



ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ



**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΣΦΑΛΜΕΝΗΣ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗΣ ΣΕ
ΑΛΙΕΥΜΑΤΑ ΠΟΥ ΦΕΡΟΥΝ ΤΗΝ ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ
«ΓΑΛΕΟΣ», ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ DNA
ΔΕΙΚΤΩΝ**

**Mislabelling detection in seafood products
commercialized with the term “Galeos”, with
mitochondrial DNA markers**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΠΑΖΑΡΤΖΗ ΘΕΟΔΟΣΙΑ
ΣΙΑΠΕΡΟΠΟΥΛΟΥ ΣΤΥΛΙΑΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΙΜΣΙΡΙΔΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2019

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΣΦΑΛΜΕΝΗΣ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗΣ ΣΕ ΑΛΙΕΥΜΑΤΑ ΠΟΥ ΦΕΡΟΥΝ ΤΗΝ
ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ «ΓΑΛΕΟΣ», ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ DNA
ΔΕΙΚΤΩΝ**

**Mislabelling detection in seafood products commercialized with the term “Galeos”,
with mitochondrial DNA markers**

ΠΑΖΑΡΤΖΗ ΘΕΟΔΟΣΙΑ
ΣΙΑΠΕΡΟΠΟΥΛΟΥ ΣΤΥΛΙΑΝΗ

Υποβολή Μεταπτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή του Μεταπτυχιακού Διπλώματος του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων της σχολής Γεωτεχνικών Επιστημών του Διεθνούς Πανεπιστημίου της Ελλάδος.

Οκτώβριος 2019

Εισηγήτρια: Ιμσιρίδου Αναστασία

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική διατριβή με τίτλο «Ανίχνευση εσφαλμένης επισήμανσης σε αλιεύματα που φέρουν την εμπορική ονομασία “γαλέος”, με τη χρήση μιτοχονδριακών DNA δεικτών» εκπονήθηκε από τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Παζαρτζή Θεοδοσία και Σιαπεροπούλου Στυλιανή, στο Εργαστήριο Γενετικής Ανάλυσης Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, που στεγάζεται στο Εργαστήριο Αγροβιοτεχνολογίας και Ελέγχου Αγροτικών Προϊόντων, του τμήματος Τεχνολογίας Γεωπονίας, της Σχολής Γεωτεχνικών Επιστημών, του Διεθνούς Πανεπιστημίου της Ελλάδος. Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών με τίτλο «Συστήματα διασφάλισης ποιότητας και οργάνωση παραγωγής», υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Αναστασίας Ιμσιρίδου.

Στο συγκεκριμένο σημείο, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της διπλωματικής μας εργασίας. Την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Αναστασία Ιμσιρίδου για την εμπιστοσύνη, την κατανόηση, τη συμπαράσταση, την υπομονή της και την εξαιρετική καθοδήγησή της, παρά τις δυσκολίες που αντιμετωπίσαμε. Επίσης, τη Δρ. Χρυσούλα Γκουμπίλη για την πολύτιμη βοήθειά της και τη μετάδοση των γνώσεων της, που ήταν πραγματικά ανεκτίμητες για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας.

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε επίσης τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Χατζηπλή για τις πολύτιμες συμβουλές του, καθώς και τον εργαστηριακό συνεργάτη και μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Δημήτριο Λουκοβίτη για τις καθημερινές συμβουλές του, την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά του, ιδίως στο εργαστηριακό μέρος της εργασίας. Οφείλουμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Μίνο και την κ. Αρχοντία Χατζησπύρου για τη συνεισφορά τους στη δειγματοληψία. Επιπλέον, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τις οικογένειές μας, για τη στήριξη και την ενθάρρυνσή τους σε αυτή μας την προσπάθεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επεξεργασία κατά την εμπορία πολλών ειδών συνήθως προκαλεί απώλεια στα διαγνωστικά μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, με σκοπό την ενίσχυση της δόλιας αντικατάστασης των ειδών και της εσφαλμένης επισήμανσης. Η έλλειψη των μορφολογικών χαρακτηριστικών είναι σύνηθες φαινόμενο στα ελασμοβράγχια, καθώς απορρίπτονται όλα τα εξωτερικά χαρακτηριστικά (π.χ. το δέρμα, το κεφάλι και τα πτερύγια), και το τμήμα του σώματος μεταποιείται σε φιλέτα. Τέτοιες μέθοδοι αυξάνουν τις πιθανότητες αντικατάστασης των ειδών με άλλα χαμηλότερης εμπορικής αξίας, ή με είδη απειλούμενα με εξαφάνιση, αφήνοντας τους καταναλωτές απροστάτευτους από αθέμιτες και παραπλανητικές πρακτικές. Το DNA Barcoding έχει καταστεί η πιο συχνά εφαρμοζόμενη μέθοδος για την ανίχνευση της εσφαλμένης επισήμανσης θαλασσινών προϊόντων και της υποκατάστασης των ειδών, καθώς η μορφολογική ταυτοποίηση καθίσταται αδύνατη λόγω της μεταποίησης του ψαριού. Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία για την ασφάλεια των τροφίμων (ΦΕΚ 475 / Τεύχος Β ' / 27-3-2015, αριθ. 1750/32219 της ΕΕ 1379/2013), μόνο τα προϊόντα του γένους *Mustelus spp.* (*M. mustelus*, *M. punctulatus* και *M. asterias*) μπορούν να πωληθούν υπό την εμπορική ονομασία «γαλέος».

Συνολικά, 74 δείγματα τα οποία πωλήθηκαν υπό τον όρο «γαλέος», συλλέχθηκαν από 24 διαφορετικές λαϊκές αγορές και ιχθυοπωλεία, από τέσσερις διαφορετικές πόλεις της Ελλάδας (Αθήνα, Θεσσαλονίκη, Κομοτηνή, Καβάλα), από το Μάρτιο του 2016 έως το Μάιο του 2018. Από τον ιστό των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε εξαγωγή του γενωματικού DNA, του οποίου η ποσότητα και η ποιότητα απεικονίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Δύο διαφορετικά mtDNA γονίδια (16S rRNA και COI) επιλέχθηκαν για την ανάλυση κάθε δείγματος, και όλα τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν και αλληλουχήθηκαν με τη βοήθεια αυτόματου αναλυτή ABI. Όλες οι παραγόμενες αλληλουχίες ελέγχθηκαν και συγκρίθηκαν με αυτές που είναι διαθέσιμες σε βάσεις δεδομένων για την ταυτοποίηση των ειδών, όπως η GenBank και η BOLD.

Στη μελέτη ανιχνεύτηκε ένα εξαιρετικά υψηλό επίπεδο εσφαλμένης επισήμανσης (54,8%), καθώς μόνο τα 33 από τα 74 δείγματα ταξινομήθηκαν στο γένος *Mustelus*. Αξίζει να σημειωθεί ότι, περισσότερα από τα μισά προϊόντα προέρχονται από είδη τα οποία ανήκουν στην κόκκινη λίστα της IUCN (53,4%), και από είδη τα οποία εντάσσονται σε απαγορευσεις εκφορτώσεων βάσει διεθνούς και εθνικής νομοθεσίας (57,6%). Το γεγονός ότι γίνεται υποκατάσταση των ειδών με είδη μεγαλύτερου μεγέθους, τα οποία

παρουσιάζουν ελάχιστες μορφολογικές ομοιότητες με τα είδη *Mustelus spp.*, προφανώς αποδεικνύει σκόπιμη υποκατάστασή τους.

ABSTRACT

In the trade of many species, food processing usually causes the loss of any morphological diagnostic features of the species, enhancing the possibility of fraudulent substitution and mislabeling. Lack of morphological features due to food processing is common in elasmobranchs, as all external traits are discarded (e.g. skin, head and fins), and the body part is processed into filets. Such methods increase the chances of species substitution with cheaper alternatives or endangered species, leaving consumers unprotected from unfair or deceptive practices. DNA Barcoding has become the most commonly applied approach for detection of mislabeled seafood products and species substitution, because morphological identification is impossible, due to the processing of the fish. According to the Greek food and safety legislation requirements (Official Government Gazette 475/ Issue B'/27-3-2015, No. 1750/32219 under EU 1379/2013), only the *Mustelus spp.* products (*Mustelus mustelus*, *M. punctulatus* and *M. asterias*) can be sold under the commercial term "galeos".

A total of 74 samples sold under the name galeos, were collected from 24 fishmongers and open markets located in four different cities of Greece (Athens, Thessaloniki, Kavala and Komotini), between March 2016 and May 2018. Genomic DNA was extracted from the sample tissue of fish, and the quantity and quality of the DNA were visualized on an agarose gel, with the use of ultraviolet radiation. Two different mtDNA genes (16S rRNA and COI) were selected for the analysis of each sample, and all PCR products were electrophoresed on agarose gel. The PCR products were purified and sequenced in an ABI automated analyzer. All produced sequences were checked and compared with those available in GenBank and BOLD databases, for species identification.

Across the study, an extremely high level of mislabeling was identified (54.8%), as only 33 from 74 samples were classified to the *Mustelus spp.* species. It is worth mentioning that over half of products originate from species belonging to the IUCN red list (53.4%), and from species with prohibitions on landings by international and national legislation (57.6%). The substitution of large-growing species, with little morphological resemblance to *Mustelus spp.*, likely demonstrates deliberate substitution.

Πίνακας περιεχομένων

| | |
|--|----|
| 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 1 |
| 1.1.Νοθεία σε αλιευτικά προϊόντα | 1 |
| 1.2.Ελασμοβράγχια | 4 |
| 1.3.Γαλέος (<i>Mustelus spp.</i>) | 8 |
| 1.4.Διατήρηση των ειδών: Προστατευόμενα είδη | 10 |
| 1.5.DNA barcoding | 13 |
| 1.6.Γονίδια δείκτες: 16S rRNA, COI | 15 |
| 1.6.1.Γονίδιο COI | 16 |
| 1.6.2.Γονίδιο 16S rRNA..... | 17 |
| 2.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ..... | 19 |
| 3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 20 |
| 3.1.Συλλογή δειγμάτων | 20 |
| 3.2.Απομόνωση DNA..... | 21 |
| 3.2.1.Απομόνωση DNA με χρήση του πρωτοκόλλου CTAB | 21 |
| 3.2.2.Απομόνωση DNA με χρήση του Ultra Clean Tissue & Cells DNA Isolation Kit | 22 |
| 3.2.3.Απομόνωση DNA με χρήση του Genomic Mini Kit | 23 |
| 3.3.Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης | 24 |
| 3.3.1.Αντιδραστήρια και διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης | 24 |
| 3.3.2.Παρασκευή πηκτής αγαρόζης και διαδικασία ηλεκτροφόρησης..... | 24 |
| 3.4.Ενίσχυση των γονιδίων με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR) | 25 |
| 3.4.1.Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA με την αντίδραση PCR | 26 |
| 3.4.2.Ενίσχυση του γονιδίου COI με την αντίδραση PCR..... | 27 |
| 3.5.Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR σε πηκτή αγαρόζης..... | 28 |
| 3.6.Ανάλυση πρωτοδιάταξης (Sequencing analysis)..... | 29 |
| 3.6.1.Καθαρισμός αρχικού προϊόντος PCR | 29 |
| 3.6.2.Προετοιμασία της δεύτερης αντίδρασης PCR | 29 |
| 3.6.3.Καθαρισμός του δεύτερου προϊόντος PCR..... | 30 |
| 3.6.4.Προετοιμασία των δειγμάτων για τοποθέτησή τους στον αναλυτή ABI..... | 31 |
| 3.7.Βιοπληροφορική Ανάλυση | 31 |
| 4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 33 |
| 4.1.Απομόνωση DNA | 33 |
| 4.2.Προϊόντα αντίδρασης PCR του γονιδίου 16S rRNA | 34 |
| 4.3.Προϊόντα αντίδρασης PCR του γονιδίου COI..... | 36 |
| 4.4.Ταυτοποίηση δειγμάτων | 38 |
| 4.5.Αποτελέσματα ταυτοποίησης..... | 47 |
| 5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 54 |

| | |
|---|----|
| 6.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ..... | 62 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 63 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ | 74 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Νοθεία σε αλιευτικά προϊόντα

Τα προϊόντα αλιείας αποτελούσαν ανέκαθεν βασική πηγή τροφής σε όλο τον κόσμο. Η παγκόσμια κατανάλωσή τους, όμως, αυξήθηκε έντονα τα τελευταία πενήντα χρόνια, με αποτέλεσμα, σήμερα, τα θαλασσινά να είναι τα πιο εμπορεύσιμα τρόφιμα στον κόσμο (Asche et al., 2015). Το γεγονός αυτό οφείλεται στη ραγδαία αύξηση του πληθυσμού και στην αλλαγή των συνθηκών των καταναλωτών, οι οποίοι τα τελευταία χρόνια δείχνουν μια ιδιαίτερη προτίμηση στα τρόφιμα υψηλής θρεπτικής αξίας (Kearney, 2010). Σύμφωνα με τα στοιχεία του FAO, η παγκόσμια κατανάλωση ψαριών ανά κάτοικο αυξήθηκε από 9,9 κιλά κατά μέσο όρο στη δεκαετία του 1960, σε 14,4 κιλά στη δεκαετία του 1990 και σε 19,7 κιλά το 2013 (FAO, 2014), ενώ την ίδια εποχή στην Ευρώπη, η κατανάλωση αλιευτικών προϊόντων έφθανε κατά μέσο όρο σε 25,5 κιλά το άτομο (EUMOFA, 2017).

Σήμερα οι καταναλωτές δίνουν ολοένα και περισσότερη προσοχή σε θέματα ποιότητας και ασφάλειας τροφίμων. Αυτό οφείλεται κυρίως στην αυξημένη επιστημονική πληροφόρηση μέσω των μέσων μαζικής ενημέρωσης. Οι καταναλωτές είναι περισσότερο ευπαθείς σε οποιαδήποτε μεταβολή μπορεί να προκύψει κατά την παραγωγή, και συνήθως δίνουν μεγάλη προσοχή στα συστατικά των τροφίμων, ειδικά σε περιπτώσεις διαιτητικών διατροφικών αναγκών ή ιατρικών συνθηκών. Οι παραπάνω λόγοι καθιστούν τους καταναλωτές ιδιαίτερα απαιτητικούς όσον αφορά την ποιότητα των τροφίμων και την ιχνηλασιμότητα των προϊόντων (Barbuto et al., 2010).

Η απάτη στα τρόφιμα δεν είναι ένα νέο φαινόμενο. Τα τελευταία χρόνια, όμως, έχει έρθει στο προσκήνιο αρκετές φορές, και κυρίως μετά από το σκάνδαλο του 2013 για το κρέας πουλερικών στην Ευρωπαϊκή Ένωση, το οποίο εξέθεσε τις διεθνείς αλυσίδες τροφίμων στην απάτη και στο οργανωμένο έγκλημα. Έκτοτε, η προσοχή των μέσων ενημέρωσης έχει επανειλημμένα επικεντρωθεί και σε εμπορικές απάτες αλιευτικών προϊόντων (Smith et al., 2008; Khaksar et al., 2015; Nedunoori et al., 2017).

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό κανονισμό (κανονισμός ΕΚ 853/2004), ως «αλιευτικά προϊόντα» ορίζονται όλα τα ζώα αλμυρών ή γλυκών υδάτων (πλην των ζώντων δίθυρων μαλακίων, των ζώντων εχινόδερμων, των ζώντων χιτωνοζώων και των ζώντων θαλάσσιων γαστεροπόδων, και όλων των θηλαστικών, των ερπετών και των βατράχων), άγρια ή εκτρεφόμενα, συμπεριλαμβανομένων όλων των εδώδιμων μορφών, μερών και προϊόντων των ζώων αυτών. Η απάτη στο εμπόριο των αλιευμάτων διαπράττεται όταν τα ψάρια διατίθενται παράνομα στην αγορά, συνήθως για οικονομικό όφελος, με σκοπό την εξαπάτηση του καταναλωτή. Αυτό συμβαίνει με διάφορους τρόπους, όπως εσφαλμένη

επισήμανση και υποκατάσταση των ειδών, χρήση παραγόντων δέσμευσης ύδατος για την αύξηση του βάρους των προϊόντων, και πρακτικές βελτίωσης της ποιότητας των ψαριών ώστε να παρουσιάζονται ως υψηλότερης ποιότητας από ότι είναι στην πραγματικότητα. Για παράδειγμα, το μονοξείδιο του άνθρακα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση και διατήρηση του χρώματος του ψαριού κατά τη διάρκεια της κατάψυξης, πράγμα το οποίο απαγορεύεται σε ορισμένες χώρες (FAO, 2018).

Ο πιο συνηθισμένος τύπος νοθείας αλιευμάτων περιλαμβάνει τη σκόπιμη εσφαλμένη επισήμανση και υποκατάσταση των ειδών. Η υποκατάσταση αυτή πραγματοποιείται όταν τα χαμηλότερης αξίας και λιγότερο επιθυμητά είδη πωλούνται στη θέση πιο ακριβών και επιθυμητών ψαριών. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η δόλια εμπορία σολομού ιχθυοτροφείου ως σολομού άγριας σύλληψης, με στόχο το κέρδος εις βάρος του καταναλωτή (Horreo et al., 2017). Υποκατάσταση των ειδών μπορεί επίσης να προκύψει όταν ένα είδος υψηλότερης αξίας διατίθεται στο εμπόριο ως είδος χαμηλότερης αξίας, για να αποφευχθεί η βαριά φορολόγηση. Τέλος, η συγκεκριμένη μορφή απάτης μπορεί να συμβεί με σκοπό την απόκρυψη της γεωγραφικής προέλευσης του προϊόντος, ή την απόκρυψη της παράνομης συγκομιδής και εμπορίας ενός προστατευόμενου είδους (FAO, 2018).

Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα αλιεύματα είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε παράνομες πρακτικές, δεδομένου ότι αντιπροσωπεύουν το δεύτερο τρόφιμο, μετά το λάδι, που πλήττεται περισσότερο από απάτες, και το πρώτο στην κατηγορία των τροφίμων ζωικής προέλευσης (Sprink & Moyer, 2011; Johnson, 2014). Στη Νότια Αμερική, σε μια έρευνα στη Βραζιλία ανιχνεύθηκε υψηλό επίπεδο (πάνω από 70%) λανθασμένης επισήμανσης και υποκατάστασης ειδών (de Brito et al., 2015). Μια μελέτη για την υποκατάσταση των αλιευμάτων στη Νότιο Αφρική, έδειξε ότι από τα 149 δείγματα που συλλέχθηκαν από εστιατόρια και λιανοπωλητές σε τρεις επαρχίες, το 18% των δειγμάτων είχαν εσφαλμένη επισήμανση (Cawthorn et al., 2015). Πολλές από τις έρευνες που πραγματοποιούνται τα τελευταία χρόνια, έχουν επικεντρωθεί και στα ελασμοβράγχια, αποκαλύπτοντας τεράστια ποσοστά νοθείας. Για παράδειγμα, μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε φιλέτα καρχαριών το 2009 στην Ιταλία, αποκάλυψε ένα ποσοστό νοθείας της τάξης του 80% (Barbuto et al., 2010). Μια αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε λαϊκές αγορές της Βραζιλίας, αποκάλυψε ότι το 47% των δειγμάτων που πωλούνταν με το κοινό όνομα "caçao", ήταν κρίσιμως κινδυνεύοντα είδη, με βάση την παγκόσμια και τη βραζιλιάνικη νομοθεσία (Almerón-Souza et al., 2018).

Οι αιτίες για αυτό το δυσάρεστο φαινόμενο κρύβονται κυρίως στη δυσκολία αναγνώρισης πολλών ειδών, εξαιτίας της υψηλής επεξεργασίας και μεταποίησης τους. Για παράδειγμα, πολλά είδη ψαριών είναι παρόμοια σε υφή και γεύση, και είναι σχεδόν αδύνατο να ταυτοποιηθούν μορφολογικά, όταν όλα τα εξωτερικά χαρακτηριστικά τους απορρίπτονται (π.χ. δέρμα, κεφαλή, πτερύγια) και το τμήμα του σώματός τους μεταποιείται σε φιλέτα (Holmes et al., 2009).

Επιπλέον, και για να καλυφθεί η εγχώρια ζήτηση, πολλές χώρες σε όλο τον κόσμο πρέπει αναγκαστικά να εισάγουν ένα μεγάλο μερίδιο αλιευτικών προϊόντων από το εξωτερικό. Επί του παρόντος, οι μεγαλύτερες χώρες εξαγωγής αλιευμάτων είναι στην Ασία, όπου η παραγωγή ψαριών (τόσο από την αλιεία όσο και από την υδατοκαλλιέργεια) έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία είκοσι χρόνια, αντιπροσωπεύοντας σήμερα περίπου το 70% της παγκόσμιας παραγωγής (FAO, 2014). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), τα θαλασσινά εισάγονται σε μεγάλο βαθμό από τις ανατολικές χώρες, ιδιαίτερα από την Κίνα και το Βιετνάμ. Η πολυπλοκότητα, όμως, των εμπορικών συναλλαγών που χαρακτηρίζουν τον τομέα της αλιείας καθιστά δύσκολη την ανίχνευση της προέλευσης των θαλασσινών. Τα θαλασσινά συχνά καλύπτουν πολύ μεγάλες αποστάσεις, αλλάζοντας πολλές φορές χέρια μεταξύ διαφόρων μεσαζόντων, και αυτό μπορεί να ευνοήσει την απώλεια πληροφοριών ιχνηλασιμότητας κατά μήκος της αλυσίδας, καθώς και να ενθαρρύνει τις απάτες και την εμπορία παράνομων, λαθραίων και μη ρυθμισμένων (Illegal, Unreported, and Unregulated, IUU) αλιευτικών προϊόντων (Miller & Sumaila, 2014; Pramod et al., 2014). Συνεπώς, είναι επιτακτική ανάγκη να διενεργούνται ακριβείς και αυστηροί έλεγχοι από τις επίσημες αρχές, στα συνοριακά σημεία των εισερχόμενων τροφίμων.

Για αυτό το σκοπό η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) εισήγαγε μία από τις πιο προοδευτικές νομοθετικές πράξεις, προκειμένου να προωθήσει την ιχνηλασιμότητα και να προστατεύσει τους καταναλωτές. Σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 1379/2013, όλα τα προϊόντα αλιείας πρέπει υποχρεωτικά να συνοδεύονται από την εμπορική και επιστημονική ονομασία τους, μαζί με τη γεωγραφική περιοχή, τη μέθοδο παραγωγής και τα αλιευτικά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αλίευσή τους. Η εφαρμογή του παραπάνω κανονισμού μπορεί επιπλέον να βοηθήσει τους καταναλωτές που θα ήθελαν να υποστηρίξουν την τοπική εγχώρια αλιεία, αλλά μέχρι πριν δεν τους παρέχονταν οι απαραίτητες πληροφορίες για να το πράξουν (Lowell et al., 2015). Επιπρόσθετα, κάθε κράτος μέλος της Ευρωπαϊκής Ένωσης ορίζει ένα κατάλογο των εμπορικών ονομασιών που γίνονται αποδεκτές προς πώληση στην επικράτειά τους (D'Amico et al., 2016). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία για την ασφάλεια των τροφίμων (ΦΕΚ

475 / Τεύχος Β ' / 27-3-2015, αριθ. 1750/32219 της ΕΕ 1379/2013) μόνο τα προϊόντα του γένους *Mustelus spp.* μπορούν να πωληθούν υπό την εμπορική ονομασία «γαλέος» ή «γαλέος δροσίτης», παρά το γεγονός ότι αναφέρονται ως τρωτά (Vulnerable) στην κόκκινη λίστα των απειλούμενων ειδών της Διεθνούς Ένωσης Προστασίας της Φύσης (IUCN). Η εφαρμογή των παραπάνω νομοθεσιών σκοπό έχει τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας.

1.2. Ελασμοβράγχια

Ο γαλέος ο οποίος συγκαταλέγεται στους καρχαρίες, ανήκει στην υπέρταξη των χονδριχθύων (Chondrichthyes), στην υπόταξη των ελασμοβράγχιων (Elasmobranchii) και στην τάξη των καρχαρινόμορφων (Carcharhiniformes). Οι χονδριχθύες θεωρούνται από τις αρχαιότερες γενιές σπονδυλωτών στον πλανήτη (Corrigan & Beheregaray, 2009). Εμφανίζονται και έχουν διατηρηθεί πρακτικά χωρίς να αλλάξουν για τουλάχιστον 400 εκατομμύρια χρόνια (Corrigan & Beheregaray, 2009; Heinicke et al., 2009). Γενικά, οι καρχαρίες ανήκουν στην υπέρταξη των χονδριχθύων, η οποία χωρίζεται σε δύο βασικές υποκατηγορίες, τους ολοκέφαλους (Holocephalii) και τα ελασμοβράγχια (Elasmobranchii). Τα ελασμοβράγχια, ταξινομούνται σε 17 τάξεις, 52 οικογένειες και περίπου 1100 είδη (Compagno et al., 2005). Από τα 1100 είδη, τα 500 περίπου ανήκουν σε καρχαρίες, οι οποίοι διαχωρίζονται σε 8 τάξεις: Carcharhiniformes, Squaliformes, Orectolobiformes, Lamniformes, Hexanchiformes, Pristiophoriformes, Squatiniformes, Heterodontiformes (Compagno, 1990).

Τα ελασμοβράγχια μπορούν να ζήσουν σε κάθε θαλάσσιο περιβάλλον, από τους θερμούς παράκτιους κοραλλιογενείς υφάλους μέχρι τους κρύους και σκοτεινούς ωκεανούς (Greenberg, 2008). Στα ευρωπαϊκά ύδατα απαντώνται σχεδόν 140 είδη ελασμοβραγγίων, εκ των οποίων τα 49 είδη φιλοξενούνται στην Μεσόγειο θάλασσα. Στις ελληνικές θάλασσες ζουν περίπου 36 είδη.

Αυτά τα ψάρια διαφέρουν από τους οστεϊχθύες, καθώς διαθέτουν χόνδρινο σκελετό αντί για οστέινο. Ο χόνδρος αυτός είναι ελαφρύς και εύκαμπτος και δεν οστεοποιείται πραγματικά ποτέ. Αυτό το είδος σκελετού έχει ωφελήσει τους καρχαρίες, παρέχοντάς τους μεγάλη δύναμη και ευελιξία χωρίς βάρος (Greenberg, 2008). Ο χρωματισμός τους είναι γκριζόμαυρος, ποικίλει όμως ανάλογα με το είδος και το περιβάλλον στο οποίο ζουν, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο ο θηρευτής να τα ξεχωρίσει από το περιβάλλον τους. Συνήθως, το ανώτερο τμήμα του καρχαρία, η περιοχή της ράχης, είναι σκουρότερο από την κοιλιακή περιοχή, ούτως ώστε να μην είναι ορατοί από ψηλά στα μεγάλα βάθη των ωκεανών, ενώ το κατώτερο τμήμα τους είναι πιο ανοιχτόχρωμο. Το

κρανίο τους είναι ενιαίο, έχουν έναν πολύ καλά ανεπτυγμένο εγκέφαλο και ένα εξαιρετικά ανεπτυγμένο και πολύπλοκο αισθητήριο σύστημα. Οι περισσότεροι έχουν ιδιαίτερα ανεπτυγμένη όραση, όσφρηση, ακοή, γεύση και αφή, τα οποία τους βοηθούν στον εντοπισμό του θηράματος ακόμα και αν βρίσκονται εκατοντάδες μέτρα μακριά (Greenberg, 2008). Τα μάτια τους είναι πλευρικά, το μέγεθος και η θέση των οποίων εξαρτάται από τις συνήθειες και τη συμπεριφορά του κάθε είδους. Συνήθως, τα είδη που ζουν σε βαθιά νερά, έχουν μεγαλύτερα μάτια από αυτά που ζουν σε πιο αβαθή.

Έχουν πέντε έως επτά βραγχιακές σχισμές σε κάθε πλευρά του κεφαλιού, κοντά στο μπροστινό μέρος του σώματός τους. Οι περισσότεροι διαθέτουν 5 διαφορετικούς τύπους πτερυγίων: τα θωρακικά, τα ραχιαία με ή χωρίς άκανθες, τα πυελικά, το εδρικό, και το ουραίο. Τα ραχιαία πτερύγια είναι υπεύθυνα για τη σταθεροποίηση του σώματος, το ουραίο χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την προώθηση, ενώ τα θωρακικά πτερύγια βοηθούν τον καρχαρία να στρίψει. Το ήπαρ τους είναι μεγάλο, μπορεί να αποτελέσει μέχρι και το 30% της μάζας του σώματός του, και είναι γεμάτο με έλαια χαμηλής πυκνότητας που μεταξύ άλλων λειτουργιών, βοηθά στη ρύθμιση της πλευστότητας και εξασφαλίζει ότι δε θα βυθιστεί. Το συκώτι δίνει επίσης την κατακόρυφη κινητικότητα στον καρχαρία, έτσι ώστε να μπορεί να κινείται πάνω και κάτω μέσα στο νερό με ευκολία (Comragno et al., 2005). Διαθέτουν χιλιάδες δόντια, ιδιαίτερα σκληρά και αναλλοίωτα στο χρόνο, τα οποία παράγονται συνεχώς και αποβάλλονται σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους (Sato et al., 2013). Τα λέπια τους είναι πλακοειδή και έχουν τέτοια διάταξη πάνω στο σώμα, ώστε το ένα να μην καλύπτει το άλλο. Τα συγκεκριμένα λέπια δε μεγαλώνουν ανάλογα με την αύξηση του σώματος του καρχαρία, αλλά αυξάνονται σε αριθμό. Ενώ ο καρχαρίας μεγαλώνει, αναπτύσσει επιπλέον σειρές από πλακοειδή λέπια για να καλύψει την αυξανόμενη περιοχή του σώματός του (Comragno et al., 2005). Οι καρχαρίες μπορούν να χάσουν έως και 20.000 λέπια ετησίως, τα οποία αντικαθίστανται αμέσως. Αυτό το είδος λεπιών παρέχει φυσική προστασία από τα τραύματα και βοηθούν τον καρχαρία κατά την κολύμβηση, καθώς βελτιώνουν την υδροδυναμική του ικανότητα.

Τα ελασμοβράγχια, σε αντίθεση με τα περισσότερα ψάρια, γονιμοποιούνται εσωτερικά (Hamlett, 1997). Οι αρσενικοί καρχαρίες διαθέτουν ειδικές επεκτάσεις στα πυελικά τους πτερύγια γνωστά ως "claspers", για να εισάγουν το σπέρμα στο θηλυκό (Florida Museum). Υπάρχουν δύο τρόποι αναπαραγωγής των χονδριχθύων, η ωοτοκία και η ζωοτοκία. Ένα μικρό ποσοστό καρχαριών είναι ωοτόκοι, δηλαδή γεννούν αυγά με καθόλου ή πολύ μικρή ανάπτυξη, τα οποία αναπτύσσονται και εκκολάπτονται έξω από το σώμα της μητέρας. Σε αυτήν την περίπτωση το έμβρυο αναπτύσσεται λαμβάνοντας θρεπτικά

συστατικά από τη λέκιθο και τα υγρά του ωαρίου. Το 70% των καρχαριών (245-270 είδη) είναι ζωοτόκοι, που σημαίνει ότι το έμβρυο τρέφεται και αναπτύσσεται μέσα στο μητρικό σώμα (Wourms & Demski, 1993; Hamlett, 1997). Τα ζωοτόκα είδη μπορούν να χωριστούν σε αυτά που διαθέτουν πλακούντα και σε αυτά που δε διαθέτουν (ωοζωοτόκα). Στην πρώτη περίπτωση, το έμβρυο μεγαλώνει μέσα στη μήτρα της μητέρας και περιβάλλεται από το λεκιθικό σάκο, ο οποίος αλλάζει σε πλακούντα όταν έρθει σε επαφή με τη μήτρα. Ο πλακούντας συνδέει το έμβρυο με τη μητέρα, και με αυτόν τον τρόπο τα θρεπτικά συστατικά περνούν από τους ιστούς της μητέρας στους ιστούς του εμβρύου και έτσι αυτό τρέφεται (Hamlett, 1997; Comragno et al., 2005). Στη δεύτερη περίπτωση των ωοζωοτόκων καρχαριών, τα γονιμοποιημένα αβγά διατηρούνται, αναπτύσσονται και εκκολάπτονται στη σάλπιγγα μέσα στο σώμα της μητέρας, και η διατροφή των εμβρύων κατά τη διάρκεια της κύησης βασίζεται στα θρεπτικά συστατικά από τη λέκιθο και τα υγρά του ωαρίου. Και στις δύο κατηγορίες, τα ψάρια τα οποία γεννιούνται ή εκκολάπτονται είναι ανεπτυγμένα μορφολογικά, πλήρως λειτουργικά, και μπορούν να επιβιώσουν μόνα τους. Η ανάπτυξη των εμβρύων ποικίλει ανάλογα με το είδος και κυμαίνεται μεταξύ δύο και 22 μήνες. Οι καρχαρίες συνήθως γεννούν ή τοποθετούν τα αβγά τους σε προστατευμένες περιοχές, όπως σε παράκτιους κόλπους, ρηχούς υφάλους ή εκβολές ποταμών, έτσι ώστε να τα προστατέψουν από αρπακτικά ζώα και μεγάλους καρχαρίες (Hamlett, 1997).

