

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2021/4



ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra	V1-1808
Naslov	Uporaba tehnologije DNA za ugotavljanje poneverb v ribiških proizvodih z vrednotenjem socio ekonomskih vidikov
Vodja	11069 Lovrenc Lipej
Naziv težišča v okviru CRP	1.5.1. Uporaba tehnologije DNA za identifikacijo ribiških proizvodov in socioekonomski vidiki škode zaradi napačnega označevanja ribiških proizvodov
Obseg učinkovitih ur raziskovalnega dela	938
Cenovna kategorija	C
Obdobje trajanja	11.2018 - 10.2020
Nosilna raziskovalna organizacija	105 Nacionalni inštitut za biologijo
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	2790 Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	1 NARAVOSLOVJE 1.03 Biologija 1.03.03 Ekosistemi
Družbeno-ekonomski cilj	08. Kmetijstvo
Raziskovalno področje po šifrantu FORD	1 Naravoslovne vede 1.06 Biologija

2. Sofinancerji

	Sofinancerji		
1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano	
	Naslov	Dunajska cesta 22, Ljubljana	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Z razvojem ribištva in z njim povezane predelovalne dejavnosti se je celotna veriga od ulova, predelave in distribucije do potrošnika zelo podaljšala. Zato je ribiška panoga zelo občutljiva na poneverbe v celotni verigi od ribolova do ali vzreje v akvakulturi do maloprodaje. Med njimi so najpogostejše zamenjave vrst (nenamerne zaradi velike podobnosti vrst in zato težke taksonomske določitve ali namerne, da se prikrije ilegalni lov, ali da se prodaja manj kakovostne vrste kot bolj kakovostne), ki vplivajo na kakovost proizvoda. Ribiški proizvodi so po ugotovitvah INTERPOLA in Evropske komisije za hrano zelo podvrženi goljufijam zaradi vedno daljše oskrbne verige, lova na vedno bolj oddaljenih območjih, iztovora in predelave v tretjih državah (npr. filetiranje, ki je opravljeno izven teritorialnih voda) in nato ponovne predelave in distribucije do maloprodajnih mest. Zaradi spremenjenih prehranjevalnih navad so se zelo uveljavili izdelki za hitro pripravo (npr. ribje palčke), ki vsebujejo zelo predelane surovine in je njihovo vrstno sestavo težko ugotavljati. Zaradi škandalov s ponarejanjem hrane in zaradi vedno večjega prelova na globalni ravni se je pojavila potreba po večjem nadzoru ter okrepila zavest potrošnikov, da se natančneje preverjajo ribiški proizvodi. EK je izdala uredbo, ki predpisuje informacije, ki jih mora vsebovati deklaracija, da se potrošnik seznani z izvorom, načinom lova, ribolovnim območjem, ko kupuje ribe. Sledljivost se izgubi pri predelanih proizvodih. Z razvojem tehnologije DNA so se razvili novi pristopi in tehnike za ugotavljanje poneverb v ribiških proizvodih. Nekatere od teh tehnologij so v uradni veljavi kot je ugotavljanje identitete vrst z barkodiranjem COI. Ob času prijave projekta v Sloveniji ni bilo podrobnih rezultatov o tem, kaj se dogaja v maloprodaji, z barkodiranjem se preverja filete rib, ki so v maloprodaji, na zahtevo Urada za varno hrano (MKGP) ali pa na zahtevo prodajalca. Obseg problema v Sloveniji še ni bil raziskan, prav tako nobena študija ne poroča o obsegu poneverb v ribiških proizvodih v Sloveniji. Razvoj metodologij, ki temeljijo na tehnologijah uporabe DNA, obetajo da bo odkrivanje poneverb lažje, hitreje in dostopno večjemu številu laboratorijev in raziskovalcev. Tako je možno analizirati ribiške proizvode brez predhodnega taksonomskega znanja in tudi tiste proizvode, kjer takšnega znanja ni možno uporabiti zaradi bioloških posebnosti ali ker je riba predelana, filetirana ali toplotno obdelana. Zelo je tudi pomembno mednarodno sodelovanje med različnimi deležniki ter raziskovalci, NGO in potrošniškimi organizacijami. Projekt se osredotoča na razvoj molekularnih testov, ki temeljijo na DNA za identifikacijo nekaterih vrst in ribiških proizvodov. To je prvi takšen projekt v Sloveniji.

ANG

With the development of fisheries and related processing, the entire chain from catching to processing and distribution to the consumer has been greatly extended. As a result, the fishing industry is highly susceptible to fraud throughout the chain, from fishing to aquaculture rearing to retailing. Most commonly, species are substituted (unintentionally due to high species similarity and therefore difficult taxonomic identification, or intentionally to cover up illegal hunting or to sell lower-quality species as higher-quality ones), which affects product quality. According to INTERPOL and European Food Commission, fishery products are highly susceptible to fraud due to the increasingly long supply chain, fishing in increasingly remote areas, landing and processing in third countries (e.g. fileting outside territorial waters) and subsequent further processing and distribution to retailers. Due to changes in eating habits, quickly prepared products (e.g. fish fingers) containing highly processed raw materials and whose species composition is difficult to determine have become very popular. Food adulteration scandals and increasing global overfishing have necessitated greater scrutiny and raised consumer awareness of the need for closer inspection of fishery products. The EC has issued a regulation stipulating what information must be included in the declaration so that the consumer is informed about the origin, the fishing method, the fishing area when buying fish. Traceability is lost in processed products. With the development of DNA technology, new approaches and techniques have been developed to detect counterfeiting in fishery products. Some of these technologies are in place, such as species identification by COI barcoding. At the time of the project application in Slovenia, there were no detailed results on what happens in retail, barcoding checks of fish fillets that are in retail, at the request of the Food Safety Authority (MKGP) or at the request of the seller. The extent of the problem in Slovenia has not yet been studied and no study reports on the extent of misappropriation of fishery products in Slovenia. The development of methods based on technologies using DNA promises to make the detection of counterfeits easier, faster and accessible to a larger number of laboratories and researchers. It will thus be possible to analyze fishery products without prior taxonomic knowledge and also those products where such knowledge cannot be used due to biological peculiarities or because the fish is processed, filleted or heat-treated. International cooperation between different stakeholders and researchers, NGOs and consumer organizations is also very important. The project focuses on the development of

DNA-based molecular tests to identify specific species and fishery products. This is the first such project in Slovenia.
--

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela oz. ciljev raziskovalnega projekta²

Pregled ponudbe ribiških proizvodov na slovenskem trgu in identifikacija najbolj tveganih vrst rib in proizvodov

Vzorčenje je bilo načrtovano v 10 slovenskih mestih (Piran, Izola, Koper, Ljubljana, Nova Gorica, Kranj, Celje, Novo Mesto, Maribor, Murska Sobota) v ribarnicah in v 7 velikih trgovskih verigah. Ribiški proizvodi, ki so bili vzorčeni so bili ribje konzerve sardel, papalin, inčunov (36 različnih konzerv), lignje (sveže, zamrznjene ali predelane), filete tuna, filete lososa, in predelane ribje proizvode. Lignje smo vzorčili v 7 slovenskih mestih (Izola, Koper, Solkan, Nova Gorica, Celje, Maribor in Murska Sobota), med vzorčnimi mesti sta bili 3 majhne ribarnice (v Izoli, Solkanu, Mariboru), trgovske verige (Spar v Izoli in Murski Soboti, Lidl v Kopru, Hofer v Kopru, Merkator v Kopru in Nova Gorica, Tuš v Celju, E. Leclerc v Mariboru). Skupaj smo nabrali 17 vzorcev lignjev v 11 prodajalnah (3 ribarnice in 6 velikih trgovskih verig). Po večini mest ni več manjših ribarnic (npr. v Novem mestu, Murska Sobota), ampak so ribarnice v sklopu trgovskih verig kot so Spar in E. Leclerc, zato smo morali tudi spremeniti režim vzorčenja. Po vzorčenju smo vse vzorce anonimizirali. Zbrali smo naslednje podatke: datum vzorčenja, lokacija, ime prodajalne, ime proizvoda (kot je bilo zapisano na deklaraciji), trgovsko ime na deklaraciji, znanstveno ime vrste, oblika ponudbe, veterinarski žig, ribolovno območje, država porekla, ribolovno orodje, način proizvodnje, cena, shranjevanje. Vzorčevanje je potekalo od 11. 02.2019 do 20. 03.2019.

Razvoj metod osnovanih na tehnologijah DNA za odkrivanje poneverb v ribiških proizvodih in vpeljava metod v prakso

Ob pregledu literature se je pokazalo, da je malo podatkov v literaturi za vrste, ki ne zavzemajo velikih deležev v ulovu, prav tako zanje ni razvitih molekularnih DNA sond za identifikacijo vrst, bodisi so uporabljene metode že zastarele. Sem sodi veliko taksonomskih skupin in med njimi so tudi mehkužci kot so lignji kot tudi za druge skupine rib (male pelagične vrste, ki so konzervirane), najbolj so obdelani in tudi komercialno razpoložljivi testi za vrste, ki so prelovljene ali zelo izkoriščane (tuni, morski list, trska, lososi) ter vrste po katerih je veliko povpraševanje (nekatero vrst rib kot so kirnje in hlastači v hamburgerjih). De novo smo razvili kvantitativen test, ki temelji na Q-PCR za male pelagične vrste (sardela *Sardina pilchardus*, papalina *Sprattus sprattus*, inčun *Engraulis encrasicolous*), ki omogoča razlikovanje med vrstami v biološkem materialu, ki je zelo degradiran (ribje konzerve) in so priljubljena delikatesa. Na podlagi bioinformatične obdelave 16S sekvenc vrst iz družine Clupeide smo pripravili nabor specifičnih začetnih oligonukleotidov in sond za razlikovanje prej naštetih vrst ter optimizirali postopek od izolacije DNA do Q-PCR testa.

Lignji so ena od priljubljenih delikates na slovenskem tržišču, prav tako se njihov ulov povečuje na svetovni ravni, ekonomsko pomembnih vrst je okoli 40 vrst, ki pa jih je taksonomsko težko ločiti. Pregledali smo ponudbo lignjev na slovenskem tržišču, skladnost deklaracije s *Pravilnikom o trgovskih imenih rib* (Ur. L. RS, št. 46/2005) ter nato naredili barkodiranje vzorcev za zanesljivo potrditev vrste. Iz rezultatov barkodiranja smo dobili sekvence DNA iz vzorcev na tržišču in iz referenčnih vzorcev (*Loligo vulgaris*, *Illex coindetii*, *Loligo forbesi*, *Todarodes sagittastus*), ki smo jih uporabili za bioinformatično analizo skoraj 500 sekvenc za dizajn začetnih oligonukleotidov in sond za LAMP in za Q-PCR. Vse DNA sekvence smo najprej poravnali in odstranili tehnično neustrezne, nato smo iz preostalih naredili filogenetsko analizo, da smo preverili ali so vrste dovolj ločene, da je smiselno DNA sekvence uporabiti za molekularni test. Obe metodi sta zahtevni v začetni fazi, ko je potrebno pripraviti nabor DNA sekvenc ter nato pri analizi in dizajnu sond in začetnih oligonukleotidov. Razvili smo tudi kvantitativni test, ki temelji na Q-PCR za razločevanje vrste *Loligo vulgaris* od drugih vrst. Za izbrane vrste (*Doryteuthis gahi*, *Dosidicus gigas*, *Illex coindetii*, *Loligo forbesi*, *Loligo reynaudii*, *Loligo vulgaris*, *Uroteuthis chinensis*) smo najprej prenesli zaporedja naslednjih genov: 16S rDNA, 18S rDNA, cytb in COI. Primerjava je vključevala vse sorodne vrste in vrste najdene na tržišču ob času vzorčevanja, da smo zagotovili specifičnost testa. Izbrali smo regijo COI (648 bp), izbrali najbolj zanesljiva zaporedja in jih uporabili za razvoj začetnih oligonukleotidov za test LAMP.

Vzpostavitev zbirke referenčnega materiala, dopolnitve Pravilnika o trgovskih imenih rib (Ur. L. RS, št. 46/2005)

Vzorci (tkiv in izolirana DNA) in embalažo (fotografije embalaže) smo arhivirali z vsemi metapodatki (datum vzorčenja, lokacija, ime prodajalne, ime proizvoda (kot je bilo zapisano na deklaraciji), trgovsko ime na deklaraciji, znanstveno ime vrste, oblika ponudbe, veterinarski žig, ribolovno območje, država porekla, ribolovno orodje, način proizvodnje, cena, shranjevanje), nukleotidna zaporedja (COI, 18S in 28S) deponirali v GenBank in bodo postale javne ko bodo objavljeni članki. Pridobili smo referenčne vzorce *Loligo vulgaris*, *Alloteuthis media*, *Illex coindetii*, *Loligo forbesii* in *Todarodes sagittatus* (pridobljeni od dr. L. Allcock, NUI Galway, Irska), ki smo jih arhivirali skupaj z nabranimi vzorci.

Da bi ugotovili v kolikšni meri veljavni Pravilnik o trgovskih imenih rib (Ur. L. RS, št. 46/2005) ustreza sedanjim razmeram in v kolikšnem obsegu deklaracije vsebujejo veljavna trgovska imena smo naredili podrobno analizo deklaracij, ki opisujejo vzorce lignjev. Preverjali smo skladnost deklaracije, ki spremlja prodajane lignje s Pravilnikom o trgovskih imenih rib (Ur. L. RS, št. 46/2005), ki so bili naprodaj v februarju in marcu leta 2019 po različnih prodajalnah v 10 slovenskih mestih. Najprej smo preverili skladnost zapisanih trgovskih imen in znanstvenih imen med deklaracijo proizvoda in veljavnim Pravilnikom o trgovskih imenih rib (Ur. L. RS, št. 46/2005). Slovensko trgovsko ime je bilo navedeno v 94% (16/17) vzorcev, enako velja za znanstveno ime (94%, 16/17), v enem primeru ni bilo navedeno slovensko trgovsko ime in v drugem primeru ni bilo navedeno znanstveno ime. V 12 (70%) primerih je bila navedena šifra FAO za ribolovno območje, ter v 11 (65%) primerih je bilo napisano z besedo območje ribolova, država porekla je bila navedena v 10 (59%) primerih. Ribolovno orodje je bilo navedeno v 14 (82%) primerih (v 2 primerih trnki in vrvici ter v 12 primerih vlečne mreže). Veterinarski žig je bil na 2 proizvodih, v 3 primerih so jih prodajali kot sveže ulovljene (kot jadranske lignje (*Loligo vulgaris*), kot *Loligo* spp., in kot lignji totan (*Todarodes sagittatus*)), 7 vzorcev je bilo zamrznjenih, 6 vzorcev je bilo ponovno odmrznjenih, 1 vzorec so bili lignji konzervirani v olju. Preverjanje skladnosti med zapisi na deklaracijah za vzorce lignjev in med Pravilnikom o trgovskih imenih rib (Ur. L. RS, št. 46/2005) pokaže, da ima 65% (11/17) vzorcev navedene podatke na deklaraciji neskladne s Pravilnikom o trgovskih imenih rib (Ur. L. RS, št. 46/2005), bodisi da se ne ujema navedba slovenskega trgovskega imena ali znanstvenega imena z imeni v pravilniku. Nato smo preverili skladnost znanstvenih imen v Pravilniku o trgovskih imenih rib (Ur. L. RS, št. 46/2005) z veljavnimi znanstvenimi imeni v WORMS. Pravilniku o trgovskih imenih rib (Ur. L. RS, št. 46/2005) vsebuje 13 zapisov o lignjih, od tega so 3 zapisi na ravni rodu in vsi trije rodovi so veljavni, 10 zapisov je na ravni vrste in od teh je 8 vrst veljavnih, medtem ko sta 2 vrsti premeščeni v drug rod. Barkodiranje smo opravili pri vseh vzorcih (potrditev identitete vrste s sekvenciranjem COI) smo ugotovili, da je na 41% (7/17) vzorcih bila navedena vrsta ista kot potrjena z barkodiranjem (primerjali smo znanstveno ime na deklaraciji in barkodo). Glavnina (7 vzorcev je pripadalo vrsti *D. gahi* (patagonski lignji), 2 vzorca vrsti *L. vulgaris*, 2 *Uroteuthis duvaucelii*, 2 *Uroteuthis chinensis*, 2 *Illex coindetii* in eden vzorec *Dosidicus gigas*, 4 vzorci so bili označeni samo kot *Loligo* spp. in po barkodiranju smo identificirali naslednje vrste: *L. vulgaris*, *D. gahi*, *U. chinensis* in *I. coindetii*. Preverili smo tudi ujemanje med navedenim FAO ribolovnim območjem na deklaraciji in ribolovnim območjem vrste kot je bila identificirana z barkodiranjem: v 53% se je navedeno FAO območje ujemale z arealom vrste, in v 47% je bilo navedeno napačno ribolovno območje. Rezultati so izpostavili zastarelost znanstvenih imen (uporaba starih sinonimov) v Pravilniku o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov (Ur. L. RS, št. 46/2005), kar otežuje sledenje po podatkih, ki so navedeni na deklaraciji. Problematična je uporaba zgolj rodovnega imena (v pravilniku so: *Loligo* spp., *Illex* spp., *Ommastrephes* spp), ki zajema vse vrste v rodu, kar je izjemno nenatančno. Nenatančno navajanje podatkov na deklaraciji ima daljnosežne posledice ne samo za potrošnike, ampak tudi v upravljanju ribištva in vpliva na zanesljivost zbranih podatkov in uradne statistike. Nezanosljivi podatki povečujejo negotovost v statističnih izračunih ter vplivajo na upravljanje ribištva, slabo upravljanje ribištva lahko vodi v prelov staležev. Pripravili smo dopolnitve Pravilnika o trgovskih imenih rib (Ur. L. RS, št. 46/2005): priporočamo da je Pravilnik v elektronski obliki, da bi ga bilo možno sproti popravljati in dopolnjevati, uskladiti je potrebno trgovska imena z znanstvenimi imeni, ki skladna z najnovejšimi taksonomskimi spoznanji, kot orodje se lahko uporabi vir na spletni strani EK [List of commercial and scientific name of species](https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/species_en?sn=14802) https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/species_en?sn=14802.

Analiza socioekonomskega vidika napačnega deklariranja in označevanja ribiških

proizvodov

V raziskavo (semistrukturiran intervju) je bilo vključenih 15 intervjuvancev iz različnih organizacij in državnih organov, ki se ukvarjajo z ribištvom ali delujejo na trgu rib v Sloveniji. Intervjuji so bili izvedeni v časovnem razponu od junija 2019 do januarja 2020. Sodelovali so strokovnjaki iz naslednjih organizacij: Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Zavod za ribištvo Slovenije, Inšpektorat za ribištvo, Ribiška zveza Slovenije, Kmetijsko gospodarska zbornica Slovenije, Varuh odnosov v verigi preskrbe s hrano, Nacionalni inštitut za biologijo, enota Morska biološka postaja Piran, Zveza potrošnikov Slovenije, Gospodarska zbornica Slovenije, Racoon d. o. o. (center za promocijo in pospeševanje športnega ribolova in ribiškega turizma), WWF Adria, predstavnik ribičev in ribič. Intervjuji so trajali okoli 40 minut, nekateri so bili daljši od 60 minut. Z intervjuji smo pridobili primarne podatke za raziskovanje, ki je vključevalo različne vidike in segmente ribiškega trga v Sloveniji, s poudarkom na socio-ekonomskih dejavnikih. Preučevali smo ribolov in vzrejo školjk ter rib v morju in v celinskih vodah, povezovanje ribištva s turizmom, predelavo ribiških izdelkov, zlorabe na ribiškem trgu in sorodne teme kakor tudi možnosti za trajnostni razvoj ribištva v slovenskem morju in v celinskih vodah. Rezultati intervjujev so nam dali vpogled v vrste težav, ki so prisotne in možne rešitve kot so jih predvideli različni deležniki povezani s trgom rib. Analiza odgovorov je pokazala, da ima največ možnosti za razvoj akvakultura, pri čemer je treba upoštevati podnebne spremembe in razpoložljiv prostor; možen je razvoj novih prehranskih proizvodov ter razširiti ponudbo rib; če se poveča povpraševanje po ribah se bo povečal uvoz ribiških proizvodov; mnogi intervjuvanci slabo poznajo principe sledljivosti v ribištvu in še manj razpoložljive metodologije; poudarili so pomen dostopa do zanesljivih informacij. Raziskava je bila predstavljena na 8. konferenci agrarnih ekonomov DEAS v letu 2020 (Mavrič in sod., 2020) in v magistrski nalogi (Mavrič, 2020), kjer je bilo izpostavljeno, da v Sloveniji primanjkuje poglobljenega raziskovanja na področju ribištva in z njim povezanih dejavnosti. Rezultati so še podrobneje obdelani in v prispevku Mavrič in sod., 2020, ter v monografiji, ki je bila predložena na razpis ARRS za sofinanciranje (Mavrič in sod., v pripravi).

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Prehranska varnost in zaščita potrošnikov je strateškega pomena zaradi številnih ogrožujočih dejavnikov, ki vplivajo na prelov ribjih fondov. Slovenski trg se ne more oskrbeti samo s slovenskim ribolovom, ampak je v glavnem odvisen od uvoza, kar pomeni daljše oskrbne verige v katerih lahko prihaja do napak ali celo namernega prikrivanja pravih podatkov (zamenjave vrst, prikrivanja geografskega izvora in ribolovnih orodij, celo prikrivanja ilegalnega ribolova). Zaradi tega mora biti zagotovljena sledljivost in nadzor v celotni oskrbni verigi, kar je v ribištvu izjemno zahtevna naloga zaradi velikega števila ribolovnih vrst ter biološke variabilnosti znotraj vrst. Zakonodaja ES in nacionalna zakonodaja predpisuje kateri podatki iz oskrbne verige morajo biti dostopni potrošnikom na deklaraciji, da se lahko odločijo za preiščljiven nakup. Pregledali smo ponudbo na slovenskem tržišču in se osredotočili na vsebino in skladnost podanih informacij. Naše ugotovitve kažejo, da je 40% ribiških proizvodov slabo opremljenih z informacijami kar je primerljivo z rezultati dosedanjih študij po evropskih državah. Identiteto vrst smo preverjali z barkodiranjem, opravili še obsežne bioinformatične in filogenetske analize vrst, ki so bile navedene na proizvodih ter tudi tistih vrst, ki smo jih identificirali po barkodiranju. Šele po natančni filogenetski analizi smo pripravili dokončen set DNA sekvenc iz ustreznih DNA markerjev (COI, 16S), ki so služili za nadaljno bioinformatično analizo in za dizajn *de novo* molekularnih testov (Q-PCR, LAMP). Zaradi velikega števila ribolovnih vrst poteka *de novo* dizajn molekularnih testov glede na regionalno porabo, kar pomeni da se raziskovalci posvetijo regionalno najpomembnejšim vrstam, ki so v neki regiji na voljo, bodisi da so to vrste, ki jih lovijo lokalno ali pa uvožene. V Sloveniji je največ ribiških proizvodov iz uvoza, kar pomeni da je oskrbna veriga daljša in tudi več možnosti za nepravilnosti, sledljivost pa je težje zagotavljati. Le manjši delež izvira iz lokalnega ribištva kjer je sledljivost lažje zagotavljati, ker gre za prodajo celih rib. V Sloveniji manjka specifičnih molekularnih testov za hitro identifikacijo vrst, ki se morajo iz raziskovalne uporabe prenesti v uporabo za nadzor nad ribiškimi proizvodi, predvsem tistimi, ki so iz uvoza. V raziskavi nas je zanimalo kakšna je osveščenost deležnikov, ki sodelujejo v ribištvu in posredno ali neposredno sodelujejo v oskrbni verigi in njihova vizija prihodnjega razvoja ribištva. Pokazalo se je, da je ozaveščenost in pomen sledljivosti večini deležnikov slabo poznan, možnosti razvoja vidijo predvsem v akvakulturi in v novih nišnih proizvodih. Raziskava je pokazala, da je potrebna modernizacija v dostopu do informacij za potrošnike in za vse člene v oskrbni verigi, vključno z nadzornimi organi (hiter dostop preko spleta, osveževanje informacij), promocija kratkih oskrbnih verig ter vključevanje domačih raziskovalcev, ki lahko dizajnirajo molekularne teste glede na potrebe na trgu rib v Sloveniji.

6. Spremembe programa dela raziskovalnega projekta oziroma spremembe sestave projektne skupine⁴

Sprememb v sestavi projektne skupine ni bilo.

7. Najpomembnejši dosežki projektne skupine na raziskovalnem področju⁵

Dosežek			
1.	COBISS ID	1541983172	Vir: vpis v obrazec
	Naslov	SLO	MAVRIČ, Alex, RAMŠAK, Andreja, BOJNEC, Štefan. Trg rib in ribištvo v Sloveniji. V: PRIŠENK, Jernej (ur.). Razvojni vidiki prenosa znanja v skupni kmetijski politiki po letu 2020 : 8. konferenca DAES : Maribor, 20.-21. februar 2020. 8. konferenca DAES, Maribor, 20.-21. februar 2020. 1. izd. Maribor: Društvo agrarnih ekonomistov Slovenije - DAES, 2020. Str. 137-148, ilustr. ISBN 978-961-91094-9-6. http://www.daes.si/Splet/8.%20konferenca%20DAES%20-%20Zbornik.pdf .
		ANG	MAVRIČ, Alex, RAMŠAK, Andreja, BOJNEC, Štefan. Fish market and Fishery in Slovenia. In: PRIŠENK, Jernej (ed.). Development aspects of knowledge transfer in the common agriculture politics after 2020: Maribor, 20.-21. februar 2020. 8. th conference DAES, Maribor, 20.-21. februar 2020. 1. ed. Maribor: Association of Agrarian Economists of Slovenia - DAES, 2020. pp. 137-148, ilustr. ISBN 978-961-91094-9-6.

