

METHODS FOR FISH SPECIES IDENTIFICATION IN FOOD PRODUCTS

Pavol Bajzik, Jozef Golian, Radoslav Židek, Jozef Čapla, Eubomír Belej, Matúš Ondrejka, Eubica Mrázová, Lenka Maršáľková

ABSTRACT

The need for identification of fishery products in food is currently ongoing issue for both consumers and producers of food. Consumer interest is driven in one the healthy diet, which prefers fish products, as an indispensable ingredient food and on the other hand, is a potential allergen causing health problems in humans allergic to fish protein. Allergy is a phenomenon that significantly affects human health, as well as overall life expectancy of an individual. The large number of fish species are known to trigger allergic reactions directly food intake or inhalation of fumes only, depending on the sensitivity organism. Large quantity of fish allergens are proteins from the stock protein to enzymes. Methods used for species identifications of fish in food products are PCR sequencing, multiplex PCR, PCR-RFLP, PCR-SSCP, RAPD, real-time PCR.

Keywords: PCR sequencing, multiplex PCR, PCR-RFLP, PCR-SSCP, RAPD, real-time PCR

ÚVOD

Identifikácia rybných druhov v potravinových produktoch je problematická, pretože morfológické znaky rýb sú čiastočne alebo kompletne stratené počas tepelnej úpravy. Je dôležité určiť druh ryby, pretože zvyšujúci sa medzinárodný obchod s morskými produktmi a nariadenia Európskej komisie 104/2000 požadujú, aby boli korektné a správne označené. V posledných rokoch bol z dôvodu zmeny správania spotrebiteľov zaznamenaný veľký nárast v konzumácii rýb a to hlavne zo zdravotných a nutričných dôvodov. Druhy rýb môžu byť identifikované erudovanými rybármi, veľkoobchodníkmi, majiteľmi reštaurácií a spotrebiteľmi pokiaľ je ryba v celku. Avšak, ak je ryba vo forme filiet identifikácia je ťažšia. Ďalšie komplikácie prichádzajú s úpravou rýb (mletie, obalovanie, pečenie). Tu je riziko, že môže úmyselne alebo neúmyselne prichádzať k zamene menej hodnotných rýb za ryby s vyššou hodnotou (Mackie, 1996).

Európska komisia (EC, 1999) smernica číslo 104/2000 zo 17. decembra 1999 na spoločnej organizácii trhu pre rybie a vodohospodárske produkty špecifikovala, že tieto produkty nesmú byť predávané malospotrebiteľom, pokiaľ nebudú označené komerčným menom druhu, metódou spracovania a miestom výlovu. Táto smernica vyžaduje od všetkých členských štátov vytvorenie a publikovanie zoznamu všetkých druhov rýb na trhu, označených všeobecným aj odborným názvom. Preto bolo potrebné vyvinúť analytickú metódu pre identifikáciu druhov aby sa dalo vyhnúť zámernej aj neúmyselnej zamene rýb a kôrovcov a presadiť smernicu o označovaní (Mackie et al., 1999).

Pre rybie druhy bolo vyvinutých mnoho analytických techník, vykonávaných prostredníctvom proteínových analýz: elektroforetické ako aj izoelektrické techniky a SDS-PAGE (Ataman et al., 2006; Mackie et al., 2000), chromatografické techniky (Horstkotte a Rehbein, 2003; Knuutinen a Harjula, 1998) a imunologické techniky ako imunodifúzia a ELISA (Fernández et al., 2002; Ochiai, et al., 2001). Hoci mnohé z týchto metód sú považované v určitých prípadoch za vhodné, nie sú použiteľné pre rutinnú analýzu, pretože proteíny strácajú biologickú aktivitu ihneď po usmrtení ryby a ich prítomnosť a charakteristika závisí od typu bunky. Okrem toho je

väčšina z nich termolabilná. Preto sú pre identifikáciu tepelne spracovaných produktov z rybných druhov preferované DNA metódy viac ako proteínové (Lockley a Bardsley, 2000).