Ο χρόνος ζωής των ελασμοβραγχίων διαφέρει από είδος σε είδος. Συνήθως κυμαίνεται από 16 έως 30 χρόνια. Υπάρχουν όμως και κάποια είδη όπως, το κεντρόνι (*Squalus acanthias*) και ο φαλινοκαρχαρία (*Rhincodon typus*) τα οποία μπορεί να φτάσουν τα 100 χρόνια ζωής. Το μέγεθός τους μπορεί να ξεκινήσει από τα 20 εκατοστά όπως σε ορισμένα σκυλόψαρα (*Etmopterus perryi*), και να φτάσει μέχρι και τα 20 μέτρα όπως συμβαίνει στον φαλινοκαρχαρία (*Rhincodon typus*) (Florida Museum).

Τα διαθέσιμα δεδομένα και ο ακριβής όγκος για την αλιεία καρχαριών είναι περιορισμένα και θεωρούνται αμφισβητήσιμα, καθώς υπάρχει πρόβλημα ταυτοποίησης και έλλειψη ειδικής αναφοράς για τα είδη, ακόμα και στις στατιστικές του FAO που θεωρούνται οι πιο αντιπροσωπευτικές. Τα δεδομένα για το παγκόσμιο εμπόριο κρέατος καρχαρία φαίνεται ότι αυξάνονται σταθερά. Τα τελευταία επίσημα δεδομένα από τις στατιστικές του FAO δείχνουν ότι η συνολική αλίευση ελασμοβραγχίων παγκοσμίως ήταν σχετικά σταθερή από το 2005, και κυμαινόταν μεταξύ 0,7 και 0,8 εκατομμύρια τόνους (FAO, 2018). Ο εκτιμώμενος ελληνικός όγκος των ελασμοβραγχίων που αλιεύτηκαν το 2017 ήταν 512 τόνοι, οι οποίοι μπορεί να υποτιμηθούν σημαντικά λόγω των αλιευμάτων που προέρχονται από παράνομη και μη αναφερόμενη αλιεία (Ολοκληρωμένο Σύστημα Παρακολούθησης Και

Καταγραφής Αλιευτικών Δραστηριοτήτων - ΟΣΠΑ, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων).

Το κρέας του καρχαρία θεωρείται αρκετά θρεπτικό, καθώς είναι μια πολύ καλή πηγή πρωτεΐνης και ω-3 λιπαρών οξέων. Δεν έχουν όλοι οι καρχαρίες την ίδια εμπορική αξία και δε χρησιμοποιούνται με τον ίδιο τρόπο. Το κρέας τους κατατάσσεται ως «καλό», «κακό» ή «μεγάλο» από τη βιομηχανία (Da Silva, 2007). Οι «καλοί» καρχαρίες είναι εκείνοι με σάρκα υψηλής αξίας και καλή ποιότητα κρέατος (π.χ. smoothhound shark, soupfin shark). Ο όρος «κακός καρχαρίας» περιγράφει τους καρχαρίες με σάρκα χαμηλότερης αξίας και κατώτερη ποιότητας κρέατος (π.χ. spotted gully shark, hammerhead shark, blue shark). Ο όρος «μεγάλοι» καρχαρίες αναφέρεται σε καρχαρίες μεγάλου μεγέθους, οι οποίοι δεν είναι κατάλληλοι για κατανάλωση από τον άνθρωπο (Da Silva, 2007). Η χαμηλή ποιότητα κρέατος αναφέρεται στο κρέας που είναι λεπτόκοκκο ή έχει ελαφρώς ημιδιαφανές χρώμα. Για παράδειγμα, ο γλαυκοκαρχαρίας (*Prionace glauca*) θεωρείται ως το λιγότερο προτιμώμενο είδος από τους καταναλωτές, καθώς ο ιστός του είναι ιδιαίτερα μαλακός και με έντονη οσμή.

Για την παραλαβή «καλής» ποιότητας κρέατος καρχαρία πρέπει να εφαρμοστούν σωστές πρακτικές χειρισμού αμέσως μετά την αλίευσή τους. Το πρώτο βήμα για το σωστό χειρισμό είναι η αιμορραγία. Η αιμορραγία πρέπει να γίνεται αμέσως μετά τη σύλληψη, κόβοντας τον καρχαρία πίσω από το κεφάλι ή ακριβώς μπροστά από την ουρά, αφήνοντάς τον να αιμορραγεί για περίπου 2 λεπτά ή μέχρις ότου το μεγαλύτερο μέρος του αίματος έχει απομακρυνθεί. Στη συνέχεια ακολουθεί ο αποκεφαλισμός, ο εξπλαχνισμός και το πλύσιμο. Τέλος, ο καρχαρίας είτε ολόκληρος είτε σε φιλέτα πρέπει να καταψυχθεί αμέσως, για να αποτραπεί η βακτηριακή ανάπτυξη (Vannuccini, 1999).

Η γενική σύνθεση του κρέατος καρχαρία περιλαμβάνει πολλά συστατικά, όπως υγρασία, πρωτεΐνες, λιπίδια, βιταμίνες και ανόργανα άλατα. Μία μέση σύνθεση που έχει αναφερθεί για το κρέας καρχαρία είναι 77,2% νερό, 19% πρωτεΐνη, 2,5% λιπίδια και 1,3% τέφρα (Jacquot, 1961). Τα συστατικά αυτά διαφέρουν σε ποσότητα ανάλογα με το είδος, την εποχή, το φύλο, το μέγεθος και το στάδιο του κύκλου ζωής.

Αν και το κρέας καρχαρία έχει υψηλή θρεπτική αξία, υπάρχουν ωστόσο ορισμένες ουσίες οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Η ισταμίνη μπορεί να συσσωρευτεί σε ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα στο κρέας εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας και του χρόνου αμέσως μετά την αλίευση του ζώου, καθιστώντας το ευάλωτο σε βακτηριακή μόλυνση. Αν τα ψάρια δε ψυχθούν αμέσως μετά την αιμορραγία, δημιουργούνται βέλτιστες συνθήκες για το σχηματισμό ισταμίνης. Τα υψηλά επίπεδα

ισταμίνης στα ψάρια μπορούν να προκαλέσουν δηλητηρίαση στους ανθρώπους (Ababouch & Gram, 2004). Σύμφωνα με το FAO, ψάρια με επίπεδα ισταμίνης χαμηλότερα από 5 mg/100 g θεωρούνται ασφαλή για ανθρώπινη κατανάλωση, ενώ ψάρια με επίπεδα ισταμίνης πάνω από 100 mg/100 g θεωρούνται τοξικά και μη ασφαλή για ανθρώπινη κατανάλωση (Ababouch & Gram, 2004).

Δεδομένου ότι οι καρχαρίες είναι μεγάλα, μακρόβια είδη και βρίσκονται στο υψηλότερο επίπεδο της θαλάσσιας τροφικής αλυσίδας, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη βιοσυσσώρευση βαρέων μετάλλων, όπως ο υδράργυρος (Hg), ο μόλυβδος (Pb), το κάδμιο (Cd) και το αρσενικό (As) (FAO, 2003; Ababouch & Gram, 2004). Ο υδράργυρος προκαλεί τη μεγαλύτερη ανησυχία, ειδικά με τη μορφή οργανικού μεθυλδραργύρου (MeHg), καθώς η κατανάλωσή του σε υψηλά επίπεδα μπορεί να οδηγήσει σε δηλητηρίαση, η οποία επηρεάζει κυρίως το κεντρικό νευρικό σύστημα του ανθρώπινου σώματος (Ruelas-Inzunza & Paez-Osuna, 2005). Το μέγιστο επιτρεπτό επίπεδο υδραργύρου στα ψάρια είναι 1 mg/kg (US Food and Drug Administration, 1998; European Commission, 2001; Department of Health, 2004). Ένας ακόμα κίνδυνος που συνδέεται με την κατανάλωση κρέατος καρχαρία είναι η ουρία. Αν και είναι μη τοξική, μετατρέπεται σε αμμωνία από τα βακτήρια, και μπορεί να οδηγήσει σε έντονη γεύση και οσμή στο κρέας εάν δεν γίνει σωστός χειρισμός σε αυτό αμέσως μετά τη σύλληψή του (Vannuccini, 1999).

1.3. Γαλέος (*Mustelus spp.*)

Μεταξύ των καρχαριών, τη μεγαλύτερη εμπορική αξία την έχουν αυτοί που ανήκουν στο γένος *Mustelus spp.* Περιλαμβάνει μικρούς έως μεσαίου μεγέθους βενθοπελαγικούς καρχαρίες οι οποίοι είναι άφθονοι σε εύκρατα και τροπικά οικοσυστήματα (Compagno, 1984). Υπάρχουν πάνω από 20 είδη καρχαριών που ταξινομούνται στο γένος *Mustelus*, στην τάξη *Carcharhiniformes* και στην οικογένεια *Triakidae*. Αυτό το γένος αντιπροσωπεύεται από τρία είδη στη Μεσόγειο θάλασσα: *Mustelus mustelus* (starry smooth-hound), *Mustelus asterias* (common smooth-hound), *Mustelus punctulatus* (blackspotted smooth-hound). Μόνο αυτά τα τρία είδη επιτρέπεται να πωλούνται με την ονομασία «γαλέος» στο ελληνικό εμπόριο.

Ο αστρογαλέος (*Mustelus asterias*, Cloquet, 1821) είναι ένας βενθοπελαγικός καρχαρίας που βρίσκεται στα παράκτια ύδατα του βορειοανατολικού Ατλαντικού Ωκεανού και στη Μεσόγειο Θάλασσα (Compagno, 1984). Προτιμά τον αμμώδη ή χαλικώδη βυθό και βρίσκεται σε βάθη έως 200 m (συνήθως 100 m) (Compagno, 1984; Brito 1991; Ellis et al., 2005). Τα άτομα που αλιεύονται έχουν συνήθως μήκος έως 80 cm, ενώ το μέγιστο μήκος

του μπορεί να φτάσει τα 140 cm και το μέγιστο βάρος του τα 4,8 κιλά (Compagno, 1984; International Game Fish Association, 1991; Quiéno et al., 2003). Είναι σχετικά μικρός και λεπτός, γκριζου χρώματος, με μικρά λευκά στίγματα στη ράχη και στα πλευρά (Farrell, 2010). Διαθέτει 5 βραγχιακές σχισμές και αρκετά πεπλατυσμένο κεφάλι. Το σχήμα του στόματός του είναι τριγωνικό, με πλακοειδή δόντια, και τρέφεται κυρίως με καρκινοειδή (καβούρια, αστακοί). Είναι ζωτόκο χωρίς πλακούντα (ωζωτόκο) και γεννά 7-15 νεογνά ανά γέννα, μήκους περίπου 30 cm, μετά από περίοδο κύησης 12 μηνών (Compagno et al., 2005; Lopez et al., 2006).



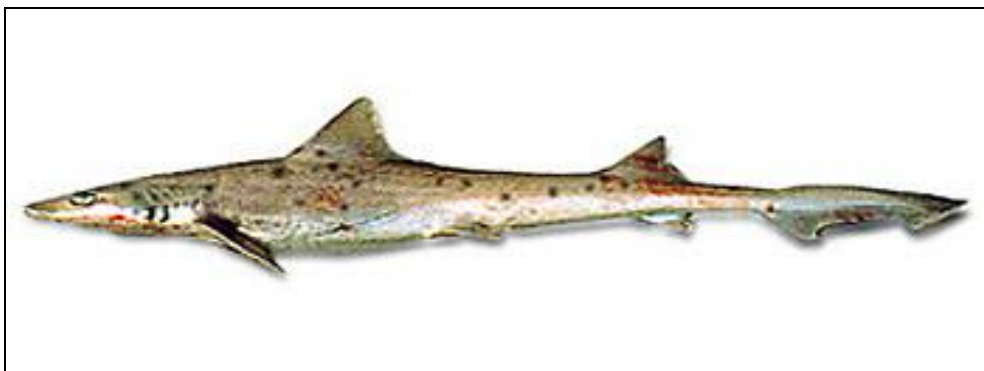
Εικόνα 1: *Mustelus asterias* (Compagno, 1984)

Το είδος *Mustelus mustelus* (Linnaeus, 1758), είναι ένας παράκτιος, νυκτόβιος, βενθικός καρχαρίας, ο οποίος απαντάται κυρίως στον ανατολικό Ατλαντικό Ωκεανό και στη Μεσόγειο Θάλασσα (Compagno, 1984). Κολυμπάει σε αγέλες κοντά στο βυθό και προτιμά αμμώδεις και λασπώδεις περιοχές (Compagno et al., 2005; Serena, 2005). Φτάνει σε βάθος τα 350 m, αλλά συνήθως συλλέγεται σε βάθη από πέντε έως 50 m (Compagno, 1984). Επιπλέον, έχει βρεθεί στο ανατολικό Ιόνιο Πέλαγος, σε βάθος 624 m (Mytilineou et al., 2005). Μπορεί να φτάσει σε μήκος έως και 200 cm, όμως τα άτομα που συλλέγονται έχουν συνήθως μήκος 100 cm. Το χρώμα του σώματός του είναι ομοιόμορφο γκρι, με μαύρα διασκορπισμένα σημάδια σε ορισμένες περιπτώσεις (Compagno et al., 1989; Heemstra & Heemstra, 2004). Έχει 5 βραγχιακές σχισμές και στα πτερύγιά του υπάρχει συνήθως λευκό περίγραμμα. Έχει επιμηκυσμένο κεφάλι, ρύγχος περιμετρικά οβάλ και τρέφεται κυρίως με καρκινοειδή, κεφαλόποδα και οστεϊχθύες (Compagno, 1984). Η μέγιστη ηλικία που μπορεί να φτάσει είναι τα 25 έτη (Goosen & Smale, 1997; Da Silva, 2007), με τη σεξουαλική ωριμότητα να επιτυγχάνεται στα 10 έτη και μήκος 70 έως 80 cm (Muus & Nielsen, 1999; Serena, 2005). Είναι ζωτόκο και γεννά 4-17 νεογνά μήκους 34-42 cm (De Maddalena et al., 2001; Serena, 2005; Saïdi et al., 2008), με την περίοδο της κύησης να διαρκεί 9-11 μήνες (Smale & Compagno, 1997; Da Silva, 2007; Saidi et al., 2009).



Εικόνα 2: *Mustelus mustelus* (Compagno, 1984)

Για το είδος *Mustelus punctulatus* (Risso, 1826) δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες καθώς δεν είναι ευρέως γνωστό, κυρίως λόγω της σύγχυσης του με το είδος *Mustelus mustelus*. Το είδος *Mustelus punctulatus* είναι ένας βενθικός καρχαρίας, ο οποίος απαντάται κυρίως στα παράκτια ύδατα του ανατολικού Ατλαντικού ωκεανού και στη Μεσόγειο θάλασσα (Compagno et al., 2005). Προτιμά αμμώδεις και χαλικώδεις περιοχές, σε βάθος έως 200 m (Serena, 2005). Έχει γκριζό χρώμα, με μαύρα στίγματα στα πλευρά, και μαύρο περίγραμμα στα ραχιαία πτερύγια. Το μέγιστο μήκος του μπορεί να φτάσει τα 190 cm, αλλά συνήθως αλιεύονται άτομα μήκους 120 cm (FishBase). Τρέφεται με καρκινοειδή και μικρά ψάρια. Η σεξουαλική ωριμότητα επιτυγχάνεται στα 60 με 100 cm (Compagno et al., 2005). Είναι ζωοτόκο χωρίς πλακούντα (ωοζωοτόκο) και γεννά νεογνά μήκους 24-30 cm, μετά από περίοδο κύησης 12 μηνών (Jardas et al., 2007; Saidi et al., 2009).



Εικόνα 3: *Mustelus punctulatus* (Compagno, 1984)

1.4. Διατήρηση των ειδών: Προστατευόμενα είδη

Η κατάσταση διατήρησης μιας ομάδας οργανισμών υποδεικνύει εάν η ομάδα εξακολουθεί να υπάρχει, και πόσο πιθανό είναι να εξαφανιστεί στο εγγύς μέλλον.

Χρειάζεται να ληφθούν υπόψη πολλοί παράγοντες για τον καθορισμό της κατάστασης διατήρησης και όχι απλά ο υφιστάμενος πληθυσμός, αλλά η συνολική αύξηση ή μείωση του πληθυσμού με την πάροδο του χρόνου, ο επιτυχής ρυθμός αναπαραγωγής, γνωστές απειλές κ.ά. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορα συστήματα ελέγχου της κατάστασης διατήρησης των ειδών, τα οποία χρησιμοποιούνται σε διεθνές, πολυεθνικό, εθνικό και τοπικό επίπεδο.

Η κόκκινη λίστα απειλούμενων ειδών της Διεθνούς Ένωσης Προστασίας της Φύσης IUCN (IUCN Red List of Threatened Species) καθιερώθηκε το 1948, και είναι το πιο γνωστό σε παγκόσμιο επίπεδο σύστημα κατάταξης και ταξινόμησης της κατάστασης διατήρησης των ειδών. Τα είδη ταξινομούνται από την IUCN σε εννέα ομάδες που καθορίζονται βάσει κριτηρίων όπως ο ρυθμός μείωσης, το μέγεθος του πληθυσμού, η γεωγραφική κατανομή και ο βαθμός κατακερματισμού του πληθυσμού (IUCN, 2012). Στην λίστα IUCN ο όρος «απειλούμενα είδη» αναφέρεται σε μια ομάδα τριών κατηγοριών:

- Τρωτά (Vulnerable, VU) - Μεγάλη πιθανότητα κινδύνου
- Κινδυνεύοντα (Endangered, EN) - Μεγάλος κίνδυνος εξαφάνισης στη φύση
- Κρισίμως Κινδυνεύοντα (Critically Endangered, CR) - Πολύ μεγάλος κίνδυνος εξαφάνισης στη φύση

Τα ελασμοβράγχια περιλαμβάνουν 509 είδη καρχαριών και 630 είδη σαλαχιών (Weigmann, 2016). Ωστόσο, αυτή η βιοποικιλότητα πρέπει να είναι μεγαλύτερη λόγω της συνεχούς καταγραφής νέων ειδών τα τελευταία χρόνια. Από αυτό το σύνολο, πάνω από το 90% αναφέρεται στην κόκκινη λίστα της IUCN, με περίπου 16,5% στις απειλούμενες κατηγορίες και τουλάχιστον 40% ως "ανεπαρκώς γνωστά". Οι ευρωπαϊκοί καρχαρίες που ταξινομούνται στη λίστα IUCN ως απειλούμενοι είναι οι καρχαρίες του γένους: *Squalus*, *Lamna*, *Squatina*, *Cetorhinus*, *Isurus*, *Sphyrna* καθώς επίσης και διάφορα είδη καρχαριών και σαλαχιών των βαθέων υδάτων (IUCN, 2017).

Παρόλο που τα ελασμοβράγχια αποτελούν λιγότερο από το 1% των παγκόσμιων αλιευμάτων (FAO, 2016), τα είδη αυτά έχουν βιολογικά χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ιδιαίτερα ευάλωτα στην υπεραλίευση, όπως είναι η μακροζωία, η καθυστερημένη σεξουαλική ωρίμανση, η χαμηλή γονιμότητα και οι μεγάλες περίοδοι κύησης (Dulvy et al., 2008; Field et al., 2009; Bornatowski et al., 2014). Πράγματι, αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι υπήρξε μείωση του πληθυσμού των ελασμοβραγχίων, με αποτέλεσμα τη δημογραφική κατάρρευση σε περιφερειακή κλίμακα (Baum et al., 2003; Barausse et al., 2014).

Η υπεραλίευση των καρχαριών είναι ιδιαίτερα προβληματική, επειδή οι καρχαρίες ως ανώτατοι θηρευτές διαδραματίζουν βασικό ρόλο στα θαλάσσια οικοσυστήματα, και

επομένως η δυναμική των πληθυσμών τους μπορεί να επηρεάσει όλη τη θαλάσσια ποικιλομορφία (Gallagher et al., 2012; Pauly et al., 2013; Worm et al., 2013). Το 1999, ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) ξεκίνησε ένα διεθνές σχέδιο για τη διατήρηση των καρχαριών, αναγνωρίζοντας την υψηλή ευπάθεια αυτών των οργανισμών (Vannuccini, 1999). Ωστόσο, παρά την πρωτοβουλία αυτή, σημαντικός αριθμός ελασμοβραγχίων παραμένει απειλούμενος από ανθρώπινες δραστηριότητες, γεγονός που αποδεικνύεται και από την παγκόσμια αύξηση καρχαριών στο εμπόριο κατά 42%, από το έτος 2000 έως το 2011 (FAO, 2015).

Σύμφωνα με πρόσφατες εκτιμήσεις, περίπου 100 εκατομμύρια καρχαρίες αλιεύονται ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο, χωρίς να συνυπολογιστεί η παράνομη, λαθραία και μη ρυθμισμένη (Illegal, Unreported and Unregulated - IUU) αλιεία (Liu et al., 2013). Σύμφωνα με στοιχεία του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), η Ευρώπη είναι η δεύτερη ήπειρος με τα περισσότερα αλιεύματα καρχαριών, ενώ η Ισπανία, η Γαλλία, η Πορτογαλία και το Ηνωμένο Βασίλειο συγκαταλέγονται στις 20 χώρες με τις περισσότερες εκφορτώσεις καρχαριών.

Ο εκτιμώμενος ελληνικός όγκος των ελασμοβραγχίων που αλιεύθηκαν το 2017 ήταν 512 τόνοι (Ολοκληρωμένο Σύστημα Παρακολούθησης και Καταγραφής Αλιευτικών Δραστηριοτήτων - ΟΣΠΑ - του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων για την Ελλάδα). Η πρακτική της αφαίρεσης των πτερυγίων των καρχαριών προς πώληση - η οποία είναι ιδιαίτερα δημοφιλής στα ασιατικά κράτη - παραμένει άγνωστη στην Ελλάδα (Gallagher & Hammerschlag, 2011). Παρόλα αυτά, το κρέας των καρχαριών είναι πολύ διαδεδομένο στην ελληνική κουζίνα, και πωλείται σε αγορές και ιχθυοπωλεία με την εμπορική ονομασία «γαλέος» ή «γαλέος δροσίτης».

Σύμφωνα με το παράρτημα 2 "Κατάλογος ελληνικής εμπορικής ονομασίας ιχθύων, καρκινοειδών, κεφαλόποδων, δίθυρων και άλλων υδρόβιων οργανισμών ειδών" της ελληνικής νομοθεσίας περί τροφίμων και ασφάλειας (ΦΕΚ 475 / Τεύχος Β' / 27-3-2015, αρ. 1750/32219 της Ε.Ε. 1379/2013) μόνο τα *Mustelus spp.* προϊόντα (*M. mustelus* «γκριζογαλέος», *M. punctulatus* «σικτογαλέος» και *M. asterias* «αστρογαλέος») μπορούν να διατίθενται στην αγορά με την κοινή ονομασία γαλέος. Ωστόσο, έχει δημιουργηθεί μία σύγχυση όσον αφορά το είδος που πωλείται ως γαλέος. Σε πολλές ελληνικές πόλεις ο γαλέος αναφέρεται στο είδος *Galeorhinus galeus* ή «σκυλογαλέος», και όχι στα είδη *Mustelus spp.* που θα έπρεπε σύμφωνα με τη νομοθεσία. Το μεγαλύτερο όμως πρόβλημα έγκειται στο γεγονός ότι τα παραπάνω είδη, τα οποία πωλούνται σύμφωνα με την ελληνική

νομοθεσία ως γαλέος, αναφέρονται ως "τρωτά" στην κόκκινη λίστα απειλούμενων ειδών της διεθνούς ένωσης προστασίας της φύσης (IUCN).

Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές βελτιώσεις στις πολιτικές αλιείας των καρχαριών σε Ευρωπαϊκό κυρίως επίπεδο, όπως απαγόρευση αφαίρεσης των πτερυγίων, επιστημονικά βασισμένα όρια στην αλιεία καρχαριών και παροχή ειδικών προστατευτικών μέτρων για τα είδη που απειλούνται με εξαφάνιση. Οι αλλαγές αυτές είναι επειγόντως αναγκαίες και σε εθνικό επίπεδο, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η μακροπρόθεσμη βιωσιμότητα του πληθυσμού των καρχαριών.

1.5. DNA barcoding

Οι ιστορικές μέθοδοι ταυτοποίησης και ταξινόμησης των οργανισμών βασίζονταν σε μεγάλο βαθμό στα ορατά μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Αν και η σύγχρονη μορφολογική ταξινόμηση χρησιμοποιεί πολλά επιπλέον χαρακτηριστικά (εσωτερική ανατομία, φυσιολογία, γεωγραφία κ.α.), η ταυτοποίηση των ειδών με βάση τους μορφολογικούς χαρακτήρες είναι εξαιρετικά δύσκολη και πολλές φορές αδύνατη. Αυτό το ταξινομικό πρόβλημα δημιουργεί πολλά εμπόδια στην αξιολόγηση και διατήρηση της παγκόσμιας βιοποικιλότητας (Ward et al., 2009).

Η ταυτοποίηση των ειδών με αναλυτικές μεθόδους έχει χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια. Οι μέθοδοι που βασίζονται σε πρωτεΐνες περιλαμβάνουν ανοσολογικές δοκιμασίες, τεχνικές ηλεκτροφόρησης και χρωματογραφία (HPLC, TLC) (Fügel et al., 2005; Kurtz et al., 2010). Οι τεχνικές αυτές μπορεί να αποτύχουν στη διαφοροποίηση στενά συγγενικών ειδών (Carrera et al., 1997). Αντίθετα, οι μέθοδοι που βασίζονται στο DNA έχουν αρκετά πλεονεκτήματα, επειδή το DNA είναι λιγότερο ευαίσθητο στην υποβάθμιση, μπορεί να προσεγγιστεί σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του οργανισμού, και τα δεδομένα της αλληλουχίας του είναι πιο εύκολο να αναπαραχθούν (Hanner et al., 2005). Επιπλέον, το DNA παρέχει περισσότερες πληροφορίες από τις πρωτεΐνες, και μπορεί εύκολα να εξαχθεί από ίχνη οργανικού υλικού (Hellberg & Morrissey, 2011).

Οι πρώτες μελέτες που χρησιμοποίησαν αλληλουχίες DNA για τη διάκριση ειδών εξέτασαν μια ποικιλία γονιδίων και διαφορετικών τμημάτων αυτών των γονιδίων. Αυτή η ρευστότητα στα γονίδια στόχους δημιουργούσε προβλήματα στη χρήση της αλληλουχίας του DNA για την ταυτοποίηση νέων ειδών, επειδή απαιτούνταν κάποια προϋπάρχουσα γνώση της ταυτότητας των ειδών για την επιλογή των κατάλληλων εκκινητών. Το DNA barcoding διαφέρει από αυτές τις αρχικές προσεγγίσεις, διότι βασίζεται στην ανάλυση της μεταβλητότητας σε μια τυποποιημένη περιοχή του γονιδιώματος που ονομάζεται "DNA

barcode" (Hebert et al., 2003). Η προσέγγιση αυτή αποδείχθηκε χρήσιμη για την επίλυση των ταξινομικών προβλημάτων σε πολλές θεωρητικές και πρακτικές εφαρμογές (Rasmussen et al., 2009; Valentini et al., 2009; Hollingsworth et al., 2011).

Το DNA barcoding χρησιμοποιεί μια τυποποιημένη σύντομη αλληλουχία DNA (μοριακός δείκτης), η οποία μπορεί εύκολα να προκύψει και να χαρακτηριστεί για όλα τα είδη του πλανήτη (Savolainen et al., 2005). Για να είναι αποτελεσματικές οι περιοχές αυτές θα πρέπει να έχουν υψηλή διακριτότητα και χαμηλή ενδοειδική μεταβλητότητα (Galal-Khallaf et al., 2014). Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό άγνωστων ειδών, για την ταυτοποίηση ενός οργανισμού, ή για την καταγραφή όσο το δυνατόν περισσότερων taxa (Koch et al., 2000).

Ως μοριακός δείκτης ορίζεται μια αλληλουχία DNA (400-800 ζεύγη βάσεων), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μελετήσει μια συγκεκριμένη θέση σε ένα χρωμόσωμα, δηλαδή ένα γονίδιο δείκτης. Τα γονίδια δείκτες έχουν έναν ευδιάκριτο φαινότυπο που ανιχνεύεται εύκολα με απλές τεχνικές, με αποτέλεσμα να βρίσκουν πολλές πρακτικές εφαρμογές. Μερικά γονίδια που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των αλιευτικών προϊόντων είναι το *cyt b*, το *COI* και το *16S rRNA* (Hellberg & Morrissey, 2011).

Το DNA barcoding έχει μεγάλη χρησιμότητα για την επιστήμη της συστηματικής. Παρέχει την ταχύτερη ταξινομική μέθοδο των ειδών, επισημαίνοντας διαφορετικά taxa που μπορεί να αντιπροσωπεύουν νέα είδη, και οδηγεί σε μια παγκόσμια απογραφή της διαφορετικότητας της ζωής. Το DNA barcoding παρέχει ένα ζωτικής σημασίας εργαλείο για την εκτίμηση και τη διαχείριση της τεράστιας βιοποικιλότητας της γης (Gregory 2005; Schindel & Miller, 2005).

Με την ολοένα αυξανόμενη χρήση της μεθόδου, έγινε εμφανής και η αναγκαιότητα δημιουργίας μίας διεθνούς πλατφόρμας όλων των ειδών. Το Barcode of Life Data System (BOLD, <http://www.boldsystems.org>) ιδρύθηκε το 2007 και συντονίζεται από το Διεθνές Πρόγραμμα Barcode of Life (iBOL). Πρόκειται για ένα αποθετήριο το οποίο υποστηρίζει τη συλλογή των DNA barcodes, με σκοπό τη δημιουργία μιας βιβλιοθήκης αναφοράς για όλα τα ζωντανά είδη (Ratnasingham & Hebert, 2007).

Το πρόγραμμα BOLD χρησιμοποιείται για τη συσχέτιση μίας αλληλουχίας DNA του γονιδίου *COI*, τόσο με ένα συγκεκριμένο δείγμα, όσο και με άλλες αλληλουχίες DNA που ανήκουν στο ίδιο ή σε διαφορετικά είδη. Αυτή η πλατφόρμα αποτελείται από πολλά στοιχεία, μεταξύ των οποίων και το εργαλείο Identification System (ID's), το οποίο είναι ένα από τα πιο χρήσιμα. Το ID's παρέχει ένα εργαλείο αναγνώρισης είδους, που δέχεται ακολουθίες DNA του γονιδίου *COI* και επιστρέφει μια ταξινομική ανάθεση του υπό εξέταση

δείγματος σε επίπεδο είδους. Οποιοσδήποτε ερευνητής μπορεί να χρησιμοποιήσει το ID's, και αν υπάρχει στη βάση δεδομένων αρχείο αναφοράς που ανήκει στο άγνωστο δείγμα, το σύστημα παρέχει ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους ή κατάλογο των ταξινομικών κατηγοριών που σχετίζονται με αυτό το δείγμα. Το πρόγραμμα BOLD είναι εξαιρετικά χρήσιμο σε πλήθος ερευνών, ενώ έχει και πρακτικές εφαρμογές, όπως είναι η ταυτοποίηση και η ιχνηλασιμότητα των τροφίμων (Galimberti et al., 2013).

1.6. Γονίδια δείκτες: 16S rRNA, COI

Το μιτοχόνδριο είναι ένα οργανικό σύμπλεγμα, που περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη, και βρίσκεται στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Τα μιτοχόνδρια έχουν συνήθως διάμετρο μεταξύ 0,75 και 3 μm, αλλά ποικίλλουν σημαντικά στο μέγεθος και τη δομή (Wiemerslage & Lee, 2016). Τα μιτοχόνδρια παράγουν το μεγαλύτερο μέρος της απαιτούμενης τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), που χρησιμοποιείται από το κύτταρο ως πηγή χημικής ενέργειας. Για το λόγο αυτό ονομάζονται κέντρα παραγωγής ενέργειας του κυττάρου. Εκτός από την παροχή κυτταρικής ενέργειας, τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται και σε άλλες λειτουργίες, όπως η σηματοδότηση, η κυτταρική διαφοροποίηση, ο θάνατος των κυττάρων, καθώς και η διατήρηση του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής ανάπτυξης (McBride et al., 2006).