Dosežek		
		http://www.daes.si/Splet/8.%20konferenca%20DAES%20-%20Zbornik.pdf .
Opis	SLO	Prispevek analizira ribištvo in trg rib v Sloveniji, na podlagi primarnih in sekundarnih podatkov pridobljenih iz intervjujev in se osredotoča na različne vidike ribištva in trga rib v Sloveniji s poudarkom na socio-ekonomskih dejavnikih, problemih in anomalijah na trgu, ekoloških vidikih ter drugih dejavnikih trajnostnega razvoja. Problemi in odstopanja v ribištvu in na trgu rib so povezani z okoljevarstvom in izvajanjem trajnostnega razvoja, s prelovom in z nekaterimi neučinkovitimi ukrepi v upravljanju ribištva, težavami v sledljivosti rib v vrednosti verigi in morebitnem goljufanju kupcev z napačnimi informacijami in cenovno-kakovostnimi zavajanjem. Prispevek sklone z ugotovitvami, implikacijami in možnostmi, kako bi lahko izboljšali stanje v ribištvu in na trgu rib v Sloveniji.
	ANG	The paper analyses fisheries and the fish market in Slovenia, based on primary and secondary data from interviews, and focuses on various aspects of fisheries and the fish market in Slovenia, with an emphasis on socio-economic factors, market problems and anomalies, ecological aspects and other factors of sustainable development. Problems and anomalies in fisheries and the fish market are related to environmental sustainability and the implementation of sustainable development, overfishing and some ineffective measures in fisheries management, problems in the traceability of fish in the value chain, and possible customer fraud through misinformation and price-quality misrepresentation. The paper concludes with conclusions, implications and options on how to improve the situation in fisheries and the fish market in Slovenia.
Objavljeno v		8. konferenca DAES : Maribor, 20.-21. februar 2020. 8. konferenca DAES, Maribor, 20.-21. februar 2020. 1. izd. Maribor: Društvo agrarnih ekonomistov Slovenije - DAES, 2020. Str. 137-148, ilustr. ISBN 978-961-91094-9-6. http://www.daes.si/Splet/8.%20konferenca%20DAES%20-%20Zbornik.pdf .
Tipologija		1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci
2.	COBISS ID	31725315 Vir: vpis v obrazec
Naslov	SLO	RAMŠAK, Andreja, BREZNIK, Bety. Kako lahko mali ribolov izkoristi uporabo tehnologije DNK? : predavanje na simpoziju The future of small-scale fishery markets in the Mediterranean: social, environmental, economic and governance aspects, Izola, 6 October 2020
	ANG	RAMŠAK, Andreja, BREZNIK, Bety. How can small scale fishery benefit from DNA technology applications? : lecture at the symposium The future of small-scale fishery markets in the Mediterranean: social, environmental, economic and governance aspects, Izola, 6 October 2020.
Opis	SLO	Goljufije v ribištvu, ribogojstvu in predelavi so danes eno ključnih vprašanj, saj so zahteve po zagotavljanju hrane za naraščajoče prebivalstvo zelo visoke. Po drugi strani pa so goljufije z ribiškimi proizvodi slabo raziskane zaradi manj razvitih metodologij za odkrivanje goljufij in velikega števila ribjih vrst v živilskopredelovalni industriji. Razvoj molekularnih testov ponuja možnost komercializacije, inšpekcijske službe in komercialni laboratoriji pa jih lahko uporabljajo kot metodo za potrditev identitete proizvoda. Strategija pametne specializacije v Sloveniji je to temo vključila v prednostno področje "Naravni in tradicionalni viri za prihodnost" in je prepoznana kot pomembno vprašanje. V Sloveniji obstaja v živilskopredelovalni industriji določen interes za razvoj hitrejših, cenejših in zanesljivejših metod, s katerimi bi bilo mogoče določiti izvor in vrstno sestavo surovin, kupljenih na mednarodnem trgu za nadaljnjo predelavo. Zmanjšanje goljufij in izboljšanje sledljivosti bi lahko bila priložnost za lokalne ribiče. Ti bodo lahko

Dosežek		
		razviti svojo lastno blagovno znamko in bi lahko bili bolj konkurenčni na trgu, kar bi jim olajšalo prodajo njihovih proizvodov po višjih cenah. Uvedba zanesljivih testov, njihova prepoznavnost in zaupanje omogočajo povečanje zaupanja potrošnikov v blagovno znamko, ki potrjujejo njeno kakovost in preglednost proizvodnega procesa.
	ANG	Frauds in fisheries, aquaculture and processing are nowadays one of the key issues, because the demands to provide food for growing population are very high. On the other hand, the frauds of fishery products are poorly researched due to less developed methodologies for detecting frauds and large number of fish species in the food processing industry. Developing of molecular tests offer the possibility of commercialization, and inspection services and commercial laboratories can use them, as a method to confirm the identity of the product. The Smart Specialization Strategy in Slovenia included this topic into the priority area "Natural and traditional resources for the future" and is recognised as an important issue. In Slovenia, there is a some amount of interest in the food processing industry for developing of faster, cheaper and reliable methods, that would be able to determine the origin and species composition of raw ingredients bought on the international market for further processing. Reducing fraud and improving the traceability could be an opportunity for local fishermen. They will be able to develop their own brand and they could be more competitive on the market, making it easier to sell their products with the higher prices. The introduction of reliable tests, their visibility and trust enables the possibility to raise consumer confidence in the brand, which confirm its quality and transparency in production process.
	Objavljeno v	The future of small-scale fishery markets in the Mediterranean: social, environmental, economic and governance aspects, Izola, 6 October 2020.
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci

8. Najpomembnejši dosežek projektne skupine na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti⁶

Dosežek		
1.	COBISS ID	5205071 Vir: vpis v obrazec
Naslov	SLO	Iz morja do vilic - ali vemo kaj dobimo na krožnik? : predavanje na prireditvi Noč ima svojo moč, Morska biološka postaja, Piran, 27. 9. 2019, predavatelj Andreja Ramšak
	ANG	From sea to fork - do we know what's on our plate? : lecture at the event Noč ima svojo moč, Marine Biology Station, Piran, 27. 9. 2019, lecturer Andreja Ramšak
Opis	SLO	Širši javnosti je bila na poljuden način predstavljena problematika poneverb ribiških proizvodov in vpliva na pravice potrošnikov ter njihovo zdravje. Namen je osveščanje laične javnosti ter povečanje znanja na tem področju, kajti poznavanje ribolovnih vrst in sledljivosti je izjemno nizko, kar dokazujejo številne študije. Predavanje je imelo velik vpliv in ga je obiskala tudi novinarka Radia Študent in ga nato predstavila v oddaji Frekuensi della scienza, utrinki z Noči raziskovalcev.
	ANG	The issue of fraudulent fishery products and the impact on consumers' rights and their health was presented to the general public in an informative manner. The aim is to raise awareness among the general public and to increase knowledge in this area, as knowledge of fisheries species and traceability is extremely low, as demonstrated by numerous studies. The lecture had a great impact and was also visited by a Radio Student journalist and then featured in the programme Frekuensi della

	Dosežek	
		scienza, highlights from the Researchers' Night.
	Šifra	F.27 Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine
	Objavljeno v	predavanje na prireditvi Noč ima svojo moč, Morska biološka postaja Piran, 27.9.2019
	Tipologija	3.25 Druga izvedena dela
2.	COBISS ID	533435 Vir: vpis v obrazec
	Naslov	<i>SLO</i> O morju vemo manj kot o Marsu. Ljubljana: Radiotelevizija Slovenija javni zavod, 2019. 1 spletni vir (5 zvočnih datotek). Terenski Val. https://val202.rtvsl.si/2019/11/morska-bioloska-postaja-piran/ .
		<i>ANG</i> We know less about the sea than we do about Mars. Ljubljana: Radiotelevizija Slovenija javni zavod, 2019. 1 spletni vir (5 zvočnih datotek). Terenski Val. https://val202.rtvsl.si/2019/11/morska-bioloska-postaja-piran/ .
	Opis	<i>SLO</i> Problematika je bila predstavljena v radijskem intervjuju na Val 2020 v zelo poslušanem terminu in je dosegla veliko število poslušalcev.
		<i>ANG</i> The issue was featured in a radio interview on Val 2020 in a very popular slot and reached a large number of listeners.
	Šifra	F.27 Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine
	Objavljeno v	Radiotelevizija Slovenija javni zavod, 2019. 1 spletni vir (5 zvočnih datotek). Terenski Val. https://val202.rtvsl.si/2019/11/morska-bioloska-postaja-piran/ .
	Tipologija	3.11 Radijski ali TV dogodek

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine²

Predstavljeni so bili principi sledljivosti v ribištvu za ključne deležnike ribiči, akvakultura in nadzorni organi (Piran 2018), sodelovanje na problemski konferenci Morje kdo bo tebe ljubil (27.5. 2019 v panelu Ribišstvo, Koper) in Radio Študent: Utrinki z Noči raziskovalcev na Radiu Študent v oddaji Frekuensi della Scienza.

Predstavitev problematike v okviru študijskih programov: na EMUNI za študente Mednarodne poletne šole Summer School: Blue Economy in the Euro-Mediterranean Region, predstavitev problematike ilegalnega ribolova ter sledljivosti v ribištvu; na vabljenem seminarju 82415- HOT TOPICS IN MARINE SCIENCES, Univerza v Bologni, (od 21. do 25. januarja 2019), Oddelek za biologijo, geologijo in morske znanosti.

Magistrski nalogi: RUBINIČ, Marko. Visokoosjetljivi DNA testovi za određivanje zamjena vrsta u plodovima mora. 2020

MAVRIČ, Alex. Trg rib in ribišstvo v Sloveniji : magistrska naloga. Koper: 2020.

diplomska naloga: GRBEC, Gregor. Razvoj metode LAMP za potrjevanje pristnosti živil iz lignjev vrste *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1798), 2020

Publikacije v recenziji

Alex Mavrič, Štefan Bojnec, Andreja Ramšak, Izzivi razvoja ribišstva v Sloveniji (oddano na razpis ARRS za sofinanciranje monografij v letu 2021); v monografiji smo povzeli rezultate in jih umestili v širši kontekst ribišstva in akvakulture, in bo obogatila znanje, kajti ribišstvo in akvakultura ter vidiki sledljivosti so v Sloveniji slabo raziskani.

Alex Mavrič, Štefan Bojnec, Andreja Ramšak. SOCIOECONOMIC AND ENVIRONMENTAL IMPORTANCE OF THE FISH MARKET AND FISHERIES IN SLOVENIA (v Annales)

dr. Andreja Ramšak, Zamenjave vrst med lignji na slovenskem tržišču, predavanje 14. 5. 2021, GZS, Ljubljana, projekt Qualify-Interreg Europe, EU Regional Development Fund.

V vabljenem predavanju bo predstavljena problematika sledljivosti in poneverb ter rezultati dobljeni z analizo ponudbe in molekularnih testov za identifikacijo lignjev na slovenskem tržišču.

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

10.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Zapletena in dolga veriga od ulova do potrošnikove mize je zelo ranljiva in zahteva izjemen nadzor na večih nivojih, da se zagotovi sledljivost. Številni dejavniki kot prekomerno izkoriščanje morja, tekmovalnost v ribiški industriji, pritisk za zniževanje stroškov in večanje dobička, zahteve potrošnikov po raznovrstni ponudbi in nizkih cenah še povečuje pritisk, ki vodi v različne odklone. Polovica svetovnega ulova je procesirana takoj po ulovu na plovilih ali po iztovoru kar povečuje potrebo po forenzičnih laboratorijih, ki zmorejo identifikacijo ribolovnih organizmov. Identifikacija vrst in geografski izvor ni pomembna samo za trg rib, kjer se proizvodi prodajajo, ampak tudi za upravljalce v ribištvu, da z ukrepi preprečujejo prelov in illegalen ter neprijavljen ribolov. Zaradi obsežnega trgovanja in hitre pokvarljivosti ribolovnih organizmov je izjemna potreba po izdelavi hitrih, zanesljivih identifikacijskih testov, ki jih je možno izvajati kjerkoli v oskrbni verigi. V zadnjem desetletju smo priča razvoju testov, ki za razločevanje uporabljajo specifične dele genomske DNA, pri čemer je največja ovira veliko število ribolovnih vrst (ca. 2000) ter njihovo poznavanje. Zaradi tega razvoj testov sledi regionalni potrošnji določenih vrst in potrebam odločevalcev/nadzornih organov kar je razvidno tudi iz znanstvene literature; največ pozornosti je posvečene vrstam, ki so ekonomsko bolj pomembne (družina hlastači Lutjanidae, oslič, morski list, trska). Naš največji doprinos je v izdelavi specifičnih testov, ki omogočajo identifikacijo treh vrst iz družine Clupeidae in molekularno identifikacijo šestih vrst lignjev iz družine Loliginidae in Ommastrephidae, ki so pogosti na slovenskem tržišču. Razvoj identifikacijskih testov gre v smeri izdelave platform, ki omogočajo asimetrično pomnoževanje izolirane DNA in nato hibridizacijo s sondami točno določenih vrst ter nato identifikacijo na podlagi detektiranega fluorescenčnega signala, pri čemer je še vedno potrebna predhodna intenzivna bioinformatična analiza vrst za katere želimo dizajnirati test.

ANG

The complex and long chain from catch to the consumer's table is highly vulnerable and requires exceptional controls at multiple levels to ensure traceability. A number of factors such as overexploitation of the sea, competition in the fishing industry, pressure to reduce costs and increase profits, consumer demands for a diverse range and low prices add to the pressures leading to various deviations. Half of the world's catch is processed immediately after capture on board vessels or after landing, increasing the need for forensic laboratories capable of identifying fishing organisms. Species identification and geographical origin is important not only for the fish market where the products are sold, but also for fisheries managers to take measures to prevent overfishing and illegal and unreported fishing. The large scale of trade and the rapid perishability of fishery organisms make it extremely necessary to produce rapid, reliable identification tests that can be carried out anywhere in the supply chain. The last decade has witnessed the development of tests that use specific pieces of genomic DNA for discrimination, the biggest obstacle being the large number of fish species (ca. 2000) and their knowledge. As a consequence, the development of tests follows the regional consumption of specific species and the needs of decision makers/management bodies, which is also reflected in the scientific literature; most attention is paid to species that are more economically important (snapper family Lutjanidae, hake, sole, cod). Our major contribution has been the development of specific tests allowing the identification of three species of the Clupeidae family and the molecular identification of six species of squid of the Loliginidae and Ommastrephidae families, which are common on the Slovenian market. The development of identification tests is moving towards the production of platforms that allow asymmetric amplification of isolated DNA and subsequent hybridisation with probes of well-defined species, followed by identification on the basis of the detected fluorescence signal, while still requiring prior intensive bioinformatics analysis of the species for which the test is to be designed.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Projekt je prinesel nova spoznanja o trgu rib in sledljivosti ribiških proizvodov, ki so na voljo

v Sloveniji. Pomembni členi v sledljivosti so natančna identifikacija bioloških vrst, geografski izvor, način ribolova, ter natančno vodenje dokumentacije, da se v dolgi oskrbni verigi ne izgubijo pomembne informacije, ki omogočajo nadzornim organom sledenje, potrošnikom pa omogočajo osveščeno izbiro izdelka. Slovenski trg se ne more oskrbeti samo s slovenskim ribolovom, ampak je v glavnem odvisen od uvoza, kar pomeni daljše oskrbne verige v katerih lahko prihaja do zmot in tudi do prikrievanja geografskega izvora ter identitete vrste. Zaradi tega mora biti zagotovljena sledljivost in nadzor v celotni oskrbni verigi, kar je v ribištvu izjemno zahtevna naloga zaradi velikega števila ribolovnih vrst ter biološke variabilnosti. Rezultati projekta so pokazali v kolikšni meri so potrošnikom na voljo relevantne in natančne informacije o ribiških proizvodih v skladu z veljavnimi predpisi (Pravilnik o trgovskih imenih rib (Ur. L. RS, št. 46/2005), pregledali smo ponudbo na tržišču ter identiteto vrst v izbranih proizvodih potrdili z barkodiranjem ter z občutljivimi molekularnimi testi (RT-PCR, LAMP), ki temeljijo na specifičnih odsekih DNA značilnih za določeno vrsto, podali priporočila za izboljšave v sledljivosti ribiških proizvodov. Rezultati projekta in dizajn občutljivih identifikacijskih testov odpirajo možnosti za sodelovanje s številnimi deležniki v oskrbni verigi: nadzor, zakonodaja, gospodarski subjekti od ribičev do predelovalne industrije in potrošnikov, ki potrebujejo zanesljive podatke. Z raziskavo v katero je bilo vključenih 15 pomembnih akterjev, ki se na različne načine vključujejo v ribištvo (raziskave, upravljalci, ribiči, pridelovalci v akvakulturi) smo ugotovili, da so principi sledljivosti v ribištvu slabo poznani, manjka ustreznega znanja in metodologij, a hkrati so še odprte možnosti za diverzifikacijo novih ribiških proizvodov ter za aktivno promocijo in osveščanje potrošnikov kot tudi vseh, ki delujejo na trgu rib v Sloveniji. Obravnavano problematiko in rezultate smo prenesli v visokošolski izobraževalni sistem (Sredozemsko kmetijstvo, gostujoča predavanja na tujih univerzah). Z rezultati projekta smo prispevali k zmanjševanju tveganj v oskrbni verigi ter k povečevanju ozaveščenosti v sektorju ribištva in predelave, pri upravljalcih in nadzornih organih ter potrošnikih. Z rezultati lahko bolje podpiramo zagotavljanje sledljivosti za nadzorne organe in za predelovalno industrijo, kadar potrebuje dodatno ekspertizo za preverjanje surovin.

ANG

The project has provided new insights into the fish market and the traceability of fishery products available in Slovenia. Important links in traceability are the precise identification of biological species, geographical origin, fishing method, and accurate record-keeping to ensure that important information is not lost in the long supply chain, enabling control authorities to trace and consumers to make informed product choices. The Slovenian market cannot be supplied by Slovenian fisheries alone, but is mainly dependent on imports, which means longer supply chains where mistakes can be made and the geographical origin and identity of the species can also be concealed. This requires traceability and control throughout the supply chain, which is an extremely challenging task in fisheries due to the large number of species and biological variability. The results of the project have shown to what extent relevant and accurate information on fishery products is available to consumers in accordance with the current regulations (Regulation on trade names of fish (Official Journal of the Republic of Slovenia, No 46/2005)), we have reviewed the market supply and confirmed the identity of the species in selected products by barcoding, and we have made recommendations for improvements in the traceability of fishery products by using sensitive molecular assays (RT-PCR, LAMP) based on species-specific stretches of DNA characteristic of a particular species. The results of the project and the design of the sensitive identification tests open up opportunities for collaboration with many stakeholders in the supply chain: control, legislation, operators from fishermen to the processing industry and consumers who need reliable data. Through a survey of 15 important stakeholders involved in fisheries in different ways (research, managers, fishermen, aquaculture producers), we found that the principles of traceability in fisheries are poorly understood, there is a lack of relevant knowledge and methodologies, but at the same time there are still open opportunities for diversification of new fishery products and for active promotion and awareness-raising for consumers as well as for all those active in the fish market in Slovenia. The issues and results have been transferred to the higher education system (Mediterranean Agriculture, guest lectures at foreign universities). The results of the project have contributed to reducing risks in the supply chain and to raising awareness in the fisheries and processing sector, among managers and control bodies, and among consumers. The results can better support traceability assurance for control authorities and for the processing industry when it needs additional expertise to verify raw materials.

11. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- ☒ v domačih znanstvenih krogih
☒ pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?^{1.1}

Interes je izražen s strani Gospodarske zbornice Slovenije s povabilom na seminar dne 14. 5. 2021, predstavitev rezultatov v predavanju: Zamenjave vrst med lignji na slovenskem tržišču. Z Droga Kolinska smo pridobili projekt Sledljivost sestavin v predelanih ribiških proizvodih na razpisu MIZŠ Raziskovalci na začetku kariere v letu 2018, a je kandidat umaknil naknadno svoje sodelovanje. Velik interes za sodelovanje je izražen s strani nadzornih organov v ribištvi in za uporabo razvitih tehnik.

11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- ☒ v mednarodnih znanstvenih krogih
☒ pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi institucijami:^{1.2}

Sodelovanje z National University of Ireland, Martin Ryan Marine Institute
 Univerza v Bologni, Oddelku za biologijo, geologijo in okoljske znanosti v Ravenni.
 Evrosredozemska Univerza EMUNI
 Sveučilište u Rijeci

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:^{1.3}

Sodelovanje z z National University of Ireland, Luise Allcock specialistka za taksonomijo in evolucijo Cephalopoda, vzdržuje obsežno zbirko glavonožcev in še posebej lignjev, posredovala nam je tkiva naslednjih vrst *Illex coindetti*, *Todarodes sagittatus*, *Loligo forbesii* za referenčno zbirko, ter izkušnje iz projekta Ceph&Chefs (Interreg Atlantic). Sodelovanje se bo nadaljevalo s skupno objavo znanstvenega članka in prav tako z iskanjem skupnih projektov. Sodelovanje z Univerzo v Bologni, Sveučilište u Rijeci in EMUNI je bilo namenjeno prenosu znanja in rezultatov iz projekta do ključnih študentov (študij morskih ved in fokusirana mednarodna poletna šola). Sodelovanje se je nadaljevalo s sodelovanjem v projektu LabMAf, ki ga je vodila EMUNI in smo na simpoziju posvečenem malemu ribištvi predstavili projektne rezultate. Skupaj s kolegi iz Univerze v Bologni in EMUNI sodelujemo v COST akciji SEA-UNICORN (CA 19107).

12. Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE

	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	

	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih
	Uporaba rezultatov	Delno
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih
	Uporaba rezultatov	Delno
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanju naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.31	Razvoj standardov	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	Ni dosežen
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

Komentar

13. Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☐	☒	☐	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☐	☒	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☒	☐	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☐	☒	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☒	☐	☐	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☒	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☐	☐	☒	☐	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☒	☐	☐	☐	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☒	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☒	☐	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☐	☒	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☐	☒	☐	☐	

G.02.11.	Nov investicijski zagon					
G.02.12.	Drugo:					
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti					
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti					
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij					
G.03.04.	Drugo:					
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01.	Dvig kvalitete življenja					
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja					
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave					
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti					
G.04.05.	Razvoj civilne družbe					
G.04.06.	Drugo:					
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete					
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj					
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura					
G.07.02.	Prometna infrastruktura					
G.07.03.	Energetska infrastruktura					
G.07.04.	Drugo:					
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva					
G.09.	Drugo:					

Komentar**14. Naslov spletne strani za projekte, odobrene na podlagi Javnih razpisov za sofinanciranje ciljnih raziskovalnih projektov za leta 2017, 2018 in 2019¹⁴**

<https://www.famnit.upr.si/sl/raziskovanje/programi-in-projekti/CRP-V1-1808/>
<https://www.nib.si/aktualno/novice/1265-uporaba-tehnologije-dna-za-ugotavljanje-poneverb-v-ribiskih-proizvodih-z-vrednotenjem-socio-ekonomskih-vidikov-crp-zagotovimo-si-hrano-za-jutri-st-projekta-v1-1808>

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni;
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS;
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki (v primeru, da poročilo ne bo oddano z digitalnima podpisoma);
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta;
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat na zgoščenki (CD),

ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije prijaviteljice:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Nacionalni inštitut za biologijo

Lovrenc Lipej

ŽIG

Datum:

12.5.2021

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2021/4

¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku). [Nazaj](#)

² Navedite cilje iz prijave projekta in napišite, ali so bili cilji projekta doseženi. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ Navedite morebitna bistvena odstopanja in spremembe od predvidenega programa dela raziskovalnega projekta, zapisanega v prijavi raziskovalnega projekta. Navedite in utemeljite tudi spremembe sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta. Če sprememb ni bilo, navedite »Ni bilo sprememb«. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite dosežke na raziskovalnem področju, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FORD področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

⁶ Navedite dosežke na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti, ki so nastali v okviru tega projekta. Dosežke iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FORD področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Dosežek na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti je po svoji strukturi drugačen kot dosežek na raziskovalnem področju. Povzetek dosežka na raziskovalnem področju je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek dosežka na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. v sistemu COBISS rezultat ni evidentiran). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹¹ Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹² Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹³ Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁴ Izvajalec mora za projekte, odobrene na podlagi Javnega razpisa za izbiro raziskovalnih projektov Ciljnega raziskovalnega programa »CRP 2017« v letu 2017 in Ciljnega raziskovalnega programa »CRP 2019« v letu 2019 ter Javnega razpisa za izbiro raziskovalnih projektov Ciljnega raziskovalnega programa »Zagotovimo.si hrano za jutri« v letu 2018, na spletnem mestu svoje RO odpreti posebno spletno stran, ki je namenjena projektu. Obvezne vsebine spletne strani so: vsebinski opis projekta z osnovnimi podatki glede financiranja, sestava projektne skupine s povezavami na SICRIS, faze projekta in njihova realizacija, bibliografske reference, ki izhajajo neposredno iz izvajanja projekta ter logotip ARRS in drugih sofinancerjev. Spletna stran mora ostati

aktivna še 5 let po zaključku projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2021 v1.00

DA-30-EC-3E-DC-AE-F1-BE-A1-2E-F4-B2-CA-31-62-EC-C5-E7-17-64

**ELABORAT O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA NA
PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROGRAMA (CRP)
»ZAGOTOVIMO SI HRANO ZA JUTRI« V LETU 2018
(Uradni list RS, št. 41/2018, z dne 15. 06. 2018)**

Težišče 1 Prehranska varnost Slovenije

PROJEKT CRP V1-1808

**Uporaba tehnologije DNA za ugotavljanje poneverb v ribiških proizvodih z
vrednotenjem socio ekonomskih vidikov**

01. 11. 2018 – 31. 10. 2020, podaljšanje brez financiranja do 31. 3. 2021

Vodja projekta: prof. dr. Lovrenc Lipej

Avtorji: doc. dr. Andreja Ramšak, dr. Alenka Arbeiter Baruca, doc. dr. Matjaž Hladnik, izr. prof.
dr. Dunja Bandelj, prof. dr. Štefan Bojnec



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO,
GOZDARSTVO IN PREHRANO

Projekt CRP V1-1808 je financirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije in Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano iz proračunskih sredstev.

Kazalo	
Uvod	5
Pregled literature	6
Rezultati.....	13
DELOVNI SKLOP 1: Izdelava standardiziranega molekularnega testa za zanesljivo identifikacijo svežih in predelanih ribiških proizvodov	13
DS1.1: Vzorčenje, obdelava vzorcev in biološkega materiala	13
DS1.2: Genetska identifikacija referenčnega materiala	16
DS1.3: Razvoj in optimizacija molekularnega testa na osnovi informativnih odsekov mitohondrijske DNA	19
DS1.4: Testiranje in optimizacija Q-PCR testov	23
DS2.2 Proučitev primernosti novo razvitih molekularnih testov za razvoj metode LAMP	24
DS2.3: Optimizacija standardiziranega molekularnega testa.....	26
DELOVNI SKLOP 3: vzpostavitev zbirke vzorcev DNA referenčnega materiala in elektronsko shranjevanje podatkov.	33
Vzpostavitev zbirke vzorcev DNA referenčnega materiala	33
Vzpostavitev podatkovne zbirke pridobljenih rezultatov	33
Predlogi za dopolnitve Pravilnika o trgovskih imenih rib (Ur.l.RS, št. 46/2005)	34
DELOVNI SKLOP 4: socio-ekonomski vidik napačnega deklariranja in označevanja ribiških proizvodov.....	40
Analiza ribiških proizvodov, ki so na trgu (s trga EU in iz uvoza) s poudarkom na količinah in vrstah.....	43
Ovrednotenje količine napačno deklariranih ribiških proizvodov in ekonomsko škodo zaradi napačnega označevanja ribiških proizvodov	43
DELOVNI SKLOP 5: diseminacija projekta in rezultatov projekta	44
Objave zavedene v sistemu COBISS	47
Literatura	48
Priloge.....	50
Priloga 1 Izolacija DNA.....	50
Priloga 2 Filogenetsko drevo lignjev narejeno na osnovi COI (vir: M. Rubinić magistrsko delo, Univerza v Reki).	54

Kazalo slik

Slika 1 Informacije za potrošnika –pomen deklaracije (vir: EK).	8
Slika 2 Shema oskrbne verige v ribištvu in kompleksnost trgovanja z dobrinami, nekateri proizvodi prečkajo več državnih meja v oskrbni verigi, včasih prečkajo ozemlja brez strogih in določenih zahtev po sledljivosti (Oceana, 2016). Okusno, alergeno, ulovljeno ali gojeno? (vir: Oceana, 2016).	9
Slika 3 Okusno, alergeno, ulovljeno ali gojeno? (vir: Oceana, 2016).	10
Slika 4 Primer vzorčenega biološkega materiala v trgovskih verigah in ribarnicah (fileti (levo) in lignji (desno)).	13
Slika 5 Slikovno dokumentiranje vzorčenih lignjev (od leve proti desni: jadranski lignj <i>Loligo vulgaris</i> , <i>L. gahi</i> , in neidentificirana vrsta), imena so zapisana enako kot na deklaracijah, kasneje smo preverili z barkodiranjem identiteto vrst.	16
Slika 6 Rezultati pomnoževanja regije COI pri lignjih (zgoraj: oznake vzorcev).	18
Slika 7 Prikaz prileganja začetnih oligonukleotidov in sode s fluorescentno oznako ter utiševalcema (Vir: Integrated DNA Technologies).....	20
Slika 8 Prikaz pomnožitvenih krivulj (zgoraj) in prikaz plošče s pozitivnimi rezultati (zelena barva) in negativno kontrolo (rdeča barva) za vrste sardela <i>Sardina pilchardus</i> , sardon <i>Engraulis encrasicolus</i> in inčun <i>Sprattus sprattus</i>	22
Slika 9 Primer pomnožitvenih krivulj standardnih raztopin za vrsto sardela <i>Sardina pilchardus</i>	22
Slika 10 Primer umeritvene krivulje, izrisane izkvantifikacijskih vrednosti (Cq vrednosti) in desetiškega logaritma količine DNA za vrsto sardela <i>Sardina pilchardus</i>	23
Slika 11 Prikaz talilnih krivulj za določanje HRM (High Resolution melting) s SyberGreen; različni testi so označeni z barvami: Test 1 (rdeče T _m = 73,87)), Test 2 (modro T _m =72,86) in Test 3 (zeleno T _m =70,84) narejeni na neredčenih vzorcih. Temperatura pomnoževanja je bila 60°C.	28
Slika 12 Prikaz pomnoževalnih krivulj za test HMT s SyberGreen pri temperaturi 60°C.....	28
Slika 13 Prikaz pomnoževalnih krivulj za test HMT s SyberGreen za Test 1 narejen na neredčenih vzorcih lignjev. Temperatura pomnoževanja je bila 62°C.	29
Slika 14 Prikaz pomnoževalnih krivulj za test 2. Temperatura pomnoževanja je bila 62°C.	30
Slika 15 Prikaz pomnoževalnih krivulj za test HMT s SyberGreen za Test 3 narejen na neredčenih vzorcih lignjev. Temperatura pomnoževanja je bila 62°C.	32
Slika 16 Shema zbiranja podatkov z deklaracij ter preverjanje skladnosti s Pravilnikom o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov (Ur. L. RS, št. 46/2005).	34

Kazalo tabel

Tabela 1 Reakcijska mešanica pomnoževanja v PCR za lignje.....	17
Tabela 2 Temperaturni profil pomnoževanja gena COI pri lignjih.	17
Tabela 3 Reakcijska mešanica pomnoževanja v PCR za vrste sardela, sardon in papalina.	17
Tabela 4 Temperaturni profil pomnoževanja gena COI pri vrstah sardela, sardon in papalina.....	18
Tabela 5 Temperaturni profil sekvenčne reakcije za pomnoževanje gena COI pri vrstah sardela, sardon in papalina za sekvenciranje.....	19
Tabela 6 Reakcijska mešanica za Q-PCR za testiranje specifičnosti razvitih molekularnih testov na osnovi 16S rDNA za izbrane vrste rib.	21
Tabela 7 Temperaturni profil reakcije PCR v aparatu LightCycler 96.....	21
Tabela 8 Seznam analiziranih vrst rib ter število analiziranih konzerv in število posameznih osebkov.	23
Tabela 9 Priporočena koncentracija začetnih oligonukleotidov za 25,0 µL LAMP reakcijo	26
Tabela 10 Reakcijske mešanice za ugotavljanje T _m za različne Q-PCR teste za <i>Loligo vulgaris</i>	27
Tabela 11 Temperaturni profil pomnoževanja DNA lignjev s Q-PCR za določanje optimalne in specifične temperature pomnoževanja	29
Tabela 12 Preverba slovenskih in latinskih imen za konzerve sardin v Pravilnik o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov (Ur. L. RS, št. 46/2005) in njihova veljavnost v WORMS. Imena iz pravilnika so zapisana identično kot v Pravilnik o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov (Ur. L. RS, št. 46/2005)	31
Tabela 13 Rezultati pomnoževanja pri 62°C za Test 2.	32
Tabela 14 Rezultati pomnoževanja pri 62°C za Test 3.	32
Tabela 15 Preverba slovenskih in latinskih imen za lignje v Pravilnik o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov (Ur. L. RS, št. 46/2005) in njihova veljavnost v WORMS. Imena iz pravilnika so zapisana identično kot v Pravilnik o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov (Ur. L. RS, št. 46/2005)	34
Tabela 16 Preverba slovenskih in latinskih imen za konzerve sardin v Pravilnik o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov (Ur. L. RS, št. 46/2005) in njihova veljavnost v WORMS. Imena iz pravilnika so zapisana identično kot v Pravilnik o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov (Ur. L. RS, št. 46/2005).....	37

Uvod

Ciljni raziskovalni projekt *Uporaba tehnologije DNA za ugotavljanje poneverb v ribiških proizvodih z vrednotenjem socio ekonomskih vidikov (šifra projekta V1-1808)*, je eden prvih projektov s področja poneverb morske hrane. To področje je razmeroma slabo obdelano, četudi je hrana iz morja pomemben vir beljakovin za 20 % človeštva predvsem v nerazvitih državah. V razvitih državah predstavlja hrana iz morja pomembno dobrino, ki pogosto dosega visoko tržno vrednost. V zadnjih dveh desetletjih je poraba rib in drugih vrst iz morskega ribolova narasla zaradi oglaševanja blagodejnih učinkov na človekovo zdravje.