DNA orientované analýzy sú orientované hlavne na využitie PCR metód pre amplifikáciu špecifického fragmentu. Za účelom kopírovania špecifickej sekvencie je použitý oligonukleotidový primer ohraničujúci špecifický úsek DNA a umožňujúci syntézu miliónov kópií určitého regiónu DNA. Získaný amplikón je potom následne analyzovaný špeciálnymi postupmi.

Sekvenovanie použitím metódy PCR

Najpriamejší spôsob získavania informácií z PCR produktov je sekvenovanie. Takto získané informácie sa používajú na identifikáciu rôznych druhov rýb (Jérôme et al., 2003; Lin et al., 2001; Murgia et al., 2002). Smerovanie týchto prác sa zameriavalo na amplifikáciu mtDNA sekvencií, zvyčajne na oblasť cytochróm *b* génu. Sekvenovanie a fylogenetická analýza mtDNA je používaná v posledných rokoch na kontrolu nesprávne označených druhov (Marko et al., 2004). Pepe et al. (2005) identifikovali ryby čelade *Gadidae* a *Merlucciidae* v osemnástich rôzne spracovaných rybných produktoch, sekvenovaním PCR produktov zo zachovanej oblasti cyt *b* génu. Táto metóda umožnila identifikáciu rybných druhov vo všetkých vzorkách. Ryby v testovaných produktoch patria do dvoch vyššie spomenutých čeladi s výnimkou jednej vzorky údenej baccaly, ktorá nebola zahrnutá do čelade *Gadidae* (Pepe et al., 2005). Taktiež fragmenty jadrových génov alfa-actínu, 5S rDNA a p-53, (ktorý okrem iného kóduje rastový hormón), boli sekvenované za účelom rozlíšenia rôznych rybných druhov (Canapa et al. 2000; Venkatesh a Brenner, 1997). Metóda sekvenovania je časovo aj technicky náročná, ale poskytuje relatívne veľké množstvo informácií s nutnosťou ich ďalšieho spracovania. Tieto údaje môžu byť použité v ďalšej PCR metóde akou je PCR-RFLP na ukončenie druhovej identifikácie (Ram et al. 1996; Sebastio et al., 2001).

Dostupnosť detailných sekvenčných informácií pre mnohé druhy a z toho vyplývajúca možnosť identifikácie fylogeneticky informatívneho jedno bázoového polymorfizmu umožnila navrhnutie druhovo špecifických primerov. Pri špecificky vhodných reakčných

podmienkach primer generuje produkt len v prítomnosti DNA z daného druhu. Kompletná sekvenčná informácia umožňuje tvorbu predpokladaného množstva produktu, takže identifikácia je potvrdená, keď je náležité množstvo amplicónu viditeľné na gély.

Druhovo špecifické PCR primery

Neselektívny primer je založený na sekvecii, ktorá je spoločná pre všetky analyzované druhy v systéme, je to presné miesto na géne, ktoré môže byť použité na „prikázanie“ množstva amplicónu ktoré má byť vygenerované. Využitie tejto metódy pre identifikáciu rybích druhov popísal (Asensio et al., 2001). Multiplex-PCR má potenciál priniesť úspory času a úsilia v laboratóriu, bez kompromisov vo funkčnosti. Navyše je možná aj kvalitatívna detekcia prímiesí. Je nutné poznať sekvenčné miesta, aby bolo možné navrhnúť primery a zahrnúť vhodnú kontrolu na zamedzenie možnosti, získania falošného pozitívneho alebo negatívneho výsledku.

Metóda PCR-RFLP

V PCR reakcii bez druhovo-špecifických primerov je potrebná niektorá z ďalších sekundárnych rozlišovacích techník ako napríklad RFLP. RFLP analýza PCR produktov je značne využívaná pre rozlišovanie druhov a jednoduchý primer s vhodným výberom restriktívnych enzýmov produkuje fragmenty, ktoré môžu byť použité na identifikáciu viacerých druhov súčasne.