Αν και το μεγαλύτερο μέρος του DNA ενός κυττάρου περιέχεται στον πυρήνα του, το μιτοχόνδριο έχει το δικό του ανεξάρτητο γονιδίωμα (μιτοχονδριακό DNA, mtDNA) που παρουσιάζει ουσιαστική ομοιότητα με τα βακτηριακά γονιδιώματα (Anderson et al., 2003). Το μιτοχονδριακό DNA είναι ένα μικρό, δίκλωνο, κυκλικό, υπερελικωμένο μόριο DNA και το μέγεθος του κυμαίνεται από 16 έως 20 χιλιάδες ζεύγη βάσεων. Κάθε μιτοχόνδριο εκτιμάται ότι περιέχει 2-10 αντίγραφα mtDNA (Wiesner et al., 1992). Στους περισσότερους πολυκύτταρους οργανισμούς το mtDNA κληρονομείται αποκλειστικά από τη μητέρα. Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις στις οποίες το mtDNA έχει κληρονομηθεί και από τους δύο γονείς (Luo et al., 2018).

Οι δύο κλώνοι του mtDNA διαφοροποιούνται μεταξύ τους από τα νουκλεοτίδια που περιέχουν. Έτσι υπάρχει ένας πλούσιος σε γουανίνη κλώνος, ο οποίος αναφέρεται ως βαρύς κλώνος (Heavy strand, H), και ένας πλούσιος σε κυτοσίνη κλώνος, που αναφέρεται ως ελαφρύς κλώνος (Light strand, L). Ο κλώνος L περιέχει 28 γονίδια, ενώ ο κλώνος H περιέχει 9 γονίδια, από ένα σύνολο 37 γονιδίων (Anderson et al., 1981). Από αυτά τα 37 γονίδια, τα 13 γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες (πολυπεπτίδια), τα 22 είναι για τα μεταφορικά RNAs (tRNAs) και τα δύο για τις μικρές και τις μεγάλες υπομονάδες του

ριβωσωμικού RNA (12S rRNA και 16S rRNA). Τα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες, καθορίζουν υπομονάδες ενζύμων που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Τα γονίδια αυτά είναι τα ακόλουθα: 7 υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 και 6), 1 υπομονάδα του κυτοχρώματος b, 3 υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COI, COII, COIII) και 2 υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ATPase 6 και 8) (Bhattacharya et al., 2016).

Ο χαρακτηριστικά υψηλός αριθμός αντιγράφων, η μητρική κληρονομία και ο υψηλός βαθμός μεταβλητότητας των αλληλουχιών καθιστούν το mtDNA ισχυρό εργαλείο για την ταυτοποίηση ειδών (Rastogi et al., 2007). Σε αντίθεση με το πυρηνικό DNA το οποίο κληρονομείται και από τους δύο γονείς με αποτέλεσμα τα γονίδια να αναδιατάσσονται στη διαδικασία του ανασυνδυασμού, δεν υπάρχει συνήθως καμία αλλαγή στο mtDNA από γονέα σε απόγονο. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος και επειδή ο ρυθμός μετάλλαξης του mtDNA είναι υψηλότερος από εκείνον του πυρηνικού DNA, το mtDNA είναι ένα εξαιρετικό μέσο για τους επιστήμονες που ασχολούνται με τη γενετική των πληθυσμών και την εξελικτική βιολογία (Castro et al., 1998).

Για τους παραπάνω λόγους και εξαιτίας του μικρού μεγέθους του μιτοχονδριακού DNA, έχει αναπτυχθεί μεγάλος αριθμός παγκόσμιων εκκινητών (universal primers), οι οποίοι είναι σε θέση να πολλαπλασιάσουν περιοχές του mtDNA, σε ένα μεγάλο εύρος σπονδυλωτών και ασπόνδυλων.

1.6.1. Γονίδιο COI

Το μιτοχονδριακό γονίδιο COI είναι ένας από τους πιο δημοφιλείς μοριακούς δείκτες που χρησιμοποιούνται για τη συστηματική ταξινόμηση των ειδών. Το τμήμα των 658 ζευγών βάσεων βρίσκεται στο 5' άκρο του γονιδίου της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης c. Το γονίδιο COI κωδικοποιεί μέρος του τερματικού ενζύμου της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων και είναι ένα από τα μεγαλύτερα γονίδια στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Η προσαρμοστικότητά του είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε σύγκριση με άλλα γονίδια των μιτοχονδρίων (Hebert et al., 2003).

Η ποικιλότητα εντός του είδους για αυτό το γονίδιο είναι χαμηλή σε σύγκριση με τη μεταβολή μεταξύ των ειδών. Κατά συνέπεια, τα είδη ορίζονται από μια συγκεκριμένη ακολουθία ή από ένα σύμπλεγμα πολύ παρόμοιων ακολουθιών. Ο ρυθμός μετάλλαξης της αλληλουχίας του είναι υψηλός και διατηρείται μεταξύ των ειδών, καθιστώντας δυνατή τη διάκριση στενά συγγενικών ειδών (Hebert et al., 2003). Για τους παραπάνω λόγους, το

γονίδιο COI έχει χρησιμοποιηθεί σε πλήθος μελετών για διάφορα είδη ζώων, όπως πτηνά (Hebert et al., 2004), ψάρια (Ward et al., 2005), αράχνες (Barrett & Hebert, 2005) και ερπετά (Nagy et al., 2012).

Η ολοένα αυξανόμενη χρήση του γονιδίου COI ως μοριακού δείκτη και τα εξαιρετικά αποτελέσματα που είχε στις ταξινομήσεις των ειδών ήταν οι αιτίες που οδήγησαν στη δημιουργία της βάσης δεδομένων Fish Barcode of Life (FISH-BOL). Η FISH-BOL είναι μια βιβλιοθήκη ακολουθιών DNA, με βάση την αλληλουχία του γονιδίου COI, για χιλιάδες διαφορετικά είδη ψαριών, η οποία ενημερώνεται συνεχώς. Με τη βοήθεια της ειδικής αυτής βάσης δεδομένων μεγάλης κλίμακας, είναι δυνατή η σύγκριση μιας άγνωστης αλληλουχίας DNA με κάποια προϋπάρχουσα, με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του είδους (Galimberti et al., 2013).

1.6.2. Γονίδιο 16S rRNA

Ένας ακόμα μοριακός δείκτης που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην εκτίμηση της φυλογενετικής συγγένειας των οργανισμών είναι το γονίδιο για το 16S ριβοσωμικό RNA (16S rRNA). Το γονίδιο 16S rRNA αποτελείται από περίπου 1500 ζεύγη βάσεων και είναι απαραίτητο, μαζί με το γονίδιο 12S rRNA, για τη μετάφραση του αγγελιοφόρου RNA σε μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Τα γονίδια 12S και 16S rRNA καταλαμβάνουν το 1/16 και το 1/10 του συνολικού μιτοχονδριακού γονιδιώματος, αντίστοιχα. Όπως συμβαίνει στα περισσότερα μιτοχονδριακά γονίδια στο mtDNA των ζώων, αυτά τα δύο γονίδια υφίστανται πολλές αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων. Στο ανθρώπινο mtDNA έχουν αναφερθεί 297 αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων στο γονίδιο 12S rRNA (31% του γονιδίου) και 413 στο γονίδιο 16S rRNA (25% του γονιδίου), όταν συγκρίνονται με το πρότυπο mtDNA του Anderson (Attardi & Schatz, 1988; Yang et al., 2014).

Το μιτοχονδριακό γονίδιο 16S rRNA προσφέρει μία άμεση και αποτελεσματική προσέγγιση, στη διαφοροποίηση των θαλάσσιων ζώων, των φυτών και των βακτηρίων. Πρωτίστως, υπάρχει σε όλα τα κύτταρα και το μέγεθός του (1.500 ζεύγη βάσεων) είναι αρκετά μεγάλο για παροχή πληροφορίας. Έχει συντηρημένες και μεταβλητές αλληλουχίες, με τρεις φορές χαμηλότερους ρυθμούς εξέλιξης, που τις καθιστούν ιδιαίτερα κρίσιμες για την ταυτόχρονη ενίσχυση και εύρεση στενών και απομακρυσμένων φυλογενετικών σχέσεων. Έτσι γίνεται δυνατή η χρήση του γονιδίου 16S rRNA για την αντιστοίχιση ενός δείγματος στο επίπεδο του γένους και σε πολλές περιπτώσεις στο επίπεδο του είδους (Attardi & Schatz, 1988).

Επίσης, έχουν δημιουργηθεί ποικίλες βάσεις δεδομένων για το μιτοχονδριακό γονίδιο 16S rRNA, που περιλαμβάνουν ακολουθίες για μεγάλο αριθμό ειδών. Η αλληλουχία από ένα άγνωστο δείγμα μπορεί να συγκριθεί με αυτές τις αλληλουχίες και να οδηγήσει στην ταχεία ταυτοποίησή του. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό σε μια εποχή όπου η αλληλούχιση του DNA έχει γίνει πια αντικείμενο εμπορίου (Cole et al., 2009).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

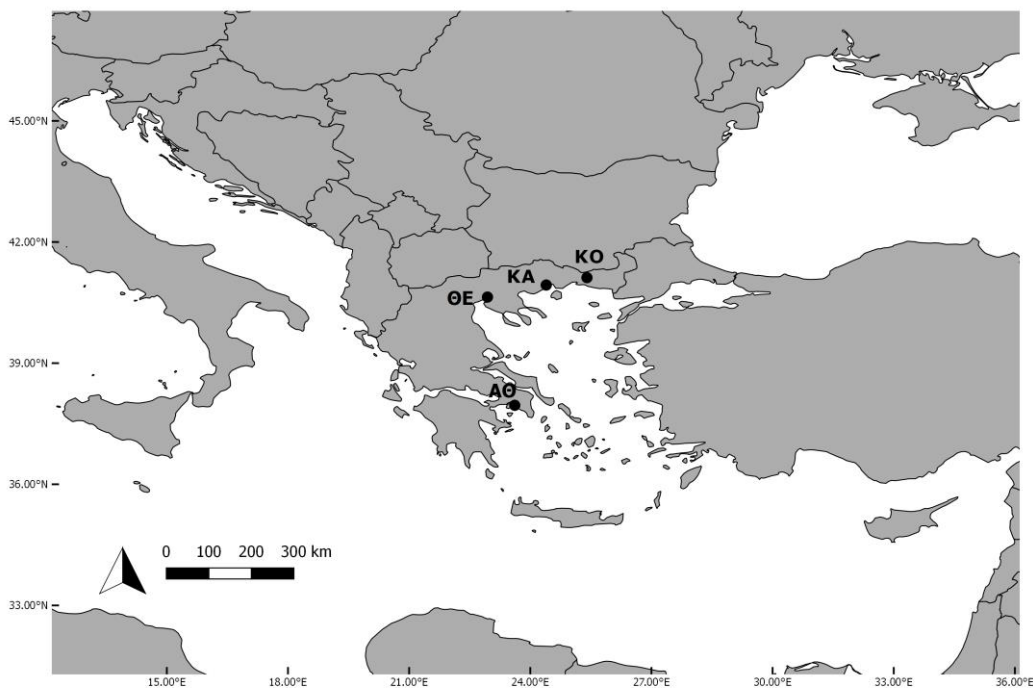
Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα αλιεύματα είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε παράνομες πρακτικές, κυρίως εξαιτίας της δυσκολίας αναγνώρισης πολλών ειδών, λόγω της υψηλής επεξεργασίας και μεταποίησης τους. Η εσφαλμένη επισήμανση στα διάφορα προϊόντα αλιείας είναι ιδιαίτερα ζημιογόνα για τους καταναλωτές. Εκτός της οικονομικής απάτης που προκύπτει από αυτήν, η υποκατάσταση των ειδών μπορεί να προκαλέσει και σοβαρά προβλήματα υγείας στους καταναλωτές (π.χ. αλλεργίες). Επιπλέον, η υποκατάσταση έχει αρνητικό αντίκτυπο στη διατήρηση των ειδών, και έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση παράνομων, λαθραίων και μη ρυθμισμένων (Illegal, Unreported, and Unregulated, IUU) αλιευτικών προϊόντων.

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε ο μερικός προσδιορισμός της αλληλουχίας δύο μιτοχονδριακών γονιδίων (16S rRNA και COI), για τον εντοπισμό ειδών που πωλούνται κάτω από την εμπορική ονομασία «γαλέος». Τα δείγματα συλλέχθηκαν από ιχθυοπωλεία και λαϊκές αγορές τεσσάρων διαφορετικών πόλεων της Ελλάδας (Αθήνα, Θεσσαλονίκη, Καβάλα, Κομοτηνή). Στόχος αυτής της μελέτης ήταν η αξιολόγηση του ποσοστού εσφαλμένης επισήμανσης που σχετίζεται με τα προϊόντα καρχαριών που πωλούνται με την ονομασία «γαλέος», υπό το πρίσμα της ελληνικής νομοθεσίας (η ονομασία «γαλέος» αντιστοιχεί μόνο σε είδη του γένους *Mustelus spp.*). Επιπλέον, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην ανίχνευση παράνομων ειδών καρχαρία που προστατεύονται από τη διεθνή και την εθνική νομοθεσία.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Συλλογή δειγμάτων

Συνολικά συλλέχθηκαν 74 δείγματα, τα οποία πωλούνταν με την εμπορική ονομασία «γαλέος», κατά τη χρονική περίοδο Μάρτιος 2016 έως Μάιος 2018. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από 24 λαϊκές αγορές και ιχθυοπωλεία από τέσσερις διαφορετικές πόλεις της Ελλάδος, και συγκεκριμένα από την Αθήνα, τη Θεσσαλονίκη, την Καβάλα και την Κομοτηνή (Πίνακας 1, Εικόνα 1). Τα αλιεύματα αυτά πωλούνται κυρίως σε μορφή φιλέτου, αλλά μπορεί να βρεθούν και ακέραια στην περίπτωση νεαρών ατόμων. Επειδή τα συγκεκριμένα είδη συνήθως κόβονται σε πολλές φέτες, αποφεύχθηκε η αγορά πολλαπλών δειγμάτων από έναν μόνο έμπορο λιανικής πώλησης, για να εξαληφθεί η συλλογή ιστών από το ίδιο άτομο. Κατά τη δειγματοληψία, και όπου ήταν δυνατό, τα νωπά δείγματα φωτογραφήθηκαν στο χώρο πώλησης, ώστε να είναι εμφανή το είδος του αλιεύματος και η τιμή πώλησης. Στο παράρτημα Ι φαίνονται ενδεικτικά κάποιες φωτογραφίες από τα διάφορα σημεία δειγματοληψίας. Οι τιμές πώλησης των αλιευμάτων κυμαίνονταν μεταξύ 6,8-18 € ανά kg. Από τα δείγματα αυτά συλλέχθηκε δείγμα 1-5 g ιστού, το οποίο αποθηκεύτηκε σε σωληνάκια erpendorf με 99% αιθανόλη. Όλα τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και αποθηκεύτηκαν στους -4°C, μέχρι περαιτέρω ανάλυση.



Εικόνα 4: Τόποι συλλογής των δειγμάτων σε όλη την Ελλάδα. ΑΘ: Αθήνα ΘΕ: Θεσσαλονίκη. ΚΑ: Καβάλα. ΚΟ: Κομοτηνή.

3.2. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA γίνεται με μεγάλη προσοχή, για να αποφευχθεί οποιαδήποτε επιμόλυνση. Γι' αυτό το λόγο, οι επιφάνειες εργασίας και τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται (νυστέρι, λαβίδα κ.λπ.) καθαρίζονται και απολυμαίνονται με διάλυμα αιθανόλης 70%. Η λήψη του ιστού γίνεται με τη βοήθεια νυστεριού, και στη συνέχεια ο ιστός μεταφέρεται προσεκτικά με λαβίδα σε σωληνάκια erpendorf, τα οποία αποθηκεύονται στην κατάψυξη.

Στην παρούσα εργασία, η απομόνωση του DNA των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικούς τρόπους: με χρήση του πρωτοκόλλου CTAB και με έτοιμα kit απομόνωσης του εμπορίου (Genomic Mini Kit, Ultra Clean Tissue & Cells DNA Isolation Kit).

3.2.1. Απομόνωση DNA με χρήση του πρωτοκόλλου CTAB

Διαλύματα για την απομόνωση με τη μέθοδο CTAB

Για την απομόνωση του DNA με το πρωτόκολλο CTAB χρειάστηκε να παρασκευαστούν τα παρακάτω διαλύματα:

- **Διάλυμα CTAB 2X:** Για την παρασκευή του διαλύματος χρειάζονται 10 ml 1 M Tris-HCl (pH=8), 35 ml 4 M NaCl, 4 ml 0,5 M EDTA, 2 g CTAB και δις-απεσταγμένο νερό μέχρι ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 100 ml. Στη συνέχεια γίνεται ανάδευση του μείγματος με θέρμανση μέχρι να διαλυθεί τελείως η σκόνη. Στο τέλος προστίθενται 100 ml μερκαπτοαιθανόλης.
- **Διάλυμα SAVAGE (εξισορροπημένη φαινόλη - χλωροφόρμιο - ισοαμυλική αλκοόλη):** Για την παρασκευή του διαλύματος χρειάζονται 25 ml διαλύματος εξισορροπημένης φαινόλης και 25 ml διαλύματος χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης. Το διάλυμα χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης παρασκευάζεται από 24 ml διαλύματος χλωροφορμίου και 1 ml διαλύματος ισοαμυλικής αλκοόλης.
- **Διάλυμα TE (10mM Tris-HCl pH=7,4, 1mM EDTA pH=8):** Για την παρασκευή του διαλύματος χρειάζονται 5 ml 2 M Tris-HCl (pH=7,4) και 2 ml 0,5 M EDTA (pH=8). Στη συνέχεια ακολουθεί έντονη ανάδευση ώστε να ομογενοποιηθεί πλήρως το μείγμα, και συμπλήρωση με δις-απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 1000 ml.

Απομόνωση DNA με χρήση του πρωτοκόλλου CTAB

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο CTAB (Hillis et al., 1996), 70 mg ιστού μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και προστίθενται 0,5 ml διαλύματος CTAB 2X και 5 ml διαλύματος 10

mg/ml πρωτεΐνάσης K (Applichem Panreas, Germany). Το πρώτο διάλυμα βοηθάει στην απελευθέρωση του DNA από τα οργανίδια και τον πυρήνα του κυττάρου, ενώ η πρωτεΐνάση K βοηθάει στην καταστροφή των πρωτεϊνών του κυττάρου και των ιστονών του DNA. Το μείγμα επώαζεται για δύο ώρες σε κλίβανο (Bioline Scientific, Greece) στους 55°C και κατά τη διάρκεια της επώασης γίνεται ανάδευση σε vortex mixer (Lab Tech, England) ανά μισή ώρα, ώστε να διαλυθεί πλήρως ο ιστός. Έπειτα, γίνεται προσθήκη 0,5 ml διαλύματος SAVAGE, στην οργανική φάση του οποίου διαλύονται οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια ενώ στην υδατική φάση διαλύεται το DNA. Ακολουθεί έντονη ανάδευση των φιαλιδίων σε vortex mixer, περιστροφή για 5 min σε rotator (Stuart SB3, UK) και φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές (rpm) για 3 min σε φυγόκεντρο (Sigma 1-14, Germany). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των φάσεων, και το υπερκείμενο που περιέχει το DNA μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωλήνα erpendorf, στον οποίο προστίθενται 0,5 ml διαλύματος χλωροφορμίου (Applichem Panreas, Germany).

Ακολουθεί έντονη ανάδευση των φιαλιδίων, περιστροφή για 5 min και φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές (rpm) για 3 min. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf, στον οποίο προστίθενται 1 ml παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (Schalau, Spain), η οποία αφυδατώνει το DNA που γίνεται ορατό σε μορφή νήματος. Γίνεται φυγοκέντρηση του μείγματος στις 12.000 στροφές (rpm) για 2 min, έτσι ώστε το DNA να προσκολληθεί στα τοιχώματα του σωλήνα. Στη συνέχεια, αφαιρείται η απόλυτη αιθανόλη, προστίθεται 1 ml διαλύματος αλκοόλης 70% και ακολουθεί περιστροφή των σωλήνων για 1 h. Έπειτα, απομακρύνεται προσεκτικά η αλκοόλη, και οι σωλήνες τοποθετούνται στον κλίβανο ξήρανσης (Venticell, Germany) στους 35°C, μέχρι να εξατμιστεί εντελώς η αλκοόλη και να στεγνώσει το DNA. Τέλος, στον σωλήνα erpendorf προστίθενται 100 μl διαλύματος TE, στο οποίο διαλύεται το DNA, και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C.

3.2.2. Απομόνωση DNA με χρήση του Ultra Clean Tissue & Cells DNA Isolation Kit

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο Ultra Clean Tissue & Cells DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories Inc, USA) προστίθενται 700 μl TD1, 25 mg ιστού και 20 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K σε Dry bead tube. Το μείγμα τοποθετείται στην τάρακτο (Thermo, USA), στις 400 στροφές για 20 min. Έπειτα, το μείγμα επώαζεται σε υδατόλουτρο (Trade Rayra, Spain) στους 60°C για δύο ώρες, και γίνεται ανάδευση σε vortex mixer (Lab Tech, England) ανά μισή ώρα, ώστε να διαλυθεί πλήρως ο ιστός. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές (rcf) για 1 min σε φυγόκεντρο (DigicenN 20, Spain). Το μείγμα μεταφέρεται σε νέα στήλη με φίλτρο και φυγοκεντρείται στις 10.000 στροφές (rcf) για 1 min, με σκοπό τον καθαρισμό του

DNA από τα υπολείμματα του διαλύματος TD1. Αφού απομακρυνθεί το υπόλειμμα, προστίθενται 400 μl διαλύματος TD2 και το μείγμα φυγοκεντρείται στις 10.000 στροφές (rcf) για 1 min. Μετά την απομάκρυνση του υπολείμματος πραγματοποιείται ξανά φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές (rcf) για 1 min, με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση των υπολειμμάτων του διαλύματος TD2. Στη συνέχεια, το φίλτρο το οποίο περιέχει το DNA μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf, και γίνεται προσθήκη 40 μl διαλύματος TD3. Ο σωλήνας παραμένει για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκεντρείται στις 10.000 στροφές (rcf) για 1 min. Στο υπόλειμμα που λαμβάνεται μετά τη φυγοκέντρηση εμπεριέχεται το DNA, το οποίο αποθηκεύεται στους 4°C.

3.2.3. Απομόνωση DNA με χρήση του Genomic Mini Kit

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο Genomic Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), σε αποστειρωμένο σωλήνα erpendorf προστίθενται 25 mg ιστού, 180 μl PureLink® Genomic Digestion Buffer και 20 μl διαλύματος πρωτεΐνωσης K. Το μείγμα επώαζεται σε υδατόλουτρο (Trade Rayra, Spain) στους 55°C για 2 ώρες, και γίνεται ανάδευση σε vortex mixer (Lab Tech, England) κάθε μισή ώρα, ώστε να διαλυθεί πλήρως ο ιστός. Μετά το τέλος της επώασης το μείγμα φυγοκεντρείται στις 10.000 στροφές (rcf) για 3 min σε φυγόκεντρο (DigicenN 20, Spain), με σκοπό την αφαίρεση τυχόν υπολειμμάτων του ιστού, και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο σωλήνα erpendorf. Προστίθενται 20 μl διαλύματος RNase A, γίνεται ανάδευση σε vortex mixer, και έπειτα το μείγμα παραμένει για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθενται 200 μl PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer και ακολουθεί καλή ανάδευση σε vortex mixer. Έπειτα, γίνεται προσθήκη 200 μl αιθανόλης 100% και το μείγμα αναδεύεται σε vortex mixer για 5 sec. Ακολουθεί η μεταφορά του μείγματος σε στήλη με φίλτρο, και η στήλη φυγοκεντρείται στις 10.000 στροφές (rcf) για 1 min. Το υπόλειμμα απομακρύνεται, προστίθενται 500 μl διαλύματος Wash Buffer 1 και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές (rcf) για 1 min. Το υπόλειμμα απομακρύνεται, προστίθενται 500 μl διαλύματος Wash Buffer 2 και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές (rcf) για 3 min. Στη συνέχεια, το φίλτρο τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωλήνα erpendorf, προστίθενται 50 μl PureLink® Genomic Elution Buffer, και ο σωλήνας παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min. Τέλος, γίνεται φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές (rcf) για 1,5 min, αφαιρείτε η στήλη με το φίλτρο, και το υπόλειμμα που παραμένει στο σωλήνα περιέχει το DNA, το οποίο αποθηκεύεται στους 4°C.

3.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Μετά τη διαδικασία απομόνωσης του DNA τόσο με το πρωτόκολλο CTAB όσο και με τα kit απομόνωσης, γίνεται ο προσδιορισμός της ποσότητας και της ποιότητας του γενετικού υλικού που απομονώθηκε. Η ανίχνευση του DNA πραγματοποιείται με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης (μετά από τη χρώση του DNA με τη μη τοξική χρωστική Midori Green) και την παρατήρηση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η τεχνική ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης επιτρέπει το διαχωρισμό τμημάτων, θραυσμάτων ή μορίων DNA με βάση το μέγεθός τους, τα οποία καθίστανται ορατά μετά από χρώση.

3.3.1. Αντιδραστήρια και διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

- Διάλυμα 1XTBE: 100 ml διαλύματος 10XTBE (Applichem Panreac) και 900 ml δις-απεσταγμένο H₂O
- Σκόνη αγαρόζης (Applichem Panreac, Germany)
- Χρωστική Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Germany)
- Διάλυμα φόρτωσης: 1% κυανό της βρωμοφαινόλης (Applichem Panreac, Germany)

3.3.2. Παρασκευή πηκτής αγαρόζης και διαδικασία ηλεκτροφόρησης

1. Σε κωνική φιάλη προστίθενται 100 ml διαλύματος 1XTBE και 1 g αγαρόζης (Applichem Panreac, Germany) υπό μορφή σκόνης.
2. Η κωνική φιάλη τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνεται μέχρι το σημείο βρασμού, έτσι ώστε να λιώσει η αγαρόζη και το μείγμα να γίνει διαυγές.
3. Αφού βγει το διάλυμα της αγαρόζης από το φούρνο μικροκυμάτων, ψύχεται υπό συνεχή ανάδευση κάτω από τρεχούμενο νερό.
4. Όταν το διάλυμα αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 1,4 ml από τη μη τοξική χρωστική Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Germany), και γίνεται προσεκτική ανάδευση ώστε να μη σχηματιστούν φυσαλίδες.
5. Το διάλυμα της αγαρόζης χύνεται στο ειδικό πλαίσιο (εκμαγείο) και απομακρύνονται οι φυσαλίδες που πιθανόν έχουν δημιουργηθεί.
6. Στο ένα άκρο του εκμαγείου που περιέχει τη ρευστή αγαρόζη εισέρχεται μία ειδική «χτένα», η οποία θα δημιουργήσει τα «πηγαδάκια» στα οποία θα φορτωθεί το προς ηλεκτροφόρηση δείγμα.
7. Η αγαρόζη παραμένει για περίπου 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, όπου ζελατινοποιείται και στερεοποιείται.

8. Αφού στερεοποιηθεί η αγαρόζη, η «χτένα» αφαιρείται, και η πηκτή τοποθετείται προσεκτικά στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία έχουν προστεθεί 700 ml διαλύματος 1XTBE.
9. Σε ένα κομμάτι parafilm αναμιγνύονται 4 ml διαλύματος DNA και 2 ml διαλύματος φόρτωσης (κυανό της βρωμοφαινόλης).
10. Με τη βοήθεια μικροπιπέτας, γίνεται αναρρόφηση όλου του μείγματος το οποίο «φορτώνεται» (τοποθετείται) σε ένα από τα πηγαδάκια της πηκτής. Σε κάθε «πηγαδάκι» τοποθετείται ένα δείγμα DNA.
11. Αφού ολοκληρωθεί η τοποθέτηση όλων των δειγμάτων στα «πηγαδάκια» της πηκτής, τοποθετείται το καπάκι της συσκευής ηλεκτροφόρησης (Cleaver, U.K).
12. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με ένα τροφοδοτικό μηχανήμα (Arelax, Belgium) και εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο στα άκρα της πηκτής, το οποίο ρυθμίζεται σε τάση 150 Volts και ένταση ρεύματος 90 mA. Εφόσον ο σκελετός σακχάρου - φωσφορικής ομάδας του DNA είναι αρνητικά φορτισμένος, τα μόρια του DNA μετακινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο (άνοδος). Η πρόοδος της ηλεκτροφόρησης παρακολουθείται με τη μετακίνηση του δείκτη του κυανού της βρωμοφαινόλης. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης διαρκεί 30 λεπτά. Εάν ήταν επιτυχής η απομόνωση του DNA, το γενετικό υλικό θα εμφανίζεται σε μια φωτεινή ζώνη επάνω στην πηκτή αγαρόζης.
13. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης απομακρύνεται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται επάνω στην τράπεζα της συσκευής υπεριώδους ακτινοβολίας (TFM -20,Upland, CA, USA).
14. Για την αποτύπωση των αποτελεσμάτων, η συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας είναι συνδεδεμένη με φωτογραφική μηχανή (Olympus). Η πηκτή φωτογραφίζεται και μέσω ειδικού λογισμικού προγράμματος (DOC-IT) γίνεται επεξεργασία και αποθήκευση της φωτογραφίας της πηκτής.

3.4. Ενίσχυση των γονιδίων με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR)

Με τη μέθοδο αυτή ενισχύεται μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν δύο διαφορετικά μιτοχονδριακά (mtDNA) γονίδια (16S rRNA και COI) για την ανάλυση κάθε δείγματος, καθώς και τα δύο έχουν χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα σε αντίστοιχες μελέτες (Palumbi, 1996; Ivanova et al., 2007). Το διάλυμα της PCR προετοιμάστηκε στο εργαστήριο ή χρησιμοποιήθηκε το έτοιμο μείγμα FastGene Optima

HotStart ReadyMix (Nippon Genetics Europe GmbH, Germany). Σε κάθε περίπτωση ακολουθείται παρόμοια διαδικασία.

3.4.1. Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA με την αντίδραση PCR

Για την ενίσχυση των 600 ζευγών βάσεων του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι παγκόσμιοι εκκινητές (Palumbi, 1996):

16SH 5'-CCGGTCTGAACTCAATCACG-3'
16SL 5'-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3'

Ο συνολικός όγκος για κάθε αντίδραση PCR είναι 25 μ l και το μείγμα της αντίδρασης περιέχει τα παρακάτω συστατικά:

| | |
|-----------------------------------|---------------|
| PCR buffer | 2,5 μ l |
| MgSO ₄ (100 mM) | 0,6 μ l |
| BSA | 0,25 μ l |
| dNTPS (10 mM) | 0,6 μ l |
| Εκκινητής 1 (100 pmol/ μ l) | 0,25 μ l |
| Εκκινητής 2 (100 pmol/ μ l) | 0,25 μ l |
| Taq πολυμεράση (5 units/ μ l) | 0,2 μ l |
| DNA | 1,0 μ l |
| Δις-απεσταγμένο νερό | 19,35 μ l |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης | 25 μ l |

Για την παρασκευή του μείγματος προστέθηκαν πρώτα το δις-απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια τα υπόλοιπα αντιδραστήρια, με τελευταία την Taq πολυμεράση. Κατά την αντίδραση PCR με χρήση του μείγματος FastGene Optima HotStart ReadyMix, τα υλικά διαφοροποιούνται, αλλά ο συνολικός όγκος της αντίδρασης παραμένει ο ίδιος:

| | |
|----------------------------|--------------|
| Δις-απεσταγμένο νερό | 8,5 μ l |
| PCR Master Mix | 12,5 μ l |
| Εκκινητής 1 (10 mM) | 1,25 μ l |
| Εκκινητής 2 (10 mM) | 1,25 μ l |
| DNA | 1,5 μ l |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης | 25 μ l |

Το πρόγραμμα ενίσχυσης για την περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA έγινε σε θερμικό κυκλοποιητή της εταιρίας Eppendorf (Germany). Η συσκευή ρυθμίστηκε στις παρακάτω θερμοκρασίες και χρόνους και το πρόγραμμα έχει ως εξής (Imsiridou et al., 2011):

1. 94°C για 3 min, αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
2. 94°C για 50 s, αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
3. 50°C για 50 s, σύνδεση των εκκινητών στο DNA-στόχο
4. 72°C για 50 s, δράση της πολυμεράσης και επιμήκυνση των αλυσίδων DNA
5. Επανάληψη των βημάτων 2-3-4 (ένας κύκλος PCR) για 30 φορές
6. 72°C για 5 min, τελική συμπληρωματική επιμήκυνση

Ο πολλαπλασιασμός του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA με το παραπάνω θερμοκρασιακό πρόγραμμα διαρκεί περίπου δύο ώρες. Μετά το τέλος της διαδικασίας τα σωληνάκια eppendorf τοποθετούνται στο ψυγείο, μέχρι το επόμενο στάδιο.