Z razvojem ribištva in z njim povezane predelovalne dejavnosti se je celotna veriga od ulova do predelave in distribucije do potrošnika zelo podaljšala. Ribolov se je pomaknil na bolj oddaljena območja zaradi osiromašenih ribolovnih virov, povečuje se zmogljivost plovil in ribolovnih orodij, ulov predelujejo na ribiških plovilih (npr. filetiranje), iztovarjajo in predelujejo v tretjih državah, čemur lahko sledi ponovna predelava in šele nato distribucija do maloprodajnih mest. Zato je ribiška panoga zelo občutljiva na poneverbe v celotni verigi od ribolova in vzreje v akvakulturi do maloprodaje. Med njimi so najpogostejše zamenjave vrst: nenamerne, zaradi velike podobnosti vrst in zato težke taksonomske določitve ali namerne, da se prikrije ilegalni ribolov, ali da se proda manj kakovostne vrste kot bolj kakovostne.

Spremenile so se tudi prehranjevalne navade potrošnikov, ki zaradi pomanjkanja časa želijo izdelke za hitro pripravo (npr. ribje palčke, očiščene ribe v obliki filetov), ki vsebujejo zelo predelane sestavine in je njihovo vrstno sestavo težko ugotavljati. Zaradi škandalov s ponarejanjem hrane in zaradi vedno večjega prelova na svetovni ravni, se je pojavila potreba po vedno večjem nadzoru ter se okrepila zavest potrošnikov, da je treba natančno preveriti ribiške proizvode. Poleg tega so zaradi zamenjav vrst možne tudi hude zdravstvene težave, kajti nekatere vrste rib in nekatere vrste mehkužcev sodijo med zelo alergena živila, ki lahko povzročijo hude alergijske reakcije. Zdravstvene težave povzročajo tudi toksini alg, s katerimi so lahko kontaminirani morski organizmi ali zaradi kemijskega onesnaženja v okolju. Nekateri potrošniki so tudi vedno bolj ozaveščeni in želijo imeti na razpolago več informacij, da se lažje odločijo za nakup rib ali drugih ribiških proizvodov. Evropska komisija je izdala uredbo, ki predpisuje, katere informacije mora vsebovati deklaracija, da se potrošnik seznani z izvorom, načinom ribolova ter ribolovnim območjem, kadar gre za prodajo celih rib ali filetov. Medtem ko se v predelanih proizvodih sledljivost izgubi, je enako vprašljiva vrstna sestava takih proizvodov.

V zadnjem desetletju so se uveljavile številne laboratorijske metode za ugotavljanje istovetnosti hrane (naprimer za rdeče meso, arome), medtem ko je njihova uporaba še vedno v zaostanku kadar gre za hrano iz morja. Glede na to, da je poglavitna težava v ribištvu ugotavljanje istovetnosti ribolovne vrste so napor raziskovalcev usmerjeni v razvoj tehnik za čim bolj poenostavljeno, hitro, a izjemno zanesljivo identifikacijo vrst. Nekatere tehnologije so uradno v veljavi, kot je ugotavljanje identitete vrst z barkodiranjem primernih genetskih markerjev, ki so običajno na mitohondrijski DNA. Barkodiranje je natančna, a zamudna tehnika, ki pa kljub vsemu v nekaterih primerih ni primerna (npr. introgresija med vrstami, močno predelane surovine).

Zaradi vedno večjega pritiska na ribolovne vire in številnih ugotovljenih goljufij s hrano, so bile po celem svetu opravljene študije, da bi ocenili obseg goljufij in gospodarske škode, ki je s tem povzročena. Rezultati so pokazali, da je v ribiških proizvodih (od filetov do bolj predelanih proizvodov) velik delež napačno prepoznanih vrst. Za Slovenijo so bili na voljo zelo skopi podatki. V študiji Evropske komisije (EK) je navedeno, da je bilo pri nas v letu 2015 približno 1 % napačno določenih ribjih vrst, ko so testirali filetirane ribe. V Sloveniji je za testiranje filetov v uporabi barkodiranje COI. Metoda je zanesljiva, vendar ima omejitve, ko gre za toplotno ali močno predelane proizvode ali pa nizko vsebnost sestavin. Problem je prepoznala tudi EK in Komisija za ribištvo. Prav tako se pojavljajo zahteve s strani različnih deležnikov (MKGP, predelovalna industrija, ozaveščeni potrošniki...) po znanju in metodah, s katerimi je možno zanesljivo in hitro ugotavljati poneverbe ribiških proizvodov.

Cilji predlaganega projekta so bili pregledati ponudbo ribiških proizvodov na slovenskem tržišču in ugotoviti, kateri so najbolj rizični ribiški proizvodi in vrste, ki jih je potrebno nadzirati in preverjati identiteto deklariranih vrst, katere vrste so tržno najbolj pomembne in kolikšna je verjetnost, da so napačno identificirane. Prav tako je nujno potrebno vpeljati ustrezne napredne tehnologije DNA (metabarkodiranje na osnovi NGS, Q-PCR, LAMP) za odkrivanje poneverb v ribiških proizvodih.

Pregled literature

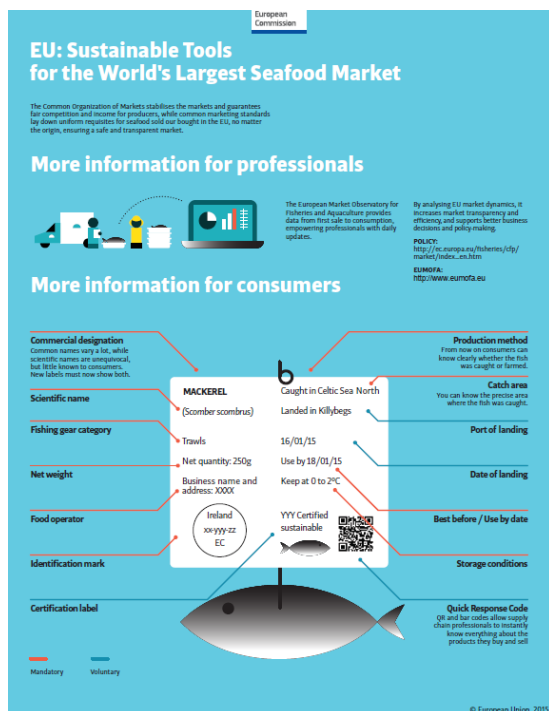
Ribištvo in akvakultura zagotavljata na svetovni ravni približno 20 % prebivalstva glavni vir živalskih beljakovin in približno 7 % vseh beljakovin, ki jih porabi človeštvo. Od leta 1960 je narasla poraba rib v povprečju od 9,9 kg na prebivalca, v 90ih je bila že 14,4 kg in v 2013 je dosegla 19,7 kg na prebivalca ter v letu 2017 je bila poraba rib 24,4 kg na prebivalca Evropski uniji (EU). V letu 2014 je proizvodnja v ribištvu znašala 167 milijon ton, od tega je ribolov prispeval 93 milijonov ton (FAO, 2016, Campbell in Pauly, 2013, Pauly in Zeller, 2017). Ribe so bile v zadnjih desetletjih intenzivno reklamirane kot zdrava lahko prebavljiva hrana in vir koristnih maščobnih kislin za zdravje ljudi, kar predstavlja velik pritisk na ribolovne vire. Ribolov pa postaja vedno bolj nevzdržen za morske ekosisteme in ogroža prehransko varnost milijardam prebivalcev (FAO, 2018). Zaradi tega je v vzponu akvakultura rib, rakov in mehkužcev v celinskih in somorničnih vodah (predvsem na Kitajskem in v sosednjih državah), ki zagotavlja hrano in zaslužek podhranjenemu prebivalstvu in je pomembna izvozna panoga v razviti del sveta.

V Sloveniji so leta 2016 gospodarski ribiči iztovorili 152 ton svežih ribiških proizvodov, kar je glede na leto 2015 za 22 % manj iztovorjene mase, povečal se je iztovor rakov, glavonožcev školjk in polžev. Povečala se je tudi vzreja morskih mehkužcev za dobrih 5 % in proizvodnja v marikulturi je znašala 664 ton. Ulov iz prostočasnega ribolova je prispeval 15 ton. V ribogojnicah v celinskih vodah je bilo v letu 2016 vzrejenih skoraj 241 ton rib, izlov športnega ribolova v celinskih vodah je znašal 142 ton (Filipi, 2016). V finančni perspektivi (2011-2027) bo EK namenila več denarja za prehransko varnost EU preko trajnostnega in konkurenčnega ribištva ter trajnostni modri rasti, večji poudarek bo na malih priobalnih ribičih.

Kljub mednarodnemu in državnemu upravljanju se ribištvo spopada z dvema glavnima težavama: 1.) ilegalen, neprijavljen, nereguliran (IUU) ribolov in 2.) poneverbe ribiških

proizvodov, ki v prvi vrsti prizadenejo potrošnike. Termin *ribiški proizvod* se nanaša na ribe in ostale ribolovne vrste, vse od ulova (vključno z akvakulturo) do prodaje in zajema vse prodajne oblike od cele ribe do predelanih proizvodov kot so fileti in paštete. Poneverbe ribiških proizvodov so možne v celotni verigi od ulova do prodaje (Fiorino in sod., 2018). Poneverbe so najpogostejše zamenjave ribolovnih vrst, ki so lahko nenamerne ali celo namerne zaradi različnih vzrokov kot so posledica slabega poznavanja taksonomije ribolovnih vrst, prikrivanje nelegalnega ulova, zamenjava zaščitene vrste z vrsto, ki ni pod regulacijo, nepravilno označevanje geografskega izvora rib, prikrivanje uporabljenih ribolovnih orodij. Poneverbe v okrbni verigi v ribištvu niso zanemarljive, lahko so vzrok resnih zdravstvenih problemov za potrošnike (zastrupitve, alergije...), zmanjšujejo njihovo zaupanje v ribiške proizvode, vplivajo na obseg davkov ter so tudi vir gospodarske škode za državo, saj vplivajo na prihodke ribičev in distributerjev. Poneverbe vplivajo na izkoriščanje ribolovnih virov in na vzdržnost ekosistemov v katerih poteka ribolov in akvakultura.

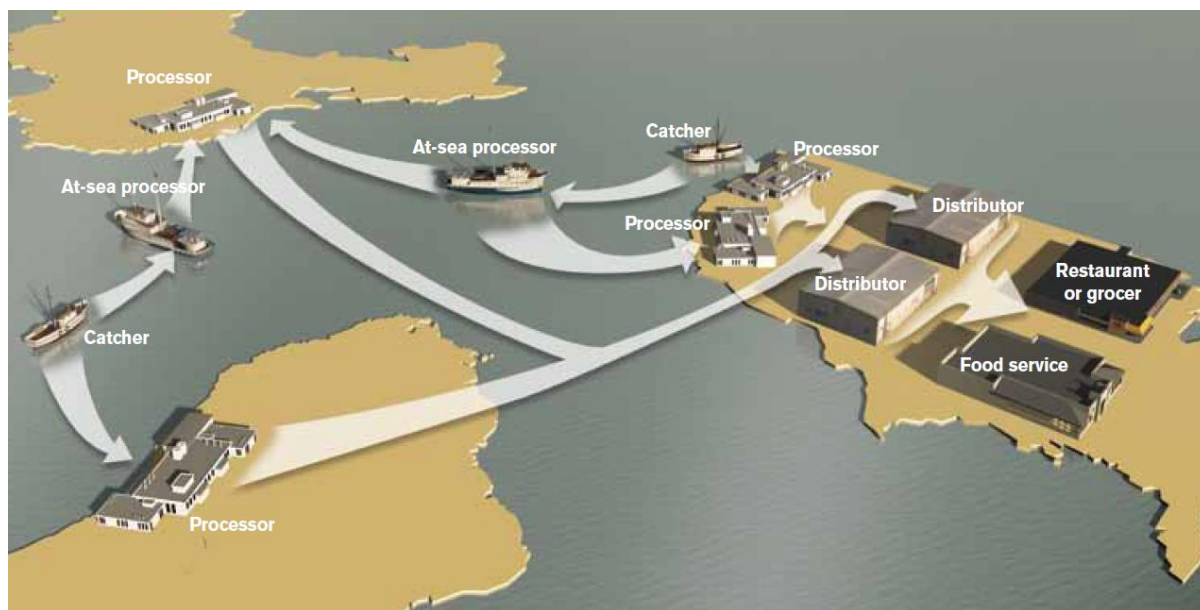
Ribištvo je nadzorovana in zelo upravljana gospodarska panoga, za članice EU je pomembna Skupna ribiška politika in številne mednarodne organizacije, ki delujejo na določenem geografskem območju in se ukvarjajo z upravljanjem določenih vrst rib. Prav tako se EU trudi zagotoviti sledljivost ribiških proizvodov ter ponuditi potrošnikom zanesljive in relevantne podatke o ribiških proizvodih (primer deklaracije na Sliki 1). EU s številnimi pravnimi akti ureja področje sledljivosti ribiških proizvodov - velja izpostaviti Uredbo Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 854/2004 z dne 29. aprila 2004 o določitvi posebnih predpisov za organizacijo uradnega nadzora proizvodov živalskega izvora, namenjenih za prehrano ljudi (Ur. l. EU, št.139/2004). Uredba v uvodu določa "(točka 23) Pristojni nacionalni organi, odgovorni za spremljanje in uveljavljanje izpolnjevanja obveznosti iz te uredbe, bi zaradi varstva potrošnikov morali izkoristiti vso razpoložljivo tehnologijo, tudi preverjanje DNK, da bi gospodarske subjekte odvrgli od lažnega označevanja ulova." ter "(točka 26) Izboljšati je treba zbiranje, obdelavo in razširjanje ekonomskih informacij o trgih z ribiškimi proizvodi in proizvodi iz ribogojstva v Uniji."



Slika 1 Informacije za potrošnika –pomen deklaracije (vir: EK).

Novejše študije kažejo, da je ribolov in celotna oskrbna veriga do prodaje zelo ranljiva in se v njej dogajajo pomanjkljivosti. Razlogi za ranljivost so posledica narave sektorja (lov, pretovor, predelava tudi večkratna predelava, distribucija do potrošnika...). Pomanjkljivosti v celotni verigi so tako obsežne in pomembne za različne vidike, da je EUROPOL-ova raziskava dokazala, da so ribji proizvodi tretja najbolj potvarjana skupina hrane (EUROPOL; 2016), medtem, ko je po mnenju Evropske komisije (EK) uvrščena še višje; na drugo mesto po potvarjanju sestavin. Evropska skupnost je poleg ZDA tudi najpomembnejši trg na katerem se prodajo izjemno velike količine rib in druge morske hrane (v EU je na voljo več kot 1200 vrst uvoženih iz več kot 120 držav, FAO, 2016). Podatki temeljijo v glavnem na študijah iz razvitih držav, medtem ko obseg težave ni znan v nerazvitih državah.

Kompleksnost oskrbne verige v ribolovu in akvakulturi ter točke na katerih prihaja do zlorab so preučili Fox in sod. (2018) na primeru Velike Britanije. Avtorji so v članku obdelali goljufije v oskrbni verigi v akvakulturi (školjke in raki) in v ribolovu ter tudi analizirali vzroke in posledice. V sektorju ribolova so prepoznali tri skupine izjemno kritičnih točk: i.) ponarejanje, ki zajema zamenjave in ponarejanje vrst in podaljševanje roka uporabnosti; ii.) ponarejanje porekla ribištva, ki zajema zamenjave in zlorabe oskrbne verige ter iii.) kršenje etičnih načel v ribištvu, kamor sodi nezakonit, nereguliran in neprijavljen ribolov, uporaba nedovoljenih ribolovnih orodij in nehumano ravnanje z ujetimi živalmi. Slika 2 prikazuje kompleksnost oskrbne verige v ribištvu.



Slika 2 Shema oskrbne verige v ribištvi in kompleksnost trgovanja z dobrinami, nekateri proizvodi prečkajo več državnih meja v oskrbni verigi, včasih prečkajo ozemlja brez strogih in določenih zahtev po sledljivosti (Oceana, 2016). Okusno, alergeno, ulovljeno ali gojeno? (vir: Oceana, 2016).

Pereč problem so poneverbe ribiških proizvodov, kajti trgovanje z njimi je zelo kompleksno (D'Amico in sod., 2014). Taka kriminalna dejanja vplivajo na varnost in avtetičnost hrane. Poznamo različne oblike goljufij, ki se dogajajo v državnih in v mednarodnih prodajnih verigah z ribami in ribiškimi proizvodi. Ocene poneverb z ribiškimi proizvodi se zelo razlikujejo med državami, tako kot so različne zmožnosti določene države izvajati nadzor nad ribiškimi proizvodi, proizvajalci in prodajalci. Nadzor se opravlja preko dokazovanja sledljivosti in istovetnosti vrst v analiziranih proizvodih za kar so potrebni poleg zakonodajne ureditve tudi usposobljeni laboratoriji, ki opravljajo testiranja. Z napredkom metod molekularne identifikacije, kot je barkodiranje DNA in naslednja generacija sekvenciranja (NGS) so na voljo možnosti za večjo preglednost v prodajni verigi z ribiškimi proizvodi (Littlefair in Claire, 2016, Giusti et al., 2017). Boj proti poneverjanju v ribištvi je zelo kompleksna naloga, ki vključuje več državnih agencij, ki imajo ustrezna pooblastila, hkrati pa področje urejajo številni zakoni, ki pokrivajo različne vidike poneverb s hrano. Odgovornost je razdeljena med državne nadzorne organe, specializirane agencije, organe pregona. Vrednost trgovanja z ribiškimi proizvodi se je v zadnjih 40 letih povečal za 0.8 milijon ton, vrednost trgovanja je leta 1974 znašala 1,3 milijarde dolarjev, v letu 2012 pa že 16.5 milijarde dolarjev (NOAA; 2013).

Dosedanje študije so kot identifikacijsko orodje uporabljale barkodiranje in kot genetski marker so uporabili COI ali cyt b ter nato primerjali dobljena nukleotidna zaporedja s podatki oziroma nukleotidnimi zaporedji v javnih podatkovnih zbirkah in v referenčnih zbirkah (GenBank, BOLD, FISHBOLD, Refence Standard Sequence Library (RSSL) for Seafood Identification FDA, itd.). Težavo predstavlja referenčne zbirke nukleotidnih zaporedij, ki so redke oziroma jih dopolnjujejo le redki laboratoriji. Pomembno je tudi poudariti, da ni standardizirane zbirke sekvenc, ampak so v uporabi že prej naštetje in le nekaj laboratorijev ima svoje referenčne podatkovne zbirke v ključno z vavčerskimi vzorci. To je pomembno

dejstvo, ker se v mnogih javnih zbirkah sekvence ne ujemajo s pravo vrsto in je potrebna velika mera previdnosti za izločitev takšnih sekvenc.

Podrobnejši pregled po nekaterih pomembnih trgih pokaže zelo skrb vzbujajoče podatke; v ZDA je najbolj pogosto zamenjana vrsta rdeči hlatač (*Lutjanus sebae*) in sicer v 75 % primerov (Marko in sod., 2004), nekatere vrste iz rodu *Lutjanus* so celo na Rdečem seznamu ogroženih vrst IUCN (<http://www.iucnredlist.org/search?page=2>). Nevladna organizacija OCEANA redno objavlja rezultate svojih neodvisnih študij poneverjanja ribiških proizvodov in njihovi podatki potrjujejo, da je v ZDA v maloprodaji kar 33 % hrane iz morja z napačno identificiranimi vrstami (Warner in sod., 2013), najnovejša študija je pokazala, da je 16,5 % rib v ribjih restavracijah napačno identificiranih (Ksaksar in sod., 2015), medtem ko je v sushi barih ta delež izjemno visok in znaša 47 % napačno identificiranih rib (Willette, 2017), kar je posledica uvoza rib iz azijskih trgov, predvsem iz Kitajske. Tudi v Kanadi so poneverbe ribolovnih vrst zaskrbljujoče, kajti 41 % vzorcev je bilo napačno identificiranih (Hanner et al., 2011). EK je po škandalu s konjskim mesom naredila nadzorni pregled na trgu bele ribe, ki je bil opravljen na 4000 vzorcih v 29 državah, ki je pokazal skladnost med identifikacijo na deklaraciji in testiranjem v 94 % (EK, 2015), medtem ko študije narejene po posameznih evropskih državah in po večjem številu raznovrstnih ribiških proizvodih kažejo mnogo bolj zaskrbljujočo sliko. Študija iz Italije pokaže 22,5 % napačno označenih proizvodov in med njimi so največkrat glavonožci (43,8 %), raki (17 %) in ribe (14 %) v glavnem uvoženi iz JV Azije (Guardonone in sod., 2017), medtem ko je ta odstotek na jugu Italije še višji (42,8 %) in gre predvsem za napačno identifikacijo osličev, bokoplavut (morskih listov, plošče, iverke) in lososov. Pod njihovimi imeni so prodajali sladkovodne vrste azijskih somov iz akvakulture, kajti prej omenjene vrste rib so zelo cenjene in dosegajo višje cene (Slika 3). Na Sardiniji je delež poneverb še višji (82 % v maloprodaji) (Meloni, Piras, Mazzete, 2015).



Slika 3 Okusno, alergeno, ulovljeno ali gojeno? (vir: Oceana, 2016).

Pomembna je tudi osveščenost potrošnikov oziroma njihova občutljivost za poneverbe ribiških proizvodov. Nedavna študija, ki so jo opravili v šestih evropskih državah (Velika Britanija, Irska, Belgija, Španija, Italija in Grčija) v kateri so preverili kako dobro potrošniki poznajo ribolovne vrste z lokalnih trgov. V anketi je bilo zajetih 720 ljudi, ki so jih naključno izbrali v velikih trgovskih centrih ter jim pokazali slike izbranih vrst rib (skuša, brancin, morski list, sardon, losos, polenovka). Anketirance so vprašali pod katerim imenom poznajo vrsto in zabeležili vse

odgovore ter kolikokrat na mesec jedo ribe ali druge morske sadeže. Rezultati niso bili spodbudni, saj je le 30 odstotkov vprašanih pravilno prepoznalo vrste s fotografij, najslabše rezultate so dosegli potrošniki iz Velike Britanije, medtem ko so bili najboljši poznavalci potrošniki iz Španije. Potrošniki so najboljše prepoznavali vrste, ki izvirajo iz lokalnega okolja in so najbolj pogoste na njihovem trgu. Zavedati se je treba, da je ponudba odvisna od prehranjevalnih navad, ki se razlikujejo od države do države (VB, Irska, Francija prevladujejo vrste iz družin Gadidae in Salmonidae, v Nemčiji bokoplavute, v Španiji in Portugalskem oslič, sardele in sorodne vrste iz družine Clupeidae in tuni). Največ kupcev iz Velike Britanije je odgovorilo, da nikoli ne jedo rib ali morskih sadežev. Ugotovili so, da ozaveščeni kupci bolje prepoznajo vrste rib, na njihovo izbiro vplivajo informacije z embalaže in informacije o izvoru proizvoda. Avtorji so rezultate pospremili z mislijo, da dokler ne bodo potrošniki vzpostavili boljše povezave s hrano (odtujenost od pridelave oziroma ribolova), ki je na krožniku, bodo še naprej odprte možnosti za zlorabe v oskrbni verigi (Cusa in sod., 2021). Potrošniki imajo pomembno vlogo, a morajo biti osveščeni in se zavedati, da lahko s svojim vedenjem vplivajo na trg rib.

Identifikacija marsikaterih ribolovnih vrst na osnovi analize DNA je znanstveno izvedljiva in že uveljavljena kot neodvisno in nepristransko orodje ter služi tudi kot dokazno gradivo v sodnih postopkih (glej tudi Martinsohn, 2011). Poznavanje molekulskih markerjev (npr. SNP, COI, rDNA) ter demografskih značilnosti nekaterih najbolj izkoriščanih populacij (npr. v Severnem morju, Baltiku, Sredozemskem morju) omogočajo zanesljivo identifikacijo vrst, kot tudi prepoznavanje njihovega geografskega izvora (Nielsen in sod., 2012). Najpogosteje uporabljene metode vključujejo izolacijo DNA, pomnoževanje genskega markerja, sekvenciranje in primerjavo pridobljenega zaporedja s podatki v javnih ali tudi internih referenčnih zbirkah. Metoda se imenuje "DNA barkodiranje" (angl. *DNA barcoding*). Za barkodiranje uporabljamo 655 bp dolg fragment (*COI*) (Hebert in sod., 2003) in jo uporablja tudi Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) pooblaščen za nadzor nad ribiškimi proizvodi (Handy in sod., 2011). *COI* primerjamo s podatki iz zbirk: (1) FISH-BOL (<http://www.fishbol.org/>), nastala v sodelovanju z mednarodnim projektom Barcode of Life (iBOL, <http://ibol.org/phase1/>); (2) "Reference Standard Sequence Library (RSSL) for Seafood Identification" (https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=seafood_barcode_data), ki jo je vzpostavila Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA), in vsebuje več kot 1700 vrst; (3) GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) je pod okriljem Nacionalnega inštituta za biotehnoške informacije (NCBI) v ZDA ter (4) podatkovna zbirka »The Barcode of Life Data System (BOLD). Slabosti barkodiranja *COI* so razgradnja DNA med postopki predelave rib (Pardo in Perez, 2004; Chapela in sod., 2007; Wong in Hanner, 2008), prisotnost aditivov, ki preprečujejo uspešnost izolacije in pomnoževanja DNA ali pa heteroplazmija in introgresija, kot je to pri nekaterih vrstah tunov, salmonidov, rodu *Mytilus* (Pardo in sod., 2015), kjer je potrebno uporabiti druge markerje za "DNA barkodiranje". V predelanih ribiških proizvodih je uspešnost boljša z metodo "mini DNA barkodiranje", ki temelji na uporabi krajše regije gena *COI* (Armani in sod., 2015) oz. seta regij v dolžini od 127 do 314 bp (Shokralla in sod., 2015). Raziskovalcem je uspelo izboljšati uspešnost pomnoževanja *COI* v predelanih proizvodih z uporabo mini barkod (Pollack in sod., 2018). Na osnovi markerjev SNP je možno identificirati

geografsko poreklo vzorcev znotraj vrst (*Gadus morhua*, *Clupea harengus*, *Solea solea* in *Merluccius merluccius*) zaradi genske adaptacije na okoljske razmere (Nielsen in sod., 2012).

Za namen identifikacije rib je možno uporabiti metode Q-PCR, ki so hitrejše in cenovno ugodnejše. Potreben je razvoj in optimizacija za posamezno vrsto, vendar so ravno zaradi tega tudi veliko bolj specifične in omogočajo detekcijo že zelo majhnih količin DNA in so uporabljene za potvorbe trske (*Gadus morhua*) s pacifiško trsko (*Gadus macrocephalus*) in aljaškim polakom (*Gadus chalcogrammus*) (Taboada in sod., 2017, Tomás in sod., 2017). Glede na veliko število vrst, ki so lahko prisotne v hrani ter glede na precejšnje število metod, ki so laboratorijem na voljo, je potrebna harmonizacija metod za testiranje ribiških proizvodov na nivoju EU (Griffiths in sod., 2014). Trenutno v EU še ni dorečeno katere so uradno potrjene metode za preverjanje identitete vrst (glej tudi predpise s področja označevanja in sledljivosti 104/2000, 2065/2001, 01224/2009 in 404/2001). Kot je prikazano je problematika zaskrbljujoča, medtem ko napredek pri uvajanju tehnik na osnovi DNA tehnologije ni zadosten navkljub znanstvenemu in tehnološkemu razvoju na področju analiz DNA, kar je poudarjeno tudi v poročilu JRC (Martinson, 2011).