Pri hľadaní rýchlych a jednoduchých genetických techník bola PCR-RFLP metóda uznaná za vhodnú na identifikáciu rybích druhov a následne so sebou priniesla finančné úspory a zjednodušenie práce v porovnaní s technikou sekvenovania DNA (Meyer et al., 1995). Táto metóda bola použitá na druhovú identifikáciu makrel (Arahishi, 2005), komerčne konzervovaných tuniakov (Lin a Hwang, 2007), úhorovitých druhov (Rehbein et al., 2002) a na identifikáciu ďalších druhov rýb v rôzne spracovaných rybích produktoch (Hsieh et al., 2007). Rybie produkty ako napr. údený tuniak, alebo konzervované ryby ochutené koreninami a omáčkami a samotná prítomnosť týchto látok používaných v potravinárskom priemysle degraduje DNA a tým inhibuje PCR reakciu (Ram et al., 1996). Aby bolo možné inhibičnému efektu zabrániť, amplifikácia DNA fragmentov je vykonávaná prostredníctvom „nested“ (vnorených) primerov PCR. Metóda bola použitá pre identifikáciu rybích druhov, pretože umožňuje amplifikáciu fragmentov s nižšou koncentráciou DNA a napriek tomu zostáva efektívna a citlivá (Pardo a Pérez-Villareal, 2004).

Metóda PCR-SSCP

SSCP je diagnostická metóda analýzy konformačného polymorfizmu jednoreťazového vlákna a využíva tvorbu rozdielnej sekvenčne špecifickej intramolekulárnej štruktúry ssDNA alebo ssRNA ovplyvňujúca mobilitu jednoreťazcov v nedenaturovaných elektroforetických podmienkach. Analýza SSCP je vhodná pre sledovanie zmien (mutácií) krátkych úsekov DNA ľubovolného pôvodu s veľkosťou 150 až 400 bp pripravených PCR reakciou (PCRSSCP) (Šmarda et al. 2005).

PCR-SSCP sa osvedčila pre identifikáciu rybích produktov ako losos, úhor, jeseter, pstruhov (Rehbein et

al., 1997) a konzervované tuniakovité druhy (Rehbein et al., 1999). Avšak predtým ako sa vyberie špecifický fragment DNA pre amplifikáciu a SSCP analýzu, do úvahy musia byť vzaté ďalšie faktory. Krátky amplicón (menej ako 300 bp) má napríklad výhodu, že intrašpecifická variabilita DNA molekuly je nižšia (Rehbein et al., 1997).

Výhody PCR-SSCP metódy oproti ostatným PCR metódam sú: 1. už aj jedno bázoová zmena v sekvencii môže byť detekovateľná prostredníctvom natívneho elektroforetického gélu (Oohara, 1997), čo umožňuje detekciu aj vysoko príbuzných druhov. 2. umožňuje analýzu aj degradovanej DNA, pretože je možné analyzovať aj krátke fragmenty DNA (Rehbein et al., 1999) 3. táto metóda je vysoko citlivá na detekciu bázoových zmien a intrašpecifická variabilita sa detekuje ľahšie ako metódami RFLP a RAPD (Bardakci a Skibinski, 1994). Napriek spomenutým výhodám, je dôležité vziať do úvahy, že SSCP analýza je ovplyvnená špecifickými podmienkami ako teplota, koncentrácia glycerolu, koncentrácia gélu (akrylamid/bis-akrylamid), koncentrácia tlmivých roztokov a zloženie komponentov v gélovej matrici (Fujita a Silver, 1994).

Napríklad primer získaný z mtDNA tuniaka, ktorý bol naamplifikovaný PCR reakciou z mitochondriálneho cyt *b* génu, bol použitý na identifikáciu aj iných rýb a druhov zvierat. Jednoreťazová DNA (ssDNA), ktorá vykazovala dve až štyri silné frakcie, bola získaná z molvy modrej, kapra, tresky jednoškvrnej, makrely, žraloka makrelovitého, tresky tmavej, tresky polárnej a sumca, avšak tieto frakcie boli iné ako frakcie získané zo vzoriek tuniaka. Ďalšie rybie druhy vykazovali slabé (treska) alebo žiadne ssDNA frakcie (atlantický losos, platesa, sled, šproty, pstruhy). Výsledkom vzoriek iných živočíchov ako rýb, boli silné frakcie ssDNA, ktorá sa líšili od frakcie vo vzorke tuniaka a zároveň boli odlišné aj navzájom (králik európsky, zajac, kôň, jeleň červený, hus, morka), iné vykazovali frakcie odlišné od tuniaka, ale nie odlišné medzi sebou (domáce kozy/ovce, domáce prasatá/ divé svine). Vzrastajúca rôznorodosť medzi PCR metódami spôsobila markantný rozdiel medzi silnými a slabými ssDNA väzbami (Weder et al., 2001).

