συλλεχθούν δείγματα από νωπά, επεξεργασμένα ή κατεψυγμένα προϊόντα που διατίθενται στην Ελληνική αγορά, παρουσιάζουν ελλιπή σήμανση και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις νοθείας των υπό μελέτη ειδών. Στα δείγματα αυτά θα γίνει ταυτοποίηση τους με DNA sequencing-barcoding και στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη των μεθόδων ανίχνευσης της νοθείας με τεχνικές PCR. Κάθε καινούργια αλληλουχία που θα προκύψει από τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, θα καταχωρηθεί στο σύστημα Barcode of Life Data Systems (BOLD) database – το οποίο περιλαμβάνει μια βιβλιοθήκη αναφοράς με DNA barcodes και χρησιμοποιείται για να ταυτοποιεί άγνωστα δείγματα.

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

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί πως η πειραματική διαδικασία δεν ολοκληρώθηκε πλήρως μέχρι τη στιγμή της συγγραφής αυτής της διπλωματικής. Παρόλα αυτά, στο πρώτο στάδιο της επόμενης φάσης του πειράματος θα πραγματοποιηθεί εκ νέου σχεδιασμός συμβατών primer ώστε να επιτευχθεί η επιτυχής ολοκλήρωση της PCR και κατόπιν τα αποτελέσματα αυτής να σταλούν για αλληλούχιση.

5. Βιβλιογραφία

5.1 Ελληνική Βιβλιογραφία

Χρίστος Ν. Νεοφύτου (2015). *Ιχθυολογία* Σελ. 405-409, Θεσσαλονίκη, UNIVERSITY STUDIO PRESS

5.1 Ξένη Βιβλιογραφία

Angel S Comesana, Paz Abella and Andres Sanjuan* (2003). Molecular identification of five commercial flatfish species by PCR–RFLP analysis of a 12S rRNA gene fragment.

Angela Di Pinto, Anna Mottola, Patrizia Marchetti, Marilisa Bottaro, Valentina Terio, Giancarlo Bozzo, Elisabetta Bonerba, Edmondo Ceci, Giuseppina Tantillo (2016). Packaged frozen fishery products: identification, mislabeling occurrence and legislative implications.

Angela Di Pinto, Patrizia Marchetti, Anna Mottola, Giancarlo Bozzo, Elisabetta Bonerba, Edmondo Ceci, Marilisa Bottaro, Giuseppina Tantillo (2015). Species identification in fish fillet products using DNA barcoding.

Anna M. Pappalardo, Venera Ferrito (2015). DNA barcoding species identification unveils mislabeling of processed flatfish products in southern Italy markets.

Carlos Infante, Gaetano Catanese, and Manuel Manchado (2004). Phylogenetic Relationships Among Ten Sole Species (Soleidae, Pleuronectiformes) from the Gulf of Cadiz.

Food and Agriculture Organisation of the United Nations (2018). The state of the world fisheries and aquaculture.

ICES Fish map species factsheet-Sole (2006).

J.A. Anticamara^{a,b}, R. Watson^{a,*}, A. Gelchua, D. Pauly (2011). Global fishing effort (1950–2010): Trends, gaps, and implications.

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

Laura Filonzi, Stefania Chiesa, Marina Vaghi, Francesco Nonnis Marzano (2010). Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy.

Maria Fiorella Mazzeo, Rosa Anna Siciliano (2016). Proteomics for the authentication of fish species.

Malandrae, Marzia Pezzolatoa,*, Maria Caramellia, Elena Bozzettaa (2019). Detection of fish species substitution frauds in Italy: A targeted National Monitoring Plan.

Marc Kochzius, Christian Seidella, Aglaia Antoniou, Sandeep Kumar Botla1b, Daniel Campoc, Alessia Cariani, Eva Garcia Vazquez, Janet Hauschild, Caroline Hervete, Sigridur Hjo, Gudmundur Hreggvidsson,, Kristina Kappel, Monica Landi, Antonios Magoulas, Viggo Marteinson, Manfred Nolte, Serge Planes, Fausto Tinti, Cemal Turan, Moleyur N. Venugopal, Hannes Weber, Dietmar Blohm. Identifying Fishes through DNA Barcodes and Microarrays.

Monsterrat Espineira, Nerea Gonzalez-Lavin, Juan M. Vieites and Francisco J. Santaclara (2008). Development of a Method for the Genetic Identification of Flatfish Species on the Basis of Mitochondrial DNA Sequences.

Pier Luigi Acutisa, Valentina Cambiottia, Maria Vittoria Riinaa, Serena Meistroa, Cristiana Maurellaa, Mario Massarob, Paolo Stacchinic, Stefano Gilid, Renato Malandrae, Marzia Pezzolatoa,*, Maria Caramellia, Elena Bozzettaa (2019). Detection of fish species substitution frauds in Italy: A targeted National Monitoring Plan.

Serpil Karan & Cemal Turan (2020). Evaluation of Molecular and Phenotypic Markers for Phylogeographic Analysis of the Black-Sea Turbot *Scophthalmus aetoticus* (Pallas, 1814) (Actinopterygii: Scophthalmidae).

Stefano Mariani, Andrew M Griffiths, Amaya Velasco, Kristina Kappel, Marc Jérôme, Ricardo I Perez-Martin, Ute Schröder, Veronique Verrez-Bagnis, Helena Silva, Sara G Vandamme, Belgees Boufana, Rogerio Mendes, Marc Shorten, Cat Smith, Elizabeth Hankard, Samantha A Hook, Alice S Weymer, Dary Gunning, and Carmen G Sotelo (2015). Low mislabeling rates indicate marked improvements in European seafood market operation.

Venera Ferrito & Anna Maria Pappalardo (2017). Seafood species identification by DNA barcoding, a molecular tool for food traceability.

5.2 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

Castanheira, Maria Filipa. 2020. *Solea senegalensis* (Short Profile). In: FishEthoBase, ed Fish Ethology and Welfare Group. World Wide Web electronic publication. Version 1.82. www.fishethobase.net (πρόσβαση 09/2021)

European Commission. The common Fisheries Policy (CFP) (πρόσβαση 09/2021). https://ec.europa.eu/oceans-and-fisheries/policy/common-fisheries-policy-cfp_en

6. Abstract

The present work focuses on the problem of fish fraud of *Soleidae* family in the Greek market. Aim of the dissertation was the identification of specific molecular markers and the selection of the appropriate methodology, which can be used as an effective control of the authenticity of the examined species of fish caught in the Greek seas, compared to other species of lower quality and economic value that are traded in the Greek market. For this purpose, three different DNA isolation protocols were tested, that of phenol and chloroform, the specific DNA isolation KIT “Extract Me”, and the CTAB lysis buffer solution. Isolation with the “Extract Me” KIT was the one that scored better quality DNA during the electrophoresis. This DNA was later used for PCR analysis, which however, did not yield the expected results that would allow the samples to be sequenced and subsequently the creation of a DNA library of the species under study.

In future stages, new primers will be designed, compatible with the species under study in order to successfully complete the PCR analysis process.

Key Words: *Soleidae* family, fraud, replacement, economical and nutritional value, sustainability, DNA isolation, PCR analysis