3.4.2. Ενίσχυση του γονιδίου COI με την αντίδραση PCR

Για την ενίσχυση των 670 ζευγών βάσεων του μιτοχονδριακού γονιδίου COI χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (Ward et al., 2005):

FishF1 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'
FishF2 5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3'
FishR1 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'
FishR2 5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3'

Ο συνολικός όγκος για κάθε αντίδραση PCR είναι 25 μl και το μείγμα της αντίδρασης περιέχει τα παρακάτω συστατικά:

| | |
|-----------------------------|-----------|
| PCR buffer | 2,5 μl |
| MgSO ₄ (100 mM) | 0,625 μl |
| BSA | 0,25 μl |
| dNTPS (10 mM) | 0,6 μl |
| Εκκινητής 1 (100 pmol/μl) | 0,25 μl |
| Εκκινητής 2 (100 pmol/μl) | 0,25 μl |
| Taq πολυμεράση (5 units/μl) | 0,2 μl |
| DNA | 1,0 μl |
| Δις-απεσταγμένο νερό | 19,325 μl |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης | 25 μl |

Για την παρασκευή του μείγματος προστίθετε πρώτα το δις-απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια τα υπόλοιπα αντιδραστήρια με τελευταία την Taq πολυμεράση. Κατά την αντίδραση PCR με χρήση του μείγματος FastGene Optima HotStart ReadyMix, τα υλικά διαφοροποιούνται, αλλά ο συνολικός όγκος της αντίδρασης παραμένει ο ίδιος:

| | |
|----------------------------|---------|
| Δις-απεσταγμένο νερό | 8,5 μl |
| PCR Master Mix | 12,5 μl |
| Εκκινητής 1 (10 mM) | 1,25 μl |
| Εκκινητής 2 (10 mM) | 1,25 μl |
| DNA | 1,5 μl |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης | 25 μl |

Το πρόγραμμα ενίσχυσης για την περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδίου COI έγινε σε θερμικό κυκλοποιητή της εταιρίας Eppendorf (Germany). Η συσκευή ρυθμίστηκε στις παρακάτω θερμοκρασίες και χρόνους και το πρόγραμμα έχει ως εξής (Ivanova, et al., 2007):

1. 95°C για 2 min, αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
2. 94°C για 30 s, αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
3. 53°C για 30 s, σύνδεση των εκκινητών στο DNA-στόχο
4. 72°C για 1 min, δράση της πολυμεράσης και επιμήκυνση των αλυσίδων DNA
5. Επανάληψη των βημάτων 2-3-4 (ένας κύκλος PCR) για 35 φορές
6. 72°C για 10 min, τελική συμπληρωματική επιμήκυνση

Ο πολλαπλασιασμός του μιτοχονδριακού γονιδίου COI με το παραπάνω θερμοκρασιακό πρόγραμμα διαρκεί περίπου δύο ώρες. Μετά το τέλος της διαδικασίας τα σωληνάκια eppendorf τοποθετούνται στο ψυγείο, μέχρι το επόμενο στάδιο.

3.5. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR σε πηκτή αγαρόζης

Για να ελεγχθεί η ενίσχυση του γονιδίου, γίνεται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, όπως και στον έλεγχο απομόνωσης του DNA. Η παρασκευή της πηκτής γίνεται με παρόμοιο τρόπο, με μόνη διαφορά στη συγκέντρωση της, η οποία είναι 1,5% σε διάλυμα 1XTBE. Για να βρεθούν τα μήκη των τμημάτων του DNA που έχουν ενισχυθεί (αριθμός ζευγών βάσεων), σε ένα πηγαδάκι της πηκτής φορτώνεται ένας "μάρτυρας" DNA. Ο μάρτυρας είναι ένα πλασμίδιο, το οποίο έχει κοπεί με ένζυμα περιορισμού σε γνωστές θέσεις. Έτσι προκύπτει ένας αριθμός θραυσμάτων DNA που έχουν γνωστό μήκος. Όταν φορτωθεί μαζί με τα ενισχυμένα τμήματα DNA στην πηκτή αγαρόζης, γίνεται σύγκριση των

θέσεων τους με τα θραύσματα γνωστού μήκους του μάρτυρα. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο 100 bp DNA ladder (GeneOn, Germany).

3.6. Ανάλυση πρωτοδιάταξης (Sequencing analysis)

Για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση πρωτοδιάταξης των μιτοχονδριακών γονιδίων 16S rRNA και COI, σύμφωνα με τη μέθοδος του Sanger (Sanger et al., 1977) και με τη χρήση του αυτόματου αναλυτή ABI 3500. Η ενζυμική μέθοδος Sanger απαιτεί μονόκλωνο DNA, το οποίο χρησιμοποιείται σαν μήτρα για τη σύνθεση *in vitro* της συμπληρωματικής αλυσίδας, με τη βοήθεια μιας DNA πολυμεράσης. Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά τα στάδια της μεθόδου Sanger.

3.6.1. Καθαρισμός αρχικού προϊόντος PCR

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR που ελήφθησαν στο προηγούμενο στάδιο, χρησιμοποιείται το έτοιμο kit καθαρισμού UltraClean® PCR Clean-Up Kit (MOBIO Laboratories Inc, USA) και η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

- Προσθήκη 105 μl Spin Bind buffer στα 21 μl του προϊόντος της PCR. Ακολουθεί έντονη ανάδευση (Vortex) για 10 s.
- Μεταφορά του περιεχομένου σε ειδικούς σωλήνες με στήλη (Spin Filter unit). Φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1 min.
- Άδειασμα του σωλήνα από τα υπολείμματα και επανατοποθέτηση της στήλης στον ίδιο σωλήνα. Στη στήλη τώρα έχει δεσμευτεί το προϊόν της PCR.
- Προσθήκη 300 μl Spin Clean buffer σε κάθε δείγμα. Φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1 min.
- Άδειασμα του σωλήνα από τα υπολείμματα και επανατοποθέτηση της στήλης στον ίδιο σωλήνα. Φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1 min.
- Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό σωλήνα. Προσεκτική προσθήκη 50 μl Elution buffer.
- Επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1 min.
- Απόρριψη της στήλης. Ο σωλήνας περιέχει τώρα καθαρό DNA (προϊόν PCR).

3.6.2. Προετοιμασία της δεύτερης αντίδρασης PCR

Στη διάρκεια της δεύτερης αντίδρασης PCR, η DNA πολυμεράση θα δημιουργήσει τα μονόκλινα τμήματα DNA, τα οποία θα διαφέρουν μεταξύ τους κατά ένα νουκλεοτίδιο. Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε ειδικό plate της εταιρείας ABI. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης PCR για κάθε δείγμα είναι 6 μl. Σε κάθε πηγάδι του plate προστίθενται:
 - 2 μl καθαρισμένο προϊόν PCR
 - 4 μl Master mix το οποίο αποτελείται από: 2,554 μl H₂O, 0,096 μl εκκινητή, 1,05 μl sequencing buffer, 0,3 μl Big dye premix.

Το διάλυμα Big dye premix περιέχει την πολυμεράση, τα κανονικά νουκλεοτίδια (dNTPs) και τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια με τις φθορίζουσες χρωστικές (ddNTPs). Το διάλυμα sequencing buffer χρησιμοποιείται μόνο για την αραιώση του διαλύματος Big dye premix.

- Το plate τοποθετείται στη συσκευή PCR. Το πρόγραμμα της PCR έχει ως εξής:
 1. 96°C για 3 min, αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
 2. 96°C για 20 s
 3. 55°C για 15 s
 4. 60°C για 4 min
 5. Επανάληψη των βημάτων 2-3-4 (ένας κύκλος PCR) για 40 φορές

3.6.3. Καθαρισμός του δεύτερου προϊόντος PCR

Ο δεύτερος καθαρισμός του προϊόντος PCR γίνεται για να απομακρυνθούν τα φθορίζοντα νουκλεοτίδια, τα οποία δεν έχουν ενσωματωθεί. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

- EDTA 0,5 M, pH = 8 (0,1 μl ανά δείγμα)
- Sodium acetate 3 M, pH = 5,2 (0,2 μl ανά δείγμα)
- Αιθανόλη 99% (24 μl ανά δείγμα)

Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

- Προετοιμασία ενός μείγματος για το σύνολο των αντιδράσεων που θα χρειαστούν, και προσθήκη 24,3 μl του μείγματος σε κάθε πηγάδι του plate (τα πηγάδια περιέχουν το δεύτερο προϊόν PCR).
- Κλείσιμο του plate με ειδικό καπάκι.
- Επώαση στο σκοτάδι για 1 h.
- Φυγοκέντρηση για 30 min στις 3.700 στροφές και σε 15°C.

- Απομάκρυνση του υγρού περιεχομένου του plate. Το καθαρισμένο προϊόν της PCR παραμένει ως ίζημα.
- Φυγοκέντρωση για 15 s στις 400 στροφές και σε 15°C.
- Προσθήκη 70 μl διαλύματος αλκοόλης 70% σε κάθε δείγμα.
- Φυγοκέντρωση για 15 min στις 3.700 στροφές και σε 15°C.
- Απομάκρυνση του υγρού περιεχομένου του plate.
- Φυγοκέντρωση για 15 s στις 400 στροφές και σε 15°C.
- Επώαση για 1 h στους 37°C και στο σκοτάδι.

3.6.4. Προετοιμασία των δειγμάτων για τοποθέτησή τους στον αναλυτή ABI

Σε κάθε πηγάδι του plate, στο οποίο υπάρχουν ήδη τα καθαρισμένα προϊόντα της δεύτερης PCR, τοποθετούνται 9,5 μl φορμαμίδιο. Το φορμαμίδιο λειτουργεί ως αποδιατακτικός παράγοντας και διατηρεί τα κομμάτια του DNA μονόκλωνα. Το plate τοποθετείται για 5 min στους 95°C, όπου γίνεται αποδιάταξη των τυχόν δίκλωνων τμημάτων DNA που έχουν παραμείνει. Έπειτα τα δείγματα είναι έτοιμα να τοποθετηθούν στον αυτόματο αναλυτή ABI.

Οι βελόνες του αναλυτή ρουφούν 1μl από το κάθε δείγμα και το στέλνουν στα capillaries (τα οποία έχουν μέσα το πολυμερές της ηλεκτροφόρησης). Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται στο εσωτερικό του αναλυτή, και ένας ανιχνευτής Laser δίνει σήμα κάθε φορά που εντοπίζει ένα φθορίζον νουκλεοτίδιο. Το σήμα μεταφράζεται σαν μία έγχρωμη κορυφή και καθώς το όλο σύστημα συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή, η ακολουθία των νουκλεοτιδίων του DNA εμφανίζεται σαν μία ακολουθία έγχρωμων κορυφών.

Τα περισσότερα προϊόντα PCR στάλθηκαν για αλληλούχηση στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας CeMIA SA, Λάρισα, Ελλάδα (www.cemia.eu), ενώ μικρός αριθμός των δειγμάτων αλληλουχήθηκε στο Εργαστήριο Αγροβιοτεχνολογίας και Ελέγχου Αγροτικών Προϊόντων του Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης.

3.7. Βιοπληροφορική Ανάλυση

Οι ακολουθίες που προέκυψαν από την ανάλυση πρωτοταγούς δομής των γονιδίων 16S rRNA και COI, αναλύθηκαν και επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος BioEdit v7.2.6 (Hall, 1999). Στη συνέχεια, οι διορθωμένες ακολουθίες ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση του εργαλείου BLAST (blastn), στη βάση δεδομένων GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Επιπλέον, και με κύριο στόχο την επαλήθευση των αποτελεσμάτων, οι ακολουθίες που προέκυψαν για το γονίδιο COI ταυτοποιήθηκαν και με

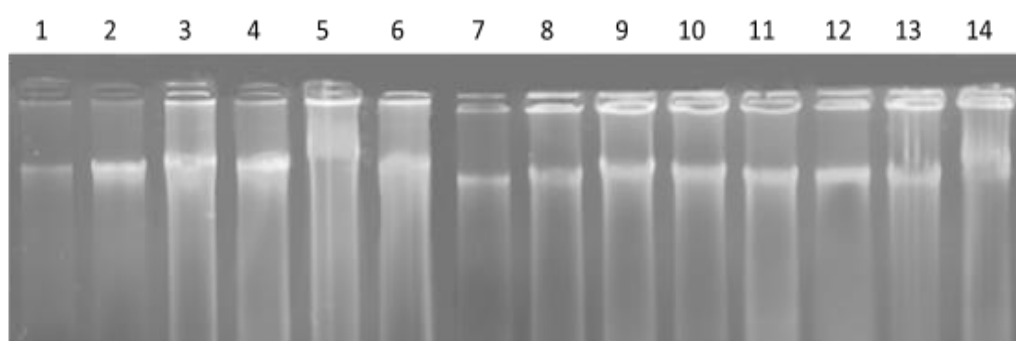
τη χρήση της βάσης δεδομένων Barcode of Life Data Systems (BOLD, http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine), χρησιμοποιώντας το εργαλείο Identification System (ID's).

Και για τις δύο βάσεις δεδομένων, το όριο ταυτοποίησης καθορίστηκε στο 98%. Οι αλληλουχίες με υψηλή ομοιότητα ($\geq 98\%$) θεωρήθηκαν αποδεκτές και κατά συνέπεια καταχωρήθηκαν (Πίνακας 1). Ακολουθίες που δεν έφθασαν σε αυτά τα όρια παραλείφθηκαν. Όλες οι αλληλουχίες είναι διαθέσιμες στα παραρτήματα II και III.

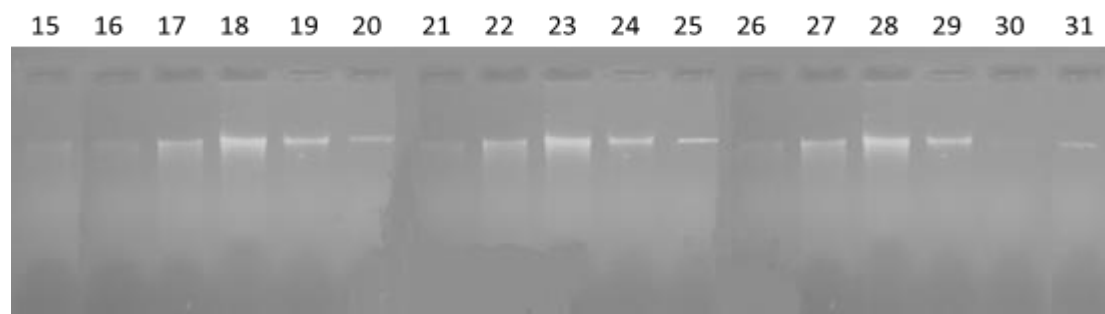
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Απομόνωση DNA

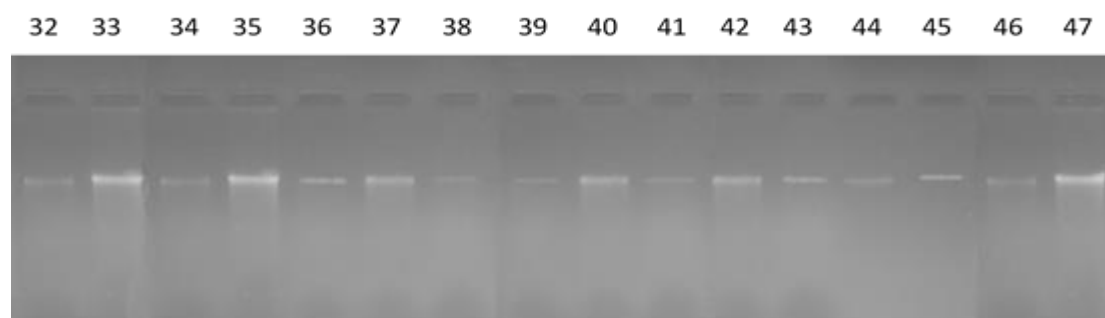
Στις Εικόνες 5-10 φαίνονται τα αποτελέσματα από την απομόνωση του DNA για τα 74 δείγματα που εξετάστηκαν. Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε είτε με το πρωτόκολλο CTAB, είτε με τα έτοιμα κιτ απομόνωσης του εμπορίου Genomic Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) και Ultra Clean Tissue & Cells DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories Inc, USA), και ήταν επιτυχής σε όλα τα δείγματα. Αυτό φαίνεται από τις φωτεινές ζώνες που παρατηρούνται στην πηκτική αгарόζη, οι οποίες υποδηλώνουν την παρουσία του DNA.



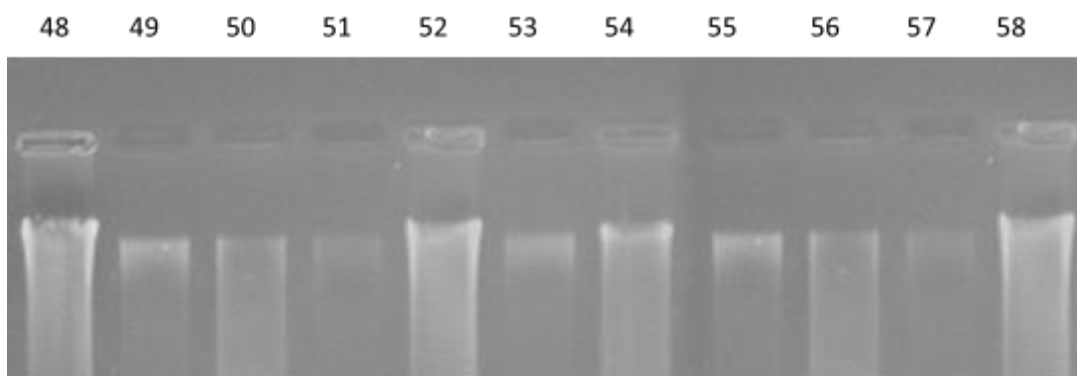
Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση πηκτικής αгарόζης όπου φαίνονται οι ζώνες DNA για τα δείγματα 1-14.



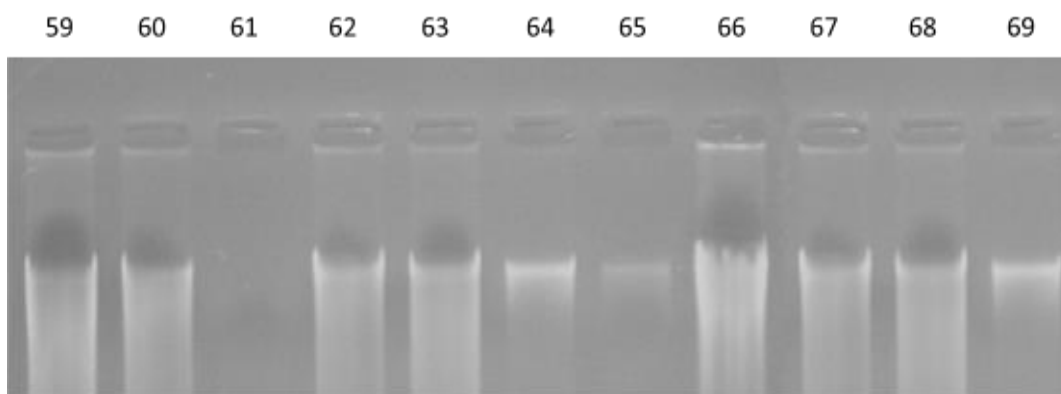
Εικόνα 6: Ηλεκτροφόρηση πηκτικής αгарόζης όπου φαίνονται οι ζώνες DNA για τα δείγματα 15-31.



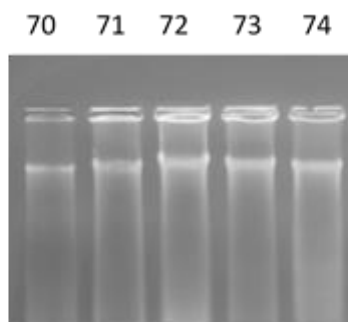
Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρηση πηκτικής αгарόζης όπου φαίνονται οι ζώνες DNA για τα δείγματα 32-47.



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης όπου φαίνονται οι ζώνες DNA για τα δείγματα 48-58.



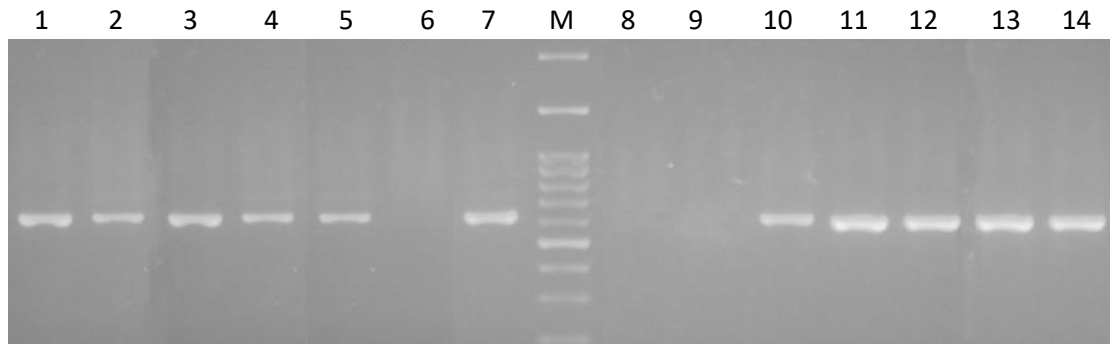
Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης όπου φαίνονται οι ζώνες DNA για τα δείγματα 59-69.



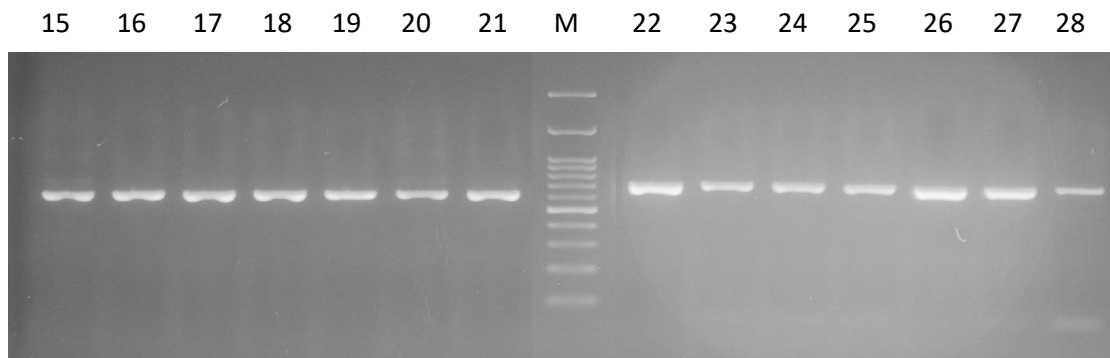
Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης όπου φαίνονται οι ζώνες DNA για τα δείγματα 70-74.

4.2 Προϊόντα αντίδρασης PCR του γονιδίου 16S rRNA

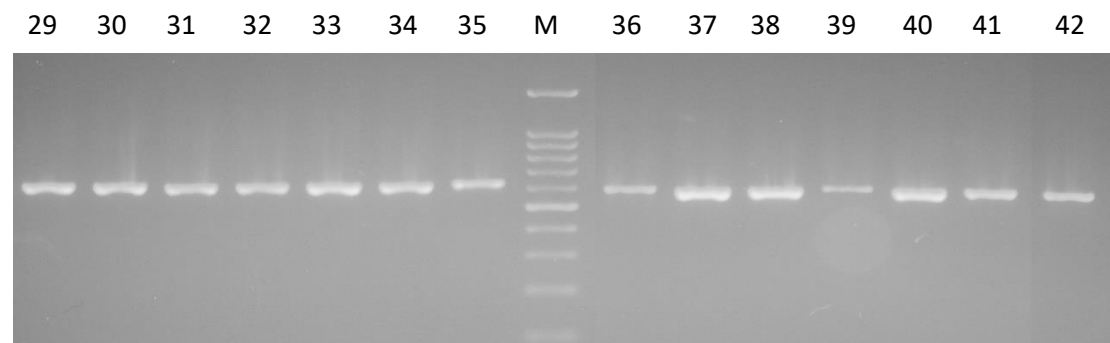
Στις Εικόνες 11-16 φαίνονται τα προϊόντα της ενίσχυσης του γονιδίου 16S rRNA. Το γονίδιο 16S rRNA ενισχύθηκε επιτυχώς σε 71 από τα 73 δείγματα. Στα δείγματα όπου το γονίδιο ενισχύθηκε επιτυχώς παρατηρείται μια κύρια φωτεινή ζώνη, η οποία αντιστοιχεί περίπου στο ύψος των 600 ζευγών βάσεων, όταν αυτή συγκρίνεται με το μάρτυρα των 100 ζευγών βάσεων (GeneOn, Germany).



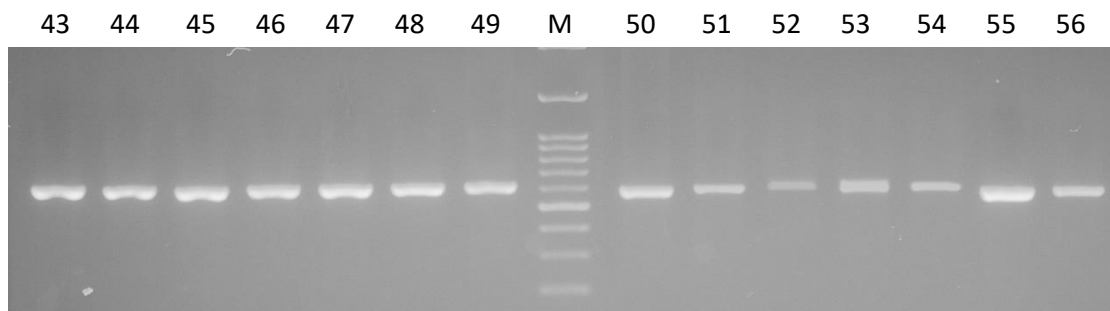
Εικόνα 11: Προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου 16S rRNA για τα δείγματα 1-14 και μάρτυρας (M) 100 ζευγών βάσεων.



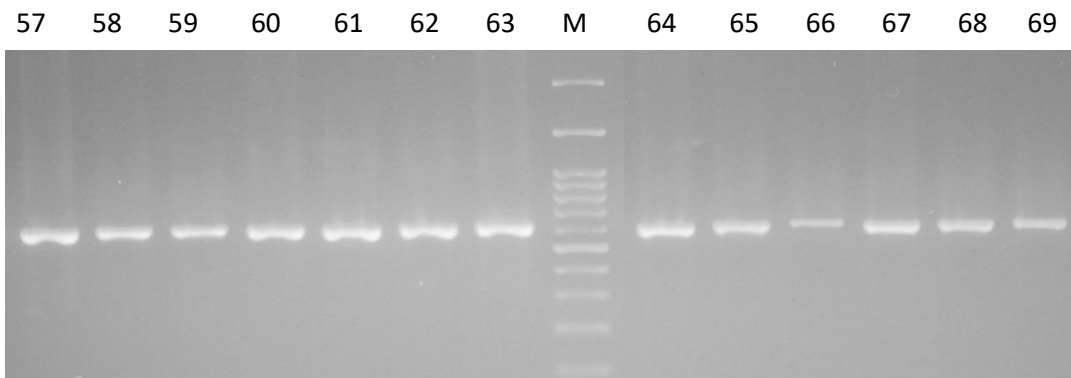
Εικόνα 12: Προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου 16S rRNA για τα δείγματα 15-28 και μάρτυρας (M) 100 ζευγών βάσεων.



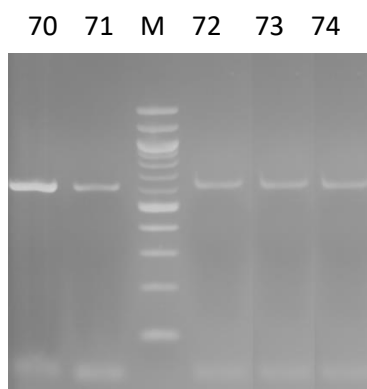
Εικόνα 13: Προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου 16S rRNA για τα δείγματα 29-42 και μάρτυρας (M) 100 ζευγών βάσεων.



Εικόνα 14: Προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου 16S rRNA για τα δείγματα 43-56 και μάρτυρας (M) 100 ζευγών βάσεων.



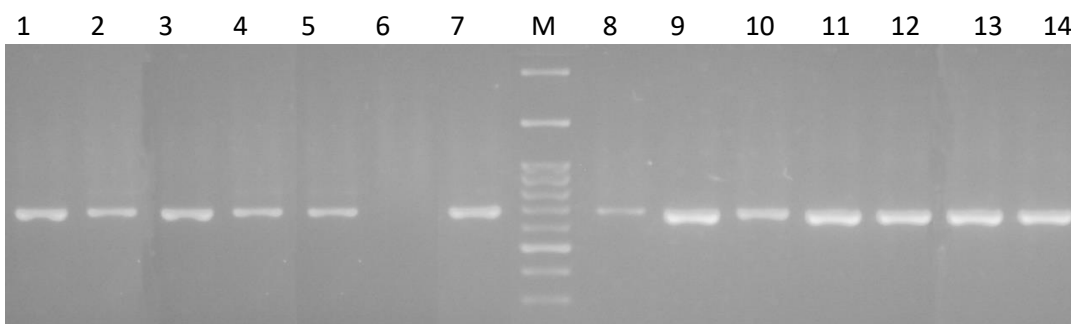
Εικόνα 15: Προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου 16S rRNA για τα δείγματα 57-69 και μάρτυρας (M) 100 ζευγών βάσεων.



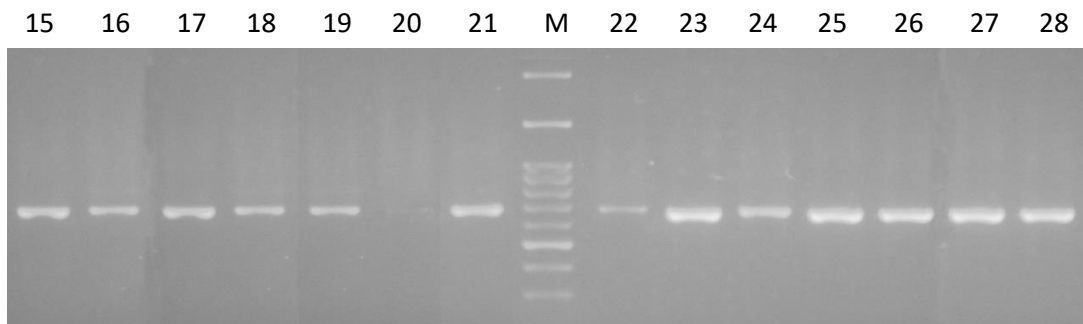
Εικόνα 16: Προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου 16S rRNA για τα δείγματα 70-74 και μάρτυρας (M) 100 ζευγών βάσεων.

4.3 Προϊόντα αντίδρασης PCR του γονιδίου COI

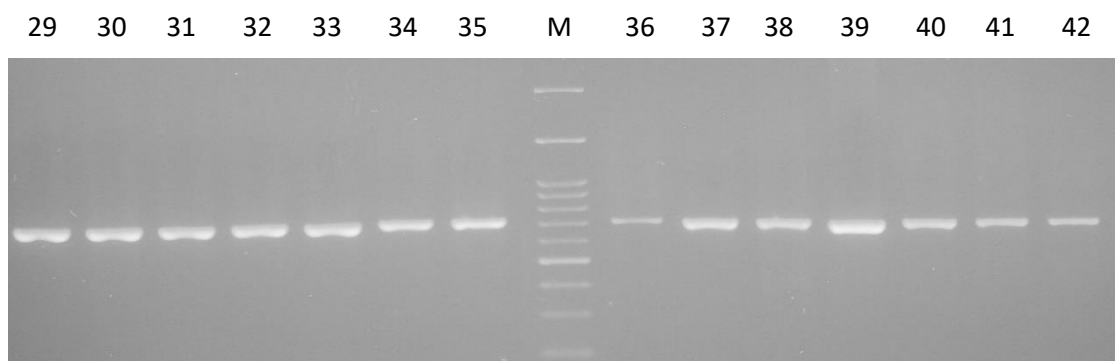
Στις Εικόνες 17-22 φαίνονται τα προϊόντα της ενίσχυσης του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI). Το γονίδιο COI ενισχύθηκε επιτυχώς σε 69 από τα 73 δείγματα. Στα δείγματα όπου το γονίδιο ενισχύθηκε επιτυχώς παρατηρείται μια κύρια φωτεινή ζώνη, η οποία αντιστοιχεί περίπου στο ύψος των 670 ζευγών βάσεων, όταν αυτή συγκρίνεται με το μάρτυρα των 100 ζευγών βάσεων (GeneOn, Germany).