V Sloveniji nimamo podrobnih rezultatov o tem kaj se dogaja v maloprodaji, medtem ko se barkodiranje opravlja na zahtevo Urada za varno hrano (MKGP) v pooblaščenem laboratoriju ali na zahteve prodajalca. Obseg težave v Sloveniji ni bil raziskan, še posebej ne za predelane ribiške proizvode in na voljo ni študije, ki bi opisala obseg poneverb v ribiških proizvodih v Sloveniji. Leta 2015 je Evropska komisija opravila študijo, v kateri so testirali skoraj 4000 vzorcev morske hrane, v kateri so bile deklarirane pridnene bele ribe, rezultati so pokazali da je bilo samo 6 % vzorcev napačno označenih. Vendar je slika drugačna, ko podatke razčlenimo po državah in glede na vrste rib, ki so napačno označene. Uradni podatki te študije so pokazali, da je v Sloveniji bilo napačno označenih 1 % pregledanih proizvodov (European Commission, 2015). Med najbolj poneverjanimi so vrste iz družine Serranidae (zobčasti ostriži), med katerimi je delež napačno označenih proizvodov znašal 31 %. V ZDA so vrste zobčastih ostrižev (ang. grouper) zelo cenjene v ribjih hamburgerjih in podobno ter so najbolj poneverjene (Ulrich in sod., 2015).

Do sedaj financirani CRP projekti namenjeni ribištvu so maloštevilni ter so obravnavali i.) onesnažila v ribah na slovenskem tržišču (težke kovine, PCBje) ter ugotavljali senzorične lastnosti izbranih vrst rib (CRP V4-1120, 2011 - 2014), ii.) sinergijske učinke ribištva in turizma na slovenski obali (V5-1013, 2010-2012, iii.) ukrepe za ohranjanje ogroženih sladkovodnih vrst, medtem ko problematika poneverjanja ribiških proizvodov na slovenskem tržišču še ni bila obravnavana. Problematika poneverb v ribiški industriji je bila obravnavana v preteklih EU projektih, ki so bili zelo odmevni ter prinesli nova spoznanja o metodah za študij populacijske genetike izkoriščanih populacij ter genskih markerjih, ki so uporabni za ugotavljanje geografskega izvora ulovljenih rib (npr. LABELFISH (INTERREG IVB), FishPopTrace, SEAFOOD, FishTrace idr.), medtem ko se v zadnjih treh letih pojavljajo projekti, ki se posvečajo zamenjavam vrst in drugim odklonom ter kršitvam v oskrbni verigi v ribištvu ter razvoju metod za identifikacijo vrst (npr. SEATRACES, SeaFoodTomorrow).

Rezultati

DELOVNI SKLOP 1: Izdelava standardiziranega molekularnega testa za zanesljivo identifikacijo svežih in predelanih ribiških proizvodov.

DS1.1: Vzorčenje, obdelava vzorcev in biološkega materiala

Z vzorčenjem biološkega materiala po ribarnicah in trgovskih verigah smo začeli v januarju 2019 in smo ga končali v marcu 2019. V prvih vzorčenjih smo preizkusili načrt vzorčenja, ki je obsegal izbor ribiških proizvodov, zbiranje podatkov z deklaracije in njihovo shranjevanje ter arhiviranje, fotografiranje in odvzem biološkega vzorca za analize DNA v laboratoriju, shranjevanje tkiv in njihovo označevanje ter anonimizacija vzorcev ter zagotovitev sledljivosti vzorcev. V trgovskih verigah in ribarnicah smo vzorčili zamrznjene ali sveže filetirane proizvode, ribje konzerve in lignje (Slika 4), kar je bilo v trenutku vzorčenja na voljo.

Zbrani biološki material smo v laboratoriju najprej fotografirali in dokumentirali (Slika 4, 5 in 6). Za vsak tip vzorčenega biološkega materiala smo pripravili tabele za zbiranje podatkov glede na vrsto ribiškega proizvoda in z njim povezanih podatkov (datum, lokacija, ime proizvoda, trgovsko ime vrste, zapisano znanstveno ime, oblika ponudbe, način shranjevanja, ribolovno območje, država porekla, ribolovno orodje, način proizvodnje, cena, oznaka veterinarskega žiga, proizvajalec, blagovna znamka). Vse našete podatke, ki so bili navedeni na deklaraciji smo zbrali v tabelah. Zbrani podatki služijo za pripravo podatkovnega modela in za pripravo šifrantov (sodelovanje z Zavodom za ribištvo Slovenije-ZZRS).



Slika 4 Primer vzorčenega biološkega materiala v trgovskih verigah in ribarnicah (fileti (levo) in lignji (desno)).

Konzerve. V trgovskih verigah smo vzorčili konzerve, ki vsebujejo vrste iz družine Clupeidae, zbrani material je deklariran kot vrste *Sardina pilchardus*, *Sprattus sprattus*, *Engraulis encrasicolus*, *E. ringens* po podatkih na deklaraciji. Ugotovili smo, da je ponudba konzerv zelo raznolika in se razlikuje po trgovskih verigah. Najbolj raznoliko ponudbo omenjenih konzerv ima E. Leclerc in Spar, medtem ko je najbolj skromna ponudba v Tušu. Vzorčenih je bilo 36 konzerv različnih blagovnih znamk. Fotografirali smo embalažo, ribice v konzervi ter prepisali vse informacije z deklaracije za nadaljno analizo (Slika 5).

V vsaki konzervi smo najprej pregledali vse ribe v konzervi in preverili ali so med deklarirano vrsto še druge vrste, ki jih je možno razločiti že po videzu. Za DNA testiranje smo izbrali osebkke, ki po izgledu niso sodili v deklarirano vrsto, označeno na deklaraciji ter tri naključno izbrane osebkke (Slika 5). Od vsakega izbranega osebka smo shranili tri koščke tkiva v tri 2 mL mikrocentrifugirke in jih prelili z 96 % etanolom ter shranili na -20 °C za zbirko tkivnih vzorcev in nadaljne analize. Odvzeta tkiva za testiranje s Q-PCR testom, ki smo ga razvili v tem projektu (glej poglavje DS1.3 za opis testa), tkiva smo pred analizo obdelali po posebnem postopku. Vzorce tkiv smo najprej razmastili z mešanico kloroforma, metanola in destilirane vode v razmerju 1:2:0,8. Tkivo smo dali v 2 mL mikrocentrifugirko skupaj s pufrom za razmastitev in jih pustili na sobni temperaturi in v temnem prostoru do naslednjega dne in šele nato izolirali celokupno DNA.



Slika 5 Fotodokumentirana embalaža, vsebina konzerve in posamezni osebki pred nadaljnjo obdelavo.

Referenčni material za testiranje v konzervah. Za razvoj in optimizacijo molekularnega testa za pomnoževanje 16S rDNA s Q-PCR smo zbrali sveže ribe iz družine Clupeidae, ki predstavljajo referenčni material za testiranje rib v konzervah in so vključene v referenčno zbirko tkiv in DNA, ki je na Morski biološki postaji, Nacionalni inštitut za biologijo. Zbrali smo naslednje vrste iz družine Clupeidae: navadna sardela (*Sardina pilchardus*), sardon (*Engraulis encrasicolus*) in papalina (*Sprattus sprattus*). Nekaj osebkov referenčnih vrst je na Sliki 6, od vsake vrste smo shranili vsaj 10 osebkov zaradi variabilnosti v nukleotidnih zaporedjih 16S rDNA. Zbirko bomo povečevali s priložnostnimi vzorci tudi v prihodnje.



Slika 6 Foto dokumentirani posamezni osebki referenčnega materiala pred nadaljnjim shranjevanjem in izolacijo DNA.

V trgovskih verigah smo vzorčili tudi predelane ribje proizvode (ribje palčke, surimi ipd.) in do sedaj povzorčili 11 vrst različnih proizvodov. Vzorčili smo tudi filete in glede na deklaracije smo do sedaj na tržišču našli filete treh vrst tunov in ene vrste lososa. Od vsakega fileta lososa ali tune smo odvzeli tri koščke tkiva, jih prav tako prenesli v 2 mL mikrocentrifugirke in jih shranili v 96 % etanolu ter shranili na -20 °C. Dva koščka tkiva smo uporabili za izolacijo DNA (torej dve ponovitvi za posamezen filet), tretji košček tkiva pa shranili v skrinjo na -20 °C za morebitne dodatne analize in so del zbirke tkiv in DNA.

Lignje smo vzorčili v 7 slovenskih mestih (Izola, Koper, Solkan, Nova Gorica, Celje, Maribor in Murska Sobota), med vzorčnimi mesti so bile tri majhne ribarnice (v Izoli, Solkanu, Mariboru), trgovske verige (Spar v Izoli in Murski Soboti, Lidl v Kopru, Hofer v Kopru, Merkator v Kopru in Nova Gorica, Tuš v Celju, E. Leclerc v Mariboru). V večini mest ni več manjših ribarnic (v Novem mestu, Murska Sobota), ampak so ribarnice v sklopu trgovskih verig kot so Spar in E.Leclerc.

Na tržišču smo našli 7 vrst lignjev glede na podatke na deklaracijah (od tega je ena vrsta neidentificirana, *Loligo vulgaris*, *L. gahi*, *L. duvacei*, *L. chinensis*, *Loligo patagonica*, *Dasidicus gigas*, *Todarodes sagittatus*) ter zelo neopredeljeno trgovsko ime z navedbo *Loligo spp.*, ki so bili ulovljeni na različnih geografskih območjih (Slika 7). Skupaj smo nabrali 17 vzorcev lignjev v 11 prodajalnah (3 ribarnice in 6 velikih trgovskih verig). Za vsako deklarirano vrsto lignja smo vzorčili 10 osebkov. Od vsakega smo shranili tkivo v treh podvzorcih (3 mikrocentrifugirke) in še dodatno en košček tkiva na -20 °C za morebitne dodatne analize. V vsako 2 mL mikrocentrifugirko smo shranili tri koščke tkiva in jih shranili v 96 % etanolu ter shranili na -20°C. Dva koščka tkiva od vsakega osebka smo uporabili za izolacijo DNA (torej dve tehnični ponovitvi za vsak osebek).



*Slika 5 Slikovno dokumentiranje vzorčenih lignjev (od leve proti desni: jadranski lignj *Loligo vulgaris*, *L. gahi*, in neidentificirana vrsta), imena so zapisana enako kot na deklaracijah, kasneje smo preverili z barkodiranjem identiteto vrst.*

DS1.2: Genetska identifikacija referenčnega materiala

Izolacija DNA. Za izolacijo DNA iz svežih celih rib, konzerviranih rib, filetov in lignjev smo optimizirali dva protokola, in sicer protocol CTAB-PVP, prirejen po Japelaghi in sod. (2011) in komercialni kit za izolacijo DNA E.Z.N.A Mollusc DNA Kit (OMEGA bio-tek). Izolacija DNA s kitom proizvajalca E.Z.N.A Mollusc DNA Kit (OMEGA bio-tek) je bila enostavnejša, izolirana DNA višje čistosti zaradi adhezije DNA na silikatnih kolonah. S protokolom CTAB-PVP smo pridobili večjo količino DNA, zato smo za vse nadaljnje vzorce uporabili to metodo. Poleg tega je metoda tudi cenovno ugodnejša. Protokol za izolacijo DNA je v Prilogi 1. Koncentracijo izolirane DNA smo izmerili s fluorimetrično metodo na fluorimetru Qubit™ v 3.0 (Invitrogen, ZDA) in s kompletom reagentov Quant® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, ZDA). Za izolacijo DNA iz različnih vzorcev (sveži vzorci, zamrznjeni vzorci tkiv, prekuhani in naoljeni vzorci kot so ribje konzerve, ribje palčke) smo uporabili različne metode izolacije DNA od komercialnih kitov do klasičnih metod izolacije. Vzorce konzerv in ribjih palčk smo najprej v različnih raztopinah razmastili (heksan, mešanica kloroforma in izoamil alkohola), da bi pridobili čimbolj čisto DNA, za različne tehnike pomnoževanja, ki sse med sabo ločijo po občutljivosti (LAMP, Q-PCR testi, klasičen PCR). Rezultate je potrebno sistematično opisati in objaviti v strokovni literaturi.

Genetska karakterizacija referenčnega materiala z markerjem COI. Za genetsko karakterizacijo lignjev smo uporabili univerzalne začetne oligonukleotide (Folmer in sod., 1994) in pomnoževanje s klasičnim PCR in testirali različne pogoje pomnoževanja (Tabela 2) ter preverili vpliv posameznih reagentov v PCR na učinkovitost pomnoževanja. Za osnovni PCR protokol smo uporabili protokol avtorjev Kneibelsberger in sod. (2016), ter ga modificirali (glej Tabela 2), ena od bistvenih komponent je izbira primerne Taq DNA polimeraze (Thermo Fisher), ki omogoči optimalno pomnoževanje.

Tabela 2 Reakcijska mešanica pomnoževanja v PCR za lignje.

Reagenti	Volumen [μ L]	Delovna koncentracija
10× PCR pufer	2,5	1× PCR pufer
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2 mM
dNTP (2 mM vsak)	2,5	0,2 mM vsak
LCO1490 (10 pmol/ μ l)	0,5	0,2 pmol/ μ l
HCO2198 (10 pmol/ μ l)	0,5	0,2 pmol/ μ l
DNA-polimeraza (5 U/ μ l)	0,125	0,025 U/ μ l
H ₂ O	15,875	
DNA	1	
Skupni volumen reakcije	25	

Tabela 3 Temperaturni profil pomnoževanja gena COI pri lignjih.

Temperatura	Čas	
94 °C	2 min	
94 °C	30 s	×35
55 °C	30 s	
72 °C	60 s	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

Za ribje vrste sardela, sardon in papalina smo uporabili začetne oligonukleotide z oznako Fish (Ward in sod., 2005) in polimerazo GoTaq® DNA (Promega). Reakcija PCR je potekala v skupnem volumnu 15 μ l (Tabela 4), po naslednjem temperaturnem profilu (Tabela 5):

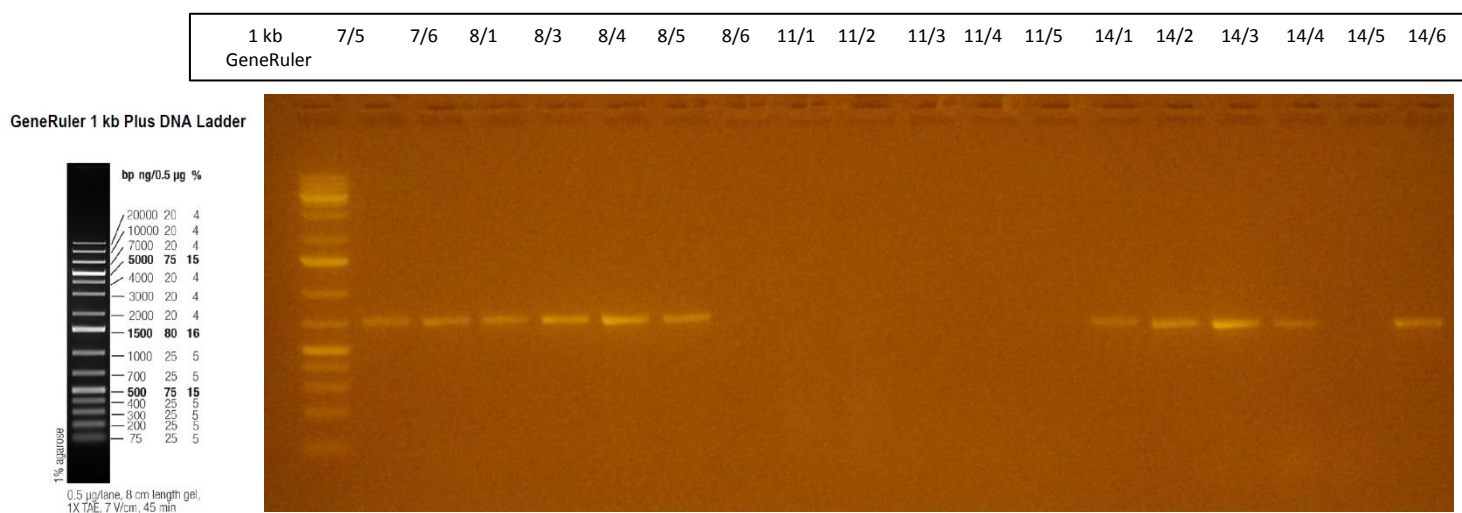
Tabela 4 Reakcijska mešanica pomnoževanja v PCR za vrste sardela, sardon in papalina.

Reagenti	Volumen [μ L]	Delovna koncentracija
5× PCR pufer	3	1× PCR pufer
MgCl ₂ (25 mM)	1,2	2 mM
dNTP (2 mM vsak)	1,2	0,2 mM vsak
FishF1_2 (10 pmol/ μ l)	0,3	0,2 pmol/ μ l
FishR1_2 (10 pmol/ μ l)	0,3	0,2 pmol/ μ l
DNA-polimeraza (5 U/ μ l)	0,075	0,025 U/ μ l
H ₂ O	3,9	
DNA	5	
Skupni volumen reakcije	15	

Tabela 5 Temperaturni profil pomnoževanja gena COI pri vrstah sardela, sardon in papalina.

Temperatura	Čas	
94 °C	5 min	
94 °C	30 s	×30
52 °C	30 s	
72 °C	1 min 30 s	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

Uspešnost pomnoževanja DNA rib in lignjev v reakciji PCR smo pred nadaljnjimi analizami preverili na 1,8 % agaroznem gelu (Slika 6). Pričakovana velikost fragmenta COI je 600bp, kar je videti na Slika 6, kjer so naloženi na agarozni gel namnoženi fragmenti COI iz različni vrst lignjev.



Slika 6 Rezultati pomnoževanja regije COI pri lignjih (zgoraj: oznake vzorcev).

Po uspešnem pomnoževanju vzorcev rib in lignjev je sledilo čiščenje PCR produktov z reagentom Exonuclease I (ExoI, Thermo Scientific), ki razgradi začetne oligonukleotide, in z reagentom Thermo Sensitive Alkaline Phosphatase (FastAP, Thermo Scientific), ki razgradi nukleotide (A, C, G, T), ki se niso porabili v reakciji PCR. Sledila je priprava sekvenčne reakcije za pomnoževanje produktov za sekvenciranje v skupnem volumnu 10 µl. V tem PCR smo poprej očiščenemu produktu PCR (3,5 µl) dodali začetni oligonukleotid (začetni ali povratni oligonukleotid) v založni koncentraciji 10 µM (0,2 µl na vzorec), BigDye 3.1 terminator (0,5 µl na vzorec), 5x sekvenčni pufer (2 µl na vzorec) in vodo (3,8 µl na vzorec). Temperaturni profil sekvenčne reakcije je prikazan v Tabela 6.

Tabela 6 Temperaturni profil sekvenčne reakcije za pomnoževanje gena COI pri vrstah sardela, sardon in papalina za sekvenciranje.

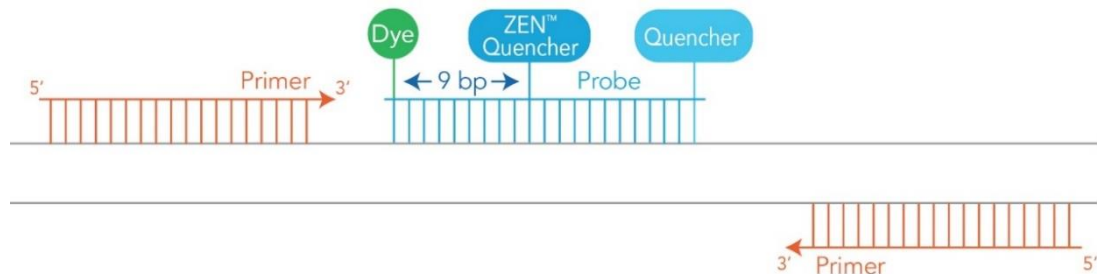
Temperatura	Čas	
96 °C	3 min	
96 °C	10 s	×50
50 °C	10 s	
60 °C	4 min	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

Po končani sekvenčni reakciji smo produkte očistili in jih nato sekvencirali na genetskem analizatorju SeqStudio (Applied Biosystems). Za sekvenciranje vzorcev v postopku barkodiranja smo uporabili še komercialni servis Macrogen, kamor smo poslali prečiščene produkte PCR na sekvenciranje (76 vzorcev) obeh verig DNA. Nato smo v programu Chromas naredili konsenzusna zaporedja in ročno preverila vsako nukleotidno zaporedje in preverili bralni okvir z orodjem ExPASy Tool (Swiss Bioinformatics Institute). Dobljena nukleotidna zaporedja rib in lignjev smo primerjali z obstoječimi podatki v javno dostopnih mednarodnih podatkovnih bazah (GenBank NCBI in BOLD) in tako potrdili, kateri vrsti pripadajo analizirani vzorci. Vse vzorce lignjev, ki smo jih povzorčili smo barkodirali in naredili filogenetsko drevo, da smo preverili ali so vrste, ki smo jih obravnavali filogenetsko ločene, ker iz literature teh podatkov nismo mogli pridobiti. V Prilogi 2 je prikazano filogeentsko drevo na osnovi COI markerja za vzorčene in referenčne vrste lignjev. Obširno je postopek in rezultati opisano v magistrski nalogi RUBINIĆ, Marko. *Visokoosjetljivi DNA testovi za određivanje zamjena vrsta u plodovima mora : diplomski rad*. Rijeka: [M. Rubinić], 2020. 103 f., ilustr. [COBISS.SI-ID [34083331](#)].

DS1.3: Razvoj in optimizacija molekularnega testa na osnovi informativnih odsekov mitohondrijske DNA

DNA predelanih rib, kot so konzerve, je zaradi toplotne obdelave razgrajena na krajše fragmente, ki so lahko krajši od 500bp. V takih primerih je težko pomnoževanje daljših markerjev kot je barkodiranje s COI. Identifikacija predelanih rib je zato uspešnejša s pomnoževanjem s Q-PCR, ki omogoča specifično detekcijo in kvantifikacijo DNA v zahtevnih vzorcih kot so vzorci z razgrajeno DNA, majhna količina matrične DNA, itd. Pregled literature in primerjava nukleotidnih zaporedij tarčnih vrst velika sardela *Sardinella aurita*, sardela *Sardina pilchardus*, papalina *Sprattus sprattus*, sardon *Engraulis encrasicolous* ter sorodnih vrst je pokazala, da je primeren marker 16S rDNA iz mitohondrijev. Primerjava nukleotidnih zaporedij je pokazala, da so določene regije 16S rDNA dovolj specifične za razlikovanje rodov znotraj družine Clupeidae in da je možno narediti identifikacijske teste, ki so specifični za vrsto. Razvili smo specifične molekularne sonde za odkrivanje vrst velika sardela *Sardinella aurita*, sardela *Sardina pilchardus*, papalina *Sprattus sprattus*, sardon *Engraulis encrasicolous* na osnovi 16S rDNA. Molekularni test za posamezno vrsto vključuje vodilni (F) in povratni (R)

začetni oligonukleotid ter sondo, ki je označena z barvilom FAM in z dvojnima utiševalcema (ZEN in 3IABkFQ) (Integrated DNA Technologies) kot prikazuje Slika 7.



Slika 7 Prikaz prileganja začetnih oligonukleotidov in sonde s fluorescentno oznako ter utiševalcema (Vir: Integrated DNA Technologies).

Na osnovi obsežne primerjave nukleotidnih zaporedij iz omenjenih vrst, smo razvili naslednja zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond na podlagi bioinformatične analize nukleotidnih zaporedij 16S rDNA:

Test za *Engraulis encrasicolous*

F: AGACGAGAAGACCCTATGGAGCT

R: TGGTCGCCCCAACCTAAGA

sonda: 5'-/56-FAM/AAC TCA ACA /ZEN/ AGT CCT AAA TAC CCG CAG CCT T/3IABkFQ/-3'

Test za *Sardina pilchardus*

F: AGACGAGAAGACCCTATGGAGCT

R: TCGCCCCAACCGAAGA

sonda: 5'- /56-FAM/AGC ACC CTA /ZEN/ CAC CAG GGC CCA AAC/3IABkFQ/-3'

Test za *Sardinella aurita*

F: AGACGAGAAGACCCTATGGAGCT

R: TCGCCCCAACCGAAGA

sonda: 5'- /56-FAM/AGA TGC TCT /ZEN/ AAA CAA CGC GGT CCT GGT A /3IABkFQ /-3'

Test za *Sprattus sprattus*

F: AGACGAGAAGACCCTATGGAGCT

R: TCGCCCCAACCGAAGA

sonda: 5'- /56-FAM/CCC ACC AAT /ZEN/ CAT GAA AAG CAA GTC TCA GTT /3IABkFQ /-3'

Specifičnost 16S rDNA molekularnih testov za identifikacijo posamezne vrste smo najprej testirali na svežem referenčnem tkivu navedenih vrst. Za testiranje smo uporabili reagente PerfeCTa qPCR ToughMix (Quanta bio) in reakcijsko mešanico pripravili po navodilih proizvajalca (Tabela 7).

Tabela 7 Reakcijska mešanica za Q-PCR za testiranje specifičnosti razvitih molekularnih testov na osnovi 16S rDNA za izbrane vrste rib.

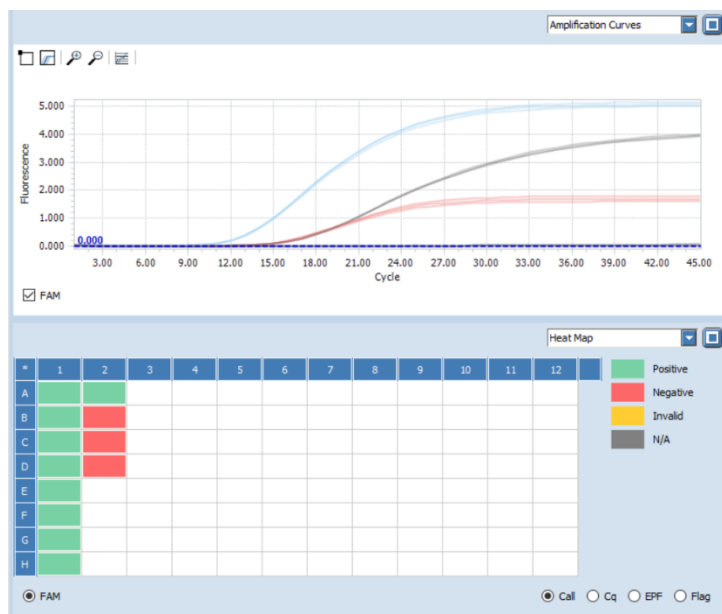
Reagent	Volumen [μ L]	Delovne koncentracije
Ultra čista voda	3	
Vodilni začetni oligonukleotid (10 μ M)	0,8	0,4 μ M
Povratni začetni oligonukleotid (10 μ M)	0,8	0,4 μ M
Sonda	0,4	0,2 μ M
Master Mix	10	
DNA	5	
Skupni volumen reakcije	20	

Pomnoževanje vzorcev DNA je potekalo v aparatu LightCycler 96 (Life Science, Roche) po temperaturnem profilu predstavljenem v Tabela 8.

Tabela 8 Temperaturni profil reakcije PCR v aparatu LightCycler 96.

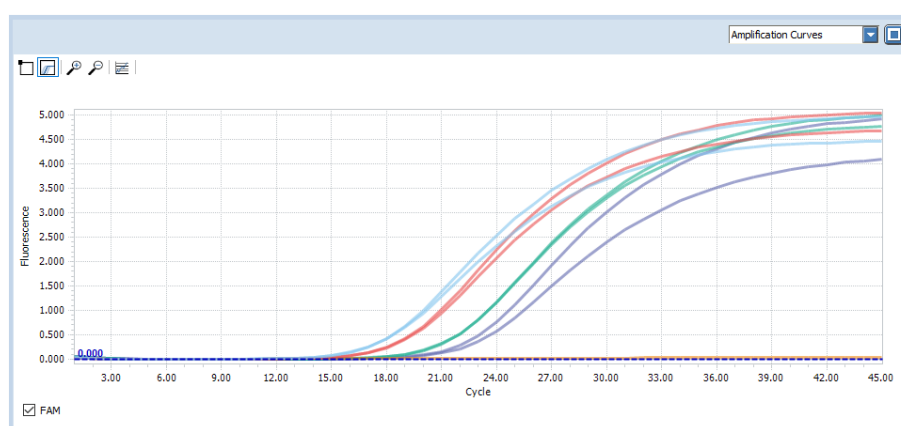
Korak PCR reakcije	Temperatura	Čas pomnoževanja	
Denaturacija DNA	95 °C	600 s	
2-stopenjsko pomnoževanje	95 °C	10 s (hitrost segrevanja 4,4 °C)	× 45 ciklov
	60 °C	30 s (hitrost ohlajanja 2,2 °C)	
Ohlajanje	37 °C	30 s	

S testiranjem molekularnih testov na referenčnem materialu smo potrdili specifičnost molekularnih testov za vrste sardela *Sardina pilchardus*, inčun *Sprattus sprattus* in sardon *Engraulis encrasicolous* (Slika 8). Specifičnosti molekularnega testa za vrsto *Sardinella aurita* nismo testirali, ker nismo imeli na voljo referenčnega materiala. Omenjen molekularni test smo preizkusili na vrsti *Sardina pilchardus*, kjer nismo ugotovili navzkrižnega pomnoževanja. Z navzkrižnim testiranjem smo preverili tudi specifičnost drugih molekularnih testov. Pri nobeni kombinaciji nismo zaznali nespecifičnega pomnoževanja in zato sklepamo, da so razviti molekularni testi vrstno specifični, kot prikazuje Slika 8.