Metóda Real-time PCR

Kvantitatívna real-time PCR (qPCR) metóda je založená na využití TaqMan fluorescenčnej sondy. Sonda označená žiariacou a zhasiacou farbičkou sa naväzuje na DNA ohraničenú primermi. Počas PCR amplifikácie 5'-3' exonukleázová aktivita Taq DNA polymerázy rozštiepi próbu hybridizovanú na templáte (Holland et al., 1991). Štiepenie próby vyúsťuje do nárastu fluorescencie, proporcionálne k množstvu DNA amplifikovanej na templáte. Využitie fluorescencie pre detekčné účely eliminuje potrebu pre ďalšie kroky po PCR reakcii. V porovnaní s konvenčnou kvalitatívnou PCR, táto metóda má niekoľko výhod. Fluorescencia môže byť meraná počas reakcie PCR a poskytuje analýzu v reálnom čase a qPCR tiež ponúka nižší potenciál pre kontamináciu PCR produktov. Presnosť a citlivosť tejto metódy, kombinovaná s vysokou rýchlosťou, spoľahlivosťou a možnosťou automatizácie (Heid et al. 1996), prispieva k vhodnosti tejto metódy na kvantifikáciu rýb a rybích produktov, napríklad využitie TaqMan sondy na identifikáciu a kvantifikáciu tresky. Trotta et al., (2005) využili real-time

PCR pre identifikáciu rybiech filiet kanic (druh západoindickej a austrálskej ryby) a jej príbuzných druhov. **Hird et al., (2005)** túto metódu využili na identifikáciu treskovitých rýb. Prítomnosť tejto ryby s koncentráciou viac ako 7 % môže byť detegovaná v surovom, alebo mierne tepelne upravenom produkte. V ďalšej práci **López a Pardo, (2005)** aplikoval TaqMan sondu v real-time PCR metóde pre identifikáciu a kvantifikáciu tuniaka. Presnosť tejto metódy môže byť ovplyvnená mnohými faktormi ako napríklad množstvo DNA vo vzorke, ktoré môže byť variabilne závislé na spôsobe spracovania produktu.

Aj na identifikáciu iných živočíšnych druhov v spracovaných mäsových produktoch je metóda real-time PCR vhodná, pretože aj najmenší fragment DNA vytvorený počas tepelného spracovania mäsa môže byť amplifikovaný a identifikovaný. V testovaných zmesiach obsahujúcich hovädzie, bravčové, konské, baranie, kuracie a morčacie mäso, bolo možné identifikovať tieto druhy s presnosťou 0,05%. Pri optimalizácii metódy sa zvýšila presnosť identifikácie druhov až na 0,01%. Krížová reaktivita medzi druhmi nebola nájdená s výnimkou čistého konského mäsa (250 ng DNA) v morčacom mäse. Krížová reaktivita jelenieho mäsa, ikier, pštrosa, kengura, kozy, domácich a divých kačiek, tučniakov, prepelíc a bažantov bola tiež zisťovaná a bolo dokázané, že množstvo väčšie ako 250 ng DNA týchto druhov v reakčnej zmesi dávalo falošný pozitívny signál. Bolo vyhodnotených viac ako 150 vzoriek mäsa pri použití DNA hybridizácie a real-time PCR. Porovnanie výsledkov ukázalo, že metóda real-time PCR je účinnejšia ako DNA hybridizácia (**Jonker et al., 2008**). Okrem toho kvôli nákladom je táto metóda zaujímavá len pri produktoch s vyššou trhovou hodnotou. Keďže táto metóda má enormné využitie a veľké možnosti aplikácie bude v dohľadnej dobe implementovaná vo väčšine laboratórií.