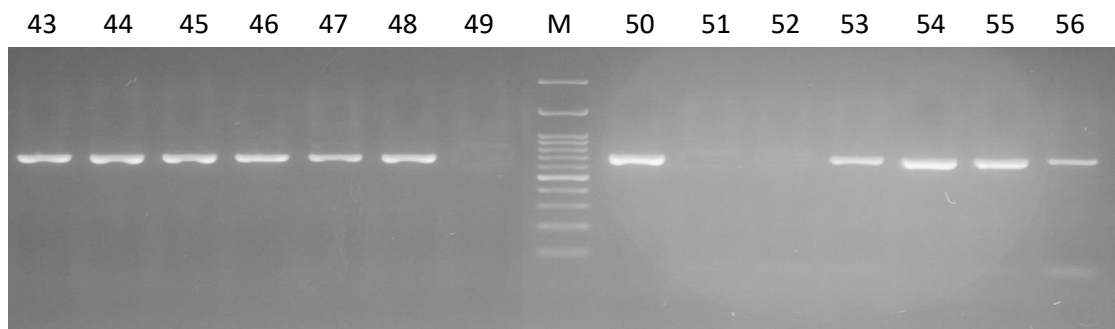
Εικόνα 17: Προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου COI για τα δείγματα 1-14 και μάρτυρας (M) 100 ζευγών βάσεων



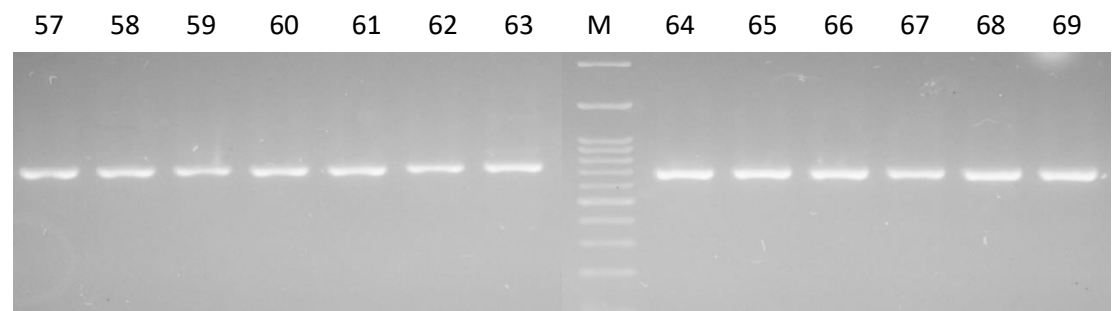
Εικόνα 18: Προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου COI για τα δείγματα 15-28 και μάρτυρας (M) 100 ζευγών βάσεων.



Εικόνα 19: Προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου COI για τα δείγματα 29-42 και μάρτυρας (M) 100 ζευγών βάσεων.

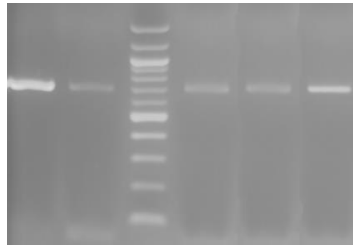


Εικόνα 20: Προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου COI για τα δείγματα 43-56 και μάρτυρας (M) 100 ζευγών βάσεων.



Εικόνα 21: Προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου COI για τα δείγματα 57-69 και μάρτυρας (M) 100 ζευγών βάσεων.

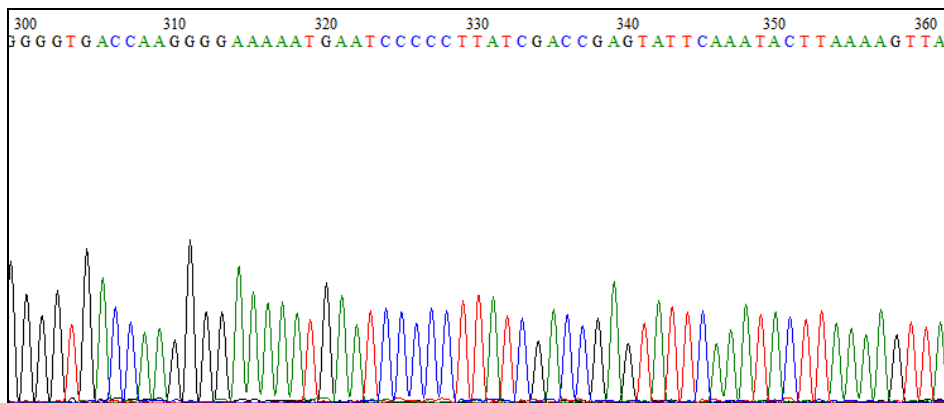
70 71 M 72 73 74



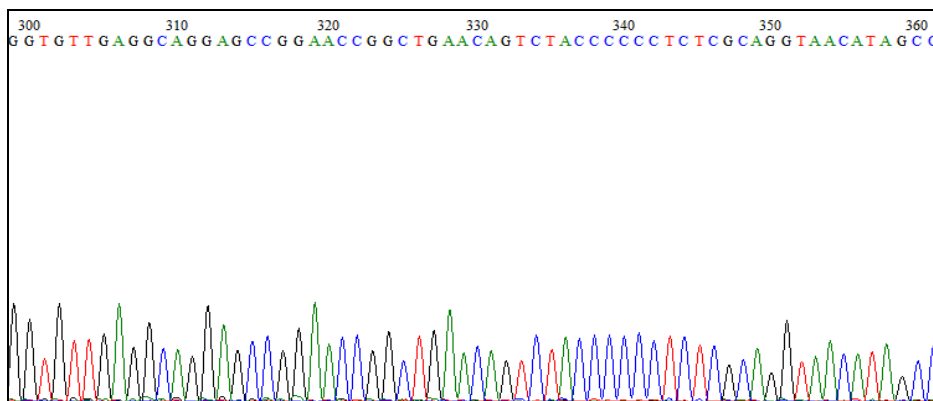
Εικόνα 22: Προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου COI για τα δείγματα 70-74 και μάρτυρας (M) 100 ζευγών βάσεων.

4.4 Ταυτοποίηση δειγμάτων

Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης, επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος BioEdit v7.2.6 (Hall, 1999), για να γίνει η ταυτοποίηση των δειγμάτων. Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται τμήμα του χρωματογραφήματος για κάθε γονίδιο, ενός τυχαίου δείγματος που αναλύθηκε (Εικόνα 23, Εικόνα 24).



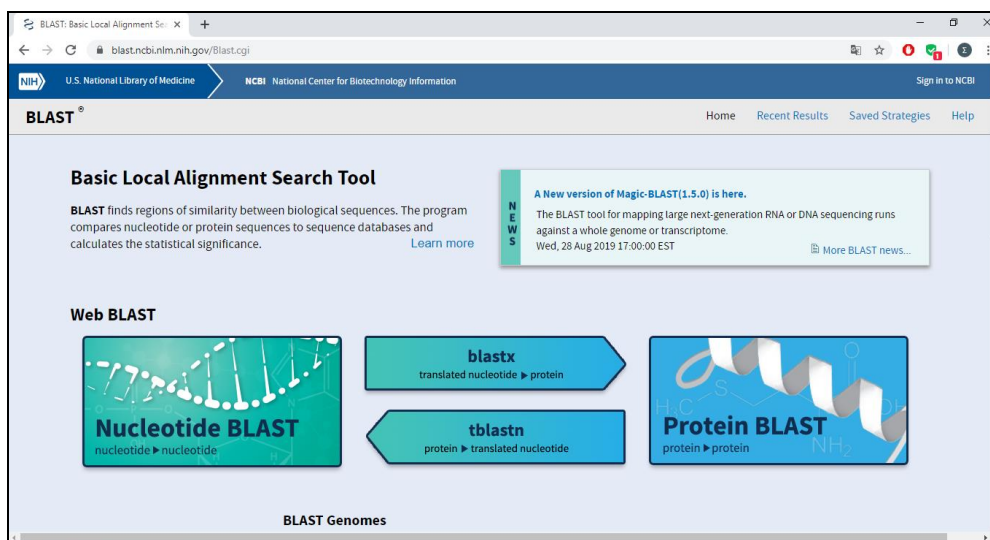
Εικόνα 23: Χρωματογράφημα που προκύπτει μετά από ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 16S rRNA.



Εικόνα 24: Χρωματογράφημα που προκύπτει μετά από ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου COI.

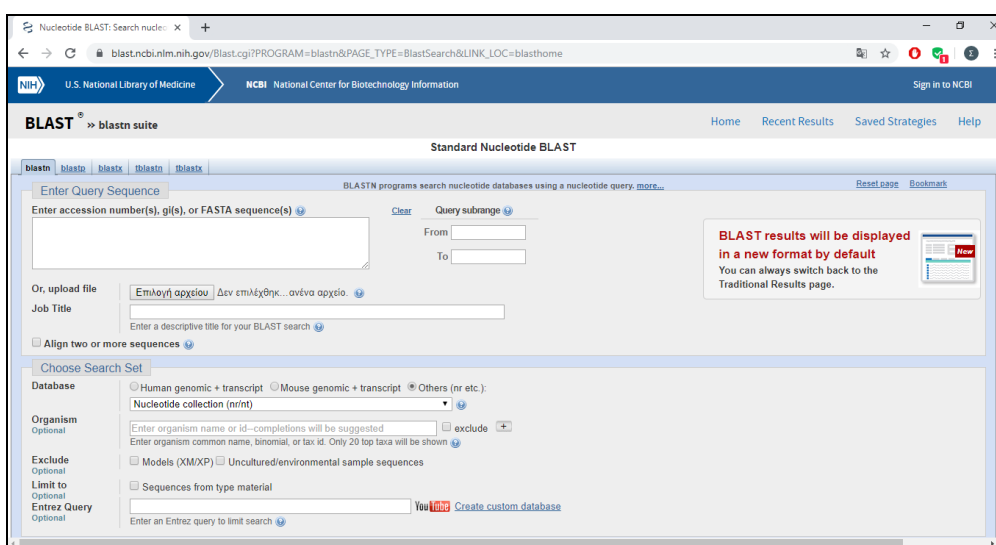
Για το γονίδιο 16S rRNA αλληλουχήθηκαν, κατά μέσο όρο, 544 ζεύγη βάσεων, και αφού επεξεργάστηκαν και διορθώθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit v7.2.6 (Hall, 1999), αναλύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση του εργαλείου BLAST (blastn), στη βάση δεδομένων GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Η διαδικασία ταυτοποίησης για το πρώτο δείγμα περιγράφεται παρακάτω.

Στην Εικόνα 25 φαίνεται το περιβάλλον το οποίο εμφανίζεται με την εισαγωγή της διεύθυνσης <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> στον περιηγητή.



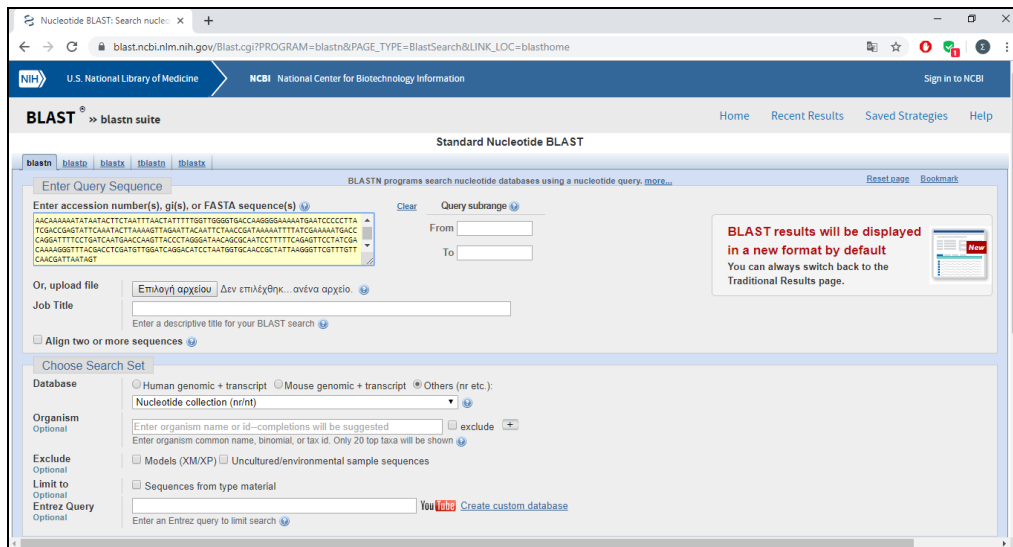
Εικόνα 25: Αρχική σελίδα του εργαλείου BLAST.

Στην σελίδα αυτή επιλέγεται το εργαλείο *Nucleotide BLAST*, το οποίο οδηγεί στο περιβάλλον που φαίνεται στην Εικόνα 26.



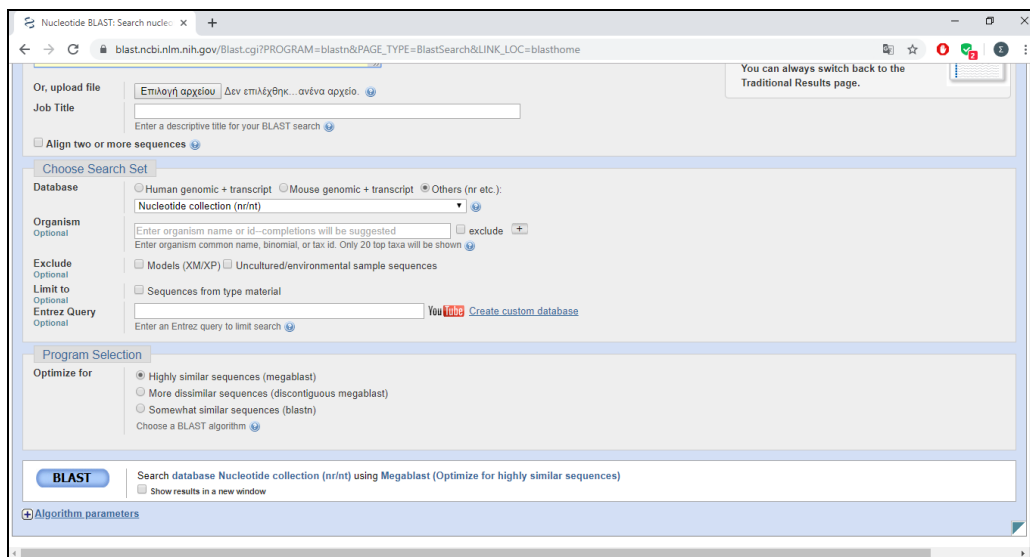
Εικόνα 26: Αρχική σελίδα του εργαλείου Nucleotide BLAST.

Στην συνέχεια επιλέγεται η αλληλουχία που πρόκυτε να αναλυθεί και τοποθετείται στο πλαίσιο *Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)*, όπως φαίνεται στην Εικόνα 27. Η συγκεκριμένη αλληλουχία ανήκει στο πρώτο δείγμα.



Εικόνα 27: Εισαγωγή της αλληλουχίας.

Στο κάτω μέρος της ίδιας σελίδας επιλέγεται το κουμπί BLAST (Εικόνα 28) και αναμένεται η εξαγωγή των αποτελεσμάτων.



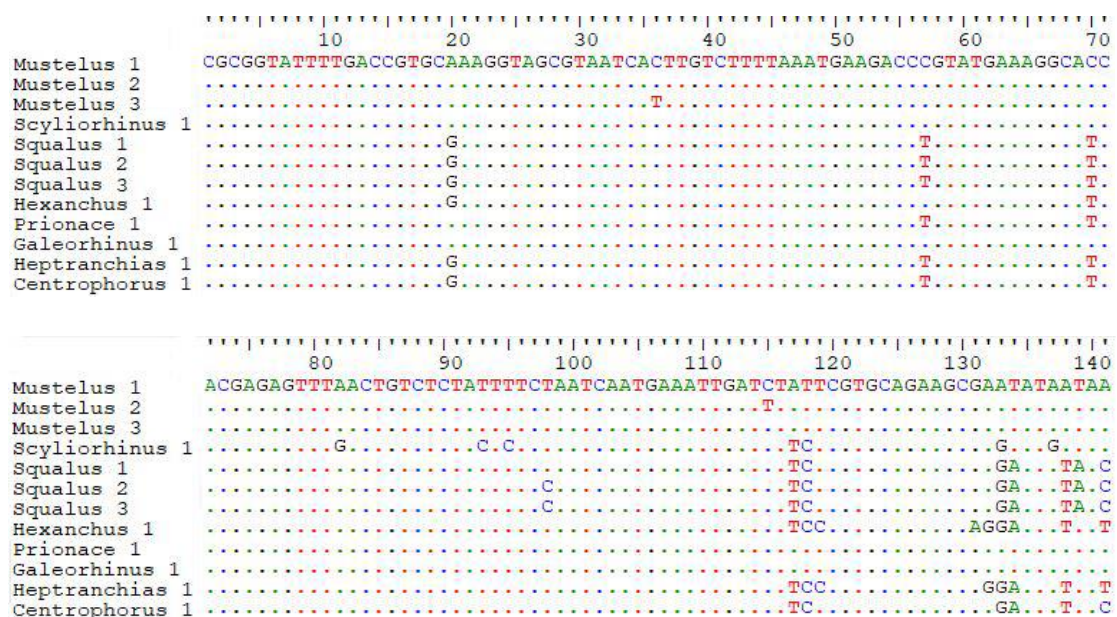
Εικόνα 28: Έναρξη ταυτοποίησης.

Στην Εικόνα 29 φαίνονται τα αποτελέσματα του προγράμματος BLAST για το πρώτο δείγμα. Το δείγμα αυτό ανήκει στο είδος *Scyliorhinus canicula* με ομοιότητα 100%.

| Sequences producing significant alignments | | Download | Manage Columns | Show | 100 | ? | |
|--|---|-----------|----------------|--------------------------|---------|------------|-----------------------------|
| | | GenBank | Graphics | Distance tree of results | | | |
| select all 100 sequences selected | | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Scyliorhinus canicula voucher NRM.49164 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, mitochondrial | 970 | 970 | 100% | 0.0 | 100.00% | KJ128901.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Scyliorhinus canicula complete mitochondrial genome | 970 | 970 | 100% | 0.0 | 100.00% | Y16067.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Scyliorhinus canicula 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, mitochondrial | 953 | 953 | 100% | 0.0 | 99.43% | KU577282.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Scyliorhinus torazame mitochondrial DNA, complete genome | 874 | 874 | 100% | 0.0 | 96.76% | AP019520.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Cephaloscyllium umbratile mitochondrion, complete genome | 874 | 874 | 100% | 0.0 | 96.76% | KX354996.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Cephaloscyllium umbratile mitochondrion, complete genome | 874 | 874 | 100% | 0.0 | 96.76% | KT003686.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Cephaloscyllium silasi voucher NBFGR:CHN 87 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, mitochondrial | 863 | 863 | 100% | 0.0 | 96.38% | HM467792.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Poroderma pantherinum mitochondrion, complete genome | 848 | 848 | 99% | 0.0 | 95.98% | NC_043830.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Cephaloscyllium silasi voucher NBFGR:CHN 89 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, mitochondrial | 782 | 782 | 91% | 0.0 | 96.05% | KR149223.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Cephaloscyllium silasi voucher NBFGR:CHN CS87 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, mitochondrial | 782 | 782 | 91% | 0.0 | 96.05% | KR149222.1 |

Εικόνα 29: Αποτελέσματα ταυτοποίησης της αλληλουχίας του πρώτου δείγματος στο πρόγραμμα BLAST, για το γονίδιο 16S rRNA.

Μεταξύ των 74 δειγμάτων αποκαλύφθηκαν 12 διαφορετικοί απλότυποι για το γονίδιο 16S rRNA. Συγκεκριμένα, στα 33 άτομα του γένους *Mustelus* και στα 13 άτομα του γένους *Squalus* βρέθηκαν από 3 διαφορετικοί απλότυποι αντίστοιχα, ενώ στα υπόλοιπα άτομα που αναλύθηκαν βρέθηκε ένας απλότυπος σε κάθε γένος (*Scyliorhinus*, *Hexanchus*, *Prionace*, *Galeorhinus*, *Heptranchias*, *Centrophorus*) (Εικόνα 30, Παράρτημα II). Στην Εικόνα 30 φαίνονται οι ακολουθίες των 12 απλοτύπων, καθώς και το γένος στο οποίο αντιστοιχούν. Οι ακολουθίες είναι στοιχισμένες και οι τελείες δείχνουν τα κοινά νουκλεοτίδια.



| | | | | | | | | |
|----------------|--|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|----------------------|----------|-----|
| | | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 |
| Mustelus 1 | | CATTAGACGAGAAGACCC | TATGGAGCCTTCAAACAC | TTAAGTTAATT-ATGTA | ACCATT | TTTATT | -CCTCAGG | |
| Mustelus 2 | | |T..... | | |T..... | | |
| Mustelus 3 | | |T..... | | | | | |
| Scyliorhinus 1 | | ..A..... |T..A..A.. | | | CAT...A..AAT..C.. | | |
| Squalus 1 | | | | | A..C.. | ..AAT..A..A.C..A.G.. | | |
| Squalus 2 | | | | | | ..AAT..A..A.C..A.G.. | | |
| Squalus 3 | | | | | | ..AAT..A..A.C..A.G.. | | |
| Hexanchus 1 | | | | | C.....T..... | ..AATA.....T..CAT.. | | |
| Prionace 1 | | | | |A..... |CC...-T.C.. | | |
| Galeorhinus 1 | | | | | A.T.A..... | ..TT...A.GC...T.. | | |
| Heptranchias 1 | | | | |C.....T..... | ..AATA...A.T..CAT.. | | |
| Centrophorus 1 | | | | |A..... | ..AAT..A..ACC..CAG.. | | |

| | | | | | | | | |
|----------------|--|---------------------|----------------------|-----------------|------------|--------------|--------|-----|
| | | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 |
| Mustelus 1 | | GTATAAACA-AAGTATACA | ATACTTCTAACCTAAC | TGTTTTGGTTGGGGT | GACCGAGGGG | AAAA | CAAA | |
| Mustelus 2 | | ..T...A.T..AA..... | |T..... | | | | |
| Mustelus 3 | | |A.....T..... | | | | | |
| Scyliorhinus 1 | | AC..... | ..AA..T..... | TT.....A..... | | A.....A..... | TG.. | |
| Squalus 1 | | A..A..T..-TT..... | T.C..TT..... | | | | GA.. | |
| Squalus 2 | | AG..A..T..-TT..... | T.C..TT..... | | | | G.. | |
| Squalus 3 | | AG..A..T..-TT..... | T.C..TT..... | | | A..... | G.. | |
| Hexanchus 1 | | | -TT.....TC..... | T.....C..... | | A..A..G..G.. | | |
| Prionace 1 | | AA..... | ..A.....C..... | TT..... | | A.....A..... | | |
| Galeorhinus 1 | | .A..... | ..A.....T.....T..... | -T.....T..... | | | A..... | |
| Heptranchias 1 | | | -TT.....T.....T..... | T.....C..... | | A.....A..... | A..... | |
| Centrophorus 1 | | .A..A..T..-TTC.. | T.....T.C..... | TT..... | | | GA.. | |

| | | | | | | | | |
|----------------|--|--------------------|----------------------|-----------------|------------------|--------------|--------------|--------|
| | | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 |
| Mustelus 1 | | TCCCCCTCATCGATTGAG | TACTCAG-TACTT | GAAAATTAGAA | TAAACAATTCTGAT | TTAATAAAAT | ATTTAT | |
| Mustelus 2 | | | | |C..... | | | |
| Mustelus 3 | | | | | | | | |
| Scyliorhinus 1 | |T..... | CC.....T.....AA..... | A..G.....T..... |A.CCG..... | AT..... | | |
| Squalus 1 | |T..... | |A..G..... | CG..G..A..C..... | C.....C..... | C..... | |
| Squalus 2 | |T..... | |A..... | CG..G..A..... | C..... | C..... | |
| Squalus 3 | |T..... | |A..... | CG..G..A..... | C..... | C..... | |
| Hexanchus 1 | | G..T..T..... | C.....T.T.A..... | A.....A..... | | A.....C..... | | |
| Prionace 1 | | | | A..... | A..... | G..... | A.....C..... | C..... |
| Galeorhinus 1 | | | C..... | | | A..G..G..... | | |
| Heptranchias 1 | | G..T..T..... | C.....T.T.A..... | A.....A..... | | A.....C..... | | |
| Centrophorus 1 | | | T.....C..... | A..... | A..... | CG..G..... | C.....C..... | |

| | | | | | | | | |
|----------------|--|-------------------|-----------------|----------------|--------------|-------------|--------|--------|
| | | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| Mustelus 1 | | CGAAAAATGACCCAGGA | -TTT-CCTGAT | CAATGAACCAAGTT | ACCCTAGGGATA | AACAGCGCAAT | CCTTTC | |
| Mustelus 2 | | | | | | | | |
| Mustelus 3 | | | | | | | | |
| Scyliorhinus 1 | | | |T..... | | | | T..... |
| Squalus 1 | | | ..A.T..TT..... | | | | | |
| Squalus 2 | | | ..A.T.C.TT..... | | | | | |
| Squalus 3 | | | ..A.T.C.TT..... | | | | | |
| Hexanchus 1 | | | ..A..AAT..... | | | | | |
| Prionace 1 | | | ..T..... | | | | | |
| Galeorhinus 1 | | | ..A.....-T..... | | | | | |
| Heptranchias 1 | | | ..A..AAT..... | | | | | |
| Centrophorus 1 | | | ..A..TT..... | | | | | |

| | | | | | | | | | | |
|----------------|--|------------|------------------|--------------|---------------|--------------|-----------------|--------------|-------|-----|
| | | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | 510 |
| Mustelus 1 | | TCAGAGTTCC | TATCGAAGAAAGGGTT | TACGACCTCGAT | TGGATCAGGACAT | CCTAATGGTGCA | ACCGCTATTAAGGGT | TTCGTTTGTCAA | | |
| Mustelus 2 | | | | | | | | | | |
| Mustelus 3 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus 1 | | |CA..... | | | | | | | |
| Squalus 1 | | C..... | | | | | | | | |
| Squalus 2 | | C..... | | | | | | | | |
| Squalus 3 | | C..... | | | | | | | | |
| Hexanchus 1 | | CT..... | | | | | | | | |
| Prionace 1 | | | | | | | | | | |
| Galeorhinus 1 | | A..... | | | | | | | | |
| Heptranchias 1 | | C..... | | | | | | | | |
| Centrophorus 1 | | C..... | | | | | | | | |

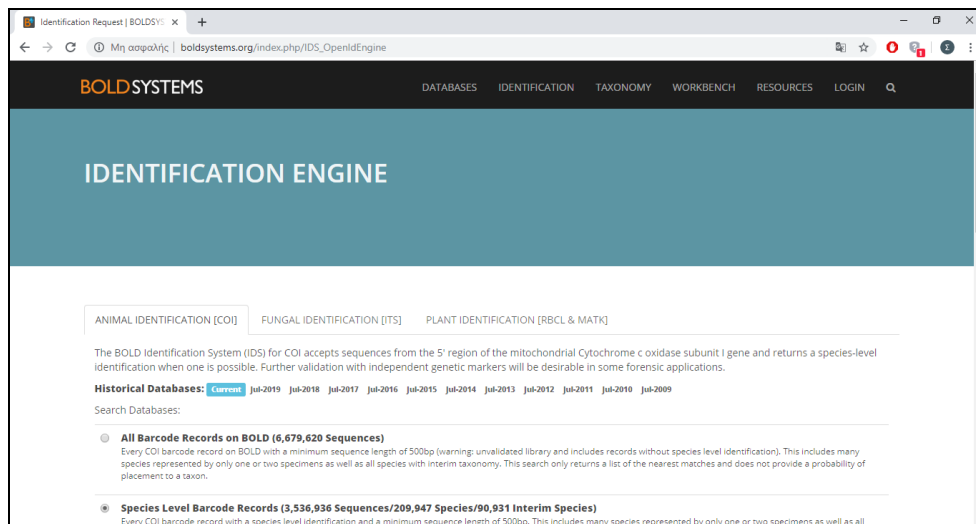
Εικόνα 30: Στοιχισμός των ακολουθιών των 12 απλοτύπων για το γονίδιο 16S rRNA.

Για το γονίδιο COI αλληλουχήθηκαν, κατά μέσο όρο, 624 ζεύγη βάσεων, και αφού επεξεργάστηκαν και διορθώθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit v7.2.6 (Hall, 1999), αναλύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση δύο διαφορετικών βάσεων δεδομένων. Στην Εικόνα 31 φαίνονται τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης με το εργαλείο BLAST (blastn), στη βάση δεδομένων GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), για το πρώτο δείγμα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω.

| Sequences producing significant alignments | | | | | | | Download | Manage Columns | Show | 100 | ? | |
|---|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|----------------|--------------------------|-----|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected | | | | | | | GenBank | Graphics | Distance tree of results | | | |
| | Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Scyllorhinus canicula voucher SE42-2 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial | 1151 | 1151 | 100% | 0.0 | 100.00% | JN641231.1 | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Scyllorhinus canicula voucher SE43-4 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial | 1151 | 1151 | 100% | 0.0 | 100.00% | JN641230.1 | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Scyllorhinus canicula voucher SE49-4 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial | 1151 | 1151 | 100% | 0.0 | 100.00% | JN641224.1 | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Scyllorhinus canicula isolate 2 cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial | 1151 | 1151 | 100% | 0.0 | 100.00% | HQ603884.1 | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Scyllorhinus canicula voucher SE35-4 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial | 1146 | 1146 | 100% | 0.0 | 99.84% | JN641237.1 | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Scyllorhinus canicula voucher SE44-3 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial | 1146 | 1146 | 100% | 0.0 | 99.84% | JN641229.1 | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Scyllorhinus canicula voucher SE46-2 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial | 1146 | 1146 | 100% | 0.0 | 99.84% | JN641227.1 | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Scyllorhinus canicula voucher SE51-4 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial | 1146 | 1146 | 100% | 0.0 | 99.84% | JN641222.1 | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Scyllorhinus canicula voucher 1366 cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial | 1142 | 1142 | 99% | 0.0 | 100.00% | KY176625.1 | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Scyllorhinus canicula voucher SE29-4 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial | 1140 | 1140 | 100% | 0.0 | 99.68% | JN641243.1 | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Scyllorhinus canicula voucher SE32-3 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial | 1140 | 1140 | 100% | 0.0 | 99.68% | JN641240.1 | | | | | |

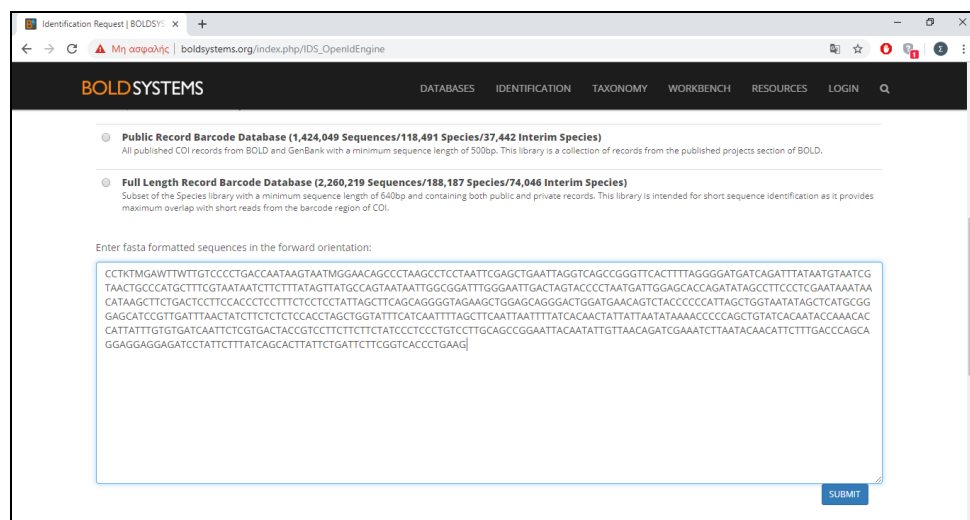
Εικόνα 31: Αποτελέσματα ταυτοποίησης της αλληλουχίας του πρώτου δείγματος στο πρόγραμμα BLAST, για το γονίδιο COI.

Η δεύτερη βάση η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των αλληλουχιών του γονιδίου COI είναι η Barcode of Life Data Systems (BOLD, http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine), με τη χρήση του εργαλείου Identification System (ID's). Στην Εικόνα 32 φαίνεται το περιβάλλον το οποίο εμφανίζεται με την εισαγωγή της παραπάνω διεύθυνσης στον περιηγητή.