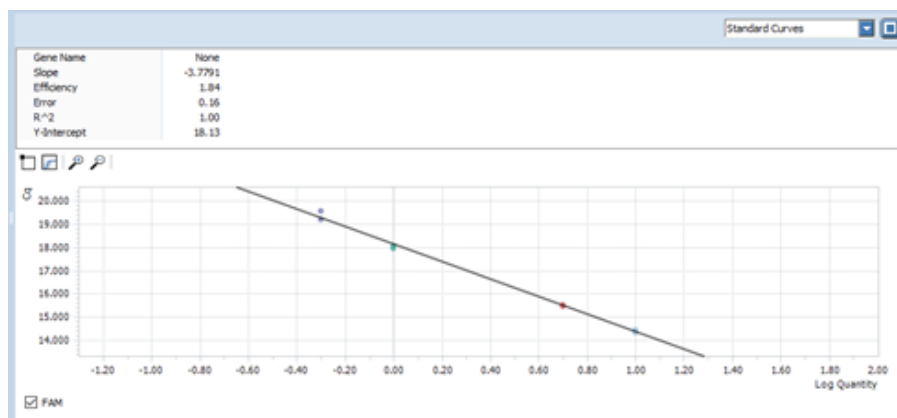


Slika 8 Prikaz pomnožitvenih krivulj (zgoraj) in prikaz plošče s pozitivnimi rezultati (zelena barva) in negativno kontrolo (rdeča barva) za vrste sardela *Sardina pilchardus*, sardon *Engraulis encrasicolous* in inčun *Sprattus sprattus*.

Q-PCR omogoča kvantifikacijo specifičnih molekul DNA v vzorcu, zato smo testirali občutljivost razvitih molekularnih testov za kvantifikacijo DNA specifične vrste. Pripravili smo standardne raztopine DNA različnih redčitev in pripravili umeritveno krivuljo iz naslednjih količin DNA: 10 ng, 5 ng, 1 ng in 0,5 ng. Umeritvena krivulja prikazuje odvisnost med kvantifikacijskimi cikli (cikel, pri katerem fluorescenca vzorca preseže fluorescenco ozadja, ang. quantification cycle, Cq) in desetiškim logaritmom začetne količine tarčne DNA. Slika 9 prikazuje primer pomnožitvene krivulje in Slika 10 umeritveno krivuljo za kvantifikacijo DNA v referenčnem vzorcu sardele *Sardina pilchardus*.



Slika 9 Primer pomnožitvenih krivulj standardnih raztopin za vrsto sardela *Sardina pilchardus*.



Slika 10 Primer umeritvene krivulje, izrisane izkvantifikacijskih vrednosti (C_q vrednosti) in desetiškega logaritma količine DNA za vrsto sardela *Sardina pilchardus*.

Novo razvite molekularne teste smo nato testirali na ribjih konzervah. Vzorce sardele smo testirali z molekularnima testoma za *Sardina pilchardus* in *Sardinella aurita*, vzorce sardona s testom za *Engraulis encrasicolous* in vzorce papaline s testom za *Sprattus sprattus*.

DS1.4: Testiranje in optimizacija Q-PCR testov

Preverba specifičnosti razvitih molekularnih testov je bila predpogoj, da smo lahko začeli s testiranjem vseh vzorcev iz ribjih konzerv s Q-PCR za vrste sardela *Sardina pilchardus*, velika sardela *Sardinella aurita*, papalina *Sprattus sprattus* in sardon *Engraulis encrasicolous*. Za testiranje identitete navedene vrste na embalaži smo uporabili DNA, ki smo jo izolirali po postoku navedenem v poglavju DS1.2. Preverjali smo identiteto vrste, ki je navedena na deklaraciji na embalaži, v nekaterih primerih vrsta ni bila navedena (7 konzerv brez navedbe vrste). Analizirali smo 34 različnih konzerv, ki so pripadale 29 blagovnim znamkam, ki so glede na informacije na deklaraciji vsebovale vrste iz družine Clupeidae. Po podatkih na deklaracijah smo zbrali naslednje vrste: *Engraulis encrasicolus*, *E. ringens*, *Sardina pilchardus* in *Sprattus sprattus*. Med vsemi zbranimi konzervami so bile najbolj zastopane konzerve s sardelami (21 konzerv), sledile so konzerve s sardoni (10 konzerv), 2 konzervi s perujskimi sardoni in 1 konzerva s papalinami. Iz vsake konzerve smo v analizo vključili vsaj tri osebke: osebke, ki po videzu niso sodili v deklarirano vrsto, označeno na deklaraciji, oziroma tri naključno izbrane osebke. Skupno smo torej analizirali 34 konzerv in 102 vzorca DNA (Tabela 9). Vsi vzorci DNA so bili analizirani v dveh tehničnih ponovitvah.

Tabela 9 Seznam analiziranih vrst rib ter število analiziranih konzerv in število posameznih osebkov.

Vrsta ribe	Število analiziranih konzerv	Število analiziranih osebkov
sardela (<i>Sardina pilchardus</i>)	21	62

sardon (<i>Engraulis encrasicolus</i>)	10	30
Perujski sardon (<i>Engraulis ringens</i>)	2	7
Papalina (<i>Sprattus sprattus</i>)	1	3
SKUPAJ	34	102

Vzorci sardel smo testirali s Q-PCR testom za vrsto *Sardinella pilchardus* in *Sardinella aurita*, da bi zagotovili nedvoumno identifikacijo vrste. Znano je namreč, da se vrsto sardela (*Sardinella pilchardus*) potvarja z vrsto velika sardela (*Sardinella aurita*). Vzorci sardonov smo analizirali samo z molekularnim testom za *Engraulis encrasicolus* in vzorce papalin z molekularnim testom *Sprattus sprattus*.

Konzerve s sardelami: v primeru ene konzerve (4 testirani osebki) z oznako, da vsebuje sardele, so bili rezultati analize negativni, kar pomeni, da ni bilo mogoče potrditi skladnosti s poimenovanjem vrste na deklaraciji. Pri vseh ostalih 20 konzervah sardel je bilo pomnoževanje DNA uspešno z molekularnim testom za vrsto *Sardina pilchardus*. Vse te osebke smo testirali še z molekularnim testom za vrsto *Sardinella aurita* in v nobenem primeru ni prišlo do pomnoževanja. V vseh 20 konzervah smo potrdili pravilnost navedbe na deklaraciji in potrdili uporabnost testa za potrjevanje vrste *Sardina pilchardus*.

Konzerve s sardoni: analizirali smo 10 konzerv s sardoni in dve konzervi s perujskimi sardoni. Pomnoževanje DNA je bilo uspešno v 10 konzervah, na katerih je bilo na deklaracijah navedeno, da gre za vrsto *Engraulis encrasicolus*. S tem smo potrdili pravilno označbo vrste na deklaracijah desetih konzerv. DNA iz vzorcev perujskih sardonov se s testom za vrsto *Engraulis encrasicolus* ni pomnožila, s čimer smo potrdili specifičnost testa za vrsto *Engraulis encrasicolus*. Testa za *Engraulis ringens* ni na voljo in zato tudi ni bilo moč potrditi pravilnosti navedbe na deklaraciji.

Konzerva s papalinami: analizirali smo eno konzervo oziroma tri osebke in potrdili istovetnost z označeno vrsto na deklaraciji konzerve.

DS2.2 Proučitev primernosti novo razvitih molekularnih testov za razvoj metode LAMP

Za razvoj LAMP testa (angl. loop-mediated isothermal amplification oz. izotermalno pomnoževanje posredovano z zanko) za potrjevanje pristnosti živilskih proizvodov iz lignjev smo določili 4 kandidatne genske regije (16S rRNA, 18S rRNA, citokrom c oksidaza (COI) in citokrom b oksidaza (cytb)), ki so v uporabi tudi pri identifikaciji drugih živalskih vrst.

Po javno dostopnih zbirkah sekvenc (GenBank, BOLD <http://boldsystems.org/>) smo poiskali vse razpoložljive sekvence od vsake genske regije po vrstah lignjev, ki smo jih s popisom ugotovili na slovenskem tržišču glede na deklaracije: *Doryteuthis gahi*, *Dosidicus gigas*, *Illex*

coindetii, *Loligo forbesi*, *Loligo reynaudii*, *Loligo vulgaris*, *Urotheuthis chinensis*. Regija na mitohondrijski DNA, oz. del zaporedja encima citokrom oksidaze podenota I (COI, Folmerjeva regija v dolžini 650 bp) je bila v podatkovnih zbirkah najbolj zastopana za proučevane vrste in je zato služila kot osnova za razvoj metode LAMP.

Za vzpostavitev lastne zbirke nukleotidnih zaporedij tržno dostopnih vrst lignjev v Sloveniji (vzorčenje opravljeno v 16 trgovinah po Sloveniji, 1 trgovina predstavlja 1 vzorec z 10 osebki) smo v pridobljenih vzorcih pomnožili regijo COI in določili nukleotidno zaporedje. Nekateri vzorci so zahtevali še dodatno optimizacijo pomnoževanja s PCR (sprememba temperaturnega profila, zamenjava Taq polimeraze), da je bilo njihovo pomnoževanje uspešno (Tabela 2).

Vsa zbrana nukleotidna zaporedja regije COI za omenjene vrste lignjev smo poravnali ter odbrali tiste, ki so se z referenčnimi sekvencami (iz podatkovne zbirke BOLD ter zaporedja, ki smo jih pridobili s sekvenciranjem regije COI lastnih vzorcev) najbolj ujemale in jih ocenili kot verodostojne za nadaljne analize in kot uporabne za izdelavo metode LAMP. Poudariti je potrebno, da je pri odbiranju nukleotidnih zaporedij za razvoj metod potrebna velika previdnost, saj je objavljenih veliko nezanesljivih zaporedij, ki niso povezana s taksonomsko določitvijo analiziranega osebka, kar povzroča velik šum pri analizi ali celo napake. Še posebej smo bili pozorni ali zaporedje izvira iz znanstvene objave in na spremljajoče podatke o analiziranem osebku: dokumentirana taksonomska določitev in vključitev v zbirko BOLD, geografski izvor, vrsta vzorca ali je bilo to sveže tkivo, predelano živilo ter tudi kakovost znanstvene objave. Vsako zaporedje je bilo ročno pregledano v programu ChromasPro 2.1.8 (Technelysium, 2018), preverjeno ali kodira pravi protein z orodjem ExPASy Translate Tool (Swiss Institute of Bioinformatics) z mitohondrijskim genskim kodom. Končni set podatkov po vrstah smo poravnali z uporabo programa MAFFT (Kazutaka Katoh, 2006) in dokončno obdelali s programsko opremo MEGA 10. 0.5 (2020). Na tako poravnanih sekvencah smo začeli z izdelavo začetnih oligonukleotidov za LAMP.

Izmed vseh izbranih nukleotidnih zaporedij navadnega lignja smo identificirali 21 haplotipov (zaporedij, ki so se med seboj razlikovala vsaj na enem nukleotidnem mestu). Najbolj zastopano zaporedje vrste *Loligo vulgaris* smo določili za referenčno zaporedje. Zaradi ugotovljene znotrajvrstne variabilnosti na regiji COI smo k razvoju metode LAMP pristopili na način, da bi z enim setom začetnih oligonukleotidov lahko pomnožili nukleotidna zaporedja vseh haplotipov. Za razvoj začetnih oligonukleotidov za metodo LAMP smo uporabili prosto dostopno orodje PrimerExplorer v5, ki ima implementiran algoritem za načrtovanje specifičnih začetnih oligonukleotidov, t.j. da začetni oligonukleotidi pomnožijo le haplotipe izbrane vrste, tako da upošteva podatek, na katerih mestih v nukleotidnem zaporedju se druge vrste ločijo od referenčnega zaporedja navadnega lignja. Za identifikacijo variabilnih mest smo haplotipe ostalih vrst poravnali z referenčnim zaporedjem navadnega lignja z orodjem Clustal Omega in rezultat uporabili za pripravo vhodne datoteke za PrimerExplorer v5 s spletnim orodjem MorphoCatcher. Z orodjem PrimerExplorer v5 smo pridobili več setov začetnih oligonukleotidov za vsako vrsto posebej, med katerimi je bilo sedem takih, ki so bili določeni kot specifični za pomnoževanje le DNA navadnega lignja. Začetne oligonukleotide izbranih setov smo modificirali tako, da smo nukleotidna mesta, ki prilegajo na znotrajvrstna variabilna mesta, nadomestili z IUPAC oznako (s tem smo zagotovili, da začetni oligonukleotidi priležejo

na zaporedja vseh haplotipov). Specifičnost setov začetnih oligonukleotidov smo preverili še z orodjem Primer-BLAST oziroma z R paketom primerTree, ki omogoča dostop do Primer-BLAST z uporabo programa R. Z IUPAC oznakami smo modificirali vseh 7 izbranih setov začetnih oligonukleotidov za metodo LAMP.

Natančen opis bioinformacijskega dela razvoja metode LAMP je podrobno opisan v zaključni nalogi študenta Gregorja Grbca, s katero je uspešno zaključil študij Bioinformatike na Univerzi na Primorskem, FAMNIT (povezava do zaključne naloge https://www.famnit.upr.si/sl/studij/zakljucna_dela/view/934)

DS2.3: Optimizacija standardiziranega molekularnega testa

Testiranje testa LAMP v laboratoriju (NIB), kjer smo izdelali smo laboratorijski protokol za testiranje LAMP. Upoštevali smo priporočene standardne pogoje za reakcijo LAMP po navodilih Optigene Ltd., Horsham, UK (glej Tabela 10).

Tabela 10 Priporočena koncentracija začetnih oligonukleotidov za 25,0 µL LAMP reakcijo

Začetni oligonukleotid	koncentracija
F3	0,2µM
B3	0,2µM
FIP	0,2µM
BIP	0,2µM
LoopF	0,2µM
LoopB	0,2µM

Uporabili smo set reagentov proizvajalca GspSSD Master Mix (Kat. št. ISO-001), ki ima primerne lastnosti: temperaturni optimum delovanja polimeraze je 65°C in zadovoljivo območje delovanja je od 60°C do 65°C. Preizkus reakcije je potekal 60 minut na 63°C in na 65°C, koncentracijski razpon DNA od 2 ng/µL do 15ng/µL in volumen reakcije 25,0 µL. Testiranje smo izvedli na referenčnih vzorcih lignjev *Loligo vulgaris*. Na osnovi znane velikosti mitohondrijskega genoma lignjev (*Idiosepius* sp. velikost mitohondrijske DNA je 16.183 bp) in koncentracije izolirane DNA smo ugotovili da imamo v vzorcih od 1.4×10^{10} do 2.86×10^{10} mitohondrijskih genomov, kar smo potrebovali za izračun redčenja DNA. Rezultat amplifikacije testa LAMP je bil pri obeh temperaturah negativen, kar pomeni da nismo mogli izdelati testa pod temi pogoji.

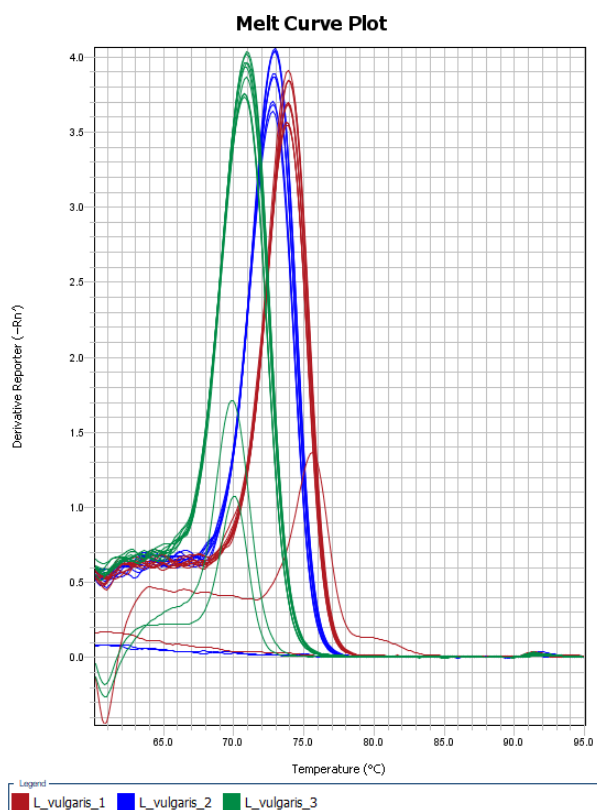
Izdelava Q-PCR testa za identifikacijo lignjev s Q-PCR na osnovi Tm za različne matrične DNA. Izvedba poskusnega testiranja za ugotavljanje Tm - High Resolution Melting (HRM) na podlagi katere lahko ločimo molekule DNA (zaradi različne sestave baz se nekoliko loči tudi Tm) s sondo, ki je označena s fluorokromom SyberGreen. Za vsak test smo pripravili reakcijsko mešanico kot je navedeno v Tabela 11. V reakcijo smo dodali še 3 µL vzorca (neredčena izolirana DNA iz lignja). Analizirali smo vse referenčne vzorce lignja *Loligo vulgaris* ter po 3 vzorce iz vsake skupine (12 skupin), za vsak vzorec smo naredili 2 redčini (10x in 100x redčenje), skupaj smo analizirali 60 vzorcev. Za negativno kontrolo smo uporabili PCR vodo, za

pozitivno kontrolo pa sintetizirano konsenzusno zaporedje COI narejeno na osnovi analiziranih COI nukleotidnih zaporedij iz lignja *Loligo vulgaris*, ki so ga sintetizirali po naročilu v podjetju Eurofins. Liofilizirano DNA smo raztopili v pufru TE na koncentracijo 10ng/μL in jo nato redčili še 100x, 1000x in 1.000 000x ter jih uporabili kot pozitivne kontrole v Q-PCR.

Tabela 11 Reakcijske mešanice za ugotavljanje Tm za različne Q-PCR teste za Loligo vulgaris

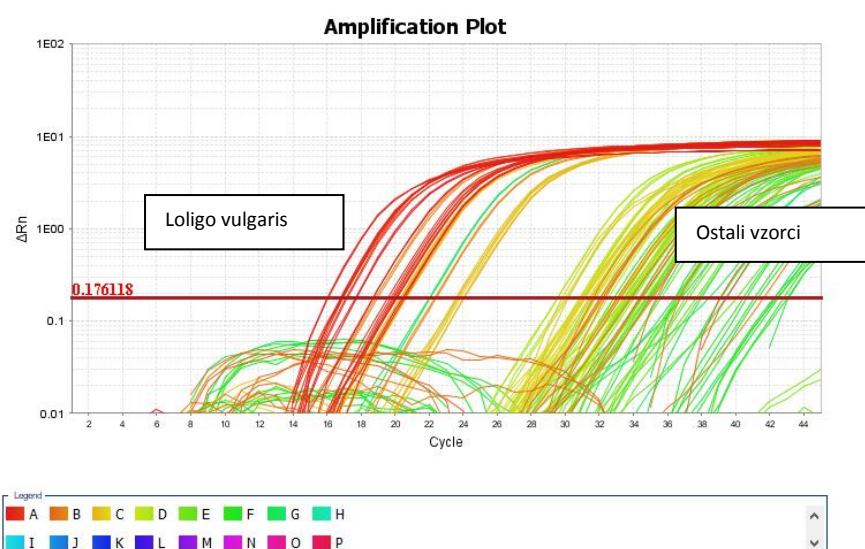
Test 1 Loligo vulgaris		
Reagent	Končna koncentracija	μl za 1 reakcijo (20μl)
L.vulgaris_1FP (10 uM)	900 nM	1.8
L.vulgaris_1RP (10uM)	900 nM	1.8
2x Power SYBRGreen Mastermix	1x	10
PCR voda	/	3.4
Test 2 Loligo vulgaris		
L.vulgaris_2FP (10 uM)	900 nM	1.8
L.vulgaris_2RP (10uM)	900 nM	1.8
2x Power SYBRGreen Mastermix	1x	10
PCR voda	/	3.4
Test 3 Loligo vulgaris		
L.vulgaris_3FP (10 uM)	900 nM	1.8
L.vulgaris_3RP (10uM)	900 nM	1.8
2x Power SYBRGreen Mastermix	1x	10
PCR voda	/	3.4

Rezultati: Testiranje vzorcev lignjev s testom SyberGreen za razločevanje vrst. Na sliki so profili Tm krivulj.



Slika 11 Prikaz talilnih krivulj za določanje HRM (High Resolution melting) s SyberGreen; različni testi so označeni z barvami: Test 1 (rdeče $T_m = 73,87$), Test 2 (modro $T_m = 72,86$) in Test 3 (zeleno $T_m = 70,84$) narejeni na neredčenih vzorcih. Temperatura pomnoževanja je bila 60°C .

Test smo ponovili še z vzorci, ki smo jih redčili še 10x ($3\mu\text{L}$ DNA in $27\mu\text{L}$ PCR vode) in 100x ($3\mu\text{L}$ 10x redčine, $27\mu\text{L}$ vode). Za pozitivno kontrolo smo uporabili sintetizirano DNA lignja *Loligo vulgaris*, ki je bila redčena 1.000.000x gBLOCK in ponovili vse tri teste (Test 1, Test 2 in Test 3) z različnimi referenčnimi vzorci lignjev *Loligo vulgaris* (glej Slika 11).



Slika 12 Prikaz pomnoževalnih krivulj za test HMT s SyberGreen pri temperaturi 60°C .

Slika 12 prikazuje pomnoževanje COI v jadranskih lignjih *Loligo vulgaris* in drugih vrstah (*Todarodes sagittatus*, *Illex coindetti* ter v skupinah nabranih vzorcev); ugotovili smo da prihaja do navzkrižne reaktivnosti z ostalimi vrstami. Pri nekaterih vrstah kaže, kot da prihaja do inhibicije pomnoževanja, saj je rezultat 10x redčine slabši kot pri 100x redčenju vzorcev. Zaradi navzkrižne reaktivnosti z drugimi vrstami smo se odločili preizkusiti višjo temperaturo naleganja začetnih oligonukleotidov in sond pri 62°C (glej Tabela).

Tabela 12 Temperaturni profil pomnoževanja DNA lignjev s Q-PCR za določanje optimalne in specifične temperature pomnoževanja

Postopek (Procedure): 02GPos32				
Dejavnost	Temperatura	Čas	Število ciklov (instrument)	Hitrost segrevanja / ohlajanja
UNG* aktivnost	50°C	2 min	1	1,6°C/s
Aktivacija polimeraze	95°C	10 min	1	1,6°C/s
Amplifikacija	95°C 62°C	15 s 60 s	45 ciklov	1,6°C/s
HRM	95°C 60°C 95°C	15 s 15 s 15 s	1	1,8°C/min; 1,6°C/min; 0,03°C /s

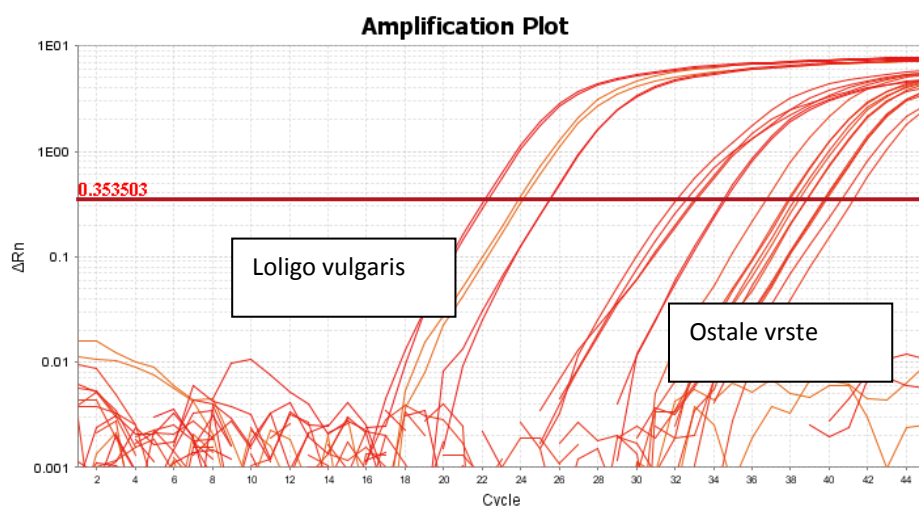
Rezultati pomnoževanja pri višji temperaturi so prikazani na spodnji sliki in tabeli.

Test 1 *Loligo vulgaris*

FP ATGAACAGTGTACCCCCATTATC

RP GACGGTCCTGCGTGAGAAAG

SEQ-*Loligo vulgaris* ATGAACAGTGTACCCCCATTATCTAGAAATCTTTCTCACGCAGGACCGTC



Slika 13 Prikaz pomnoževalnih krivulj za test HMT s SyberGreen za Test 1 narejen na neredčenih vzorcih lignjev. Temperatura pomnoževanja je bila 62°C.

Rezultati pomnoževanja s testom 1 so prikazani na Slika 13 in v Tabela 2, razvidna je navzkrižna reaktivnost *Uroteuthis chinensis* (100x redčena DNA), ki pa se kasneje pri višji redčitvi (1000x) ne pojavi več. Rezultat je potrebno še enkrat ovrednotiti.

Tabela 13 Rezultati pomnoževanja pri 62°C za Test 1.

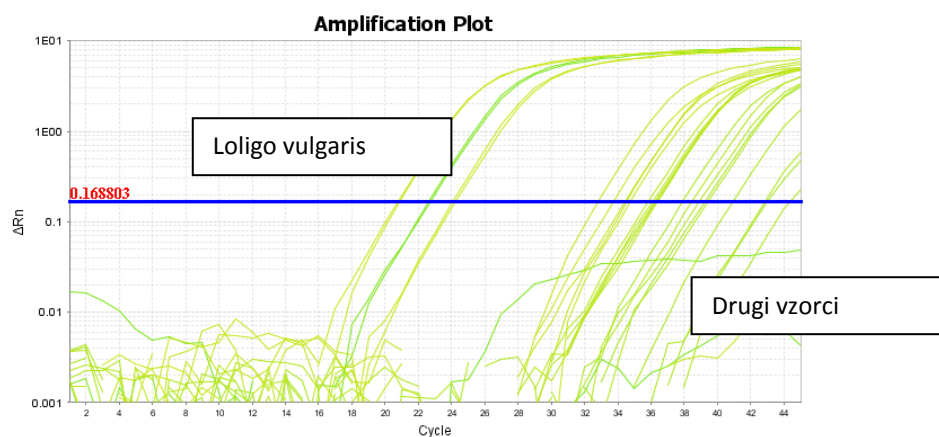
	L_vulgaris 1					Expected Tm 73.87	
	Sample Name	CT	Average Ct	Delta Ct	Tm	Average Tm	Komentar
<i>Loligo vulgaris</i>	lolul2 100x	22.14	22.22	3.29	73.50	73.48	OK
<i>Loligo vulgaris</i>	lolul2 100x	22.31			73.50		
<i>Loligo vulgaris</i>	lolul2 1000x	25.51	25.52		73.50		
<i>Loligo vulgaris</i>	lolul2 1000x	25.52			73.42		
<i>Dorytheuthis gahi</i>	ATLI1/1 100x	34.62	34.56		73.03	72.99	Run 58: 10x redčina inhibirana
<i>Dorytheuthis gahi</i>	ATLI1/1 100x	34.51			72.95		Tm malo nižja od pričakovane.
<i>Dorytheuthis gahi</i>	ATLI1/1 1000x	Undetermined			91.42		100x enaka v obeh runih
<i>Dorytheuthis gahi</i>	ATLI1/1 1000x	Undetermined			91.42		
<i>Alloteuthis media</i>	ALLMED1 100x	32.57	32.32	0.74	72.95	74.31	Ni razlike med 100x in 1000x, podobno v runu 58
<i>Alloteuthis media</i>	ALLMED1 100x	32.08			73.18		
<i>Alloteuthis media</i>	ALLMED1 1000x	33.03	33.07		78.55		
<i>Alloteuthis media</i>	ALLMED1 1000x	33.10			72.55		
<i>Dosidicus gigas</i>	Lignji 7/1 100x	38.86	39.75	0.05	75.16	77.45	OK
<i>Dosidicus gigas</i>	Lignji 7/1 100x	40.64			77.60		Tm ni ustrezna
<i>Dosidicus gigas</i>	Lignji 7/1 1000x	39.78	39.80		77.60		
<i>Dosidicus gigas</i>	Lignji 7/1 1000x	39.82			79.42		
<i>Illex coindetii</i>	Lignji 15/1 100x	38.01	38.16	2.43	73.97	78.02	OK
<i>Illex coindetii</i>	Lignji 15/1 100x	38.31			74.13		Tm ni ustrezna
<i>Illex coindetii</i>	Lignji 15/1 1000x	41.28	40.59		81.87		
<i>Illex coindetii</i>	Lignji 15/1 1000x	39.89			82.11		
<i>Uroteuthis chinensis</i>	Lignji 12/1 100x	37.91	37.33	1.37	73.66	73.66	Navzkrižna reaktivnost?
<i>Uroteuthis chinensis</i>	Lignji 12/1 100x	36.76			73.89		
<i>Uroteuthis chinensis</i>	Lignji 12/1 1000x	38.90	38.70		73.34		
<i>Uroteuthis chinensis</i>	Lignji 12/1 1000x	38.50			73.74		
Pozitivna kontrola	L_vulgaris_COI 100000	23.91	24.03		73.58	73.50	OK
Pozitivna kontrola	L_vulgaris_COI 100000	24.15			73.42		
Negativna kontrola	NTC1	Undetermined			91.18		OK
Negativna kontrola	NTC2	Undetermined			91.26		

Test 2 *Loligo vulgaris*

FP GCTTCCCCCTTCACTGACACT

RP CCTCTTTCTACAGCAGATGAAGCTAAT

SEQ-*Loligo vulgaris* GCTTCCCCCTTCACTGACACTTTTATTAGCTTCATCTGCTGTAGAAAGAGG



Slika 14 Prikaz pomnoževalnih krivulj za test 2. Temperatura pomnoževanja je bila 62°C.

