Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Online ISSN: 2345-427X
Print ISSN: 2345-4288

Investigating the amount of fraud in the production of canned tuna using the DNA barcoding method in Iran

Mona Eyvaz[1], Mehdi Zolfaghari[*2], Mojtaba Nasr Esfahani[3], Hamed Paknejad[4]

1. Ph.D. Student, Dept. of Food Science and Technology, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran. E-mail: mona.aivaz@yahoo.com
2. Corresponding Author, Dept. of Fishery Products Processing, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: zolfaghari.mz@gmail.com
3. Associate Prof., Dept. of Chemistry, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran. E-mail: m-nasresfahani@iaun.ac.ir
4. Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hkolangi@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 07.03.2022
Revised: 07.06.2022
Accepted: 07.11.2022

Keywords:
Adulteration detection,
Canned tuna,
Cytochrome oxidase 1 marker,
DNA barcoding

ABSTRACT

Nowadays, the mixing of low-quality species in canned products, especially in fishery products, is considered as one of the most important problems of monitoring some food industry production units. Among the new methods of detecting counterfeits, genetic methods such as DNA barcoding have high accuracy and precision. Therefore, the purpose of this research is to investigate the fraud in canned Iranian tuna fish produced using DNA barcoding, by cytochrome oxidase 1 detector. In this research, canned tuna stuffed with one piece of meat and canned tuna stuffed with chopped meat from different brands available in the market were collected from different regions of the country. The samples after DNA extraction and optimizing its process, were subjected to PCR by cytochrome oxidase 1 gene and then sequenced. The results of the sequencing showed that out of 100 canned samples examined, 80 samples have 97% genetic similarity to the fish listed on the can label, 18 samples have 90% genetic similarity to short fish. (Sillaginidae), and 3 samples belonged to 3 different fish species. Among these, only 3 samples were related to canned tuna prepared from one piece of meat. The results showed that this method is very useful due to its high speed and accuracy, for canned fish, where DNA parts may be lost during the canning process and it can be used to check the amounts of fraud in processed foods are recommended.

Cite this article: Eyvaz, Mona, Zolfaghari, Mehdi, Nasr Esfahani, Mojtaba, Paknejad, Hamed. 2023. Investigating the amount of fraud in the production of canned tuna using the DNA barcoding method in Iran. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 12 (2), 35-47.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2022.20391.1684
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا آنلاین: ۲۳۴۵-۴۲۷X
شاپا چاپی: ۲۳۴۵-۴۲۸۸

بررسی میزان تقلب در تولید کنسرو ماهی تن با استفاده از روش DNA بارکدینگ در ایران

مونا ایوز[۱]، مهدی ذوالفقاری*[۲]، مجتبی نصراصفهانی[۳]، حامد پاک‌نژاد[٤]

۱. دانشجوی دکتری گروه علوم صنایع غذایی و فناوری، واحد نجف‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف‌آباد، ایران. رایانامه: mona.aivaz@yahoo.com
۲. نویسنده مسئول، گروه عمل‌آوری فرآورده‌های شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: zolfaghari.mz@gmail.com
۳. دانشیار گروه شیمی، واحد نجف‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف‌آباد، ایران. رایانامه: m-nasresfahani@iaun.ac.ir
٤. دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hkolangi@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۰٤/۱۲
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۱/۰٤/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۰٤/۲۰

واژه‌های کلیدی:
تشخیص تقلب،
شناساگر سیتوکروم اکسیداز ۱،
کنسرو تن ماهیان،
DNA بارکدینگ

چکیده

امروزه اختلاط گونه‌های با کیفیت پایین در فرآورده‌های کنسروی به ویژه در محصولات شیلاتی به عنوان یکی از مهم‌ترین معضلات نظارت بر برخی واحدهای تولیدی صنایع غذایی دریایی به شمار می‌رود. از میان روش‌های نوین تشخیص از تقلبات، روش‌های ژنتیکی مانند DNA بارکدینگ از صحت و دقت بالایی برخوردار است. از این رو، هدف از پژوهش حاضر، بررسی تقلب در کنسرو تن ماهیان ایران تولیدشده با استفاده از DNA بارکدینگ، به‌وسیله شناساگر سیتوکروم اکسیداز ۱ می‌باشد. در پژوهش حاضر کنسروهای ماهی تن پرشده با گوشت یک تکه و کنسروماهی تن پرشده با گوشت خردشده از برندهای مختلف موجود در بازار از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها پس از استخراج DNA و بهینه‌سازی فرآیندهای آن، برای ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ با استفاده از پرایمرهای بهینه PCR شده و سپس مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از توالی‌یابی نشان داد از ۱۰۰ نمونه کنسرو مورد بررسی، ۸۰ نمونه دارای ۹۷ درصد شباهت ژنتیکی به ماهیان تن درج شده روی برچسب قوطی کنسرو، ۱۷ نمونه دارای ۹۰ درصد شباهت ژنتیکی به شورت ماهیان (Sillaginidae) و ۳ نمونه مربوط به ۳ گونه ماهی دیگر بود. از این میان تنها ۳ نمونه مربوط به کنسروهای تن ماهی تهیه شده از گوشت یک تکه بود. نتایج نشان داد که این روش به دلیل دقت بالا و اختصاصی بودن، برای کنسروهای ماهی که ممکن است قطعات DNA طی فرآیندهای تهیه کنسرو از بین برود، بسیار کاربردی است و استفاده از آن برای بررسی میزان تقلبات غذاهای فرآوری شده پیشنهاد می‌گردد.