Cieľom ďalšieho tímu bolo vyvinúť konvenčnú PCR metódu pre rozlišovanie nasledujúcich treskovitých druhov v rybiech produktoch: treska aljašská (*Theragra chalcogramma*), treska atlantická (*Gadus morhua*), treska belasá (*Micromesistius poutassou*), hejk spp. (*Merluccius spp.*), treska tmavá (*Pollachius virens*). Druhovo-špecifické primerové páry pre určenie treskovitých druhov boli založené na čiastočnom úseku oblasti pantophysin I (PanI) genómovej sekvencii. Sekvenčná identifikácia bola potvrdená klonovaním a sekvenovaním PCR produktov týchto druhov. Pre súbežnú detekciu tresky aljašskej, tresky belasej a hejka spp. bola skonštruovaná kvadruplexná PCR metóda. Ďalšie treskovité druhy boli detegované v oddelených PCR reakciách. Táto metóda predstavuje alternatívny prístup v použití genómovej DNA pre identifikáciu rybiech druhov. Je rýchla, jednoduchá a spoľahlivá bez potreby ďalších potvrdzujúcich metód. Okrem toho je možné identifikovať súčasne viac druhov (**Hubalková et al., 2008**).

Iná štúdia DNA mikročipov bola vyvinutá na identifikáciu rybiech druhov z Európskych morí na základe mitochondriálnej 16S rDNA sekvencii. Bolo vybraných jedenásť dôležitých komerčne využívaných rybiech druhov pre prvý prototyp tejto metódy. Oligonukleotidová farbička bola navrhnutá na základe 16S rDNA sekvencii získaných z 230 rýb z 27 druhov. A navyše viac ako 1200 sekvencií z 380 druhov slúžiacich ako sekvenčný základ na testovanie prôb bolo použitých na testovanie *in silico*.

„Single target“ hybridizácia s Cy5 značkou a PCR amplifikácia 16S rDNA fragmentov z každého z 11 druhov rýb na mikročipoch obsahujúcich kompletnú sadu prôb, potvrdila vhodnosť tejto metódy na druhovú identifikáciu rýb. Získaný pozitívny (pravdivý) fluorescenčný signál bol rádovo o jeden stupeň vyšší ako pozitívny (falošný) signál krížovej hybridizácie. Výsledkom „single nontarget“ hybridizácie, signály v približne 27% testovaných prípadov boli rádovo o jeden stupeň nižšie ako pozitívne (pravdivé) signály. Táto štúdia hovorí, že 16S rDNA gén je vhodný na zostavenie oligonukleotidových prôb, ktoré môžu byť použité na diferenciaciu 11 druhov rýb. Tieto dáta sú spoľahlivým základom na druhý krok pre vytvorenie „Fish Chip“ pre približne 50 druhov ďalších rýb, ktoré sú dôležité pre morské prostredie, jeho výskum ako aj kontrolu rybiech produktov (Kochzius et al., 2008).

Metóda RAPD

Metóda s názvom náhodne amplifikovaná polymorfická DNA, alebo náhodná PCR (AP-PCR) je jednoduchá technika pre fingerprinting DNA, ktorá je vhodná pre rýchlu porovnávaciu typizáciu DNA. Používajú sa v nej krátke obvykle 8 – 12 nukleotidové primery ľubovľnej sekvencie s neznámou homológiou k cieľovej sekvencii DNA a s málo prísnyimi podmienkami pre pripojenie primerov (**Šmarda et al. 2005**). Táto metóda bola použitá pre rozlišovanie populácie rýb druhu Hilsa shad (významná tropická ryba z čeľade *Clupeidae* rodu *Tenualosa*) (**Dahle et al., 1997**), pre rybu tilapia a jej poddruhy (**Bardakci a Skibinski, 1994**), pre mrenovité druhy rýb (**Cellejas a Ochando, 2001**), pre skupinu nilských zubáčov (**Asensio et al., 2002**) a salmonidy (**Jin et al., 2006**).