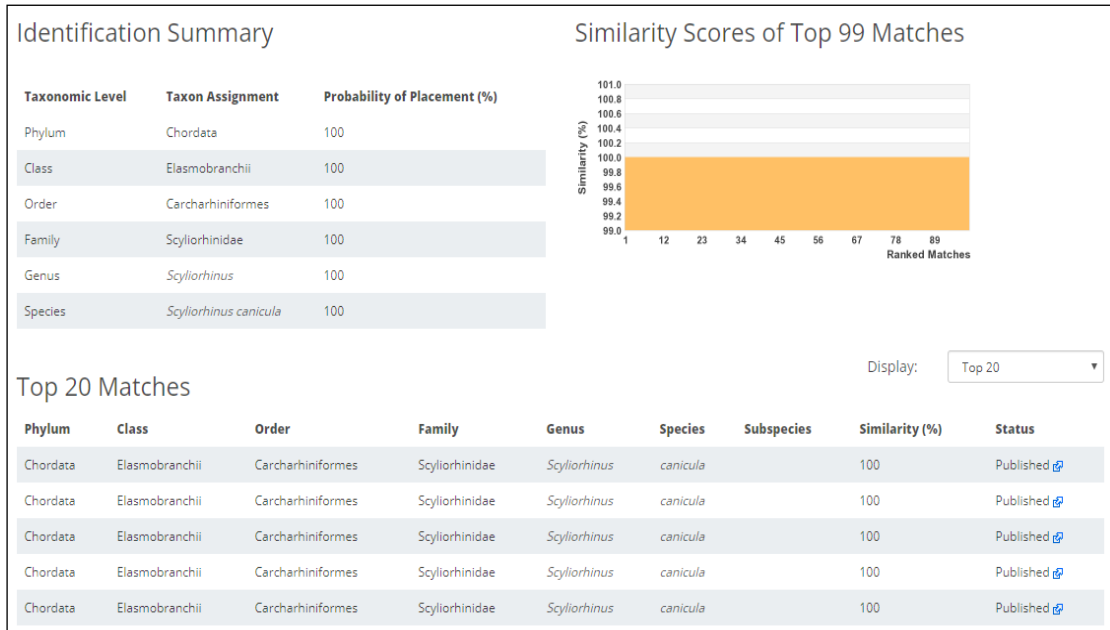
Εικόνα 32: Αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων BOLD.

Στο πλαίσιο που εμφανίζεται στο κάτω μέρος της σελίδας τοποθετείται η αλληλουχία προς ταυτοποίηση και επιλέγεται το κουμπί SUBMIT (Εικόνα 33).



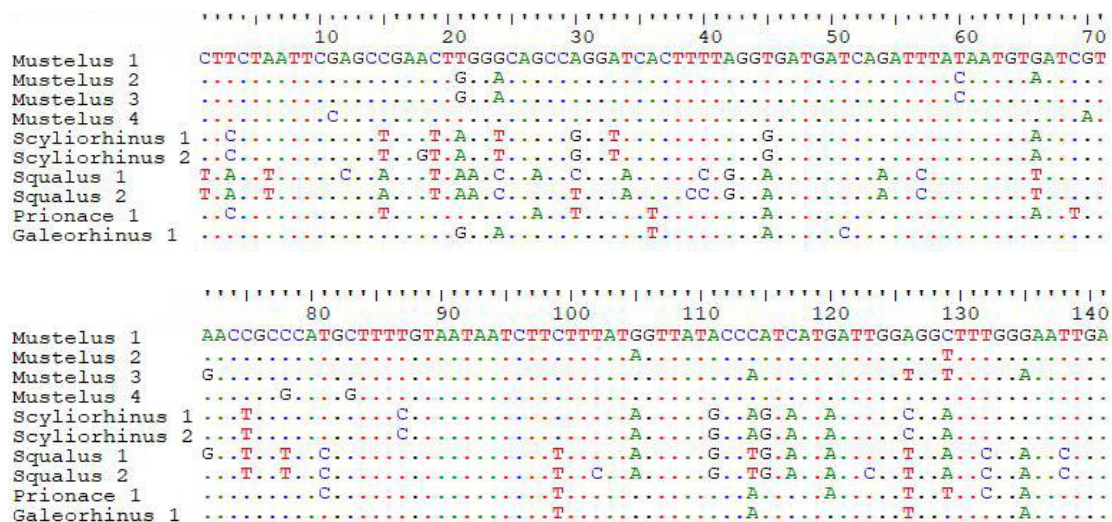
Εικόνα 33: Εισαγωγή της αλληλουχίας

Τέλος, στην Εικόνα 34 φαίνονται τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης με το εργαλείο Identification System (ID's) της βάσης δεδομένων Barcode of Life Data Systems (BOLD, http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine), για το πρώτο δείγμα. Το δείγμα αυτό ανήκει στο είδος *Scyliorhinus canicula* με ομοιότητα 100%, σύμφωνα και με τις δύο βάσεις δεδομένων.



Εικόνα 34: Αποτελέσματα ταυτοποίησης της αλληλουχίας του πρώτου δείγματος στη βάση δεδομένων BOLD, για το γονίδιο COI.

Μεταξύ των 74 δειγμάτων αποκαλύφθηκαν 10 διαφορετικοί απλότυποι για το γονίδιο COI. Συγκεκριμένα, στα 33 άτομα του γένους *Mustelus* βρέθηκαν 4 διαφορετικοί απλότυποι, στα 19 άτομα του γένους *Scyliorhinus* βρέθηκαν 2 διαφορετικοί απλότυποι και στα 13 άτομα του γένους *Squalus* βρέθηκαν 2 διαφορετικοί απλότυποι. Στα υπόλοιπα άτομα που αναλύθηκαν βρέθηκε ένας απλότυπος σε κάθε γένος (*Prionace*, *Galeorhinus*) (Εικόνα 35, Παράρτημα III). Στην Εικόνα 35 φαίνονται οι ακολουθίες των 10 απλοτύπων καθώς και το γένος στο οποίο αντιστοιχούν. Οι ακολουθίες είναι στοιχισμένες και οι τελείες δείχνουν τα κοινά νουκλεοτίδια.



```

      150      160      170      180      190      200      210
Mustelus 1  CTGGTCCCCCTTGATAATTGGTGCTCCAGATATAGCTTTCCACCGTATGAATAACATAAAGCTTTTGACTCC
Mustelus 2  .....T.....A.....A.....G.....G.....A.....G.....C.....T.....
Mustelus 3  .....A.....A.....A.....G.....T.....A.....G.....C.....A.....
Mustelus 4  .....A.....A.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....
Scyliorhinus 1  .A.A..C.A.G...A.A...C...T.A.A...C...C...
Scyliorhinus 2  .A.A..C.A.G...A.A...C...T.A.A...C...C...
Squalus 1   T..G..A...C.C.A...G...T..A.A...T...AT
Squalus 2   T.A.A.T.A...A...C...T..G.A...T...T.GT
Prionace 1  .A.T.T.A.G...A.A...C...A.A...C...T...
Galeorhinus 1 .A.T.A.A...G..T...C...G..A...C...T...

      220      230      240      250      260      270      280
Mustelus 1  TCCCGCCATCATTCCTTCTCCTTGCTTCTGCAGGAGTGGGAAGCCGGTGCAGGTACCCGGCTGAACAGT
Mustelus 2  .T.T.....T.....A.....G.....T.....T.....C...
Mustelus 3  .T.A.....T.....C.....C.....T.....G.A.G...T.T...
Mustelus 4  .....A.....A.....G.....T.....G.....T.....A.....
Scyliorhinus 1  .T.A.C.C.T.C.C.AT.A...A...G.A...T.A...G.T.A...
Scyliorhinus 2  .T.A.C.C.T.C.C.AT.A...A...G.A...T.G...G.T.A...
Squalus 1   .A.C.C.CC...AT.A.TT.A.C.A..T.T.G.A.A.C.A...
Squalus 2   .G.C.C.CC...G.A.T.A.C...T.T.A...A.A.C.A...
Prionace 1  .T.A.....T.....C...C...T...T...A...T...T...
Galeorhinus 1 .T.....A...C...A...T...A...C...T...T...

      290      300      310      320      330      340      350
Mustelus 1  ATATCCACCCTAGCTAGCAATCTAGCCCATGCTGGACCATCTGTTGATTTAGCCATCTTCTCCCTTCAT
Mustelus 2  G.....T.....A.....T.....T.....G.....C.....T.....A.....
Mustelus 3  T..C.....A.....T.....T.....G.....C.....T.....
Mustelus 4  .....A.....A.....G.....T.....G.....T.....A.....
Scyliorhinus 1  C..C..C..T...G.T..A...T...G..G...C...A.T...T..C..C
Scyliorhinus 2  C..C..C..T...CG.T..A...T...G..G...C...A.T...T..C..C
Squalus 1   C..C..C..T...AG.T..CA...A...CG...A..C...A..C..
Squalus 2   T..C..C..G...AG.T..A...CG...C..A..CC.G...A..C..
Prionace 1  T.....T...T...C...A...A...G...A...T...T...C...
Galeorhinus 1 .....T.....A...T.....G...A...T...T...C...

      360      370      380      390      400      410      420
Mustelus 1  TTAGCCGGTATTTTCATCAATCTTAGCCCTCAATTAACCTTTATTACAACCATTTATTAATATAAAACCACAG
Mustelus 2  .....A.....T.....T.....G.....
Mustelus 3  .....C.....T.....
Mustelus 4  .....A.....A.....G.....T.....G.....T.....A.....
Scyliorhinus 1  C..T...T...T...T...C...T...C...
Scyliorhinus 2  C..T...T...T...T...C...T...C...
Squalus 1   ...T...C...T...T...T...C...T...C...T...T...
Squalus 2   ...T...C...T...T...T...C...T...C...T...T...
Prionace 1  ...T...T...T...T...C...A...C...AG...
Galeorhinus 1 .....C...C...T...T...C...C...

      430      440      450      460      470      480      490
Mustelus 1  CCATTTCCCAATATCAACGCCATTATTTGTTTGATCAATTCCTCGTAACTACTGTTCTTCTTCTCTCTC
Mustelus 2  .....A.....T.....A.....C.....C.....
Mustelus 3  .....A.....C.....T.....C.....C.....
Mustelus 4  .....A.....A.....G.....C.....C.....A.....
Scyliorhinus 1  .TG.A.A..C...A...G...G...C..C...A...
Scyliorhinus 2  .TG.A.A..C...A...G...G...C..C...A...
Squalus 1   ...T..G...A..C.C...C...T...C..CA...T...
Squalus 2   ...C..T..G...A..C.C...C..C..T...C..C...T...
Prionace 1  ...A...A...T...T...C..A...C..AG...
Galeorhinus 1 .T.....A...T...T...A...C...

      500      510      520      530      540      550      560
Mustelus 1  CCTGCCAGTCTTGCAGCAGGTATTACAATATTACTCACAGACCGAAACCTTAATACCACATTCTTTGAC
Mustelus 2  ...T.....A.....T.....T.....C...T.....C...
Mustelus 3  ...T.....G.....T.....T.....C...T.....
Mustelus 4  .....A.....A.....G.....T.....T.....A.....
Scyliorhinus 1  ...C..T..C...C..A...GT.A...T...T...A...
Scyliorhinus 2  ...C..T..C...C..A...GT.A...T...T...A...
Squalus 1   T..T..T...C...C..CA...G..C..T.A..T...T..T.A..C..A...T...
Squalus 2   ...C..T..C...C..CA...G..C..T.A..T...T..T.A..C..A...T...
Prionace 1  A..T..G...C..CA...G..C..T.A..T...T..T.A..C..A...T...
Galeorhinus 1 T..C...C...A..C...T...T...T...T...T...

```

Εικόνα 35: Στοιχισμός των ακολουθιών των 12 απλοτύπων για το γονίδιο COI.

4.5 Αποτελέσματα ταυτοποίησης

Στον Πίνακα 1 φαίνονται τα αποτελέσματα ταυτοποίησης όλων των δειγμάτων, καθώς και οι χρήσιμες πληροφορίες για τα δείγματα. Συγκεκριμένα, στον πίνακα για κάθε δείγμα δίνονται: η πόλη από την οποία προέρχεται (ΚΟ: Κομοτηνή, ΚΑ: Καβάλα, ΑΘ: Αθήνα, ΘΕ: Θεσσαλονίκη), ο τύπος της αγοράς (ΙΧ: Ιχθυοπωλείο, ΛΑ: Λαϊκή Αγορά), η τιμή, η ταυτοποίηση του δείγματος σε επίπεδο είδους στις βάσεις δεδομένων GenBank και BOLD, το αποτέλεσμα για τη νοθεία, η κατηγορία του στη λίστα IUCN, οι νομοθεσίες που το προστατεύουν, και η οικογένεια στην οποία ανήκει.

Πίνακας 1: Αποτελέσματα αναλύσεων για όλα τα δείγματα. ΚΟ: Κομοτηνή, ΚΑ: Καβάλα, ΑΘ: Αθήνα, ΘΕ: Θεσσαλονίκη, ΙΧ: Ιχθυοπωλείο, ΛΑ: Λαϊκή Αγορά, DD:Data Deficient, LC: Least Concern, VU: Vulnerable, EN: Endangered, CR: Critically Endangered.

| A/A | Πόλη | Αγορά | Τιμή (€) | Ταυτοποίηση στη GenBank | | Ταυτοποίηση στη BOLD | Νοθεία | Λίστα IUCN | Νομοθεσία | Οικογένεια |
|-----|------|-------|----------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------|------------|---|----------------|
| | | | | 16S rRNA | COI | COI | | | | |
| 1 | ΚΟ | ΙΧ | - | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Ναι | LC | - | Scyliorhinidae |
| 2 | ΚΟ | ΙΧ | 17 | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 3 | ΚΟ | ΙΧ | 14 | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 4 | ΚΑ | ΙΧ | 10 | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Ναι | LC | - | Scyliorhinidae |
| 5 | ΚΟ | ΙΧ | - | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 99% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Ναι | LC | - | Scyliorhinidae |
| 6 | ΚΑ | ΙΧ | 10 | - | - | - | | | - | |
| 7 | ΚΑ | ΙΧ | - | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 8 | ΚΑ | ΙΧ | - | - | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Ναι | LC | - | Scyliorhinidae |
| 9 | ΚΟ | ΙΧ | 10 | - | <i>Scyliorhinus canicula</i> 99% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Ναι | LC | - | Scyliorhinidae |
| 10 | ΚΑ | ΙΧ | - | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Ναι | LC | - | Scyliorhinidae |
| 11 | ΚΑ | ΙΧ | 10 | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 99% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Ναι | LC | - | Scyliorhinidae |
| 12 | ΚΑ | ΙΧ | 6,8 | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Ναι | LC | - | Scyliorhinidae |
| 13 | ΚΑ | ΙΧ | 18 | <i>Mustelus manazo</i> 99% | <i>Mustelus punctulatus</i> 100% | <i>Mustelus punctulatus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 14 | ΚΑ | ΙΧ | 9 | <i>Squalus acanthias</i> 100% | <i>Squalus acanthias</i> 100% | <i>Squalus acanthias</i> 100% | Ναι | EN | CMS: Appendix II / BCN Conv.: Annex III / Κανονισμός (ΕΕ) | Squalidae |

| | | | | | | | | | 127/2017 | |
|----|----|----|------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|----|----------------------|----------------|
| 15 | KA | IX | 9 | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 99% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 99,83% | Nal | LC | - | Scyliorhinidae |
| 16 | KA | IX | 9 | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 99% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Nal | LC | - | Scyliorhinidae |
| 17 | KA | IX | - | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus asterias</i> 100% | <i>Mustelus asterias</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 18 | KA | IX | - | <i>Mustelus asterias</i> 100% | <i>Mustelus asterias</i> 100% | <i>Mustelus asterias</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 19 | KA | IX | 9 | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Nal | LC | - | Scyliorhinidae |
| 20 | KA | IX | 15 | <i>Centrophorus sp.</i> 99% | - | - | Nal | CR | BCN Conv.: Annex III | Centrophoridae |
| 21 | KA | IX | 18 | <i>Mustelus manazo</i> 99% | <i>Mustelus punctulatus</i> 100% | <i>Mustelus punctulatus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 22 | KA | IX | 9 | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Nal | LC | - | Scyliorhinidae |
| 23 | KO | IX | - | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Nal | LC | - | Scyliorhinidae |
| 24 | KA | IX | 9 | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 25 | KA | IX | 9 | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Nal | LC | - | Scyliorhinidae |
| 26 | KO | IX | 15,5 | <i>Squalus cubensis</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 100% | <i>Squalus blainville</i> 100% | Nal | DD | - | Squalidae |
| 27 | KA | IX | 11,8 | <i>Squalus cubensis</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 100% | <i>Squalus blainville</i> 99,84% | Nal | DD | - | Squalidae |
| 28 | KA | IX | 9 | <i>Squalus cubensis</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 99,84% | Nal | DD | - | Squalidae |
| 29 | KA | IX | 18 | <i>Mustelus asterias</i> 100% | <i>Mustelus asterias</i> 100% | <i>Mustelus asterias</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 30 | KA | IX | 10 | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Nal | LC | - | Scyliorhinidae |

| | | | | | | | | | | |
|----|----|----|-----|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------|----|----------------------|----------------|
| 31 | KA | IX | - | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 32 | KA | IX | 8,8 | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 99% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Ναι | LC | - | Scyliorhinidae |
| 33 | KA | IX | - | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 34 | KA | IX | - | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 35 | KA | IX | - | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 36 | KO | IX | 18 | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 37 | KA | IX | - | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 38 | KA | IX | 18 | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 39 | AΘ | IX | - | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 40 | AΘ | IX | - | <i>Squalus cubensis</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 100% | Ναι | DD | - | Squalidae |
| 41 | AΘ | IX | - | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 42 | AΘ | ΛΑ | - | <i>Squalus cubensis</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 100% | Ναι | DD | - | Squalidae |
| 43 | AΘ | IX | - | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 44 | AΘ | ΛΑ | - | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Ναι | LC | - | Scyliorhinidae |
| 45 | AΘ | ΛΑ | - | <i>Squalus cubensis</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 100% | Ναι | DD | - | Squalidae |
| 46 | AΘ | ΛΑ | - | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 47 | AΘ | ΛΑ | - | <i>Squalus cubensis</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 100% | <i>Squalus blainville</i> 100% | Ναι | DD | - | Squalidae |
| 48 | AΘ | IX | - | <i>Squalus cubensis</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 100% | <i>Squalus blainville</i> 100% | Ναι | DD | - | Squalidae |

| | | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------|----|---|----------------|
| 49 | AΘ | IX | - | <i>Hexanchus griseus</i> 100% | - | - | Ναι | LC | π.δ. 67/1981 (ΦΕΚ 23Α) | Hexanchidae |
| 50 | AΘ | ΛΑ | - | <i>Prionace glauca</i> 100% | <i>Prionace glauca</i> 99% | <i>Prionace glauca</i> 99,67% | Ναι | CR | BCN Conv.: Annex III | Carcharhinidae |
| 51 | AΘ | IX | - | <i>Heptranchias perlo</i> 100% | - | - | Ναι | DD | BCN Conv.: Annex III / π.δ. 67/1981 (ΦΕΚ 23Α) | Hexanchidae |
| 52 | AΘ | IX | - | <i>Hexanchus griseus</i> 100% | - | - | Ναι | LC | π.δ. 67/1981 (ΦΕΚ 23Α) | Hexanchidae |
| 53 | AΘ | ΛΑ | - | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Ναι | LC | - | Scyliorhinidae |
| 54 | AΘ | ΛΑ | - | <i>Squalus cubensis</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 100% | <i>Squalus blainville</i> 100% | Ναι | DD | - | Squalidae |
| 55 | AΘ | ΛΑ | - | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 56 | AΘ | ΛΑ | - | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 57 | AΘ | ΛΑ | - | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | <i>Scyliorhinus canicula</i> 100% | Ναι | LC | - | Scyliorhinidae |
| 58 | AΘ | ΛΑ | - | <i>Squalus cubensis</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 100% | Ναι | DD | - | Squalidae |
| 59 | ΘΕ | IX | 18 | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 60 | ΘΕ | IX | 18 | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 61 | ΘΕ | ΛΑ | 10 | <i>Squalus cubensis</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 100% | <i>Squalus blainville</i> 100% | Ναι | DD | - | Squalidae |
| 62 | ΘΕ | ΛΑ | 10 | <i>Squalus cubensis</i> 99% | <i>Squalus blainville</i> 100% | <i>Squalus blainville</i> 100% | Ναι | DD | - | Squalidae |
| 63 | ΘΕ | ΛΑ | 8 | <i>Prionace glauca</i> 100% | <i>Prionace glauca</i> 100% | <i>Prionace glauca</i> 100% | Ναι | CR | BCN Conv.: Annex III | Carcharhinidae |
| 64 | ΘΕ | ΛΑ | 8 | <i>Prionace glauca</i> 100% | <i>Prionace glauca</i> 100% | <i>Prionace glauca</i> 100% | Ναι | CR | BCN Conv.: Annex III | Carcharhinidae |

| | | | | | | | | | | |
|----|----|----|------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------|----|---|-----------|
| 65 | ΘΕ | ΙΧ | 18 | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 66 | ΘΕ | ΙΧ | 18 | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 99,12% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 67 | ΘΕ | ΙΧ | 14,9 | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 68 | ΘΕ | ΙΧ | 14,9 | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 69 | ΘΕ | ΙΧ | - | <i>Mustelus henlei</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 70 | ΘΕ | ΛΑ | 12 | <i>Mustelus griseus</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 71 | ΘΕ | ΛΑ | 12 | <i>Mustelus griseus</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | <i>Mustelus mustelus</i> 100% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 72 | ΘΕ | ΙΧ | - | <i>Galeorhinus galeus</i> 99% | <i>Galeorhinus galeus</i> 100% | <i>Galeorhinus galeus</i> 100% | Ναι | VU | BCN Conv.: Annex II / Κανονισμός (ΕΕ) 2102/2015 | Triakidae |
| 73 | ΘΕ | ΙΧ | - | <i>Mustelus griseus</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 99,68% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |
| 74 | ΘΕ | ΙΧ | - | <i>Mustelus griseus</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 99% | <i>Mustelus mustelus</i> 99,84% | Όχι | VU | BCN Conv.: Annex III | Triakidae |

Από τα 74 δείγματα που εξετάστηκαν, τα 73 αναλύθηκαν επιτυχώς, ενώ ένα (δείγμα 6) δεν κατάφερε να ενισχυθεί παρόλες τις προσπάθειες. Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 1, τουλάχιστον μία ακολουθία καλής ποιότητας (COI ή 16S rRNA) ελήφθη και για τα 73 δείγματα. Οι ακολουθίες στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν με υψηλό ποσοστό ομοιότητας ($\geq 99\%$).

Συνολικά βρέθηκαν 9 είδη από 8 διαφορετικά γένη (*Scyliorhinus*, *Mustelus*, *Squalus*, *Prionace*, *Galeorhinus*, *Hexanchus*, *Heptranchias*, *Centrophorus*) που ανήκαν σε 6 οικογένειες (Carcharhinidae, Centrophoridae, Hexanchidae, Scyliorhinidae, Squalidae, Triakidae). Το δείγμα 20 ταυτοποιήθηκε μόνο σε επίπεδο γένους (*Centrophorus*).

Τα 40 από τα 73 δείγματα που ταυτοποιήθηκαν, βρέθηκαν να έχουν εσφαλμένη επισήμανση, με αποτέλεσμα η νοθεία να ανέρχεται σε ποσοστό 54,79%. Το υψηλότερο ποσοστό νοθείας εντοπίστηκε στην Καβάλα (40%), ακολουθούμενο από την Αθήνα (35%), ενώ στη Θεσσαλονίκη και στην Κομοτηνή παρατηρήθηκε ίδιο ποσοστό νοθείας (12,5%). Επιπλέον, 42 δείγματα (57,53%) περιλαμβάνονται σε κάποια διεθνή ή εθνική νομοθεσία (Παράρτημα II της CITES, Σύμβαση της Βαρκελώνης: Παράρτημα II, Κανονισμός 127/2017 της ΕΕ, Υπουργική Διάταξη 67/1981 (ΦΕΚ 23Α)), ενώ 39 δείγματα (53,42%) βρίσκονται στην κόκκινη λίστα των απειλούμενων ειδών της Διεθνούς Ένωσης Προστασίας της Φύσης IUCN (IUCN Red List of Threatened Species).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η εσφαλμένη επισήμανση σε αλιεύματα που πωλούνται με την εμπορική ονομασία «γαλέος». Στην Ελλάδα, μόνο τα είδη *M. mustelus*, *M. punctulatus* και *M. asterias* αντιπροσωπεύουν το σωστό και νόμιμο χαρακτηρισμό των προϊόντων που πωλούνται υπό την ονομασία αυτή (ΦΕΚ 475 / Τεύχος Β ' / 27-3-2015, αριθ. 1750/32219 της ΕΕ 1379/2013). Λόγω του ότι τα αλιεύματα αυτά πωλούνται συνήθως σε φιλέτα, και έχουν απομακρυνθεί όλα τα εξωτερικά χαρακτηριστικά του οργανισμού από τον οποίο προέρχονται, είναι σχεδόν αδύνατο να ταυτοποιηθούν μορφολογικά, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εύκολη παραπλάνηση των καταναλωτών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές ανάλυσης DNA (DNA barcoding), με τη χρήση δύο γενετικών δεικτών (16S rRNA και COI), οι οποίοι βοήθησαν στην ταυτοποίηση όλων των δειγμάτων σε επίπεδο είδους, εκτός από την περίπτωση του *Centrophorus sp.*

Συνολικά συλλέχθηκαν 74 δείγματα από τέσσερις διαφορετικές πόλεις της Ελλάδας (Αθήνα, Θεσσαλονίκη, Καβάλα, Κομοτηνή). Από τα 74 δείγματα ελασμοβραγκίων, τα 73 αναλύθηκαν με επιτυχία, όπου και φάνηκε η αποτελεσματικότητα της μεθόδου DNA barcoding σε τέτοιου είδους φιλέτα, όπως έχει αποδειχθεί μέχρι τώρα από προηγούμενες μελέτες σε πολλά θαλάσσια είδη (Barbuto et al., 2010; Griffiths et al., 2013; Helyar et al., 2014; Mariani et al., 2015; Pazartzi et al., 2019). Η μέθοδος του DNA barcoding εφαρμόζεται πλέον ευρέως για την ταυτοποίηση αλιευμάτων (Griffiths et al., 2014), καθώς μπορεί και προσδιορίζει προϊόντα τα οποία είναι δύσκολο να αναγνωριστούν λόγω της έλλειψης των μορφολογικών χαρακτηριστικών. Στο μέλλον αυτές οι τεχνικές θα μπορούσαν να συμβάλλουν στον περιορισμό της εμπορίας παράνομων, λαθραίων και μη ρυθμισμένων (ΙΥ) αλιευτικών προϊόντων, σύμφωνα με τα δεδομένα της Ανατολικής Μεσογείου.

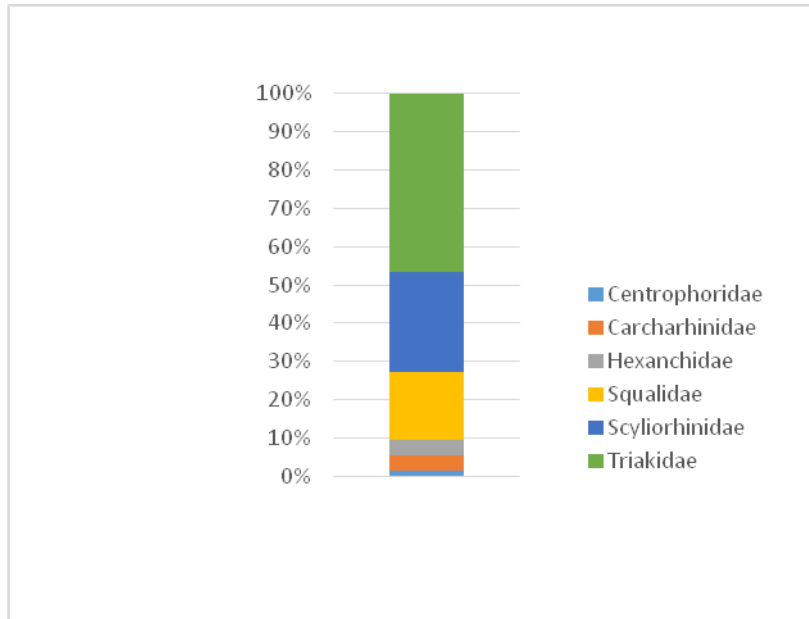
Το γονίδιο COI έχει χρησιμοποιηθεί από τους Armani et al. (2017) για τον προσδιορισμό της λανθασμένης επισήμανσης σε θαλάσσια προϊόντα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παρασκευή σουσι. Το συγκεκριμένο γονίδιο αποτέλεσε την πρώτη επιλογή, και αποδείχθηκε αρκετά χρήσιμο για τους σκοπούς της εν λόγω μελέτης, όπου φάνηκε χαμηλό ποσοστό εσφαλμένης επισήμανσης (3,4%).

Οι Guardone et al. (2017) με τη χρήση των μιτοχονδριακών γονιδίων 16S rRNA και COI, ταυτοποίησαν διάφορα προϊόντα βασισμένα σε κεφαλόποδα, καρκινοειδή και λευκά ψάρια, τα οποία προέρχονται κυρίως από την Ασία και την Αφρική. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι κατηγορίες που εξετάστηκαν, εκτός από το λευκό ψάρι, έχουν υψηλά ποσοστά λανθασμένης επισήμανσης, με τα κεφαλόποδα να έχουν το υψηλότερο ποσοστό (43,8%).

Επιπλέον, 97 δείγματα θαλάσσιων προϊόντων, επεξεργασμένων και μη, εξέτασαν οι Tinacci et al. (2018) στην αγορά της Βουλγαρίας. Από την ταυτοποίηση των δειγμάτων που πραγματοποιήθηκε με το γονίδιο COI, φάνηκε ότι για το 19,3% των προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν μη έγκυρα επιστημονικά ονόματα. Από το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται η μη αποτελεσματική εφαρμογή της Ευρωπαϊκής νομοθεσίας, σχετικά με την ιχνηλασιμότητα και την επισήμανση των τροφίμων στη συγκεκριμένη χώρα.

Στη συγκεκριμένη εργασία, ενισχύθηκε τουλάχιστον μία ακολουθία καλής ποιότητας για τα 73 δείγματα, είτε με το γονίδιο COI είτε με το γονίδιο 16S rRNA. Συνολικά, ενισχύθηκαν 140 ακολουθίες, από τις οποίες οι 69 ανήκουν στο γονίδιο COI και οι 71 στο γονίδιο 16S rRNA. Τα μήκη των ακολουθιών για το γονίδιο COI κυμάνθηκαν μεταξύ 601 και 640 ζεύγη βάσεων με μέσο μήκος τις 624 βάσεις, ενώ για το γονίδιο 16S rRNA κυμάνθηκαν μεταξύ 510 και 559 ζεύγη βάσεων με μέσο μήκος τις 544 βάσεις. Υπήρξαν 2 δείγματα στα οποία ενισχύθηκε μόνο το γονίδιο COI (8, 9) και 4 δείγματα (20, 49, 51, 52) στα οποία ενισχύθηκε μόνο το γονίδιο 16S rRNA. Στο δείγμα 6 δεν ενισχύθηκε κανένα από τα δύο γονίδια. Τα 3 από τα 4 δείγματα τα οποία ταυτοποιήθηκαν μόνο με το γονίδιο 16S rRNA, ανήκουν στην οικογένεια Hexanchidae (*Hexanchus griseus*, *Heptranchias perlo*). Όσον αφορά το γονίδιο COI, η ενίσχυσή του ήταν απαραίτητη για τη διάκριση των ειδών *Squalus blainville* και *Mustelus spp.*, για τα οποία το γονίδιο 16S rRNA δε φάνηκε ιδιαίτερα επεξηγηματικό και δεν παρείχε επαρκή ανάλυση στο επίπεδο των ειδών. Αυτό δείχνει ότι η χρήση περισσότερων από έναν γενετικών δεικτών είναι απαραίτητη για τη σωστή ταυτοποίηση ορισμένων ειδών. Οι δυσκολίες στην ταυτοποίηση κάποιων ειδών σε προϊόντα ελασμοβραγχίων είναι συνηθισμένες, και έχουν ήδη καταγραφεί μεταξύ των οικογενειών Squalidae και Triakidae για το γονίδιο COI. Το γεγονός αυτό έχει να κάνει με τις ταξινομικές αποκλίσεις των οικογενειών και τον εσφαλμένο χαρακτηρισμό των ειδών στις ήδη υπάρχουσες βάσεις δεδομένων (Lopez et al., 2006; Veríssimo et al., 2017; Almerón-Souza et al., 2018).

Μετά την ανάλυση των δειγμάτων και την ενίσχυσή τους με τα 2 διαφορετικά γονίδια, βρέθηκε ότι σε 40 περιπτώσεις (54,79%) από τις 73 συνολικά, τα δείγματα δεν ανήκουν στο γένος *Mustelus spp.*, και άρα δεν υπήρχε συμμόρφωση μεταξύ του ονόματος που αναφερόταν στην ετικέτα και του είδους που προσδιορίστηκε. Συνολικά εντοπίστηκαν 9 διαφορετικά είδη ελασμοβραγχίων τα οποία ανήκουν σε 8 γένη (*Scyliorhinus*, *Mustelus*, *Squalus*, *Prionace*, *Galeorhinus*, *Hexanchus*, *Heptranchias* και *Centrophorus*) και 6 οικογένειες (Centrophoridae 1,37%, Carcharhinidae 4,11%, Hexanchidae 4,11%, Scyliorhinidae 26,03%, Squalidae 17,81% και Triakidae 46,58) (Εικόνα 36).