Pomnoževanje DNA izolirane iz *Loligo vulgaris* je potekalo uspešno in je v ciklu 16 že nastalo zadosti produkta, ki je povzročil povečanje intenzivnosti fluorescence in s tem zadostno količino produkta za detekcijo (Slika 14). Rezultat testa je pokazal, da bi lahko prišlo na navzkrižne reaktivnosti pri pomnoževanju DNA od *Loligo vulgaris* z vrsto *Alloteuthis media* (Tabela 1) pri pogojih kot so opredeljeni v Tabeli 11 in s setom začetnih olinukleotidov kot so navedeni za Test 2.

Tabela 14 Rezultati pomnoževanja pri 62°C za Test 2.

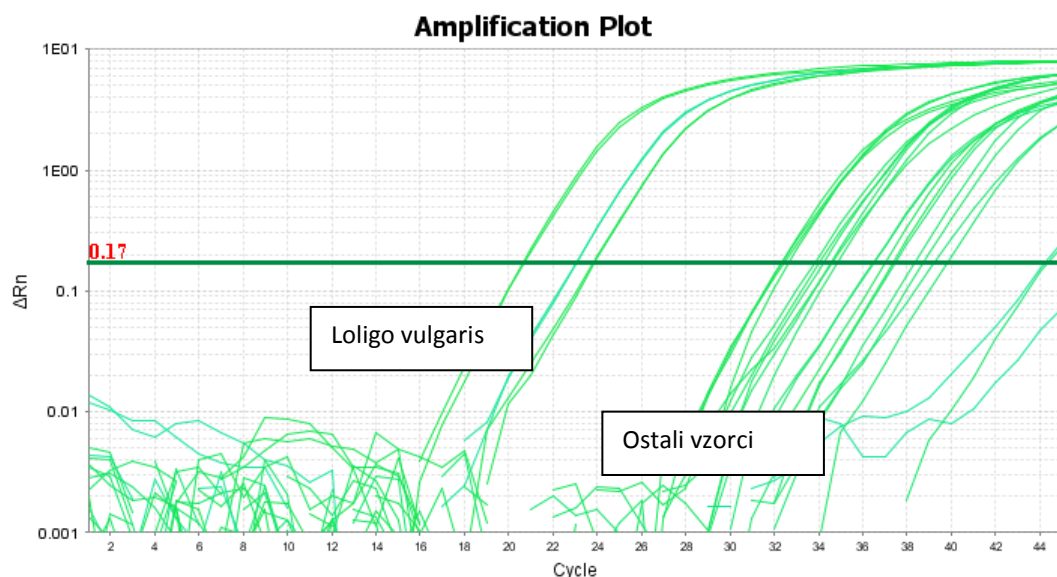
	L_vulgaris 2				Expected Tm 72.86		
	Sample Name	CT	Average Ct	Delta Ct	Tm	Average Tm	Komentar
<i>Loligo vulgaris</i>	lolvul2 100x	20.85	20.89	3.38	72.63	72.65	OK
<i>Loligo vulgaris</i>	lolvul2 100x	20.92			72.71		
<i>Loligo vulgaris</i>	lolvul2 1000x	24.18	24.26		72.63		
<i>Loligo vulgaris</i>	lolvul2 1000x	24.34			72.63		
<i>Dorytheuthis gahi</i>	ATL11/1 100x	33.75	34.27	0.26	72.16	72.13	10 x run 58 inhibirana
<i>Dorytheuthis gahi</i>	ATL11/1 100x	34.79			72.08		Tm malo nižja od pričakovane.
<i>Dorytheuthis gahi</i>	ATL11/1 1000x	Undetermined	34.53				
<i>Dorytheuthis gahi</i>	ATL11/1 1000x	34.53224945			72.16		
<i>Alloteuthis media</i>	ALLMED1 100x	34.61	33.74	2.61	72.16	72.16	Navzkrižna reaktivnost?
<i>Alloteuthis media</i>	ALLMED1 100x	32.86			72.16		
<i>Alloteuthis media</i>	ALLMED1 1000x	36.20	36.34		76.10	76.85	
<i>Alloteuthis media</i>	ALLMED1 1000x	36.49			77.60		
<i>Dosidicus gigas</i>	Lignji 7/1 100x	35.90	36.16	1.29	76.03	75.87	OK
<i>Dosidicus gigas</i>	Lignji 7/1 100x	36.42			75.24		Tm ni ustrezna
<i>Dosidicus gigas</i>	Lignji 7/1 1000x	38.57	37.45		76.10		
<i>Dosidicus gigas</i>	Lignji 7/1 1000x	36.34			76.10		
<i>Illex coindetii</i>	Lignji 15/1 100x	39.52	39.24	4.34	78.79	77.60	OK
<i>Illex coindetii</i>	Lignji 15/1 100x	38.97			77.37		Tm ni ustrezna
<i>Illex coindetii</i>	Lignji 15/1 1000x	42.84	43.59		76.74		
<i>Illex coindetii</i>	Lignji 15/1 1000x	44.34			77.53		
<i>Uroteuthis chinensis</i>	Lignji 12/1 100x	40.97	39.46	1.72	80.29	79.95	OK
<i>Uroteuthis chinensis</i>	Lignji 12/1 100x	37.95			79.82		Tm ni ustrezna
<i>Uroteuthis chinensis</i>	Lignji 12/1 1000x	43.03	41.18		77.29		
<i>Uroteuthis chinensis</i>	Lignji 12/1 1000x	39.34			82.42		
Pozitivna kontrola	L_vulgaris_COI 100000	22.69	22.73		72.71	72.67	OK
Pozitivna kontrola	L_vulgaris_COI 100000	22.78			72.63		
Negativna kontrola	NTC1	Undetermined			61.89		OK
Negativna kontrola	NTC2	Undetermined			61.58		

Test 3 *Loligo vulgaris*

FP TAATAATTCGAACAGAACTAGGTAAACCC

RP GATCATCATTTAACAGTGAACCGG

SEQ-*Loligo vulgaris* TAATAATTCGAACAGAACTAGGTAAACCCGGTTCCTACTGTAAATGATGATC



Slika 15 Prikaz pomnoževalnih krivulj za test HMT s SyberGreen za Test 3 narejen na neredčenih vzorcih lignjev. Temperatura pomnoževanja je bila 62°C.

Najbolj specifičen rezultat pomnoževanja DNA iz *Loligo vulgaris* smo dobili s Testom 3 in s temperaturo pomnoževanja pri 62°C (Tabela 4). V ciklu 16 je nastalo dovolj produkta za povečanje intenzitete fluorescence in za zanesljivo detekcijo signala (Slika 15), prav tako ni bilo opaziti navzkrižne reaktivnosti z drugimi testiranimi vrstami lignjev.

Tabela 15 Rezultati pomnoževanja pri 62°C za Test 3.

	L_vulgaris 3					Expected Tm 70.84	
	Sample Name	CT	Average Ct	Delta Ct	Tm	Average Tm	Komentar
<i>Loligo vulgaris</i>	lolvul2 100x		20.69	20.72	3.16	70.50	70.48 OK
<i>Loligo vulgaris</i>	lolvul2 100x		20.74			70.50	
<i>Loligo vulgaris</i>	lolvul2 1000x		23.85	23.88		70.50	
<i>Loligo vulgaris</i>	lolvul2 1000x		23.91			70.42	
<i>Dorytheuthis gahi</i>	ATL11/1 100x		32.33	32.49	4.73	70.03	69.77 10 x run 59 inhibirana
<i>Dorytheuthis gahi</i>	ATL11/1 100x		32.66			69.87	Tm malo nižja od pričakovane.
<i>Dorytheuthis gahi</i>	ATL11/1 1000x	37.43174744	37.22			69.79	
<i>Dorytheuthis gahi</i>	ATL11/1 1000x	37.00846863				69.39	
<i>Alloteuthis media</i>	ALLMED1 100x		32.50	32.43	1.79	69.95	69.87 Tm malo nižja od pričakovane.
<i>Alloteuthis media</i>	ALLMED1 100x		32.35			69.79	
<i>Alloteuthis media</i>	ALLMED1 1000x		34.61	34.22		82.11	81.59 1000x redčena zelo visoka Tm
<i>Alloteuthis media</i>	ALLMED1 1000x		33.83			81.08	
<i>Dosidicus gigas</i>	Lignji 7/1 100x		34.07	34.16	0.58	69.95	69.89 Run 59: ni bilo razlike med 10x in 100x, sedaj ni
<i>Dosidicus gigas</i>	Lignji 7/1 100x		34.25			70.03	razlike med 100x in 1000x, le da ima tu
<i>Dosidicus gigas</i>	Lignji 7/1 1000x		34.85	34.74		69.95	100x nižji Cq
<i>Dosidicus gigas</i>	Lignji 7/1 1000x		34.62			69.63	Tm malo nižja od pričakovane.
<i>Illex coindetii</i>	Lignji 15/1 100x		38.77	39.30	2.05	69.71	69.81 OK
<i>Illex coindetii</i>	Lignji 15/1 100x		39.83			69.63	Tm malo nižja od pričakovane.
<i>Illex coindetii</i>	Lignji 15/1 1000x		44.28	41.35		70.10	
<i>Illex coindetii</i>	Lignji 15/1 1000x		38.42			69.79	
<i>Uroteuthis chinensis</i>	Lignji 12/1 100x		36.52	36.52	1.86	77.92	73.87 OK
<i>Uroteuthis chinensis</i>	Lignji 12/1 100x		36.51			69.32	Tm niso ustrezne in nihajo.
<i>Uroteuthis chinensis</i>	Lignji 12/1 1000x		37.53	38.37		78.71	
<i>Uroteuthis chinensis</i>	Lignji 12/1 1000x		39.22			69.55	
Pozitivna kontrola	L_vulgaris_COI 100000		23.11	23.12		70.50	70.50 OK
Pozitivna kontrola	L_vulgaris_COI 100000		23.13			70.50	
Negativna kontrola	NTC1	Undetermined				70.26	
Negativna kontrola	NTC2	44.16867828				70.10	

DELOVNI SKLOP 3: vzpostavitev zbirke vzorcev DNA referenčnega materiala in elektronsko shranjevanje podatkov.

Vzpostavitev zbirke vzorcev DNA referenčnega materiala

Referenčni material za vrsto ligenj *Loligo vulgaris* in pritlikavi ligenj *Alloteuthis media* je bil nabran v sodelovanju z Zavodom za ribištvo Slovenije. Osebkke smo evidentirali in tkiva shranili na -20°C za arhiv in ponovna preverjanja. Takoj po arhiviranju smo vse osebkke barkodirali kar pomeni, da smo iz vsakega posebej izolirali DNA ter pomnožili genetske markerje, prvenstveno COI iz mitohondrijske DNA ter še 18S in 28S rDNA z jedrne DNA. Uporabili smo univerzalne začetne oligonukleotide za nevretenčarje in sicer za COI: LCO1490 in HCO2198 ter za 28S rDNA: 28SLev2 in 28SDes2. Vzpostavili smo mednarodno sodelavo z vrhunsko strokovnjakinjo za glavonožce dr. Luise Allcock z National University of Ireland, Galway, ki je odstopila referenčni material za naslednje vrste puščičasti ligenj *Todarodes sagittatus*, *Loligo forbesi* in *Illex coindetti*. Pridobili smo 85 osebkov omenjenih vrst z različnih geografskih območij, vzorce je določila vrhunsko strokovnjakinja za glavonožce dr. Luise Allcock. Iz poslanih tkiv smo izolirali DNA, pomnožili COI, in jih nato sekvencirali po Sangerju ter bioinformatično obdelali in uporabili za referenčni material za primerjavo v barkodiranju. Iz zbirke BOLD <http://boldsystems.org/> smo odbrali še sekvence za COI, ki imajo v tej zbirki deponirano fotografijo in sekvenco po vseh zahtevanih kriterijih za vrste *Loligo vulgaris*, *Alloteuthis media*, *Uroteuthis chinensis*, *Uroteuthis duvaucelii*, *Doryteuthis gahi*. Te sekvence služijo za preverjanje sekvenc iz naših vzorcev: za primerjavo istovetnosti v barkodiranju in za izdelavo sond za LAMP.

Vzpostavitev zbirke referenčnega materiala. Pripravili smo zanesljivo referenčno zbirko sekvenc za primerjavo za barkodiranje in druge bioinformatične analize ter za kontrolne vzorce DNA v molekularnih testih. Na osnovi obdelanih sekvenc smo tudi pripravili konsenzusna zaporedja, prav tako lahko originalne sekvence uporabimo za naročilo sintetične DNA, ki služi kot pozitivna kontrola v testih in lahko nadomesti naravno DNA, ki je v omejenih koncentracijah. Zbirka tkivnih vzorcev in izolirane DNA je shranjena na Morski biološki postaji v Piranu, sekvence se nahajajo trenutno v zbirki na Morski biološki postaji, javnosti bodo na voljo po objavi v znanstvenih publikacij (v 2 letih po zaključku projekta), ko bodo javno dostopne v GenBank.

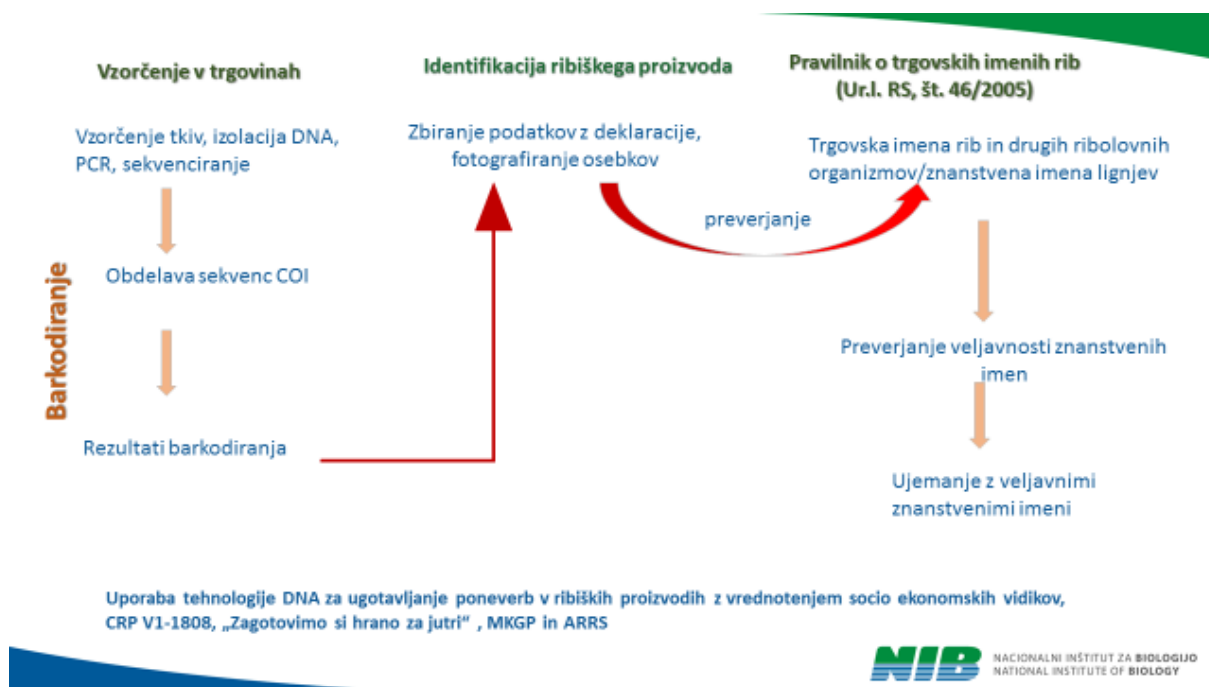
Vzpostavitev podatkovne zbirke pridobljenih rezultatov

Pripravili smo podatkovni model, ki zajema podatke o vzorcih, ki so bili vzorčeni v prodajalnah (podatki z deklaracij), podatke o referenčnih vzorcih (vrsta, lokacija, datum vzorčenja, določevalec), ter podatke o sekvencah genskih markerjev COI, 28S DNA in 18S DNA vzorcev ter referenčnega materiala. Tkivna banka obsega zamrznjena tkiva vzorcev iz prodajaln in tkiva referenčnih vrst, ki so shranjena na -20°C. Vzorce (tkiv in izolirana DNA) in embalažo (fotografije embalaže) smo arhivirali z vsemi metapodatki (datum vzorčenja, lokacija, ime prodajalne, ime proizvoda (kot je bilo zapisano na deklaraciji), trgovsko ime na deklaraciji, znanstveno ime vrste, oblika ponudbe, veterinarski žig, ribolovno območje, država porekla, ribolovno orodje, način proizvodnje, cena, shranjevanje).

Predlogi za dopolnitve Pravilnika o trgovskih imenih rib (Ur.l.RS, št. 46/2005)

Pregledali smo obstoječi *Pravilnik o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov* (Ur. L. RS, št. 46/2005), in se posebej posvetili dvema skupinama za kateri smo tudi pridobili rezultate o istovetnosti vrst na podlagi barkodiranja (lignji) in za konzerve sardin (Q-PCR test na podlagi 16SrDNA iz mitohondrijske DNA). Postopek preverjanja je prikazan na Slika 16.

Pomemben dokument v oskrbni verigi je Pravilnik o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov (Ur. L. RS, št. 46/2005), ki določa trgovska imena proizvodov (celi osebki ali fileti), ki izvirajo iz ribolovnih vrst (rib in drugih nevretenčarjev). Pravilnik o trgovskih imenih predstavlja podlago na kateri se določi ime ribiškega proizvoda pred prodajo in se na trgovsko ime navezuje tudi znanstveno ime vrste, v nekaterih primerih se uporablja tudi določitev na nivoju rodu.



Slika 16 Shema zbiranja podatkov z deklaracij ter preverjanje skladnosti s Pravilnikom o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov (Ur. L. RS, št. 46/2005).

V obstoječem pravilniku *Pravilnik o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov* (Ur. L. RS, št. 46/2005) smo pregledali vse zapise, ki se nanašajo na lignje; najprej smo preverili skladnost imen v Pravilniku z veljavnimi imeni v WORMS (World Register of Marine Species). Ugotovili smo, da Pravilnik vsebuje 15 zapisov o lignjih, od tega so 3 zapisi na nivoju rodu in vsi trije rodovi so veljavni, 10 zapisov je na nivoju vrste in od teh je 8 vrst veljavnih, medtem ko sta 2 vrsti preimenovani v drug rod (glej Tabela 15).

Tabela 15 Preverba slovenskih in latinskih imen za lignje v Pravilnik o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov (Ur. L. RS, št. 46/2005) in njihova veljavnost v WORMS. Imena iz pravilnika so

zapisana identično kot v Pravilnik o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov (Ur. L. RS, št. 46/2005)

Slovensko trgovsko ime	Znanstveno ime v pravilniku	Veljavno ime v WORMS	Skladnost z WORMS DA/NE
Argentinski kratkoplavuti ligenj	<i>Illex argentinus</i>	<i>Illex argentinus</i>	DA
Dolgoplavuti ligenj	<i>Loligo pealei</i> *#	<i>Doryteuthis pealeii</i>	NE
Južnoafriški ligenj	<i>Loligo reynaudii</i>	<i>Loligo reynaudii</i>	DA
Kratkoplavuti ligenj	<i>Illex spp</i>	Veljaven rod	
Ligenj vrste <i>Martialia</i> <i>hyadesi</i>	<i>Martialia hyadesi</i>	<i>Martialia hyadesi</i>	DA
Lignji	<i>Loligo spp</i>	Veljaven rod	
Pacifiški puščičasti ligenj	<i>Todarodes pacificus</i>	<i>Todarodes pacificus</i>	DA
Patagonski ligenj	<i>Loligo gahi</i>	<i>Doryteuthis gahi</i>	NE
Puščičasti ligenj	<i>Nototodarius sloanii</i> *	<i>Nototodarus sloanii</i>	DA
Puščičasti ligenj	<i>Nototodarus gouldi</i>	<i>Nototodarus gouldi</i>	DA
Puščičasti ligenj	<i>Ommastrephes spp</i>	Veljaven rod	

Severni kratkoplavuti lignj	<i>Illex illecebrosus</i>	<i>Illex illecebrosus</i>	DA
Navadni lignj	<i>Loligo vulgaris</i>	<i>Loligo vulgaris</i>	DA
Norveški puščičasti lignj	<i>Todarodes sagittatus</i>	<i>Todarodes sagittatus</i>	DA
Orjaški lignj	<i>Dosidicus gigas</i>	<i>Dosidicus gigas</i>	DA

- Napačno črkovano ime , pravilno *Loligo pealeii*
- # zastarela, neveljavna imena

Da bi ugotovili v kolikšni meri veljavni *Pravilnik o trgovskih imenih rib* (Ur. L. RS, št. 46/2005) ustreza sedanjim razmeram in v kolikšnem obsegu deklaracije vsebujejo veljavna trgovska imena smo naredili podrobno analizo deklaracij, ki opisujejo vzorce lignjev. Preverjali smo skladnost deklaracije, ki spremlja prodajane lignje s *Pravilnikom o trgovskih imenih rib* (Ur. L. RS, št. 46/2005), ki so bili naprodaj v februarju in marcu leta 2019 po različnih prodajalnah v 10 slovenskih mestih. Najprej smo preverili skladnost zapisanih trgovskih imen in znanstvenih imen med deklaracijo proizvoda in veljavnim *Pravilnikom o trgovskih imenih rib* (Ur. L. RS, št. 46/2005). Slovensko trgovsko ime je bilo navedeno v 94 % (16/17) vzorcev, enako velja za znanstveno ime (94 %, 16/17), v enem primeru ni bilo navedeno slovensko trgovsko ime in v drugem primeru ni bilo navedeno znanstveno ime. V 12 (70 %) primerih je bila navedena šifra FAO za ribolovno območje, ter v 11 (65 %) primerih je bilo napisano z besedo območje ribolova, država porekla je bila navedena v 10 (59 %) primerih. Ribolovno orodje je bilo navedeno v 14 (82 %) primerih (v 2 primerih trnki in vrvice ter v 12 primerih vlečne mreže). Veterinarski žig je bil na 2 proizvodih, v 3 primerih so jih prodajali kot sveže ulovljene (kot jadranske lignje (*Loligo vulgaris*), kot *Loligo* spp., in kot lignji totan (*Todarodes sagittatus*)), 7 vzorcev je bilo zamrznjenih, 6 vzorcev je bilo ponovno odmrznjenih, 1 vzorec so bili lignji konzervirani v olju. Preverjanje skladnosti med zapisi na deklaracijah za vzorce lignjev in med *Pravilnikom o trgovskih imenih rib* (Ur. L. RS, št. 46/2005) pokaže, da ima 65 % (11/17) vzorcev navedene podatke na deklaraciji neskladne s *Pravilnikom o trgovskih imenih rib* (Ur. L. RS, št. 46/2005), bodisi da se ne ujema navedba slovenskega trgovskega imena ali znanstvenega imena z imeni v pravilniku. Nato smo preverili skladnost znanstvenih imen v *Pravilniku o trgovskih imenih rib* (Ur. L. RS, št. 46/2005) z veljavnimi znanstvenimi imeni v WORMS. *Pravilnik o trgovskih imenih rib* (Ur. L. RS, št. 46/2005) vsebuje 13 zapisov o lignjih, od tega so 3 zapisi na ravni rodu in vsi trije rodovi so veljavni, 10 zapisov je na ravni vrste in od teh je 8 vrst veljavnih, medtem ko sta 2 vrsti premeščeni v drug rod. Barkodiranje smo opravili pri vseh vzorcih (potrditev identitete vrste s sekvenciranjem COI) smo ugotovili, da je 41 % (7/17) vzorcev navedena vrsta ista kot potrjena z barkodiranjem (primerjali smo znanstveno ime na deklaraciji in barkodo). Glavnina (7 vzorcev) je pripadalo vrsti *D. gahi* (patagonski lignji), 2 vrst

L. vulgaris, 2 *Uroteuthis duvaucelii*, 2 *Uroteuthis chinensis*, 2 *Illex coindetii* in 1 *Dosidicus gigas*, 4 vzorci so bili označeni samo kot *Loligo* spp. in po barkodiranju smo identificirali naslednje vrste: *L. vulgaris*, *D. gahi*, *U. chinensis* in *I. coindetii*. Preverili smo tudi ujemanje med navedenim FAO ribolovnim območjem na deklaraciji in ribolovnim območjem vrste kot je bila identificirana z barkodiranjem: v 53 % se je navedeno FAO območje ujemalo z arealom vrste, in v 47 % je bilo navedeno napačno ribolovno območje.

V *Pravilniku o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov* (Ur. L. RS, št. 46/2005) smo preverili vse zapise, ki so povezani z najdenimi zapisi trgovskih imen na konzervah v katerih smo preverjali identiteto vrst s testom Q-PCR narejenim na osnovi 16S rDNA specifične za Clupeidae. Ponovno smo najprej preverili vse zapise za vrste *Sardinella aurita*, *Sardina pilchardus*, *Engraulis encrasicolous*, *Sprattus sprattus* in njim sorodne vrste. Našli smo 20 zapisov, ki so ustrezali tem kriterijem in preverili ali znanstvena imena še veljajo. Ugotovili smo, da v 3 primerih znanstvena imena ne ustrezajo (glej Tabela 6).

Tabela 16 Preverba slovenskih in latinskih imen za konzerve sardin v Pravilnik o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov (Ur. L. RS, št. 46/2005) in njihova veljavnost v WORMS. Imena iz pravilnika so zapisana identično kot v Pravilnik o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov (Ur. L. RS, št. 46/2005)

Slovensko trgovsko ime	Znanstveno ime v pravilniku	Veljavno ime v WORMS	Skladnost z WORMS DA/NE
Argentinski sardon	<i>Engraulis anchoita</i>	<i>Engraulis anchoita</i>	DA
Japonski sardon	<i>Engraulis japonicus</i> , <i>E. japonica</i>	<i>Engraulis japonicus</i>	DA
Perujski sardon	<i>Engraulis ringens</i>	<i>Engraulis ringens</i>	DA
Papalina	<i>Sprattus sprattus</i>	<i>Sprattus sprattus</i>	DA
Sardon	<i>Engraulis capensis</i>	<i>Engraulis capensis</i>	DA
Sardon	<i>Engraulis encrasicolus</i>	<i>Engraulis encrasicolus</i>	DA
Sardoni	<i>Engraulis</i> spp.		
Kalifornijski sardon	<i>Engraulis mordax</i>	<i>Engraulis mordax</i>	DA

Brazilska velika sardela	<i>Sardinella brasiliensis</i>	<i>Sardinella brasiliensis</i>	DA
Dolgoglava velika sardela	<i>Sardinella longiceps</i>	<i>Sardinella longiceps</i>	DA
Kalifornijska sardela	<i>Sardinops caeruleus</i>	<i>Sardinops sagax</i>	NE
Kalifornijska sardela	<i>Sardinops melanostictus</i>	<i>Sardinops sagax</i>	NE
Kalifornijska sardela	<i>Sardinops ocellatus</i>	<i>Sardinops sagax</i>	NE
Kalifornijska sardela	<i>Sardinops sagax</i>	<i>Sardinops sagax</i>	DA
Kalifornijske sardele	<i>Sardinops</i> spp.		
Madeirska velika sardela	<i>Sardinella maderensis</i>	<i>Sardinella maderensis</i>	DA
Sardela	<i>Sardina pilchardus</i>	<i>Sardina pilchardus</i>	DA
Velike sardele	<i>Sardinella</i> spp.		
Zlatoproga velika sardela	<i>Sardinella gibbosa</i>	<i>Sardinella gibbosa</i>	DA

- Napačno črkovano ime
- # zastarela, neveljavna imena, N.B. *Sardinella aurita* ni v Pravilniku

Nato smo preverili zapise na deklaracijah (trgovsko ime in znanstveno ime) z trgovskim imenom in znanstvenim imenom kot to predpisuje *Pravilnik o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov* (Ur. L. RS, št. 46/2005) in ugotovili, da je od 37 vzorcev skladnih 15 (40%) vzorcev, medem ko je 13 (35%) vzorcev neskladnih. Preostalih 9 (25%) vzorcev imelo na deklaraciji samo slovensko ime proizvoda, ki ni ustrezalo predpisanemu trgovskemu imenu in v teh vzorcih samo po informacijah na deklaraciji ni bilo možno določiti vrste. V takšnih primerih je edina zanesljiva možna identifikacija samo na osnovi DNA, taksonomska določitev pogosto ni možna, ker so ribe brez glave in pogosto delno očiščene, s čimer se odstranijo zunanji taksonomski znaki.