V porovnaní s inými identifikačnými DNA metódami ako RFLP, SSCP, ktoré si vyžadujú relatívne veľké množstvo čistej DNA, sú zacielené na špecifické miesto na DNA sekvencii a sú pracne a časovo náročné v porovnaní s metódou RAPD a tieto dôvody ich robia nevhodnými na skúmanie veľkých druhových línií (**Partis a Wells, 1996**). Nevýhodou RAPD metódy je, že nie je vhodná na identifikáciu produktov, ktoré obsahujú zmes viacerých druhov rýb a nie je možné ju použiť pri viacnásobne degradovanom materiáli ako napríklad autoklávané vzorky (**Martínez et al., 1998**).

ZÁVER

Zámerom tohto príspevku bolo poskytnúť rozsiahly prehľad metód založených na PCR autentifikácii rýb a rybiech produktov. V článku sú popísané rôzne techniky ako PCR sekvenovanie, multiplex PCR, PCR-RFLP, PCR-SSCP, RAPD, real-time PCR. Tieto metódy umožnili spotrebiteľom ochranu pred falšovaním v potravinárskom priemysle.

LITERATÚRA

- ARAHISHI, F. 2005. PCR-RFLP analysis of nuclear nontranscribed spacer for mackerel species identification. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, 2005, p. 508-511.
- ASENSIO, L., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., CÉPEDE, A. RODRÍGUEZ, M. A., HERNÁNDEZ, P. E. 2001. Identification of Nile perch (*Lates niloticus*), grouper (*Epinephelus guaza*), and wreck fish (*Polyprion americanus*)