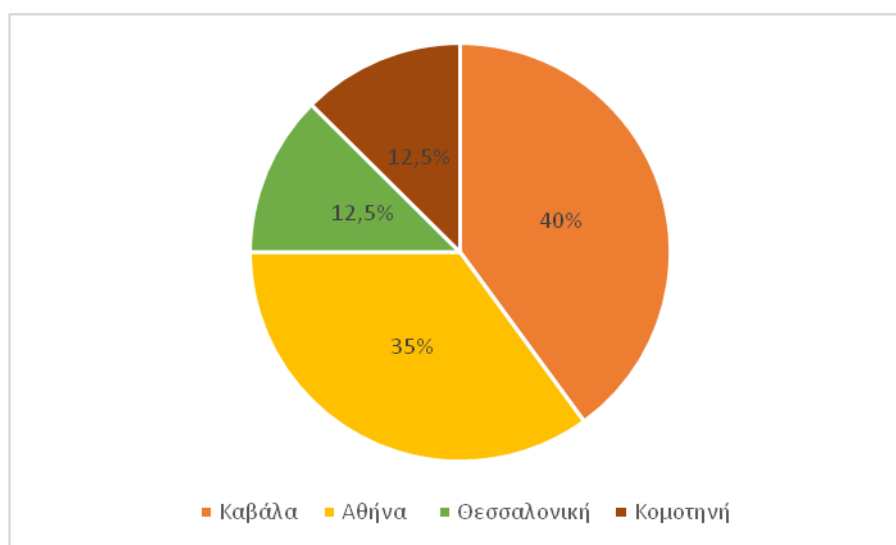
Εικόνα 36: Σύθεση των αναγνωρισμένων ειδών ανά οικογένεια.

Ο αριθμός των ειδών που ταυτοποιήθηκαν αντιπροσωπεύει το 18,37% των 49 ειδών που ανιχνεύτηκαν μέχρι σήμερα στη Μεσόγειο (Serena et al., 2005), και το 25% των 36 ειδών που καταγράφηκαν στην Ελλάδα (Paraconstantinou et al., 2014). Το είδος που ανιχνεύτηκε με τη μεγαλύτερη συχνότητα ήταν το *M. mustelus*, το οποίο εντοπίστηκε σε συνολικά 28 δείγματα (41,18%). Ακολούθησε, ιδίως στις μικρότερες πόλεις (Καβάλα, Κομοτηνή), το είδος *S. canicula* σε 19 δείγματα (26,03%) και το είδος *S. blainville* σε 12 δείγματα (16,44%). Με μικρότερη συχνότητα ταυτοποιήθηκε το είδος *M. asterias* (4,11%), *P. glauca* (4,11%) και *M. punctulatus* (2,70%).

Σε κάποιες περιπτώσεις δεν υπήρχε αντιστοιχία μεταξύ των γονιδίων COI και 16S rRNA σε επίπεδο είδους. Για παράδειγμα, τα δείγματα 13 και 21 με το γονίδιο COI ταυτοποιούνται ως *M. punctulatus*, ενώ με το γονίδιο 16S rRNA ταυτοποιούνται ως *M. manazo*. Σε αυτή την περίπτωση θεωρείται αποδεκτό είδος το *M. punctulatus*, διότι το συγκεκριμένο κρέας καρχαρία πωλήθηκε φρέσκο, πράγμα αδύνατο στην περίπτωση του είδους *M. manazo*, το οποίο εντοπίζεται στη γεωγραφική περιοχή του Ειρηνικού Ωκεανού. Επιπλέον, οι εισαγωγές της Ελλάδας περιορίζονται κατά μέσον όρο σε 1.446 τόνους ελασμοβραγχιών ετησίως, οι οποίες προέρχονται κυρίως από μεσογειακές χώρες (Dent & Clarke, 2015).

Η Καβάλα παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό νοθείας (40%), και τη μεγαλύτερη ποικιλία ειδών τα οποία πωλήθηκαν ως «γαλέος». Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν 7 διαφορετικά είδη (*Scyliorhinus canicula*, *Mustelus mustelus*, *Mustelus punctulatus*, *Squalus*

acanthias, *Centrophorus sp.*, *Mustelus asterias*, *Squalus blainville*). Ακολουθεί η Αθήνα με ποσοστό νοθείας 35% και συνολικά 6 διαφορετικά είδη (*Mustelus mustelus*, *Squalus blainville*, *Scyliorhinus canicula*, *Prionace glauca*, *Hexanchus griseus*, *Heptranchias perlo*). Τέλος, ακολουθούν η Θεσσαλονίκη και η Κομοτηνή, με ποσοστό νοθείας 12,5% και 4 (*Mustelus mustelus*, *Squalus blainville*, *Prionace glauca*, *Galeorhinus galeus*) και 3 διαφορετικά είδη (*Scyliorhinus canicula*, *Mustelus mustelus*, *Squalus blainville*), αντίστοιχα (Εικόνα 37).



Εικόνα 37: Ποσοστά νοθείας στις τέσσερις πόλεις που εξετάστηκαν.

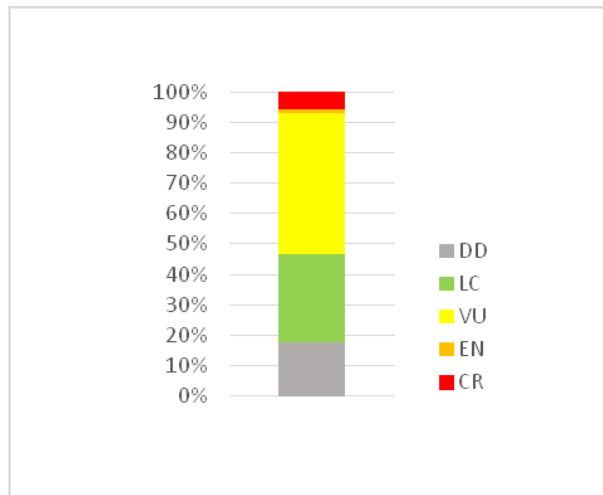
Από αυτά τα ποσοστά αποδεικνύεται ότι, παρά τις νομοθεσίες, η αντικατάσταση και η λανθασμένη επισήμανση των ειδών παραμένει σε σχετικά υψηλά επίπεδα, γεγονός που αποδεικνύει ότι ο τομέας των θαλασσιών εξακολουθεί να παραμένει ένας τομέας που επηρεάζεται εύκολα από παράνομες ή λανθασμένες πρακτικές αλίευσης (Xiong et al., 2016). Ελάχιστες είναι οι έρευνες που έγιναν μέχρι τώρα στην Ελλάδα σχετικά με τη νοθεία σε αλιεύματα. Στη μία εξετάστηκαν δείγματα ελασμοβράγχιων τα οποία πωλούνταν υπό τον όρο «γαλέος», όπου φάνηκε η εσφαλμένη επισήμανση των προϊόντων σε ποσοστό 56% (Pazartzi et al., 2019). Μία δεύτερη μελέτη εστίασε σε δείγματα μπακαλιάρου, όπου και εδώ η εσφαλμένη επισήμανση έφτασε σε αρκετά υψηλό ποσοστό (περίπου 30%) (Garcia-Vazquez et al., 2011).

Η πιο άμεσα συγκρίσιμη έρευνα με την τρέχουσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στην Ιταλική αγορά, όπου μελετήθηκε η περίπτωση της νοθείας σε φιλέτα ψαριών, τα οποία πωλούνται υπό την ονομασία «ralombo» και αφορά τα είδη του *Mustelus spp.*. Μετά την ενίσχυση των δειγμάτων με το γονίδιο COI, έγινε η ταυτοποίησή τους, από την οποία

φάνηκε ότι το ποσοστό της εσφαλμένης επισήμανσης έφτανε κοντά στο 80% (Barbuto et al., 2010). Αυτά τα υψηλά επίπεδα νοθείας φανερώνουν ότι οι καταναλωτές, ιδίως όσοι δεν γνωρίζουν τα διάφορα είδη καρχαριών, πέφτουν θύματα παραπλάνησης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των δύο μεγάλων πόλεων, ιδίως στη Θεσσαλονίκη, φάνηκε διαφορά σχετικά με τα είδη τα οποία προέρχονται από ιχθυοπωλεία και τα είδη που προέρχονται από λαϊκές αγορές. Σε κανένα από τα ιχθυοπωλεία της Θεσσαλονίκης από τα οποία λήφθηκαν δείγματα δεν εντοπίστηκε εσφαλμένη επισήμανση, γεγονός το οποίο ενδέχεται να φανερώνει αυστηρότερους και τακτικότερους ελέγχους. Κάτι αντίστοιχο παρατηρήθηκε, σε μικρότερο βαθμό βέβαια, στις αγορές της Αθήνας. Επιπλέον, τα αλιεύματα τα οποία αντιστοιχούν στο είδος *Mustelus spp.* φαίνεται να έχουν υψηλότερη εμπορική αξία, σε αντίθεση με άλλα είδη ελασμοβραγχίων. Το γεγονός αυτό πιστοποιείται στη συγκεκριμένη μελέτη, καθώς η μέση τιμή του «γαλέου» (*Mustelus spp.*) ήταν 16 €/kg (οι τιμές κυμάνθηκαν από 9 έως 18 €/kg), ενώ τα υποκατάστατα είδη είχαν σημαντικά χαμηλότερη μέση τιμή 9,8 €/kg (οι τιμές κυμάνθηκαν από 6,8 έως 15 €/kg). Σημαντική οικονομική διαφορά παρατηρήθηκε και στην Ιταλική αγορά, όπου οι τιμές του «ralombo» ήταν σχεδόν διπλάσιες από τις τιμές των άλλων ειδών της υπόταξης των ελασμοβραγχίων (Barbuto et al., 2010). Αυτή η οικονομική απόκλιση μπορεί να αποτελέσει το βασικό κίνητρο για τη νοθεία στο συγκεκριμένο είδος, έχοντας σοβαρό αντίκτυπο τόσο στους πωλητές όσο και στους καταναλωτές.

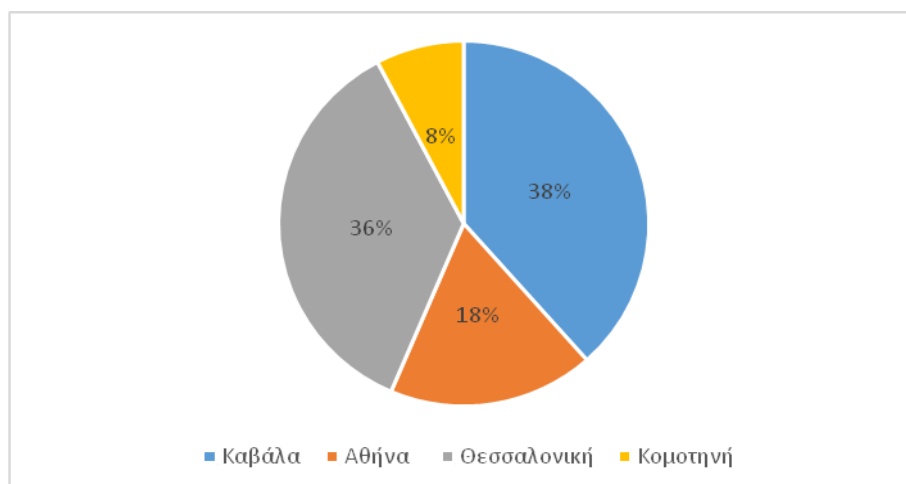
Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι ποσοστό 53,42% από τα είδη που ταυτοποιήθηκαν βρίσκονται στην κόκκινη λίστα των απειλούμενων ειδών της Διεθνούς Ένωσης Προστασίας της Φύσης IUCN (IUCN Red List of Threatened Species). Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω της επεξεργασίας και της μεταποίησης του κρέατος καρχαρία σε φιλέτα πριν την πώλησή τους, με αποτέλεσμα την εύκολη εμπορευματοποίηση των απειλούμενων ειδών, χωρίς αυτό να είναι οπτικά εμφανές. Το γεγονός αυτό προκαλεί σημαντικές επιπτώσεις στη βιοποικιλότητα και στη διατήρηση των ειδών, ιδιαίτερα στους ευάλωτους πληθυσμούς (Sadovy de Mitcheson et al., 2018). Στην Ελλάδα οι αλιεύσεις και οι εκφορτώσεις ελασμοβραγχίων σπάνια καταγράφονται σε επίπεδο είδους, και συνήθως αναφέρονται όλα τα είδη ως «γαλέος», παρά τους κανονισμούς της ΕΕ για την αναφορά των αλιευμάτων σε επίπεδο ειδών (Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 39/2013). Μεταξύ των 9 ειδών που έχουν προσδιοριστεί στη συγκεκριμένη μελέτη, τα 7 είδη (*Mustelus mustelus*, *Mustelus punctulatus*, *Mustelus asterias*, *Squalus acanthias*, *Prionace glauca*, *Galeorhinus galeus*, *Centrophorus sp.*) εντάσσονται στις απειλούμενες κατηγορίες της κόκκινης λίστας απειλούμενων ειδών της IUCN (Dulvy et al., 2016) (Εικόνα 38).



Εικόνα 38: Ποσοστά απειλούμενων ειδών της λίστας IUCN που εντοπίστηκαν στα δείγματα της παρούσας μελέτης. DD: Data Deficient, LC: Least Concern, VU: Vulnerable, EN: Endangered, CR: Critically Endangered.

Συγκεκριμένα, τα είδη που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη και αναφέρονται στην κόκκινη λίστα είναι τα *Mustelus mustelus*, *Mustelus asterias*, *Mustelus punctulatus*, *Galeorhinus galeus*, και τα οποία χαρακτηρίζονται ως τρωτά (VU) με μεγάλη πιθανότητα κινδύνου. Επιπλέον, το είδος *Squalus acanthias* το οποίο ταυτοποιήθηκε, ανήκει στα κινδυνεύοντα είδη (EN), και απειλείται με μεγάλο κίνδυνο εξαφάνισης στη φύση σύμφωνα με τη IUCN λίστα. Τέλος, από τη μελέτη δεν έλειψε η ταυτοποίηση κρίσιμωα κινδυνευόντων ειδών (CR), όπως τα είδη που ανήκουν στο γένος *Centrophorus sp.* και το είδος *Prionace glauca*, τα οποία απειλούνται με πολύ μεγάλο κίνδυνο εξαφάνισης.

Η Καβάλα και η Θεσσαλονίκη παρουσίασαν τα μεγαλύτερα ποσοστά (38,46% και 35,90% αντίστοιχα), για τα είδη που βρίσκονται στην κόκκινη λίστα της IUCN. Έπειτα ακολουθεί η Αθήνα με ποσοστό 17,95% και η Κομοτηνή με ποσοστό 7,69% (Εικόνα 39).



Εικόνα 39: Ποσοστά απειλούμενων ειδών της λίστας IUCN, στις τέσσερις πόλεις που εξετάστηκαν.

Οι Appleyard et al. (2018) εξέτασαν για πρώτη φορά, με την τεχνική του DNA barcoding και τη χρήση του γονιδίου COI, 623 αποξηραμένα πτερύγια από είδη ελασμοβραγχίων, τα οποία αλιεύθηκαν στην περιοχή της Παπούα Νέας Γουινέας. Από τα 20 είδη ελασμοβραγχίων που ταυτοποιήθηκαν, το 21% ανήκει σε είδη που θεωρούνται τρωτά (VU) ή κινδυνεύοντα (EN) σύμφωνα με την κόκκινη λίστα της IUCN, ενώ το 8% ανήκει σε κρισίμως κινδυνεύοντα (CR) είδη όπως το είδος *Sphyrna lewini*. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι ένα μεγάλο ποσοστό των ελασμοβραγχίων της συγκεκριμένης αγοράς αλιεύτηκαν πριν φτάσουν σε σεξουαλική ωρίμανση, γεγονός που σημαίνει ότι τα άτομα αυτά δεν αναπαράχθηκαν πριν την αλίευσή τους, και άρα δε μπορούν να συμβάλλουν στη συνέχιση της συγκεκριμένης γενιάς.

Οι Almerón-Souza et al. (2018) χρησιμοποίησαν επίσης την τεχνική του DNA barcoding με το γονίδιο COI για τον εντοπισμό, σε επίπεδο είδους, ελασμοβραγχίων τα οποία πωλούνται με το όνομα «cação» στις τοπικές αγορές της Βραζιλίας. Συλλέχθηκαν 63 δείγματα τα οποία βρέθηκε ότι αντιστοιχούν σε 20 διαφορετικά είδη, με πιο κοινά τα είδη *Prionace glauca* και *Sphyrna lewini*. Λαμβάνοντας υπόψη την κόκκινη λίστα της IUCN, το 47% των ειδών που εντοπίστηκε απειλείται σε παγκόσμιο επίπεδο, το 53% απειλείται σε εθνικό επίπεδο και το 47% θεωρείται κρισίμως κινδυνεύον στη Βραζιλία.

Οι Razartzi et al. (2019) εξέτασαν 87 δείγματα από διαφορετικές αγορές τεσσάρων πόλεων της Ελλάδος, τα οποία πωλήθηκαν με την εμπορική ονομασία «γαλέος». Για την ταυτοποίηση των δειγμάτων σε επίπεδο είδους χρησιμοποιήθηκαν δύο μιτοχονδριακά γονίδια, το γονίδιο 16S rRNA και το γονίδιο COI. Το ποσοστό της εσφαλμένης επισήμανσης που ανιχνεύτηκε μετά την ταυτοποίηση των δειγμάτων έφτασε το 56%. Επιπλέον, ανάμεσα στα είδη που ανιχνεύτηκαν, πάνω από τα μισά ανήκουν στα είδη της κόκκινης λίστας της IUCN. Τέλος, το 23% των προϊόντων με εσφαλμένη επισήμανση ανήκαν σε είδη τα οποία προστατεύονται από κάποια εθνική ή διεθνή νομοθεσία.

Εκτός από την κόκκινη λίστα της IUCN υπάρχουν διεθνείς και εθνικές νομοθεσίες (Παράρτημα II της CITES, Σύμβαση της Βαρκελώνης: Παράρτημα II, Κανονισμός 127/2017 της ΕΕ, Υπουργική Διάταξη 67/1981 (ΦΕΚ 23Α)), σύμφωνα με τις οποίες πολλά είδη ελασμοβραγχίων προστατεύονται. Το ποσοστό των ειδών που ταυτοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη και βρίσκονται σε κάποια από τις παραπάνω νομοθεσίες φτάνει το 57,53% (το είδος και η νομοθεσία φαίνονται στον Πίνακα 1). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι παρά τις απαγορεύσεις του Κανονισμού 127/2017 της ΕΕ και της Υπουργικής Διάταξης 67/1981 (ΦΕΚ 23Α) για την αλιεία και την εμπορία κάποιων συγκεκριμένων ειδών ελασμοβραγχίων, αυτά εξακολουθούν να εισέρχονται παράνομα στην αγορά. Στη συγκεκριμένη έρευνα, από τα 40

δείγματα φιλέτων καρχαρία με εσφαλμένη επισήμανση, το 12,5% ανήκει σε είδη τα οποία αλιεύθηκαν και εκφορτώθηκαν παράνομα στις ελληνικές αγορές. Εντοπίστηκαν 4 είδη (*Squalus acanthias*, *Hexanchus griseus*, *Heptranchias perlo*, *Galeorhinus galeus*) τα οποία επί του παρόντος προστατεύονται από τη νομοθεσία, που όπως αποδείχθηκε παραμένει αναποτελεσματική και χωρίς επιβολή κυρώσεων. Ο ελλιπής έλεγχος για την τήρηση της νομοθεσίας δεν είναι σπάνιο γεγονός (Appleyard et al., 2018, Fields et al., 2018), με τα διεθνή ποσοστά να αγγίζουν έως και το 50% (Palmeira et al., 2013). Επιπλέον, τουλάχιστον 2 από τα δείγματα που λήφθηκαν από την Καβάλα, πιθανότατα εισήχθησαν από την Τουρκία, καθώς και οι δύο χώρες εκμεταλλεύονται παρόμοια είδη και αποθέματα. Καθώς η Τουρκία δεν ανήκει στην Ευρωπαϊκή Ένωση, δεν είναι υποχρεωμένη να εφαρμόσει τις νομοθεσίες της, γεγονός που αποδεικνύει ότι η μη ελεγχόμενη αλιεία αποτελεί σημαντικό ζήτημα στις χώρες της Ανατολικής Μεσογείου. Οι κτηνιατρικοί συνοριακοί έλεγχοι για τρόφιμα ζωικής προέλευσης προερχόμενα από τρίτες χώρες (Οδηγία 97/78/ΕΚ, Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 136/2004) εφαρμόζονται σε σταθμούς επιθεώρησης στα σύνορα (Απόφαση (ΕΕ) 2009/821/ΕΚ). Δυστυχώς, μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό από αυτά τα προϊόντα υποβάλλεται σε ελέγχους (Guardone et al., 2017), αφήνοντας έτσι τους καταναλωτές απροστάτευτους.

Μεταξύ των ειδών που πωλήθηκαν στο εμπόριο με την ονομασία «γαλέος», υπήρχαν καρχαρίες πολύ μεγαλύτερου μεγέθους, όπως τα είδη *Hexanchus griseus* και *Prionace glauca*, οι οποίοι έχουν ελάχιστα κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά με τα είδη της οικογένειας Triakidae. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει τη σκόπιμη δολιοφθορά και εξαπάτηση των καταναλωτών, καθώς έχει ήδη γνωστοποιηθεί η έντονη μείωση του πληθυσμού των μεγάλων καρχαριών σε όλη τη Μεσόγειο θάλασσα (Ferretti et al., 2008), και γενικότερα η μείωση του πληθυσμού των καρχαριών παγκοσμίως (Worm et al., 2013). Είναι εμφανές στη συγκεκριμένη μελέτη, ότι πολλά από τα προϊόντα που πωλούνται με εσφαλμένη επισήμανση στους Έλληνες καταναλωτές ανήκουν σε ευάλωτες ομάδες, και σε κάποιες περιπτώσεις ανήκουν ακόμα και σε προστατευόμενα είδη. Η ακριβής επισήμανση των προϊόντων είναι ιδιαίτερα σημαντική όχι μόνο για την προστασία των καταναλωτών, αλλά και για τη διατήρηση των ευάλωτων ομάδων ελασμοβραγχίων, και την πρόληψη από την παράνομη, λαθραία και μη ρυθμισμένη εμπορία προϊόντων.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Στη συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιήθηκε, με τη χρήση της τεχνικής DNA barcoding, ο προσδιορισμός ειδών ελασμοβραγχιών τα οποία πωλούνται στην ελληνική αγορά υπό την κοινή ονομασία «γαλέος». Η χρήση δύο διαφορετικών μιτοχονδριακών (mtDNA) γονιδίων (16S rRNA και COI) για την ταυτοποίηση των δειγμάτων συνέβαλλε στην εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Η δειγματοληψία επικεντρώθηκε σε 4 πόλεις της Ελλάδας (Αθήνα, Θεσσαλονίκη, Καβάλα και Κομοτηνή), από διαφορετικές αγορές (ιχθυοπωλεία και λαϊκές αγορές), όπου φάνηκαν κάποιες διαφορές στα είδη τα οποία πωλούνται σε κάθε μία. Ιδιαίτερα σημαντικά είναι τα υψηλά επίπεδα της νοθείας, καθώς το 54,79% των δειγμάτων είχε λανθασμένη επισήμανση.

Στο μέλλον, είναι σημαντικό να διεξαχθούν παρόμοιες μελέτες σε άλλες περιοχές και σε διαφορετικούς τύπους αγορών (π.χ. supermarkets, εστιατόρια), για την εξαγωγή περισσότερων αποτελεσμάτων που σχετίζονται με τη βιομηχανία και την εμπορία κρέατος καρχαρία στην ελληνική αγορά, καθώς η συγκεκριμένη μελέτη είναι η δεύτερη η οποία διεξάχθηκε με τη χρήση μοριακών τεχνικών, για την ανίχνευση εσφαλμένης επισήμανσης σε ελληνικά αλιευτικά προϊόντα. Και οι δύο έρευνες αποκάλυψαν υψηλά επίπεδα λανθασμένης επισήμανσης, τονίζοντας την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα στην ελληνική αγορά. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι μεγάλο ποσοστό των προϊόντων συνδέεται με είδη τα οποία έχουν κριθεί τρωτά όσον αφορά την κατάσταση διατήρησής τους, σύμφωνα με την κόκκινη λίστα των απειλούμενων ειδών της Διεθνούς Ένωσης Προστασίας της Φύσης IUCN (IUCN Red List of Threatened Species), ή/και βρίσκονται υπό την προστασία διεθνών και εθνικών νομοθεσιών. Η αντικατάσταση με είδη μεγαλύτερου μεγέθους τα οποία έχουν μικρή ομοιότητα με τα είδη *Mustelus spp.*, αποδεικνύει τη στοχευμένη νοθεία και τη σκόπιμη εισαγωγή και εμπορία απαγορευμένων και προστατευόμενων ειδών καρχαρία στην ελληνική αγορά. Αυτό το γεγονός έχει σημαντικές επιπτώσεις στη διατήρηση των ειδών, ειδικά στη Μεσόγειο, όπου παρατηρείται μείωση στον πληθυσμό των ελασμοβραγχιών εξαιτίας της υπεραλίευσης (Ferretti et al., 2008).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ababouch, L. & Gram, L. (2004). Characterization of hazards in seafood. In: Assessment and management of seafood safety and quality. *Rome: Food and agricultural organization of the United Nations*, 26-95.
- Almerón-Souza, F., Sperb, C., Castilho, C. L., Figueiredo, P. I. C. C., Gonçalves, L. T., Machado, R., Oliveira, L. R., Valiati, V. H. & Fagundes, N. J. R. (2018). Molecular identification of shark meat from local markets in Southern Brazil based on DNA Barcoding: Evidence for mislabeling and trade of endangered species. *Frontiers in Genetics*, 9, 138.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R. & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457-465.
- Andersson, S. G., Karlberg, O., Canbäck, B. & Kurland, C. G. (2003). On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 358(1429), 165-177.
- Appleyard, S. A., White, W. T., Vieira, S. & Sabub, B. (2018). Artisanal shark fishing in Milne Bay Province, Papua New Guinea: biomass estimation from genetically identified shark and ray fins. *Scientific Reports*, 8, 6693.
- Armani, A., Tinacci, L., Lorenzetti, R., Benvenuti, A., Susini, F., Gasperetti, L. & Guidi, A. (2017). Is raw better? A multiple DNA barcoding approach (full and mini) based on mitochondrial and nuclear markers reveals low rates of misdescription in sushi products sold on the Italian market. *Food Control*, 79, 126-133.
- Asche, F., Bellemare, M., Roheim, C., Smith, M. D. & Tveteras, S. (2015). Fair enough? Food security and the international trade of seafood. *World Development*, 67, 151-160.
- Attardi, G. & Schatz, G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annual Review of Cell Biology*, 4, 289-333.
- Barausse, A., Correale, V., Curkovic, A., Finotto, L., Riginella, E., Visentin, E. & Mazzoldi, C. (2014). The role of fisheries and the environment in driving the decline of elasmobranchs in the northern Adriatic Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 71(7), 1593-1603.
- Barbuto, M., Galimberti, A., Ferri, E., Labra, M., Malandra, R., Galli, P. & Casiraghi, M. (2010). DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus spp.*). *Food Research International*, 43(1), 376-381.

- Barrett, R. D. H. & Hebert, P. D. N. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 83(3), 481-491.
- Baum, J. K., Myers, R. A., Kehler, D. G., Worm, B., Harley, S. J. & Doherty, P. A. (2003). Collapse and conservation of shark populations in the Northwest Atlantic. *Science*, 299(5605), 389-392.
- Bhattacharya, M., Sharma, A. R., Patra, B. C., Sharma, G., Seo, E. M., Nam, J. S., Chakraborty, C. & Lee, S. S. (2016). DNA barcoding to fishes: current status and future directions. *Mitochondrial DNA. Part A, DNA mapping, sequencing, and analysis*, 27(4), 2744-2752.
- Bornatowski, H., Navia, A. F., Braga, R. R., Abilhoa, V. & Corrêa, M. F. M. (2014). Ecological importance of sharks and rays in a structural foodweb analysis in southern Brazil. *ICES Journal of Marine Science*, 71(7), 1586-1592.
- Brito, A. (1991). Catálogo de los peces de las Islas Canarias. *Francisco Lemus, la Laguna*, 230.
- Carrera, E., García, T., Céspedes, A., González, I., Sanz, B., Hernández, P. E. & Martín, R. (1997). Immunostick colorimetric ELISA assay for the identification of smoked salmon, trout and bream. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(4), 547-550.
- Castro, J. A., Picornell, A. & Ramon, M. M. (1998). Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. *International Microbiology*, 1(4), 327-332.
- Cawthorn, D. M., Duncan, J., Kastern, C., Francis, J. & Hoffman, L. C. (2015). Fish species substitution and misnaming in South Africa: An economic, safety and sustainability conundrum revisited. *Food Chemistry*, 185, 165-181.
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M. & Tiedje, J. M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37(1), 141-145.
- Compagno, L. (1984). FAO species catalogue. Vol. 4. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of the shark species known to date. Part 2. Carcharhiniformes. In: *FAO Fisheries Synopsis No.125*. Rome, Italy, 251-655.
- Compagno, L. V., Ebert, D. A. & Smale, M. J. (1989). *Guide to the sharks and rays of southern Africa*. London, UK: New Holland Ltd.
- Compagno, L. V. (1990). Alternate life history styles of cartilaginous fishes in time and space. *Environmental Biology of Fishes*, 28(1-4), 33-75.

- Compagno, L. V., Dando, M. & Fowler, S. L. (2005). *Sharks of the World*. New Jersey, USA: Princeton University Press.
- Corrigan, S. & Beheregaray, L. B. (2009). A recent shark radiation: molecular phylogeny, biogeography and speciation of wobbegong sharks (family: Orectolobidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *52*, 205-216.
- D'Amico, P., Armani, A., Gianfaldoni, D. & Guidi, A. (2016). New provisions for the labelling of fishery and aquaculture products: Difficulties in the implementation of Regulation (EU) n. 1379/2013. *Marine Policy*, *71*, 147-156.
- Da Silva, C. (2007). The status and prognosis of the smoothhound shark (*Mustelus mustelus*) fishery in the Southeastern and Southwestern Cape Coasts, South Africa. MSc Thesis, Rhodes University, South Africa.
- De Brito, M. A., Schneider, H., Sampaio, I. & Santos, S. (2015). DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (Sciaenidae) marketed in Brazil: The case of “pescada branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*). *Food Research International*, *70*, 40-46.
- De Maddalena, A., Piscitelli, L. & Malandra, R. (2001). The largest specimen of smoothhound, *Mustelus mustelus* (Linnaeus, 1758), recorded from the Mediterranean Sea. *Biljeske-Notes*, *84*, 1-8.
- Dent, F., & Clarke, S. (2015). *State of the global market for shark products. Fisheries and aquaculture technical paper*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization.
- DoH (Department of Health) (2004). Foodstuffs, Cosmetics and Disinfectants Act, 1972 (Act 54 of 1972), regulations relating to the maximum levels for metals in foodstuffs (R.500/2004). *South African Government Gazette*, *26279*, 4-6.
- Dulvy, N. K., Baum, J. K., Clarke, S., Compagno, L. J. V., Cortés, E., Domingo, A., Fordham, S., Fowler, S., Francis M. P., Gibson, C., Martínez, J., Musick, J. A., Soldo, A., Stevens, J. D. & Valenti, S. (2008). You can swim but you can't hide: the global status and conservation of oceanic pelagic sharks and rays. *Aquatic Conservation*, *18*(5), 459-482.
- Dulvy, N. K., Allen, D. J., Ralph, G. M. & Walls, R. (2016). *The conservation status of Sharks, Rays and Chimaeras in the Mediterranean Sea [Brochure]*. Malaga, Spain: IUCN.
- EC (European Commission) (2001). Commission Regulation (EC) No. 466/2011 setting maximum levels of certain contaminants of foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, *L260*, 35-36.