Rezultati so izpostavili zastarelost znanstvenih imen (uporaba starih sinonimov) v *Pravilniku o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov* (Ur. L. RS, št. 46/2005), kar otežuje sledenje po podatkih, ki so navedeni na deklaraciji. V projektu smo se osredotočili samo na dve taksonomski skupini in to so lignji in vrste iz družine Clupeidae in Engraulidae. Problematična je uporaba zgolj rodovnega imena (v pravilniku so: *Loligo* spp., *Illex* spp., *Ommastrephes* spp., *Engraulis* spp., *Sardinella* spp., *Sardinops* spp.), ki zajema vse vrste v rodu,

kar je izjemno nenatančno. Nenatančno navajanje podatkov na dokumentih skozi oskrbno verigo ima daljnosežne posledice ne samo za potrošnike, ampak tudi na upravljanje ribištva in vpliva na zanesljivost zbranih podatkov in uradne statistike. Nezanесljivi podatki povečujejo negotovost v statističnih izračunih ter vplivajo na upravljanje ribištva, slabo upravljanje ribištva lahko vodi v prelov ribolovnih virov. Kot primer slabe prakse uporabe všečnega trgovskega imena je primer patagonske zobate ribe (*Dissostichus eleginoides*, ang. Patagonian toothfish), ki so jo prodajali pod angleškim trgovskim imenom "Chilean sea bass". Trgovsko ime si je leta 1977 izmislil trgovec, da bi ogroženo in redko vrsto ribe iz južnih arktičnih morij uspešno prodajal v ZDA. Prelov te vrste je preprečila pridobitev certifikata Marine Stewardship Council (MSC), ki je kot pogoj postavil trajnostno izkoriščanje in preprečil nadaljnjo prodaja te vrste pod drugimi trgovskimi imeni (Marko, Nance, Guynn, 2011).

Pripravili smo priporočila za izboljšave *Pravilnika o trgovskih imenih rib* (Ur. L. RS, št. 46/2005):

1.) priporočamo, da je Pravilnik o trgovskih imenih rib v elektronski obliki, da ga je možno dopolnjevati. Primeri takšnih seznamov so Seafood List v ZDA, ki ga vzdržuje Agencija za zdravila in hrano, ki je dostopen na spletu-
<https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=SeafoodList> (dostop do posodobitev <https://www.fda.gov/food/seafood-guidance-documents-regulatory-information/fda-seafood-list-updates-2020>), FishList, ki ga vzdržuje Agencija za nadzor nad hrano v Kanadi <https://inspection.canada.ca/food-label-requirements/labelling/industry/fish-and-fish-products/fish-list/eng/1352923480852/1352923563904> prav tako dostopen na spletni strani. Zakonodaja EU nalaga svojim članicam, da vzpostavijo in objavijo seznam komercialnih proizvodov iz ribolova in akvakulture ter znanstvena imena gojenih organizmov.

2.) dosledna uporaba slovenskih imen vrst za trgovska imena. Natančno in enoznačno poimenovanje omogoča, da potrošniki lažje prepoznajo vrsto in najdejo nadaljnje informacije kadar to želijo. Pri izdelavi seznama trgovskih imen ribiških proizvodov je potrebno upoštevati govorna območja, ker se pod istim imenom lahko poimenujejo različne vrste in so tudi priporočilo FAO (Martinez, James and Loreal, 2005). Priporočilo je pomembno tudi za Slovenijo, ker je v veljavi veliko domačih imen, ki izvirajo iz hrvaškega in italijanskega jezika še posebej na področju morskega ribištva, prav tako je potrebno neprestano spremljanje ribolovnih vrst, ker so med njimi nove vrste za katere še nimamo slovenskih imen, enako velja za uvožene ribiške proizvode. Ena od osnovnih in pomembnih izzivov pri ugotavljanju poneverb z ribiškimi proizvodi je vzpostavitev uradnega seznama slovenskih imen vrst, ki je enoznačno povezan z veljavnim seznamom znanstvenih imen. Uveljavitev takšnega seznama zahteva natančno preverjanje domačih imen z znanstvenimi imeni ob pomoči strokovnjaka taksonoma s področja ribištva.

3.) dosledno uporabljati veljavna znanstvena imena in jih redno posodabljati. Sodobna ribiška znanost je dinamična veda, ki neprestano vključuje tudi spoznanja drugih disciplin kot so integrativna taksonomija, zato so pogosta tudi preimenovanja in prerazvrstitve ribolovnih vrst. Slovenska trgovska imena je potrebno neprestano usklajevati z znanstvenimi imeni, ki skladna z najnovejšimi taksonomskimi spoznanji kot orodje se lahko uporabi portal WORDS <https://www.marinespecies.org/> ter vir na spletni strani EK [List of commercial and scientific](#)

name of species https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/species_en?sn=14802.

4.) uskladitev poimenovanj v Pravilniku o trgovskih imenih rib s slovarjem IATE (Interactive Terminology of Europe (<https://iate.europa.eu/home>), ki je uradni terminološki dokument in vsebuje tudi izrazoslovje s področja ribištva in ga uporabljajo za uradne prevode. Uskladitev med obema pomeni, da so vedno na voljo najnovejše posodobitve poimenovanj in ne prihaja do različnih poimenovanj.

DELOVNI SKLOP 4: socio-ekonomski vidik napačnega deklariranja in označevanja ribiških proizvodov.

V tem sklopu smo opravili mapiranje deležnikov, ki so relevantni za trg rib in v izbranih organizacijah in institucijah povprašali za odgovorno osebo ali strokovnjaka s katerim bi izvedli intervju o tematici trga rib in ribolova v Sloveniji. Mapiranje je potekalo v obdobju od julija 2019 do januarja 2020 preko elektronske pošte in s telefonskimi pogovori. Pri načrtovanju dela smo se oprli tudi na zaključke in priporočila strokovnjakov, ki smo jih obiskali na oddelku za morsko ribištvo na Zavodu za ribištvo Republike Slovenije (ZZRS) takoj ob začetku projekta in strokovnjakov iz inšpekcijskih služb, zadolženih za področje ribolova. Najprej smo jim predstavili projektno nalogo in cilje in se nato v pogovoru osredotočili na pregled ponudbe ribiških proizvodov na slovenskem tržišču, na identifikacijo najbolj rizičnih vrst rib in proizvodov, predstavitev metod na osnovi DNA tehnologije, ki so primerne za identifikacijo rib in proizvodov na tržišču, vzpostavitev zbirke referenčnega materiala ter pridobitev referenčnega materiala iz biološkega vzorčenja, ki ga v okviru morskega ribištva opravlja ZZRS, pridobitev podatkov za oceno socioekonomskih vidikov zaradi napačnega deklariranja in označevanja ribiških proizvodov, izobraževanje deležnikov (izbira ključnih deležnikov s področja morskega ribištva) ter primerne vsebine. Medtem ko so nam predstavniki inšpekcijskih služb predstavili svoje videnje problematike v inšpekcijskem nadzoru kot so težave pri preverjanju deklaracij na predpakiranih živilih, razločevanje med vrstami tunov in geografskim izvorom (ribolovnimi območji), težavna identifikacija glavonožcev v izdelkih kot so morske solate in v drugih podobnih proizvodih, težave pri identifikaciji surovine v morski hrani pri različnih ponudnikih, težave pri izvajanju nadzora v ribarnicah ter gostinskih obratih ter potrebe po analitskih metodah za identifikacijo ribiških proizvodov v inšpekcijskem postopku.

Raziskovalna vprašanja so oblikovana na osnovi zbrane literature, glede na odprta socio-ekonomska vprašanja in težave v oskrbni verigi v ribištvu. Z intervjuji smo želeli dobiti odgovore na naslednja vprašanja:

- Kakšne so specifike trga rib in ribištva v Sloveniji ter v kakšni smeri se razvijata?
- Kakšne so morebitne kršitve standardov in predpisov ter kakšne težave in pomanjkanja se pojavljajo na trgu rib ter v ribištvu?
- Kakšno je povpraševanje potrošnikov in njihova ozaveščenost o ribah v Sloveniji?
- Kakšne so razlike med ribolovom in ribogojstvom ter zakaj so pomembne za ribiško vrednostno verigo?

- Kakšne so razlike med gospodarskim in negospodarskim ribištvo?
- Kako sta ekološki vidik in trajnostni razvoj vključena v ribištvo in trg rib v Sloveniji?
- Katere organizacije v Sloveniji preučujejo ribištvo in trg rib ter skrbijo zanj in za ugotavljanje poneverb v ribiških proizvodih?
- Kako se bosta v prihodnje razvijala trg rib in ribištvo, s poudarkom na socio-ekonomskih vidikih?

Izvedenih je bilo petnajst polstrukturiranih intervjujev, ki so trajali od 45 do 60 minut. Intervjuje smo izvedli s strokovnjaki z Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP); Morske biološke postaje Piran, Nacionalni inštitut za biologijo; Zavoda za ribištvo Slovenije (dva intervjuja); Inšpektorata za kmetijstvo, gozdarstvo, lovstvo in ribištvo (Ribiške inšpekcije); Ribiške zveze Slovenije; Kmetijsko gozdarske zbornice Slovenije (dva intervjuja); Gospodarske zbornice Slovenije; Zveze potrošnikov Slovenije, WWF Adria, Racoon d. o. o., s predstavnikom Varuha odnosov v verigi preskrbe s hrano in z ribiči ter s predstavniki ribičev.

Izbrani intervjuvanci so bili predhodno obveščeni o intervjuju in smo jim posredovali vprašalnik pred izvedbo intervjuja, da so se lahko ustrezno pripravili na izvedbo intervjuja. Glede na izvedene osebne intervjuje iz oči v oči so bila mogoča podvprašanja in usmerjena razprava glede na poslana vprašanja. Z raziskavo smo zbrali podatke in informacije, ki so kvalitativne narave in so namenjeni za predstavitev implikacij in možnosti, kako bi lahko izboljšali stanje v ribištvu in na trgu rib v Sloveniji.

Cilji raziskave so bili:

- preučiti domačo in tujo literaturo ter relevantne dokumente s področja ribištva in preučevanja kršitev na trgu rib v Sloveniji;
- na osnovi rezultatov raziskave ugotoviti in analizirati lastnosti in kršitve na trgu in v ribištvu v Sloveniji, s poudarkom na socio-ekonomskih dejavnikih;
- pregledati in analizirati težave, povezane s povpraševanjem, ponudbo, trajnostnim razvojem, kršitvami standardov in predpisov, z izvozom in uvozom rib in ribiških izdelkov ter druge pomembne specifične in lastnosti trga rib v Sloveniji;
- pregledati, kako je trajnostni razvoj in ekološki vidik uveljavljen v ribištvu in na trgu rib v praksah in aktivnostih, ki jih udeleženci izvajajo, pregled uveljavitve trajnostnih in ekoloških norm ter morebitnih slabih in spornih praks;
- pregledati in analizirati načine lovljenja in vzreje rib ter vrednostno verigo trga rib, skrbi za okolje in odprta socio-ekonomska vprašanja udeležencev; in podati predloge, kako bi prakse na trgu rib in v ribištvu v Sloveniji lahko izboljšali

Z intervjuji smo pridobili primarne podatke za raziskovanje, ki so vključevali različne vidike in segmente ribiškega trga v Sloveniji, s poudarkom na socio-ekonomskih dejavnikih. Preučevali smo ribolov in vzrejo školjk ter rib v morju in v celinskih vodah, povezovanje ribištva s turizmom, predelavo ribiških izdelkov, zlorabe na ribiškem trgu in sorodne teme kakor tudi možnosti za trajnostni razvoj ribištva v slovenskem morju in v celinskih vodah. Rezultati intervjujev so nam dali vpogled v različne težave, ki so prisotne in možne rešitve kot so jih predvideli različni deležniki povezani s trgom rib. Analiza odgovorov je pokazala, da ima največ možnosti za razvoj akvakultura, pri čemer je treba upoštevati podnebne spremembe in

razpoložljivi prostor; možen je razvoj novih prehranskih proizvodov ter razširiti ponudbo rib; če se poveča povpraševanje po ribah se bo povečal uvoz ribiških proizvodov; mnogi intervjuvanci slabo poznajo principe sledljivosti v ribištvu in še manj razpoložljive metodologije; poudarili so pomen dostopa do zanesljivih informacij.

Rezultati so bili zbrani v okviru magistrske naloge MAVRIČ, Alex. *Trg rib in ribištvo v Sloveniji, 2020, Fakulteta za Management, Univerza na Primorskem (mentor prof. dr. Štefan Bojnec)* in nato še predstavljeni v prispevku MAVRIČ, Alex, RAMŠAK, Andreja, BOJNEC, Štefan. *Trg rib in ribištvo v Sloveniji*. V: PRIŠENK, Jernej (ur.). *Razvojni vidiki prenosa znanja v skupni kmetijski politiki po letu 2020*. 8. konferenca DAES, Maribor, 20.-21. februar 2020. 1. izd. Maribor: Društvo agrarnih ekonomistov Slovenije - DAES, 2020. Str. 137-148, ilustr. ISBN 978-961-91094-9-6. [COBISS.SI-ID [1541983172](#)].

Problematika je izčrpno obdelana v monografiji katere avtorji so A. Mavrič, Š. Bojnec; A. Ramšak z naslovom *Izzivi razvoja ribištva v Sloveniji*, Koper 2021, ki je bila poslana na razpis ARRS v letu 2021 za sofinanciranje znanstvenih monografij, založnik Univerza na Primorskem in v članku z naslovom *Socioeconomic and environmental importance of the fish market and fisheries in Slovenia* avtorjev A. Mavrič, Š. Bojnec; A. Ramšak (članek je v pripravi).

Tukaj povzemamo glavne ugotovitve, ki se nanašajo na:

- specifik trga rib in ribištva v Sloveniji ter smer razvoja (*v predelavi in trženju je še prostor za razvoj manjših podjetij, možnosti za izdelavo inovativnih izdelkov in v ponudbi novih zanimivih vrst ribolovnih organizmov, pri povečani potrošnji se bo ribiški trg preusmeril v uvoz izdelkov, le ozavešeni potrošniki bodo ribe in izdelke iskali pri lokalnih proizvajalcih*).
- Kršitve standardov in predpisov ter problemi in poneverbe, ki se dogajajo na trgu rib in pri ribištvu (*zamenjave vrst, zamenjave gojenih in divjih vrst, ponujene ribe niso sveže, v nekaterih primerih je težko ugotoviti poreklo - geografski izvor rib, rekreativni ribolov in prodaja ulova ni urejena, na splošno kršitev ni veliko*).
- Povpraševanje in ozaveščenost potrošnikov o ribah in ribiških izdelkih v Sloveniji (*nizko povpraševanje, večje je le v obalnih mestih in Ljubljani, v splošnem je ozaveščenost potrošnikov slaba, ne prepoznajo kršitev, ne prepoznajo ponudbe in kakovosti*).
- Razlike med ribolovom in ribogojstvom in pomembnost za ribiško vrednostno verigo (*večji potencial razvoja je prepoznan v celinskem ribogojstvu kakor v morskem ribogojstvu*).
- Vključitev ekološkega in trajnostnega razvoja v ribištvo in ribiški trg v Sloveniji (*omejene možnosti za izboljšanje stanja, premalo investicij v trajnosti razvoj, akvakultura potrebuje izvajanje dobrih proizvodnih praks, da se ohrani kakovost vode, pomanjkanje strokovnih znanj, ki bi pospešila razvoj akvakulture v Sloveniji*).
- prihodnji razvoj trga rib in ribištva s poudarkom na socio-ekonomskih vidikih (*povezovanje ribištva z drugimi gospodarskimi panogami, razvoj zaprtih sistemov za akvakulturo - predvsem na kopnem, dolgoročno usmerjeno oglaševanje potrošnikov in njihovo motiviranje, razvoj lokalnih in butičnih izdelkov, razvoj inovativnih izdelkov in blagovne znamke, ki lahko pripomorejo k razvoju specialnih tržnih niš*).

Analiza ribiških proizvodov, ki so na trgu (s trga EU in iz uvoza) s poudarkom na količinah in vrstah

Slovenija je neto uvoznica rib in ribiških izdelkov, kar pomeni, da več uvaža kot izvaža. V Sloveniji je večji del predelanih surovin uvoženih iz različnih delov sveta, ker pri nas ni zadostnih količin surovin iz ribolova, na drugi strani pa ribiči lahko prodajo slovenski ulov po višjih cenah v restavracije in v ribarnicah kot bi jim bila ponujena za predelavo. Glavni proizvodi predelave v Sloveniji so različne vrste ribjih konzerv, tunine paštete, bakala namazi, izdelki iz lososa (namazi, prigrizki), izdelki iz glavonožcev in morski sadeži (Bolje idr. 2019, 139–141). V letu 2015 je bilo v Sloveniji 12 podjetij, ki so se ukvarjala s predelavo ribolovnih organizmov, ki so ustvarila 25,7 milijona evrov prihodka iz prodaje ter so zaposlovala 209 ljudi. Največji slovenski partnerji za dobavo surovin iz morskega ribolova so Italija, Španija in Hrvaška, največ so podjetja izvozila v Avstrijo, Hrvaško in Bosno in Hercegovino (141; Publications Office of the EU 2019, 26).

Največ se uvaža iz držav članic EU, in sicer iz Hrvaške, Italije, Španije, Grčije in iz severnih morij. Od svežih rib se največ uvaža gojene orade in brancine, filete svežih lososov ter dimljene losose. Sveži in delno zmrznjeni izdelki so največkrat uvoženi iz sredozemskih držav. Iz Hrvaške se največ uvaža gojene orade in brancine. Uvaža se gojene vrste: orade, brancine, losose in šarenke ter postrvi iz Italije. Od zmrznjenih izdelkov se največ uvaža patagonske lignje preko Španije, nato osliče, fileje vitkega soma, fileje pange in morske sadeže. Podjetja, ki izvajajo predelavo rib, uvažajo vrste kot so lososi, tune, sardele, skuše in polenovke za predelavo v konzerve ali ribje namaze. Iz tretjih ne EU držav se večinoma uvažajo le zmrznjene ribiške proizvode (osliče in lignje). Za zamrznjene izdelke velja, da ti lahko prihajajo iz različnih geografskih delov sveta (Argentina in Azija). Veliko uvoženih zamrznjenih izdelkov izvira iz jugovzhodne Azije (Vietnam in okolica). Sladkovodnih rib se uvaža manj kot morskih, uvoz sladkovodnih rib prihaja večinoma iz sosednjih držav in iz Bosne in Hercegovine.

Izvoz ribiških izdelkov iz Slovenije v druge države je v majhnih količinah. Ne gre za klasičen izvoz, temveč za manjšo prodajo kot prodajo školjk na Hrvaško in v trgovski verigi Hofer ter Lidl. Največ se prodaja v sosednjo Hrvaško, v Avstrijo in srednjeevropske države. Morski ribiči ulov izvažajo na ribjo borzo v Trst, školjke izvažajo v sosednje države in majhne količine gojenih sladkovodnih rib. Delamaris izvaža določene manjše količine v balkanske države, vendar so naši ribiški izdelki predragi za izvoz na balkansko tržišče. Klapavice izvažamo v Romunijo, Italijo in Hrvaško.

Ovrednotenje količine napačno deklariranih ribiških proizvodov in ekonomsko škodo zaradi napačnega označevanja ribiških proizvodov

Ribištvo v Sloveniji je eden najmanjših sektorjev, vendar še vedno pomemben, predvsem zaradi kulturne dediščine in tržnih niš. Ribištvo v Sloveniji se prepleta z nekaterimi drugimi panogami, kot sta turizem in šport. Morsko ribištvo prevladuje v obalni regiji, celinsko ribištvo je porazdeljeno po različnih regijah glede na prevladujoči tip celinskih voda. Skupna evropska ribiška politika (SRP), ki jo po pravilih EU izvaja Slovenija, predstavlja skupek pravil, ki zagotavljajo, da se ribištvo izvaja v trajnostni smeri, s pošteno konkurenco in usmerjenim

razvojem. Med cilji so ohranjanje ribolovnih virov, izvajanje trajnostnih praks in podpiranje razvoja v akvakulturi (MKGP 2019b).

Ribištvo v Sloveniji obsega gospodarski in negospodarski ribolov na morju in na celinskih vodah, akvakulturo (morsko in sladkovodno), predelavo in trženje ribiških proizvodov ter upravljanje z ribolovnimi viri, ki je v pristojnosti MKGP. Pristojno ministrstvo skrbi tudi za razvoj trajnostne akvakulture. Na področju celinskega ribištva je pomembno ohranjanje in varovanje domorodnih vrst rib ter skrb za razvoj rekreacijskega ribolova, ki je pomembna panoga kot je muharjenje. Za segment predelave in trženja rib ter ribiških proizvodov se želijo zagotoviti večje proizvodne zmogljivosti in večjo dodano vrednost izdelkov (MKGP 2019b).

Kršitve, ki se pojavljajo na ribiškem trgu, so zamenjave ribolovnih vrst, pogosto manj cenjene z bolj cenjenimi, zamenjave ulovljenih rib z gojenimi, neustrezno označevanje, sveže ribe pogosto niso resnično sveže, pojavljajo se lahko sporne prakse pri predelavi in prodaji, v določenih primerih je težko ugotoviti poreklo rib (lokacija vzreje ali ribolova). V akvakulturi se pojavljajo težave dodajanja aditivov in antibiotikov, kar ni v prodaji to nikjer označeno. Vzreja tujerodnih vrst v akvakulturi ni zaželeno, ker lahko pride do pobega organizmov v naravo kar ima lahko zelo škodljive posledice. Ulov iz rekreativnega ribolova prodajajo različnim restavracijam, ustvari se črni trg, zaradi česar se znižajo cene ulova, ki ga ponujajo gospodarski ribiči. Intervjuvanci so omenili, da kršitev ni veliko, so pa prisotne. Kakršne koli afere v zvezi s kršitvami v ribištvu negativno vplivajo na trg, ampak običajno izzvenijo v letu ali dveh.

Ovrednotene količine napačno deklariranih ribiških proizvodov in ekonomske škode zaradi napačnega označevanja ribiških proizvodov se porazdelijo na slovensko ribištvo preko nelojalne konkurence in na ekonomske škode, ki jih nosijo porabniki, saj zaradi zavajanja preplačajo kupljene ribe in ribiške proizvode. Ponudba ribiških izdelkov izven večjih centrov je zelo slaba, slabša je tudi kupna moč kupcev. Zaradi relativne majhnosti trga so tudi ekonomske škode relativno majhne. Z rastjo dohodkov porabnikov in povečano porabo rib pa bi se ekonomske škode zaradi napačnega označevanja ribiških proizvodov lahko povečale. Kakovost ribiških proizvodov večinoma ustreza standardom in predpisom, nižje kakovosti so lahko različni predelani izdelki in ribe, ki niso prodane dovolj sveže.

Kršitve in nedoslednosti v sledljivosti ribiških proizvodov in v navedbah informacij na deklaracijah bi lahko zmanjšali s povečanjem nadzora in s sodelovanjem med državami, ki so udeležene v trgovanju. Pomemben dejavnik v ribištvu je zagotavljanje sledljivosti ribiških proizvodov od ribiča do potrošnika, ki je izjemno težko zaradi dolge in zapletene oskrbne verige ter dragih in zapletenih metod. Strokovnjaki si prizadevajo razviti nove metode testiranja, ki so stroškovno ugodnejše in bodo dostopne za uporabo vsem zainteresiranim na trgu rib v Sloveniji. Primanjkuje primernih in strokovnih člankov o ribištvu, ki bi lahko pripomogli pri oglaševanju in ozaveščanju porabnikov.

DELOVNI SKLOP 5: diseminacija projekta in rezultatov projekta

Projekt je predstavljen na spletnih straneh izvajalcev.

Tematika projekta je bila predstavljena v okviru vabljenega seminarja "82415 - HOT TOPICS IN MARINE SCIENCES" na Univerzi v Bologni za študente magistrskega študija Morske biologije. Seminar je bil izveden od 21. do 25. januarja 2019 na Oddelku za biologijo, geologijo in okoljske znanosti, v Ravenni, Univerza v Bologni in ga je v celoti izvedla dr. Andreja Ramšak (8ur).

Predavanje študentom v okviru poletne šole »*Summer school on blue growth in the Euro-Mediterranean region*«, ki sta jo organizirala Evro-sredozemska univerza (Slovenija) in Istituto Nazionale di Oceanografia e di Geofisica Sperimentale (Italija), dne 19. 6. 2019 na Evro-sredozemski univerzi, Kidričevo nabrežje 2, Piran. Predavanje z naslovom "Traceability methods as tools to combat illegal fishing" je izvedla doc. dr. Andreja Ramšak, predavanje je bilo v angleškem jeziku.

Znanja iz projekta CRP V1-1808 bodo vključena tudi v magistrski študij Akvakulture in ribištva (Genetics in Aquaculture and Fishery), Univerza v Asuanu, Egipt, doc. dr. Andreja Ramšak je vključena kot zunanji ekspert Evro-sredozemske universe (EMUNI) v pripravo študijskega programa Sustainable Management of Fisheries and Aquaculture (SMFA) (projekt FishAqu, Erasmus+ H2020).

Širši javnosti smo problematiko projekta in rezultate predstavili tudi s sodelovanjem v radijskem programu in kot predavanje na prireditvi Noč raziskovalcev:

Radijska predstavitev:

VAL 2020: 16. 11. 2019 intervju z doc. dr. Andreja Ramšak <https://val202.rtvlo.si/2019/11/morska-biološka-postaja-piran/>, predstavitev projekta CRP V1-1808, tematike in rezultatov

Radio Študent: Utrinki z Noči raziskovalcev na Radiu Študent v oddaji Frequenza della Scienza, prispevek <https://radiostudent.si/znanost/frequenza-della-scienza/utrinki-z-no%C4%8Di-raziskovalcev>, komentar o predavanju (od 11. minute naprej) je pripravila novinarka, ki se je udeležila predavanja doc. dr. Andreja Ramšak RAMŠAK, Andreja. *Iz morja do vilic - ali vemo kaj dobimo na krožnik? : predavanje na prireditvi Noč ima svojo moč, Morska biološka postaja, Piran, 27. 9. 2019.*

Predavanje na prireditvi Noč raziskovalcev Posredovanje pridobljenih znanj in problematike v poljudni obliki širši javnosti v okviru prireditev **Evropska noč raziskovalcev**:

RAMŠAK, Andreja. *Iz morja do vilic - ali vemo kaj dobimo na krožnik? : predavanje na prireditvi Noč ima svojo moč, Morska biološka postaja, Piran, 27. 9. 2019.* [COBISS.SI-ID [5205071](#)]

Predstavitev deležnikom:

predstavitev projekta delegaciji predstavnikov z Direktorata za hrano in ribištvo, Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, ki je potekala na NIB, dne 17. 10. 2019. Predstavitev projektne delo in rezultatov je opravila dr. Andreja Ramšak.

RAMŠAK, Andreja. Sledi ribi - ali kako zagotoviti sledljivost ribiških proizvodov : predavanje na delavnici Povezovanje raziskav morja z ribištvom in akvakulturo, NIB - Morska biološka postaja Piran, Piran, 14. september 2018.

Predstavljeni so bili principi sledljivosti v ribištvo za ključne deležnike ribiči, akvakultura in nadzorni organ (COBISS 4817743)

Sodelovanje na problemski konferenci Morje kdo bo tebe ljubil, ki je potekala 27.5. 2019 v panelu Ribištvo (Koper), kjer je bila predstavljena problematika sledljivosti in poneverb, sodelovala je dr. Alenka Baruca Arbeiter, ki je bila tudi diskutant.

Predavanje na simpoziju The future of small-scale fishery markets in the Mediterranean: social, environmental, economic and governance aspects, 6. 10. 2020, Izola, online dogodek, predavanje je izvedla dr. Andreja Ramšak.

RAMŠAK, Andreja. *Zamenjave vrst med lignji na slovenskem tržišču : predavanje na spletnem seminarju Analize na potvorbe živil, 14. maj 2021*. [COBISS.SI-ID [64001027](#)]. Predavanje je bilo izvedeno na povabilo GZS- Zbornica kmetijskih in živilskih podjetij

V okviru projekta CRP V1-1808 je bila opravljena:

Diplomska naloga na Fakulteti za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Univerza na Primorskem

GRBEC, Gregor. Razvoj metode LAMP za potrjevanje pristnosti živil iz lignjev vrste *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1798) = Development of a LAMP method for authenticating foodstuff consisting of species *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1798) : zaključna naloga. Koper: [G. Grbec], 2020. IX, 29 f. [3] f. pril., ilustr. https://www.famnit.upr.si/sl/studij/zakljucna_dela/view/934. [COBISS.SI-ID [30627843](#)]Mentor: doc. dr. Matjaž Hladnik in somentor: doc.dr. Andreja Ramšak

Magistrska naloga na Univerza v Reki

RUBINIĆ, Marko. *Visokoosjetljivi DNA testovi za određivanje zamjena vrsta u plodovima mora : diplomski rad*. Rijeka: [M. Rubinić], 2020. 103 f., ilustr. [COBISS.SI-ID [34083331](#)] mentorica doc. dr. Andreja Ramšak

Magistrska naloga na Fakulteti za management, Univerza na Primorskem

MAVRIČ, Alex. *Trg rib in ribištvo v Sloveniji: magistrska naloga*. Koper: [A. Mavrič], 2020. X, 113 str., [80] str. pril., ilustr. http://www.ediplome.fm-kp.si/Mavric_Alex_20200623.pdf. [COBISS.SI-ID [20491523](#)], mentor: prof. dr. Štefan Bojnec

V delu

Ramšak Andreja, Species substitution among squids on the Slovenian market, dogovorjeno za 30. 06. 2021, Piran NIB-MBP, obisk projektnih partnerjev projekt Qualify na povabilo GZS- Zbornica kmetijskih in živilskih podjetij

Alex Mavrič, Štefan Bojnec, Andreja Ramšak, Socioeconomic and environmental importance of the fish market and fisheries in Slovenia, priprava članka za Annales

Oddano v tisk

Alex Mavrič, Štefan Bojnec, Andreja Ramšak, Izzivi razvoja ribištva v Sloveniji, izdajatelj Založba Univerze na Primorskem. Monografija je bila oddana na razpis ARRS Javni razpis za sofinanciranje izdajanja znanstvenih monografij v letu 2021.