- fillets by PCR amplification of the 5S rDNA gene. In *Journal of the AOAC International*, vol. 84, 2001, p. 777-781.
- ATAMAN, C., CELIK, U., REHBEIN, H. 2006. Identification of some Aegean fish species by native isoelectric focusing. In *European Food Research and Technology*, vol. 222, 2006, p. 99-104.
- BARDAKCI, F., SKIBINSKI, D. O. F. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. In *Heredity*, vol. 73, 1994, p. 117-123.
- CANAPA, A., BARUCCA, M., MARINEL, L. A., OLMO, E. 2000. Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). In *Journal of Molecular Evolution*, vol. 50, 2000, p. 93-97.
- CALLEJAS, C., OCHANDO, M. D. 2001. Molecular identification (RAPD) of the eight species of the genus *Barbus* (Cyprinidae) in the Iberian Peninsula. In *Journal of Fish Biology*, vol. 59, 2001, p. 1589-1599.
- DAHLE, G., RAHMAN, M., ERIKSEN, A. G. 1997. RAPD fingerprinting used for discriminating among three populations of Hilsa shad (*Tenualosa ilisha*). In *Fisheries Science*, vol. 32, 1997, p. 263-269.
- FERNÁNDEZ, A., GARCÍA, T., ASENSIO, L., RODRÍGUEZ, M. A., GONZÁLEZ, I., LOBO, E. 2002. Identification of the clam species *Ruditapes decussatus* (grooved carpet shell), *Venerupis romboides* (yellow carpet shell) and *Venerupis pullastra* (pullet carpet shell) by ELISA. In *Food and Agricultural Immunology*, vol. 14, 2002, p. 65-71.
- FUJITA, K., SILVER, J. 1994. Single-strand conformational polymorphism. In *PCR Methods and Applications*, vol. 4, 1994, p. 137-139.
- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J., WILLIAMS, P. M. 1996. Real-time quantitative PCR. In *Genome Research*, vol. 6, 1996, p. 986-994.
- HIRD, H. J., HOLD, G. L., CHRISHOLM, J., REECE, P., RUSSELL, V. J., BROWN, J. 2005. Development of a method for the quantification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) in commercial products using real-time PCR. In *European Food Research and Technology*, vol. 220, 2005, p. 633-637.
- HOLLAND, P. M., ABRAMSON, R. D., WATSON, R., GELFAND, D. H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, 1991, p. 7276-7280.
- HORSTKOTTE, B., REHBEIN, H. 2003. Fish species identification by means of restriction fragment length polymorphism and high performance liquid chromatography. In *Journal of Food Science*, vol. 68, 2003, p. 2658-2666.
- HSIEH, H. S., CHAI, T., HWANG, D. F. 2007. Using the PCReRFLP method to identify the species of different processed products of billfish meats. In *Food Control*, vol. 18, 2007, p. 369-374.
- HUBALKOVÁ, Z., KRÁLIK, P., KASALOVÁ, J., RENČOVÁ, E. 2008. Identification of gadoid species in fish meat by polymerase chain reaction (PCR) on genomic DNA. In *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, 2008, no. 10, p. 3454-9.
- JÉRÔME, M., LEMAIRE, C., BAUTISTA, J. M., FLEURENCE, J., ETIENNE, M. 2003. Molecular phylogeny and species identification of sardines. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, 2003, p. 43-50.
- JIN, L. G., CHO, J. G., SEONG, K. B., PARK, J. Y., KONG, I. S., HONG, Y. K. 2006. 18 rRNA gene sequences and random amplified polymorphic DNA used in discriminating Manchurian trout from other freshwater salmonids. In *Fisheries Science*, vol. 72, 2006, p. 903-905.
- JONKER, K. M., TILBURG, J. J., HAGELE, G. H., DE BOER, E. 2008. Species identification in meat products using real-time PCR. In *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, vol. 25, 2008, no. 5, p. 527-533.
- KNUUTINEN, J., HARJULA, P. 1998. Identification of fish species by reverse-phase high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. In *Journal of Chromatography B*, vol. 705, 1998, p.11-21.
- KOCHZIUS M., NÖLTE M., WEBER H., SILKENBEUMER N., HJÖRLEIFSDOTTIR S., HREGGVIDSSON G.O., MARTEINSSON V., KAPPEL K., PLANES S., TINTI F., MAGOULAS A., GARCIA VAZQUEZ E., TURAN C., HERVET C., CAMPO FALGUERAS D., ANTONIOU A., LANDI M., BLOHM D. 2008. DNA microarrays for identifying fishes. In *Mar Biotechnol* (NY), vol.10, 2008, no. 2, p.207-17.
- LIN, W. F., HWANG, D. F. 2007. Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. In *Food Control*, vol. 18, 2007, p. 1050-1057.
- LIN, Y. S., POH, Y. P., TZENG, C. S. 2001. A phylogeny of freshwater eels inferred from mitochondrial genes. In *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 20, 2001, p. 252- 261.
- LOCKLEY, A. K., BARDSLEY, R. G. 2000. DNA-based methods for food authentication. In *Trends in Food Science and Technology*, vol. 11, 2000, p. 67-77.
- LÓPEZ, I., PARDO, M. A. 2005. Application of relative quantification Taqman real-time polymerase chain reaction technology for the identification and quantification of *Thunnus alalunga* and *Thunnus albacares*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, 2005, p. 4554-4560.
- MACKIE, I., CRAIG, A., ETIENNE, M., JEROME, M., FLEURENCE, J., JESSEN, F. 2000. Species identification of smoked and gravid fish products by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, urea isoelectric focusing and native isoelectric focusing: a collaborative study. In *Food Chemistry*, vol. 71, 2000, p. 1-7.
- MACKIE, I. M., PRYDE, S. E., GONZALES-SOTELO, C., MEDINA, I., PÉREZMARTÍN, R., QUINTEIRO, J. 1999. Challenges in the identification of species of canned fish. In *Trends in Food Science and Technology*, 1999, p. 9-14.
- MACKIE, I. M. 1996. *Authenticity of fish*. P. R. Ashurt, M. J. Dennis (Eds.), In *Food authentication*, London: Blackie Academic and Professional, 1996, p. 140-170.
- MARKO, P. B., LEE, S. C., RIC, A. M., GRAMLING, J. M., FITZHENRY, T. M., MCAALISTER, J. S. 2004. Mislabelling of a depleted reef fish. In *Nature*, vol. 430, 2004, p. 309-310.
- MARTÍNEZ, I., MALMHEDEN YMAN, I. 1998. Species identification in meat products by RAPD analysis. In *Food Research International*, vol. 31, 1998, p. 459-466.
- MEYER, R., HOFELIN, C., LUTHY, J., CANDRIAN, U. 1995. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. In *Journal of the AOAC International*, vol. 78, 1995, p. 1542-1551.
- MURGIA, R., TOLA, G., ARCHER, S. N., VALLERGA, S., HIRANO, J. 2002. Genetic identification of grey mullet species (*Mugilidae*) by analysis of mitochondrial DNA sequence: application to identify the origin of processed ovary products (*Bottarga*). In *Marine Biotechnology*, vol. 4, 2002, p. 119-126.
- OCHIAI, Y., OCHIAI, L., HASHIMOTO, K., WATABE, S. 2001. Quantitative estimation of dark muscle content in the mackerel meat paste and its products using antisera against myosin light chains. In *Journal of Food Science*, vol. 66, 2001, p. 1301-1305.
- OOHARA, I. 1997. Detection of single strand conformation polymorphisms (SSCPs) on mitochondrial DNA fragments between two domesticated strains of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. In *Fisheries Science*, vol. 63, 1997, p. 151-152.
- 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. In *Food Chemistry*, vol. 86, 2004, p.143-150.
- PARTIS, L., WELLS, R. J. 1996. Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). In *Molecular and Cellular Probes*, vol. 10, 1996, p. 435-441.