- Ellis, J. R., Cruz-Martinez, A., Rackham, B. D. & Rogers, S. I. (2005). The distribution of chondrichthyan fishes around the British Isles and implications for conservation. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 35, 195-213.
- EUMOFA (European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products) (2017). The EU fish Market. Highlights the EU in the World EU market supply consumption trade EU landings aquaculture production. Accessible at <http://www.eumofa.eu/documents/20178/108446/The+EU+fish+market+2017.pdf>.
- FAO (2003). Heavy Metals Regulations Legal Notice No 66/2003. Available at: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/eri42405.pdf>
- FAO (2014). The State of World Fisheries and Aquaculture. Opportunities and challenges. <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>. Accessed 22/12/2016.
- FAO (2015). State of the Global Market for Shark Products. Rome. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i4795e.pdf>
- FAO (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to Food Security and Nutrition for All. Rome. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>
- FAO (2018). Overview of food fraud in the fisheries sector. Rome. Available at: <http://www.fao.org/3/i8791en/I8791EN.pdf>.
- Farrell, E. D. (2010). The life-history and population biology of the starry smooth-hound, *Mustelus asterias* in the Northeast Atlantic Ocean. PhD Thesis, University College Dublin.
- FDA (US Food and Drug Administration) (1998). Fish and fishery products hazard and control guide (edited by C.f.F.S.a.A.N. FDA, Office of Seafood).
- Ferretti, F., Myers, R. A., Serena, F. & Lotze, H. K. (2008). Loss of large predatory sharks from the Mediterranean Sea. *Conservation Biology*, 22, 952-964.
- Field, I. C., Meekan, M. G., Buckworth, R. C. & Bradshaw, C. J. (2009). Susceptibility of sharks, rays and chimaeras to global extinction. *Advances in Marine Biology*, 56, 275-363.
- Fields, A. T., Fischer, G. A., Shea, S. K. H., Zhang, H., Abercrombie, D. L., Feldheim, K. A., Babcock, E. A. & Chapman, D. D. (2018). Species composition of the international shark fin trade assessed through a retail-market survey in Hong Kong. *Conservation Biology*, 32(2), 376-389.
- Florida Museum of Natural History. Discover fishes. Available at: <https://www.florida-museum.ufl.edu/discover-fish/sharks/faq/>. Accessed on: 3/6/2019

- Fügel, R., Carle, R. & Schieber, A. (2005). Quality and authenticity control of fruit purées, fruit preparations and jams - A review. *Trends in Food Science and Technology*, *16*, 433-441.
- Galal-Khallaf, A., Ardura, A., Mohammed-Geba, K., Borrell, Y. & Garcia-Vazquez, E. (2014). DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in Egyptian fish fillets. *Food Control*, *46*, 441-445.
- Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., Martellos, S. & Labra, M. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, *50*, 55-63.
- Gallagher, A. J., Kyne, P. M. & Hammerschlag, N. (2012). Ecological risk assessment and its application to elasmobranch conservation and management. *Journal of Fish Biology*, *80*, 1727-1748.
- Garcia-Vazquez, E., Perez, J., Martínez, J., Pardiñas, A., Lopez, B., Karaïskou, N., Casa, M., Machado-Schiaffino, G. & Triantafyllidis, A. (2011). High level of mislabeling in Spanish and Greek hake markets suggests the fraudulent introduction of African species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(2), 475-480.
- Goosen, A. J. & Smale, M. J. (1997). A preliminary study of age and growth of the smooth-hound shark *Mustelus mustelus* (Triakidae). *South African Journal of Science*, *18*, 85-91.
- Greenberg, R. (2008). The beauty of the beast. The present and future of elasmobranchs in Europe. Oceana, Report October 2008
- Gregory, T. R. (2005). DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature*, *434*(7037), 1067.
- Griffiths, A. M., Miller, D. D., Egan, A., Fox, J., Greenfield, A., & Mariani, S. (2013). DNA barcoding unveils skate (Chondrichthyes: Rajidae) species diversity in 'ray' products sold across Ireland and the UK. *PeerJ*, *1*, e129.
- Griffiths, A. M., Sotelo, C. G., Mendesc, R. I., Pérez-Martín, U., Schröder, M., Shorten, M. & Mariani, S. (2014). Current methods for seafood authenticity testing in Europe: Is there a need for harmonisation? *Food Control*, *45*, 95-100.
- Guardone, L., Tinacci, L., Costanzo, F., Azzarelli, D., D'Amico, P., Tasselli, G., Magni, A., Guidi, A., Nucera, D. & Armani, A. (2017). DNA barcoding as a tool for detecting mislabeling of fishery products imported from third countries: An official survey conducted at the Border Inspection Post of Livorno-Pisa (Italy). *Food Control*, *80*, 204-216.

- Hamlett, W. C. (1997). Reproductive Modes of Elasmobranches. Indiana University School of Medicine. In: The IUCN/SSC Shark Specialist Group. *Shark News* 9.
- Hanner, R., Corthals, A. & Dessauer, H. C. (2005). Salvage of genetically valuable tissues following a freezer failure. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34, 452-455.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & deWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 270, S96-S99.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S. & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA Barcodes. *PLOS Biology*, 2, 1657-1663.
- Heemstra, P. C. & Heemstra, E. (2004). Coastal fishes of southern Africa. *National Inquiry Service Center (NISC) and South African Institute for Aquatic Biodiversity (SAIAB)*.
- Heinicke, M. P., Naylor, G. J. P. & Hedges, S. B. (2009). Cartilaginous fishes (Chondrichthyes). In: Hedges, S. B. & Kumar, S. (Eds.). *The time tree of life* (pp. 320-327). New York: Oxford University Press.
- Hellberg, R. S. & Morrissey, M. T. (2011). Advances in DNA-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market. *Journal of Laboratory Automation*, 16, 308-321.
- Helyar, S. J., Lloyd, H. A., de Bruyn, M., Leake, J., Bennett, N., & Carvalho, G. R. (2014). Fish product mislabelling: failings of traceability in the production chain and implications for 538. *PloS One*, 9(6), e98691.
- Hillis, D. M., Moritz, C., & Mable, B. K. (1996). *Molecular systematics*. Sunderland, Massachusetts U.S.A.: Sinauer & Associates Inc.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W. & Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS One*, 6(5), e19254.
- Holmes, B. H., Steinke, D. & Ward, R. D. (2009). Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries Research*, 95, 280-288.
- Horreo, J. L., Machado-Schiaffino, G. & García-Vázquez, E. (2017). Forensic assignment to geographic origin, a useful tool in seafood fraud control. *Forensic Science International*, 272, 37-40.
- Imsiridou, A., Minos, G., Gakopoulou, A., Katsares, V., Karidas, T., & Katselis, G. (2011). Discrimination of two picarel species *Spicara flexuosa* and *Spicara maena* (Pisces: Centranchidae) based on mitochondrial DNA sequences. *Journal of Fish Biology*, 78(1), 373-377.

- International Game Fish Association (1991). World record game fishes. *International Game Fish Association, Florida, USA*.
- IUCN (2012). *IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. Second edition*. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, Available at: <https://portals.iucn.org/library/node/10315>.
- IUCN (2017). *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-1: Table 4a*. Available at: <https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics#Reasons%20for%20change>.
- Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H., & Hebert, P. D. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 6, 998-1002.
- Jacquot, R. (1961). Organic constituents of fish and other aquatic animal foods. In: Borgstrom G. (Ed.). *Fish as Food. Production, Biochemistry and Microbiology* (pp. 145-209). New York: Academic Press.
- Jardas, I., Santic, M., Nerlovic, V. & Pallaoro, A. (2007). Diet composition of blackspotted smooth-hound, *Mustelus punctulatus* (Risso, 1826), in the eastern Adriatic Sea. *Journal of Applied Ichthyology*, 23, 279-281.
- Kearney, J. (2010). Food consumption trends and drivers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 365(1554), 2793-2807.
- Khaksar, R., Carlson, T., Schaffner, D. W., Ghorashi, M., Best, D., Jandhyala, S., Traverso, J. & Amini, S. (2015). Unmasking seafood mislabeling in US markets: DNA barcoding as a unique technology for food authentication and quality control. *Food Control*, 56, 71-76.
- Koch, M. A., Haubold, B. & Mitchell-Olds, T. (2000). Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, *Arabis* and related genera (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution*, 17, 1483-1498.
- Kurtz, C., Leitenberger, M., Carle, R. & Schieber, A. (2010). Evaluation of fruit authenticity and determination of the fruit content of fruit products using FTNIR spectroscopy of cell wall components. *Food Chemistry*, 119, 806-812.
- Liu, S. Y. V., Chan, C. L. C., Lin, O., Hu, C. H. & Chen, C. A. (2013). DNA Barcoding of shark meats identify species composition and CITES-listed species from the markets in Taiwan. *PLOS ONE* 8(11), e79373.
- Lopez, J. A., Ryburn, J. A., Fedrigo, O. & Naylor, G. P. (2006). Phylogeny of sharks of the family Triakidae (Carcharhiniformes) and its implications for the evolution of

- carcharhiniform placental viviparity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *40*, 50-60.
- Lowell, B., Mustain, P., Ortenzi, K. & Warner, K. (2015). One Name, one Fish: Why seafood names matter. Oceana, Report July 2015.
- Luo, S., Valencia, C. A., Zhang, J., Lee, N. C., Slone, J., Gui, B., Wang, X., Li, Z., Dell, S., Brown, J., Chen, S. M., Chien, Y. H., Hwu, W. L., Fan, P. C., Wong, L. J., Atwal, P. S. & Huang, T. (2018). Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(51), 13039-13044.
- Mariani, S., Griffiths, A. M., Velasco, A., Kappel, K., Jérôme, M., Perez-Martin, R. I. & Boufana, B. (2015). Low mislabeling rates indicate marked improvements in European seafood market operations. *Frontiers in Ecology and the Environment*, *13*(10), 536-540
- McBride, H. M., Neuspiel, M. & Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current Biology*, *16*(14), 551-560.
- Miller, D. D. & Sumaila, U. R. (2014). Flag use behavior and IUU activity within the international fishing fleet: Refining definitions and identifying areas of concern. *Marine Policy*, *44*, 204-211.
- Muus, B. J. & Nielsen, J. G. (1999). Sea fish. *Scandinavian Fishing Year Book*, 340.
- Mytilineou, C., Politou, C. Y., Papaconstantinou, C., Kavadas, S., D'Onghia, G. & Sion, L. (2005). Deep-water fish fauna in the Eastern Ionian Sea. *Belgian Journal of Zoology*, *135*(2), 229-233.
- Nagy, Z. T., Sonet, G., Glaw, F. & Vences, M. (2012). First large-scale DNA barcoding assessment of reptiles in the biodiversity hotspot of Madagascar, based on newly designed COI primers. *PLoS One*, *7*(3), e34506.
- Nedunoori, A., Turanov, S. V. & Kartavtsev, Y. P. (2017). Fish product mislabeling identified in the Russian far east using DNA barcoding. *Gene Reports*, *8*, 144-149.
- Pazartzi, T., Siaperopoulou, S., Gubili, C., Maradidou, S., Loukovitis, D., Chatzisprou, A., Griffiths, A. M., Minos, G. & Imsiridou, A. (2019). High levels of mislabeling in shark meat - Investigating patterns of species utilization with DNA barcoding in Greek retailers. *Food Control*, *98*, 179-186.
- Palmeira, C. A. M., Rodrigues-Filho, L. F. S., Sales, J. B. L., Vallinoto, M., Schneider, H. & Sampaio, I. (2013). Commercialization of a critically endangered species (largetooth sawfish, *Pristis perotteti*) in fish markets of northern Brazil: Authenticity by DNA analysis. *Food Control*, *34*, 249-252.

- Palumbi, S. R. (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D. M., Moritz, C. & Mable B. K. (Eds.). *Molecular Systematics* (pp. 205–247). Sunderland: Sinauer & Associates Inc.
- Papaconstantinou, C., Kapiris, K., Karachle, P. K., & Zenetos, A. (2014). Fauna Graeciae. An updated checklist of the fishes in the Hellenic seas. *Monographs on Marine Sciences*, 7. National Centre for Marine Research: Athens.
- Pauly, D., Hilborn, R. & Branch, T. A. (2013). Fisheries: does catch reflect abundance? *Nature*, 494, 303-306.
- Pramod, G., Nakamura, K., Pitcher, T. J. & Delagran, L. (2014). Estimates of illegal and unreported fish in seafood imports to the USA. *Marine Policy*, 48, 102-113.
- Quéro, J. C., Vayne, J. J. & Porché, P. (2003). Guide des poissons de l'Atlantique européen.
- Rasmussen, R. S., Morrissey, M. T. & Hebert, P. D. (2009). DNA barcoding of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) from North America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8379-8385.
- Rastogi, G., Dharne, M. S., Walujkar, S., Kumar, A., Patole, M. S. & Shouche, Y. S. (2007). Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science*, 76, 666-674.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: the barcode of life datasystem (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, 7, 355-364.
- Ruelas-Inzunza, J. & Paez-Osuna, F. (2005). Mercury in fish and shark tissues from two coastal lagoons in the Gulf of California, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 74, 294-300.
- Sadovy de Mitcheson, Y., Andersson, A. A., Hofford, A., Law, C. S. W., Hau, L. C. Y. & Pauly, D. (2018). Out of control means off the menu: The case for ceasing consumption of luxury products from highly vulnerable species when international trade cannot be adequately controlled; shark fin as a case study. *Marine Policy*, 98, 115-120.
- Saïdi, B., Bradaï, M. N. & Bouaïn, A. (2008). Reproductive biology of the smooth-hound shark *Mustelus mustelus* (L.) in the Gulf of Gabés (south-central Mediterranean Sea). *Journal of Fish Biology*, 72, 1343-1354.
- Saïdi, B., Bradaï, M. N. & Bouaïn, A. (2009). Reproductive biology and diet of *Mustelus punctulatus* (Risso, 1826) (Chondrichthyes: Triakidae) from the Gulf of Gabès, central Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, 73(2), 249-258.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. M. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74(12), 5463-5467.

- Sato, K., Stewart, A. L. & Nakaya, K. (2013). *Apristurus garricki* sp. nov., a new deep-water catshark from the northern New Zealand waters (Carcharhiniformes: Scyliorhinidae). *Marine Biology Research*, 9(8), 758-767.
- Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K. & Lane, R. (2005). Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1462), 1805-1811.
- Schindel, D. E. & Miller, S. E. (2005). DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*, 435(7038), 17.
- Serena, F. (2005). Field identification guide to the sharks and rays of the Mediterranean and Black Sea. *FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes*.
- Smale, M. J. & Compagno, L. V. (1997). Life history and diet of two southern African smooth-hound sharks, *Mustelus mustelus* (Linnaeus, 1758) and *Mustelus palumbes* (Smith, 1957) (Pisces: Triakidae). *South African Journal of Marine Science*, 18, 229-248.
- Smith, P. J., McVeagh, S. M. & Steinke, D. (2008). DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *Journal of Fish Biology*, 72, 464-471.
- Spink, J. & Moyer, D. C. (2011). Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science*, 76(9), 157-163.
- Tinacci, L., Stratev, D., Vashin, I., Chiavaccini, I., Susini, F., Guidi, A., & 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.
- Valentini, A., Pompanon, F. & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends In Ecology and Evolution*, 24, 110-117.
- Vannuccini, S. (1999). Shark utilization, marketing and trade. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Veríssimo, A., Zaera-Perez, D. & Leslie, R. (2017). Molecular diversity and distribution of eastern Atlantic and Mediterranean dogfishes *Squalus* highlight taxonomic issues in the genus. *Zoologica Scripta*, 46(4), 414-428.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360(1462), 1847-1857.
- Ward, R. D., Hanner, R. & Hebert, P. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74, 329-356.

- Weigmann, S. (2016). Annotated checklist of the living sharks, batoids and chimaeras (Chondrichthyes) of the world, with a focus on biogeographical diversity. *Journal of Fish Biology*, *88*(3), 837-1037.
- Wiemerslage, L. & Lee, D. (2016). Quantification of mitochondrial morphology in neurites of dopaminergic neurons using multiple parameters. *Journal of Neuroscience Methods*, *262*, 56-65.
- Wiesner, R. J., Rüegg, J. C. & Morano, I. (1992). Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: Copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *183*(2), 553-559.
- Worm, B., Davis, B., Kettermer, L., Ward-Paige, C. A., Chapman, D., Heithaus, M. R., Kessel, S. T. & Gruber, S. H. (2013). Global catches, exploitation rates, and rebuilding options for sharks. *Marine Policy*, *40*, 194-204.
- Wourms, J. P. & Demski, L. S. (1993). The reproduction and development of sharks, skates, rays and ratfishes: introduction, history, overview, and future prospects. *Environmental Biology of Fishes*, *38*(1-3), 7-21.
- Xiong, X., Guardone, L., Cornax, M. J., Tinacci, L., Guidi, A., Gianfaldoni, D., & Armani, A. (2016). DNA barcoding reveals substitution of Sablefish (*Anoplopoma fimbria*) with Patagonian and Antarctic Toothfish (*Dissostichus eleginoides* and *Dissostichus mawsoni*) in online market in China: How mislabeling opens door to IUU fishing. *Food Control*, *70*, 380-391.
- Yang, L., Tan, Z., Wang, D., Xue, L., Guan, M. X., Huang, T. & Li R. (2014). Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Scientific Reports*, *4*, 4089.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα Ι: Φωτογραφίες από τα δείγματα που αναλύθηκαν.



Δείγμα 1: Το δείγμα πωλείται ως «γαλέος», με αναγραφή και της λατινικής ονομασίας (*Mustelus spp.*) σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία, ενώ ταυτοποιήθηκε ως *Scyliorhinus canicula*.



Δείγματα 7-8: Ταυτόχρονη πώληση δύο διαφορετικών δειγμάτων με την ονομασία «γαλέος», εκ των οποίων το ένα ανήκει στο γένος *Mustelus* και το άλλο στο γένος *Scyliorhinus*.



Δείγμα 12: Η χαμηλότερη τιμή (6,8 €) μεταξύ των δειγμάτων που αγοράστηκαν, με ταυτόχρονη λανθασμένη επισήμανση. Το δείγμα ανήκει στο είδος *Scyliorhinus canicula*.



Δείγμα 29: Ένα από τα ακριβότερα δείγματα (18 €) το οποίο αγοράστηκε σε μορφή φιλέτου από ιχθυοπωλείο. Το δείγμα αυτό ανήκει στο γένος *Mustelus*.

Παράρτημα II: Αλληλουχίες των δειγμάτων που αναλύθηκαν για το γονίδιο 16S rRNA.

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
|--------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------|----|----|----|-----|
| Mustelus asterias 1 | CGCGGTATTTTGACCGTGC | AAAGGTAGCGTAATCATT | TGTCTTTTAAATGAAGAC | CCCGTATGAAAGGCACC | CGAGAGTTAACTGTCCT | ATTTTCTAAT | | | | |
| Mustelus asterias 2 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus griseus 1 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus griseus 2 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus griseus 3 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus griseus 4 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 1 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 2 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 3 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 4 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 5 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 6 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 7 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 8 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 9 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 10 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 11 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 12 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 13 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 14 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 15 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 16 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 17 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 18 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 19 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 20 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 21 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 22 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 23 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 24 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus henlei 25 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus manazo 1 | | | | C | | | | | | |
| Mustelus manazo 2 | | | | C | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 1 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 2 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 3 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 4 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 5 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 6 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 7 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 8 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 9 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 10 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 11 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 12 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 13 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 14 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 15 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 16 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Scyliorhinus canicula 17 | | | | C | | | | G | | C.C |
| Squalus acanthias 1 | | .G | | C | | | | T | | |
| Squalus cubensis 1 | | .G | | C | | | | T | | C |
| Squalus cubensis 2 | | .G | | C | | | | T | | C |
| Squalus cubensis 3 | | .G | | C | | | | T | | C |
| Squalus cubensis 4 | | .G | | C | | | | T | | C |
| Squalus cubensis 5 | | .G | | C | | | | T | | C |
| Squalus cubensis 6 | | .G | | C | | | | T | | C |
| Squalus cubensis 7 | | .G | | C | | | | T | | C |
| Squalus cubensis 8 | | .G | | C | | | | T | | C |
| Squalus cubensis 9 | | .G | | C | | | | T | | C |
| Squalus cubensis 10 | | .G | | C | | | | T | | C |
| Squalus cubensis 11 | | .G | | C | | | | T | | C |
| Squalus cubensis 12 | | .G | | C | | | | T | | C |
| Hexanchus griseus 1 | | .G | | C | | | | T | | |
| Hexanchus griseus 2 | | .G | | C | | | | T | | |
| Prionace glauca 1 | | | | C | | | | T | | |
| Prionace glauca 2 | | | | C | | | | T | | |
| Prionace glauca 3 | | | | C | | | | T | | |
| Galeorhinus galeus 1 | | | | C | | | | T | | |
| Heptranchias perlo 1 | | .G | | C | | | | T | | |
| Centrophorus sp. 1 | | .G | | C | | | | T | | |

| | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
|--------------------------|--|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------|
| Mustelus asterias 1 | CAATGAAATTGATCTATTCGTCGAGAGCGGAATATAATAACATTAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTTAAACACCTTAAGTTAATT | | | | | | | | | ATGTAACCATTT |
| Mustelus asterias 2 | | | | | | | | | | |
| Mustelus qriseus 1 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus qriseus 2 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus qriseus 3 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus qriseus 4 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 1 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 2 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 3 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 4 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 5 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 6 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 7 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 8 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 9 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 10 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 11 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 12 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 13 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 14 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 15 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 16 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 17 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 18 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 19 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 20 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 21 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 22 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 23 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 24 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus henlei 25 | | | | | | | C | | | |
| Mustelus manazo 1 | | T | | | | | | | | T |
| Mustelus manazo 2 | | T | | | | | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 1 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 2 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 3 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 4 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 5 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 6 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 7 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 8 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 9 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 10 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 11 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 12 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 13 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 14 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 15 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 16 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Scyliorhinus canicula 17 | | TC | G | G | A | | C | T | A | A |
| Squalus acanthias 1 | | TC | GA | TA | C | | C | | A | C |
| Squalus cubensis 1 | | TC | GA | TA | C | | C | | A | |
| Squalus cubensis 2 | | TC | GA | TA | C | | C | | A | |
| Squalus cubensis 3 | | TC | GA | TA | C | | C | | A | |
| Squalus cubensis 4 | | TC | GA | TA | C | | C | | A | |
| Squalus cubensis 5 | | TC | GA | TA | C | | C | | A | |
| Squalus cubensis 6 | | TC | GA | TA | C | | C | | A | |
| Squalus cubensis 7 | | TC | GA | TA | C | | C | | A | |
| Squalus cubensis 8 | | TC | GA | TA | C | | C | | A | |
| Squalus cubensis 9 | | TC | GA | TA | C | | C | | A | |
| Squalus cubensis 10 | | TC | GA | TA | C | | C | | A | |
| Squalus cubensis 11 | | TC | GA | TA | C | | C | | A | |
| Squalus cubensis 12 | | TC | GA | TA | C | | C | | A | |
| Hexanchus qriseus 1 | | TCC | AGGA | T | T | | C | | C | T |
| Hexanchus qriseus 2 | | TCC | AGGA | T | T | | C | | C | T |
| Prionace qlauca 1 | | | | | | | C | | A | |
| Prionace qlauca 2 | | | | | | | C | | A | |
| Prionace qlauca 3 | | | | | | | C | | A | |
| Galeorhinus qaleus 1 | | | GGA | T | T | | C | | A | T |
| Heptranchias perlo 1 | | TCC | | | | | C | | C | T |
| Centrophorus sp. 1 | | TC | GA | T | C | | C | | A | |

| | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
|--------------------------|---|--------|--------|-------------------------------|--------|--------------------|-----|-----|-----|-----|
| Mustelus asterias 1 | AT-TCCTCAGGGTATAAACA-AAATATATAAATCTTCTA | CTTAAC | TAACTG | TTTTGGTTGGGGTGACCGAGGGGGGAAAA | CAAAAT | CCCCCTCATCGATTGAGT | | | | |
| Mustelus asterias 2 | | | | | | | | | | |
| Mustelus griseus 1 | | | | | | | | | | |
| Mustelus griseus 2 | | | | | | | | | | |
| Mustelus griseus 3 | | | | | | | | | | |
| Mustelus griseus 4 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 1 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 2 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 3 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 4 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 5 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 6 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 7 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 8 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 9 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 10 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 11 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 12 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 13 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 14 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 15 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 16 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 17 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 18 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 19 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 20 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 21 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 22 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 23 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 24 | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 25 | | | | | | | | | | |
| Mustelus manazo 1 | | | | | | | | | | |
| Mustelus manazo 2 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 1 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 2 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 3 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 4 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 5 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 6 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 7 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 8 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 9 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 10 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 11 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 12 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 13 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 14 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 15 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 16 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 17 | AAT.C.AC | | | | | | | | | |
| Squalus acanthias 1 | ATC.A.G.A.A.T | | | | | | | | | |
| Squalus acanthias 2 | ATC.A.G.A.G.A.T | | | | | | | | | |
| Squalus acanthias 3 | ATC.A.G.A.G.A.T | | | | | | | | | |
| Squalus acanthias 4 | ATC.A.G.A.G.A.T | | | | | | | | | |
| Squalus acanthias 5 | ATC.A.G.A.G.A.T | | | | | | | | | |
| Squalus acanthias 6 | ATC.A.G.A.G.A.T | | | | | | | | | |
| Squalus acanthias 7 | ATC.A.G.A.G.A.T | | | | | | | | | |
| Squalus acanthias 8 | ATC.A.G.A.G.A.T | | | | | | | | | |
| Squalus acanthias 9 | ATC.A.G.A.G.A.T | | | | | | | | | |
| Squalus acanthias 10 | ATC.A.G.A.G.A.T | | | | | | | | | |
| Squalus acanthias 11 | ATC.A.G.A.G.A.T | | | | | | | | | |
| Squalus acanthias 12 | ATC.A.G.A.G.A.T | | | | | | | | | |
| Hexanchus griseus 1 | T.CAT | | | | | | | | | |
| Hexanchus griseus 2 | T.CAT | | | | | | | | | |
| Prionace glauca 1 | T.C.AA | | | | | | | | | |
| Prionace glauca 2 | T.C.AA | | | | | | | | | |
| Prionace glauca 3 | T.C.AA | | | | | | | | | |
| Galeorhinus galeus 1 | G.C.T.A | | | | | | | | | |
| Heptranchias perlo 1 | AT.CAT | | | | | | | | | |
| Centroprorus sp. 1 | ACC.CAG.A.A.T | | | | | | | | | |

| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 | | | |
|--------------------------|--------|------------|--------|-------|---------|----------|------------|---------|----------|-----|---------------|----------|-------|
| Mustelus asterias 1 | ACTCAG | TACTTGAAAA | TCAGAA | TACAA | TTCTGAT | TAAATAAA | ATATTTATCG | AAAAATG | ACCCAGGA | TTT | CCTGATCAATGAA | CCCAAGTT | ACCCT |
| Mustelus asterias 2 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus griseus 1 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus griseus 2 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus griseus 3 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus griseus 4 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 1 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 2 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 3 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 4 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 5 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 6 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 7 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 8 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 9 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 10 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 11 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 12 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 13 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 14 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 15 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 16 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 17 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 18 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 19 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 20 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 21 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 22 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 23 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 24 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 25 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus manazo 1 | | | | | | | | | | | | | |
| Mustelus manazo 2 | | | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 1 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 2 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 3 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 4 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 5 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 6 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 7 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 8 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 9 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 10 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 11 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 12 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 13 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 14 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 15 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 16 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Scyliorhinus canicula 17 | T | AA | A | G | T | T | A | CCG | AT | | | | T |
| Squalus acanthias 1 | | | A | G | T | CG | G | A | C | C | A | T | T |
| Squalus cubensis 1 | | | A | T | CG | G | A | C | C | A | T | C | T |
| Squalus cubensis 2 | | | A | T | CG | G | A | C | C | A | T | C | T |
| Squalus cubensis 3 | | | A | T | CG | G | A | C | C | A | T | C | T |
| Squalus cubensis 4 | | | A | T | CG | G | A | C | C | A | T | C | T |
| Squalus cubensis 5 | | | A | T | CG | G | A | C | C | A | T | C | T |
| Squalus cubensis 6 | | | A | T | CG | G | A | C | C | A | T | C | T |
| Squalus cubensis 7 | | | A | T | CG | G | A | C | C | A | T | C | T |
| Squalus cubensis 8 | | | A | T | CG | G | A | C | C | A | T | C | T |
| Squalus cubensis 9 | | | A | T | CG | G | A | C | C | A | T | C | T |
| Squalus cubensis 10 | | | A | T | CG | G | A | C | C | A | T | C | T |
| Squalus cubensis 11 | | | A | T | CG | G | A | C | C | A | T | C | T |
| Squalus cubensis 12 | | | A | T | CG | G | A | C | C | A | T | C | T |
| Hexanchus griseus 1 | T | T | A | | AT | | A | C | | A | AA | T | |
| Hexanchus griseus 2 | T | T | A | | AT | | A | C | | A | AA | T | |
| Prionace glauca 1 | | A | | A | T | G | A | C | C | | T | | |
| Prionace glauca 2 | | A | | A | T | G | A | C | C | | T | | |
| Prionace glauca 3 | | A | | A | T | G | A | C | C | | T | | |
| Galeorhinus galeus 1 | | | | | | G | G | | | | A | | T |
| Heptranchias perlo 1 | T | T | A | | AT | | A | C | | A | AA | T | |
| Centrophorus sp. 1 | A | | | A | T | CG | G | A | C | C | A | T | T |

| | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | 510 |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Mustelus asterias 1 | AGGGATAACAGCGCAATCCCTTTC | CAGAGTTCCTATCGAAGAAAGGGTT | ACGACCTCGATGTTGGATCAGGACAT | CCCTAATGGTGCACCTGCTATTAAGGGTTCGTTTGTCAA | | | | | | | |
| Mustelus asterias 2 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus qriseus 1 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus qriseus 2 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus qriseus 3 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus qriseus 4 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 1 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 2 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 3 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 4 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 5 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 6 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 7 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 8 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 9 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 10 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 11 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 12 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 13 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 14 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 15 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 16 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 17 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 18 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 19 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 20 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 21 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 22 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 23 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 24 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus henlei 25 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus manazo 1 | | | | | | | | | | | |
| Mustelus manazo 2 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 1 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 2 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 3 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 4 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 5 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 6 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 7 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 8 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 9 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 10 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 11 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 12 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 13 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 14 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 15 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 16 | | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 17 | | | | | | | | | | | |
| Squalus acanthias 1 | | | | | | | | | | | |
| Squalus cubensis 1 | | | | | | | | | | | |
| Squalus cubensis 2 | | | | | | | | | | | |
| Squalus cubensis 3 | | | | | | | | | | | |
| Squalus cubensis 4 | | | | | | | | | | | |
| Squalus cubensis 5 | | | | | | | | | | | |
| Squalus cubensis 6 | | | | | | | | | | | |
| Squalus cubensis 7 | | | | | | | | | | | |
| Squalus cubensis 8 | | | | | | | | | | | |
| Squalus cubensis 9 | | | | | | | | | | | |
| Squalus cubensis 10 | | | | | | | | | | | |
| Squalus cubensis 11 | | | | | | | | | | | |
| Squalus cubensis 12 | | | | | | | | | | | |
| Hexanchus qriseus 1 | | | | | | | | | | | |
| Hexanchus qriseus 2 | | | | | | | | | | | |
| Prionace qlauca 1 | | | | | | | | | | | |
| Prionace qlauca 2 | | | | | | | | | | | |
| Prionace qlauca 3 | | | | | | | | | | | |
| Galeorhinus qaleus 1 | | | | | | | | | | | |
| Heptranchias perlo 1 | | | | | | | | | | | |
| Centrophorus sp. 1 | | | | | | | | | | | |

| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
|--------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Mustelus asterias 1 | ATTTAGCTCATGCTGGGCCATCCGTTGATTAGCCATCTTTTCCCTTCATTAGCCGGTATTTTCATCCATCTTAGCCTCAATTAATTTTATTACAACCAT | | | | | | | | | |
| Mustelus asterias 2 | | | | | | | | | | |
| Mustelus asterias 3 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 1 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 2 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 3 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 4 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 5 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 6 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 7 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 8 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 9 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 10 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 11 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 12 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 13 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 14 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 15 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 16 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 17 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 18 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 19 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 20 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 21 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 22 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 23 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 24 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 25 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 26 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 27 | | | | | | | | | | |
| Mustelus mustelus 28 | | | | | | | | | | |
| Mustelus punctulatus 1 | | | | | | | | | | |
| Mustelus punctulatus 2 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 1 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 2 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 3 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 4 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 5 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 6 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 7 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 8 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 9 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 10 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 11 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 12 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 13 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 14 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 15 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 16 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 17 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 18 | | | | | | | | | | |
| Scyliorhinus canicula 19 | | | | | | | | | | |
| Squalus acanthias 1 | | | | | | | | | | |
| Squalus blainville 1 | | | | | | | | | | |
| Squalus blainville 2 | | | | | | | | | | |
| Squalus blainville 3 | | | | | | | | | | |
| Squalus blainville 4 | | | | | | | | | | |
| Squalus blainville 5 | | | | | | | | | | |
| Squalus blainville 6 | | | | | | | | | | |
| Squalus blainville 7 | | | | | | | | | | |
| Squalus blainville 8 | | | | | | | | | | |
| Squalus blainville 9 | | | | | | | | | | |
| Squalus blainville 10 | | | | | | | | | | |
| Squalus blainville 11 | | | | | | | | | | |
| Squalus blainville 12 | | | | | | | | | | |
| Prionace glauca 1 | | | | | | | | | | |
| Prionace glauca 2 | | | | | | | | | | |
| Prionace glauca 3 | | | | | | | | | | |
| Galeorhinus galeus 1 | | | | | | | | | | |