Objave zavedene v sistemu COBISS

Prispevek na konferenci brez natisa

Predavanje na simpoziju The future of small-scale fishery markets in the Mediterranean: social, environmental, economic and governance aspects, 6. 10. 2020, Izola, online dogodek, predavanje je izvedla dr. Andreja Ramšak. Zapis v COBISS: RAMŠAK, Andreja, BREZNIK, Bety. How can small scale fishery benefit from DNA technology applications? : lecture at the symposium The future of small-scale fishery markets in the Mediterranean: social, environmental, economic and governance aspects, Izola, 6 October 2020. [COBISS.SI-ID 31725315]

MAVRIČ, Alex, RAMŠAK, Andreja, BOJNEC, Štefan. Trg rib in ribištvo v Sloveniji. V: PRIŠENK, Jernej (ur.). Razvojni vidiki prenosa znanja v skupni kmetijski politiki po letu 2020 : 8. konferenca DAES : Maribor, 20.-21. februar 2020. 8. konferenca DAES, Maribor, 20.-21. februar 2020. 1. izd. Maribor: Društvo agrarnih ekonomistov Slovenije - DAES, 2020. Str. 137-148, ilustr. ISBN 978-961-91094-9-6. <http://www.daes.si/Splet/8.%20konferenca%20DAES%20-%20Zbornik.pdf>. [COBISS.SI-ID 1541983172]

RAMŠAK, Andreja, BREZNIK, Bety. How can small scale fishery benefit from DNA technology applications? : lecture at the symposium The future of small-scale fishery markets in the Mediterranean: social, environmental, economic and governance aspects, Izola, 6 October 2020. [COBISS.SI-ID 31725315]

Radijska ali televizijska oddaja

SMREKAR, Aleš (oseba, ki intervjuja), ŠVALJ, Miha (oseba, ki intervjuja), ŠOLN, Tina (oseba, ki intervjuja), MOZETIČ, Patricija (intervjuvanec), LIPEJ, Lovrenc (intervjuvanec), LIČER, Matjaž (intervjuvanec), RAMŠAK, Andreja (intervjuvanec), SIMIČ, Slobodan (intervjuvanec). O morju vemo manj kot o Marsu. Ljubljana: Radiotelevizija Slovenija javni zavod, 2019. 1 spletni vir (5 zvočnih datotek). Terenski Val. <https://val202.rtvsl.si/2019/11/morska-biološka-postaja-piran/>. [COBISS.SI-ID 5334351] . Dne 16.11.2019 e VAL 2020 gostoval na MBP in je bio opravljen intervju z dr. Andreja Ramšak, ki je predstavila CRP V1-1808, teatiko in rezultate projekta.

RAMŠAK, Andreja. Iz morja do vilic - ali vemo kaj dobimo na krožnik? : predavanje na prireditvi Noč ima svojo moč, Morska biološka postaja, Piran, 27. 9. 2019. [COBISS.SI-ID 5205071]

RAMŠAK, Andreja. Sledi ribi - ali kako zagotoviti sledljivost ribiških proizvodov : predavanje na delavnici Povezovanje raziskav morja z ribištvom in akvakulturo, NIB - Morska biološka postaja Piran, Piran, 14. september 2018. [COBISS.SI-ID 4817743]

Literatura

- Armani, A., Guardone, L., Castigliego, L., D'Amico, P., Messina, A., Malandra, R., Gianfaldoni, D., Guidi, A. 2015. DNA and Mini-DNA barcoding for the identification of Porgies species (family Sparidae) of commercial interest on the international market. *Food Control*, 50: 589-596.
- Biswas, G., Sakai, M. 2014. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection and identification of aquaculture pathogens: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(7): 2881-2895.
- Campbell, B., Pauly, D. 2013. Mariculture: A global analysis of production trends since 1950. *Marine Policy* 39, 94–100 <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpol.2012.10.009>.
- Chapela, M. J., Sotelo, C. G., Pérez-Martín, R. I., Pardo, M. Á., Pérez-Villareal, B., Gilardi, P., Riese, J. 2007. Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control*, 18(10): 1211- 1215.
- Codex Alimentarius Commission. 2017. *Discussion paper on food integrity and food authenticity* European Commission. 2015. Fish substitution (2015). In: *Food Safety* [online]. /food/safety/official_controls/food_fraud/fish_substitution_en EK, https://ec.europa.eu/commission/publications/natural-resources-and-environment_sl).
- Cusa, M., L. Falcão, J. De Jesus, C. Biolatti, L. Blondeel, F. S. A. Bracken, L. Devriese, S. Garcés-Pastor, S. Minoudi, C. Gubili, P. L. Acutis in S. Mariani. 2021. Fish out of water: consumers' unfamiliarity with the appearance of commercial fish species. *Sustainability Science*: <https://doi.org/10.1007/s11625-021-00932-z>.
- Europol. 2016. Operation OPSON V - Report. In: *Europol* <https://www.europol.europa.eu/publications-documents/operation-opson-v-report>
- FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture. (<http://www.fao.org/3/ai5555e.pdf>).
- Fields, A.T., Abercrombie, D.L., Eng, R., Feldheim, K. & Chapman, D.D. 2015. A novel mini-DNA barcoding assay to identify processed fins from internationally protected shark species. *PLOS ONE*, 10(2): e0114844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114844>
- Filipi, P. 2016. Ribištvo. V: Poročilo o stanju... v letu 2016. Ur. Marjeta Pintar, KIS, 159 strani
- Fiorino, G.M., Garino, C., Arlorio, M., Logrieco, A.F., Losito, I., Monaci, L. 2018. Overview on Untargeted Methods to Combat Food Frauds: A Focus on Fishery Products. *Journal of Food Quality*, 2018:1-13, <https://doi.org/10.1155/2018/1581746>
- Giusti, A., Armani, A., Sotelo, C.G. 2017. Advances in the analysis of complex food matrices: Species identification in surimi-based products using Next Generation Sequencing technologies. *PLoS ONE* 12(10): e0185586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185586>
- Griffiths, A.M., Sotelo, C.G., Mendes, R., Pérez-Martín, R.I., Schröder, U., Shorten, M., Silva, H.A., Verrez-Bagnis, V., Mariani, S. 2014. Current methods for seafood authenticity testing in Europe: Is there a need for harmonisation?. *Food Control*, 45: 95-100, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.020>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.056>
- Handy, S. M., Deeds, J. R., Ivanova, N. V., Hebert, P. D., Hanner, R. H., Ormos, A., Weigt, L. A., Moore, M. M., Yancy, H. F. 2011. A single-laboratory validated method for the generation of DNA

- barcodes for the identification of fish for regulatory compliance. *Journal of AOAC International*, 94(1): 201-210.
- Hanner, R., Becker, S., Ivanova, N.V. & Steinke, D. 2011. FISH-BOL and seafood identification: geographically dispersed case studies reveal systemic market substitution across Canada. *Mitochondrial DNA*, 22 Suppl 1: 106–122. <https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588217>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., de Waard, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(Suppl 1): S96.
- Khaksar, R., Carlson, T., Schaffner, D.W., Ghorashi, M., Best, D., Jandhyala, S., Traverso, J. & Amini, S. 2015. Unmasking seafood mislabeling in U.S. markets: DNA barcoding as a unique technology for food authentication and quality control. *Food Control*, 56:71–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.007>.
- Kuščer in Gregorinčič, 2013. Prava ureditev morskega ribištva. V: POTENCIALI povezovanja ribištva in turizma / uredila Tanja Mihalič, Gorazd Sedmak. - 1. natis. - Ljubljana : Ekonomska fakulteta, 2013. - (Znanstvene monografije Ekonomske fakultete).
- Littlefair, J.E., Clare, E.L. 2016. Barcoding the food chain: from Sanger to high-throughput sequencing1. *Genome* 59: 946–958, [dx.doi.org/10.1139/gen-2016-0028](https://doi.org/10.1139/gen-2016-0028).
- Marko, P.B., Lee, S.C., Rice, A.M., Gramling, J.M., Fitzhenry, T.M., McAlister, J.S., Harper, G.R. & Moran, A.L. 2004. Fisheries: mislabelling of a depleted reef fish. *Nature*, 430(6997): 309– 310. <https://doi.org/10.1038/430309b>.
- Marko, P. B., Nance, H. A., & Guynn, K. D. (2011). Genetic detection of mislabeled fish from a certified sustainable fishery. *Letter Curr Biol*, 21 (16), R621eR622. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.07.006>.
- Martinsohn, J. 2011. *Deterring illegal activities in the fisheries sector - genetics, genomics, chemistry and forensics to fight IUU fishing and in support of fish product traceability*. Publications Office of the European Union. (also available at <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/111111111/16295>).
- Martinez, I., James, D. & Loréal, H. 2005. *Application of modern analytical techniques to ensure seafood safety and authenticity*. FAO Fisheries Technical Paper No. 455. Rome, FAO. 73 pp.
- Meloni, D., Piras, P. & Mazzette, R. 2015. Mislabelling and species substitution in fishery products retailed in Sardinia (Italy), 2009-2014. *Italian Journal of Food Safety*, 4(4). <https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.5363>
- Nielsen, E. E., Cariani, A., Aoidh, E. M., Maes, G. E., Milano, I., Ogden, R., Taylor, M., Hemmer-Hansen, J., Babbucci, M., Bargelloni, L., Bekkevold, D., Diopere, E., Grenfell, L., Helyar, S., Limborg, M. T., Martinsohn, J. T., McEwing, R., Panitz, F., Patarnello, T., Tinti, F., Van Houdt, J. K. J., Volckaert, F. A. M., Waples, R. S., FishPopTrace, c., Carvalho, G. R. 2012. Gene-associated markers provide tools for tackling illegal fishing and false eco-certification. *Nature Communications*, 3: 851.
- NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration). (2013). Imports and exports of fishery products annual summary. <http://www.st.nmfs.noaa.gov/st1/publications.html>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28: E63
- Saull, J., Duggan, C., Hobbs, G., Edwards, T. 2016. The detection of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using loop mediated isothermal amplification in conjunction with a simplified DNA extraction process. *Food Control*, 59: 306-313.

- Pardo, M.A., Pérez-Villareal, B. 2004. Identification of commercial canned tuna species by restriction site analysis of mitochondrial DNA products obtained by nested primer PCR. *Food Chemistry*, 86: 143-150.
- Pauly, D., Zeller, D. 2017. Comments on FAOs State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA 2016), *Marine Policy* 77 (2017) 176–181 <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpol.2017.01.006>.
- Pardo, M.A., Jiménez, E., Pérez-Villareal, B. 2016. Misdescription incidents in seafood sector, *Food Control* 62 (2016) 277e283 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.048>
- Pollack, S. J., Kawalek, M. D., Williams-Hill, D. M., Hellberg, R. S. 2018. Evaluation of DNA barcoding methodologies for the identification of fish species in cooked products. *Food Control*, 84: 297-304.
- Shokralla, S., Hellberg, R. S., Handy, S. M., King, I., Hajibabaei, M. 2015. A DNA Mini-Barcoding System for Authentication of Processed Fish Products. *Scientific Reports*, 5: 15894.
- Taboada, L., Sánchez, A., Sotelo, C. G. 2017. A new real-time PCR method for rapid and specific detection of ling (*Molva molva*). *Food chemistry*, 228: 469- 475.
- Tomás, C., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Faria, M. A. 2017. Codfish authentication by a fast Short Amplicon High Resolution Melting Analysis (SA-HRMA) method. *Food Control*, 71: 255-263.
- Ulrich, R.M., John, D.E., Barton, G.W., Hendrick, G.S., Fries, D.P., Paul, J.H. 2015. A handheld sensor assay for the identification of grouper as a safeguard against seafood mislabelling fraud *Food Control* 53 (2015) 81e90 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.022>
- Warner, K., Timme, W., Lowell, B. & Hirshfield, M. 2013. *Oceana study reveals seafood fraud nationwide* http://oceana.org/sites/default/files/reports/National_Seafood_Fraud_Testing_Results_FINAL.pdf
- Willette, D.A., Simmonds, S.E., Cheng, S.H., Esteves, S., Kane, T.L., Nuetzel, H., Pilaud, N., Rachmawati, R. & Barber, P.H. 2017. Using DNA barcoding to track seafood mislabeling in Los Angeles restaurants. *Conservation Biology: The Journal of the Society for Conservation Biology*, 31(5): 1076–1085. <https://doi.org/10.1111/cobi.12888>.
- Wong, E. H. K., Hanner, R. H. 2008. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International*, 41(8): 828-837.

Priloge

Priloga 1 Izolacija DNA

Za izolacijo DNA smo optimizirali dva protokola in sicer protokol prirejen po Japelaghi in sod. (2011) in komercialni kit za izolacijo DNA E.Z.N.A Mollusc DNA Kit (OMEGA bio-tek) za izolacijo DNA iz konzerviranih rib, filetov in lignjev. Izolacija DNA z omenjenim kitom je enostavnejša in izolirana DNA je čistejša zaradi silikatnih kolon.

PROTOKOL ZA IZOLACIJO CELOKUPNE DNA S CTAB

Protokol smo optimizirali, da je primeren za izolacijo celokupne DNA iz svežih rib, filetov, ribjih konzerv in iz lignjev. Protokol je prirejen po tehniki izolacije DNA, ki so jo objavili Japelaghi in sod. (2011). Za izolacijo DNA iz konzerviranih rib je potrebno predhodno razmaščevanje zaradi jedilnih olj, ki so dodana konzerviranim izdelkom. Postopek razmaščevanja poteka preko noči v mešanici kloroforma, metanola in destilirane vode v razmerju 1:2:0.8, v temnem prostoru na sobni temperaturi.

Priprava ekstrakcijskega pufra (za pripravo 200 mL):

- 60 mL 1M Tris-HCl (pH 8)
- 10 mL 0,5M EDTA (pH 8)
- 23,36 g NaCl
- 4 g PVP
- 4 g CTAB

- 4 mL β -merkaptetoetanol (dodamo tik pred uporabo)

Za pripravo ekstrakcijskega pufra smo v merilni čaši zmešali vse naštetе kemikalije, razen β -merkaptetoetanol, in dopolnili z destilirano vodo do oznake 200 mL. β -merkaptetoetanol smo dodali tik pred postopkom izolacije DNA.

Postopek izolacije DNA:

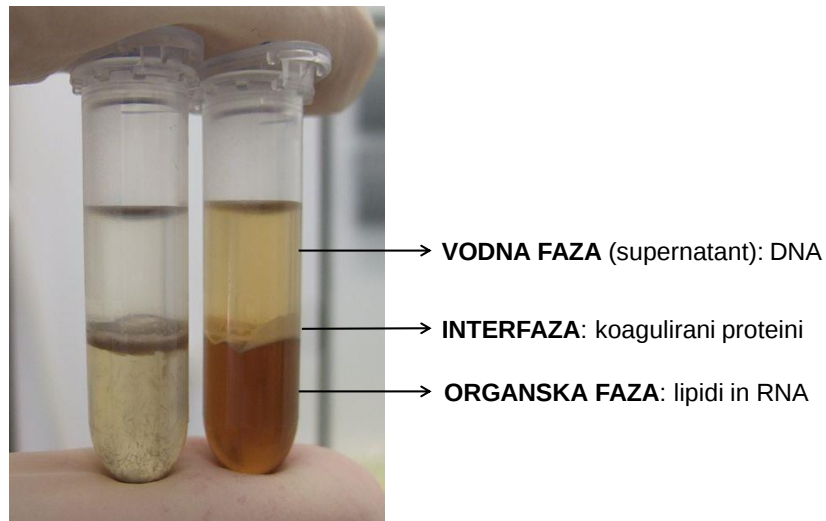
1. Košček živalskega tkiva oz. predhodno razmaščen košček ribjega mesa iz konzerve smo popivnali na papirnati brisači.
2. Košček tkiva (približno 0,03g) smo dali v terilnico, ga dobro strli (Slika 1) in mu dodali 1,2 ml ekstrakcijskega pufra CTAB-PVP, ki smo ga predhodno segreli na 65 °C ter homogenizirali vzorec.



Slika 1 Priprava ribjega mesa in homogenizacija v terilnici.

3. Homogenizirane vzorce smo prenesli v 2 ml mikrocentrifugirke in jih 30 min inkubirali v vodni kopeli pri 65 °C. Med inkubacijo smo vzorce vsakih 5 minut dobro premešali.
4. Po inkubaciji smo vzorcem dodali 500 μ l mešanice fenol-kloroform-izoamil alkohola, pripravljene v razmerju 25:24:1. Vzorce smo dobro premešali (vorteksirali) in jih 15 min centrifugirali pri hitrosti 14.000 rpm (centrifuga Eppendorf 5430R, Nemčija) in temperaturi 4 °C.
5. Supernatant (Slika 2) smo odpipetirali v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in vzorcem ponovno dodali 500 μ l mešanice fenol-kloroform-izoamil alkohola. Vzorce smo dobro premešali

(vorteksirali) in jih 15 min centrifugirali pri hitrosti 14.000 rpm (centrifuga Eppendorf 5430R, Nemčija) in temperaturi 4 °C.



Slika 2 Ločitev DNA v vodni fazi od preostalih celičnih komponent.

6. Supernatant smo odpipetirali v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in DNA oborili z dodatkom 70 µl 3 M Na-acetata (pH 5,2) in 700 µl ledeno hladnega izopropanola. Vzorce smo premešali (vorteksirali) in inkubirali 30 min pri - 80 °C.
7. Po končani inkubaciji smo vzorce ponovno dobro premešali in jih 30 min centrifugirali pri hitrosti 14.000 rpm in temperaturi 4 °C.
8. Supernatant smo odpipetirali, usedlino DNA sprali s 700 µL 70 % etanola ter vzorce posušili na sobni temperaturi.
9. DNA smo raztopili v 30-50 µl pufra TE [10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0)] in jo do nadaljnjih analiz shranili na - 20 °C.

Reference:

Japelaghi R., Haddad R., Garoosi G. A. 2011. Rapid and Efficient Isolation of High Quality Nucleic Acids from Plant Tissues Rich in Polyphenols and Polysaccharides. *Molecular Biotechnology*, 49(2), 129-137.

Reference:

Chapela M. J., Sotelo C. G., Pérez-Martín R. I., Pardo M. Á., Pérez-Villareal B., Gilardi P., Riese, J. 2007. Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control*, 18(10): 1211-1215.

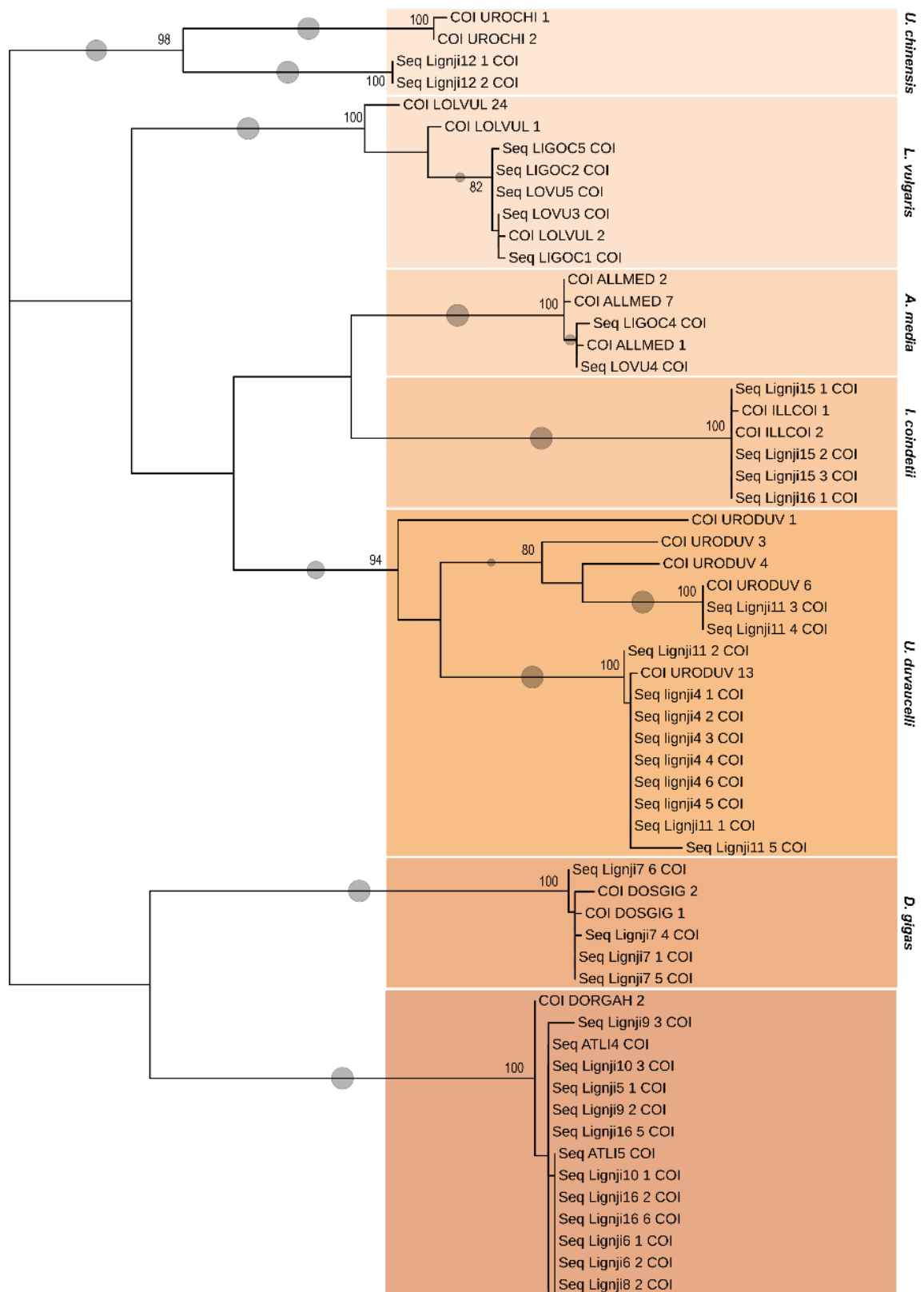
Merjenje koncentracije DNA:

Koncentracijo DNA vseh vzorcev smo izmerili s fluorimetrično metodo na fluorimetru Qubit™ v 3.0 (Invitrogen, ZDA) in s kompletom reagentov Quant® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, ZDA).

Postopek merjenja koncentracije je bil sledeč:

1. Najprej smo pripravili delovno raztopino tako, da smo reagent (Quant® dsDNA BR Reagent) redčili s pufrom (Quant® dsDNA BR Buffer) v razmerju 1:200.
2. Po 190 µl delovne raztopine smo odpipetirali v merilni centrifugirki (Quant® assay tubes) za standarda. V eno centrifugirko smo dodali 10 µl standarda 1 (Quant® dsDNA BR Standard #1), ki ne vsebuje DNA, v drugo centrifugirko pa 10 µl standarda 2 (Quant® dsDNA BR #2), ki vsebuje 100 ng/µl DNA.
3. Nato smo pripravili še vzorce DNA, tako, da smo v Qubit merilno centrifugirko odpipetirali 199 µl delovne raztopine in dodali po 1 µl izolirane DNA. Vzorce smo rahlo premešali, počakali približno 3 min in nato pričeli z merjenjem koncentracije.
4. Na fluorimetru smo v osnovnem meniju najprej izbrali »dsDNA« in nato program Quant-iT dsDNA Broad Range. Fluorimeter smo najprej umerili s standardoma 1 in 2, nato pa izmerili koncentracijo DNA vseh vzorcev v µg/ml.

Priloga 2 Filogenetsko drevo lignjev narejeno na osnovi COI (vir: M. Rubinić magistrsko delo, Univerza v Reki).



0,01

	Seq Lignji8 3 COI	
	Seq Lignji8 5 COI	
	Seq Lignji10 2 COI	
	Seq Lignji8 6 COI	
	Seq ATLI1 COI	
	Seq ATLI2 COI	
	Seq ATLI6 COI	
	Seq Lignji10 5 COI	
	Seq Lignji5 2 COI	
	Seq Lignji5 3 COI	
	Seq Lignji5 4 COI	
	Seq Lignji5 5 COI	
	Seq Lignji5 6 COI	
	Seq Lignji6 3 COI	
90	Seq Lignji10 6 COI	
90	Seq Lignji8 1 COI	
	Seq Lignji6 5 COI	
	Seq Lignji6 6 COI	
	Seq Lignji8 4 COI	
	Seq Lignji9 1 COI	
	COI DORGAH 1	
	Seq Lignji12 3 COI	

D. gahi

Priloga 3 Zbirna tabela za lignje z opisom ponudbe, skladnost z Pravilnikom o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov ter rezultati barkodiranja s COI.

Koda trgovine	Opis proizvoda/oblika ponudbe prepisano z deklaracije	Trgovsko ime na proizvodu (natančen prepis z deklaracije)	Znanstveno ime na proizvodu (natančen prepis z deklaracije)	Pravilnik o trgovskih imenih rib in drugih ribolovnih organizmov (Ur. L. RS, št. 46/2005)			Veljavnost imena v WORMS	Rezultati barkodiranja	FAO območja Deklaracija/FAO
				Trgovsko ime	Znanstveno ime	Skladnost			
01	Lignji	Jadranski lignji	Loligo vulgaris	Navadni ligenj	Loligo vulgaris	NE	Loligo vulgaris	<i>Loligo vulgaris</i>	37/27,34,37,47
01	Lignji očiščeni	Atlantski lignji	Loligo gahi	Patagonski ligenj	Loligo gahi	NE	Doryteuthis gahi	<i>Doryteuthis gahi</i>	47/41,87
02	Lignji očiščeni	lignji	Loligo spp.	lignji	Loligo spp.	DA	Not relevant	<i>Loligo vulgaris*</i>	51/27,34,37,47
03	Lignji, celi, očiščeni, z zaščitno vodno glazuro	lignji	Loligo duvaceli	lignji	Loligo spp-	NE	Uroteuthis duvaucelli	<i>Doryteuthis gahi</i>	51/41,87
03	N.P.	N.P.	Loligo chinensis	Ne obstaja v pravilniku	Ne obstaja v pravilniku	NE	Uroteuthis chinensis	<i>Uroteuthis duvaucelii</i>	61/51,57,61,71

03	Patagonski lignji, očiščeni, trupi in lovke	patagonjsko lignji	Loligo chinesis	Patagonski ligenj	Loligo gahi	NE	Doryteuthis gahi	<i>Doryteuthis gahi</i>	41/41,87
04	Patagonski lignji, hitro zmrznjeni	patagonski lignji	Loligo gahi	Patagonski ligenj	Loligo gahi	DA	Doryteuthis gahi	<i>Doryteuthis gahi</i>	41/41,87
05	Lignji orjaški lovke kuh. rez.	orjaški ligenj	Dosidicus gigas	Orjaški ligenj	Dosidicus gigas	DA	Dosidicus gigas	<i>Dosidicus gigas</i>	87/57,67,77,87
06	Lignji (patagonski)	lignji	Loligo gahi	lignji	Loligo spp.	NE		<i>Doryteuthis gahi</i>	41/41,87
07	Lignji patagonika	Patagonski lignji	Loligo patagonica	Patagonski ligenj	Loligo gahi	NE	Doryteuthis gahi	<i>Doryteuthis gahi</i>	42/41,87
08	Lignji, neočiščeni	lignji	Loligo spp.	lignji	Loligo spp.	DA		<i>Doryteuthis gahi</i>	0/41,87
08	Očiščeni lignji	Indijski lignji	Loligo duvacei	Ne obstaja v pravilniku	Ne obstaja v pravilniku	NE	Uroteuthis duvaucellii	<i>Uroteuthis duvaucellii</i>	51/51,57,61,71
09	Lignji neočiščeni	lignji	Loligo spp.	lignji	Loligo spp.	DA		<i>Uroteuthis chinensis</i>	0/61, 71, 81

010	Lignji patagonski odtaljeni	Patagonski lignji	Loligo patagonica	Patagonski lignj	Loligo gahi	NE	Doryteuthis gahi	Kontaminirani vzorci morda D. gahi	JZ-ATL/41,87
010	Lignji totan	Lignji totan	Todarodes sagittatus	Norveški puščičasti lignj	Todarodes sagittatus	NE	Todarodes sagittatus	<i>Illex coindetii</i>	0/41,87
011	Lignji patagonika očičeni	Patagonski lignji	Loligo spp.	Patagonski lignj	Loligo gahi	NE	Doryteuthis gahi	<i>Illex coindetii</i>	JZ-ATL/41,87