PEPE, T., TROTTA, M., DIMARCO, I., CENNAME, P., ANASTASIO, A., CORTESI, M. L. 2005. Mitochondrial cytochrom b DNA sequence variations: an approach to fish species identification in processed fish products. In *Journal of Food Protection*, vol. 68, 2005, p. 421-425.

RAM, J. L., RAM, M. L., BAIDOUN, F. F. 1996. Authentication of canned tuna and bonito sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 44, 1996, p. 2460-2467.

REHBEIN, H., SOTELO, C. G., PÉREZ-MARTÍN, R. I. CHAPELA-GARRIDO, M. J., HOLD, G. L., RUSSELL V. J. 2002. Differentiation of raw or processed eel by PCR-based techniques: restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) and single strand conformation polymorphism analysis (SSCP). In *European Food Research and Technology*, vol. 214, 2002, p. 171-177.

REHBEIN, H., KRESS, G., SCHMIDT, T. 1997. Application of PCR-SSCP to species identification of fishery products. In *Journal of Science of Food and Agriculture*, vol. 74, 1997, p. 35-41.

Kontaktná adresa:

Ing. Pavol Bajzík, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: bajzik2@gmail.com

doc. Ing. Jozef Golian, Dr. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: Jozef.Golian.AF@uniag.sk

Ing. Radoslav Židek, PhD. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: radoslav.zidek@seznam.cz

Ing. Jozef Čapla, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: capla@centrum.sk

REHBEIN, H., MACKIE, I. M., PRYDE, S., GONZÁLES-SOTELO, C., MEDINA, I., PÉREZ-MARTÍN, R. 1999. Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA patterns. In *Food Chemistry*, vol. 64, 1999, p. 263-268.

SEBASTIO, P., ZANELLI, P., NERI-TAURO, M. 2001. Identification of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) and gilt sardine (*Sardinella aurita*) by polymerase chain reaction, sequence of their mitochondrial cytochrome b gene, and restriction analysis of polymerase chain reaction products in semipreserves. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, 2001, p. 1194-1199.

ŠMARDA, J., DOŠKAR, J., PANTUČE, R., RUŽIČKOVÁ, V., KOPÍTKOVÁ, J. 2005. *Metody molekulární biologie*, 1.vyd. Masarykova univerzita v Brně, 2005, ISBN 80-210-3841-1.

VENKATESH, B., BRENNER, S. 1997. Genomic structure and sequence of the pufferfish (*Fugu rubripes*) growth hormone-encoding gene, a comparative analysis of teleost growth hormone gene. In *Gene*, vol. 187, 1997, p. 211-215.

WEDER, J. K. P., REHBEIN, H., KAISER, K. P. 2001. On the specificity of tunadirected primers in PCR-SSCP analysis of fish and meat. In *Eur Food Res Technol.*, vol. 213, 2001, p. 139-144.

Ing. Ľubomír Belej, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: lubomirbelej@azet.sk

Ing. Matúš Ondrejka, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: matus.ondrejka@uniag.sk

Ing. Ľubica Mrázová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: lubica.mrazova@uniag.sk

Ing. Lenka Maršáľková, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: marsalkova@gmail.com