استناد: ایوز، مونا، ذوالفقاری، مهدی، نصراصفهانی، مجتبی، پاک‌نژاد، حامد (۱۴۰۲). بررسی میزان تقلب در تولید کنسرو ماهی تن با استفاده از روش DNA بارکدینگ در ایران. *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۲ (۲)، ۴۷-۳۵.
DOI: 10.22069/japu.2022.20391.1684

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

از ابتدای تاریخ بشر، از ماهی و محصولات شیلاتی برای تأمین معاش، تفریح و بسیاری از جنبه‌های دیگر استفاده می‌شد. امروزه، ماهی و صنایع مرتبط با آن، تقریباً یک بخش مهم اقتصادی در هر فرهنگ و جامعه‌ای محسوب می‌گردد. بر اساس شواهد مشخص گردید که تقریباً در هر توده بزرگی از آب سالم، چه شیرین و چه شور صدها گونه ماهی وجود دارد که برای تولید محصولات شیلاتی از اهمیت تجاری بالایی برخوردار است (۱).

مصرف ماهی در بیش‌تر کشورها از جمله ایران بسیار کم‌تر از سطح توصیه شده می‌باشد، که معمولاً باید حدود دو وعده در هفته باشد و این مقدار فقط بخش کمی از کل پروتئین حیوانی مصرفی را در بر می‌گیرد (۲، ۳، ٤).

در ایران نیز، مانند بسیاری از کشورهای دیگر، مصرف کنسرو ماهی به خصوص کنسرو ماهی تن به‌علت استفاده راحت و آسان به جای ماهی تازه ترجیح داده می‌شود (۵). مدیران مشاغل غذایی موظفند اطمینان حاصل کنند که همه مراحل تولید، فرآوری و توزیع مواد غذایی تحت کنترل آن‌ها بوده و از نظر ایمنی غذایی، بهداشت و فرآوری مورد نیاز با قوانین تعیین شده بین‌المللی مطابقت دارد؛ سپس، می‌توانند محصولاتشان را با اطمینان خاطر به بازار عرضه کنند. هم‌چنین، متصدیان تجارت مواد غذایی که مراحل مختلف تولید، فرآوری و یا توزیع مواد غذایی را انجام می‌دهند؛ باید از استانداردهای بهداشتی عمومی پیروی کنند (٦، ۷).

ظرفیت صنعت کنسروسازی ماهی ایران ۱۳٤ واحد بوده که حدود ۷۱۷ میلیون قوطی در سال ظرفیت دارند. که ظرفیت عملیاتی این صنعت ٥٦٤ میلیون قوطی در سال می‌باشد. توسعه این صنعت به‌نحوی است که از ۳۳ محصول فرآوری‌شده شیلاتی، ۱۲ محصول آن کنسروی بوده است (۸).

تن ماهیان مورد استفاده در کنسرو در ایران به‌طور عمده شامل ماهیان ارزشمندی مانند گیدر (تن زردباله) با نام علمی *Thunnus albacares* (Yellowfin tuna)، ماهی هوور با نام علمی *Thunnus tonggol*، هوور مسقطی (*Katsuwonus pelamis*)، ماهی زرده (*Euthynnus affinis*) (Kawakawa)، می‌باشد. طبق استانداردهای غذا و دارو تولیدکنندگان موظف به درج نوع ماهی مورد استفاده در برچسب کنسرو هستند. با توجه به ارزش اقتصادی بالای ماهیان تن مذکور و علاقه‌مندی بیش‌تر مصرف‌کنندگان به خرید کنسرو این ماهیان، این کنسروها جایگاه بهتری در سبد خرید مصرف‌کنندگان دارند. متأسفانه در صنعت تولید کنسرو تن ماهیان نیز هم‌چون بسیاری از صنایع غذایی دیگر موضوع تقلب مواد غذایی هر چند اندک مطرح است (۹).

در تهیه این نوع کنسروها از دو نوع گوشت استفاده می‌شود. به این صورت که کنسروهایی که وجود دارند یا به صورت گوشت‌های یک تکه هستند. به طوری که گوشت ماهیان پس از پخت، قالبگیری می‌شود و در قوطی‌های کنسرو که از جنس فلز است، قرار می‌گیرد. در مورد کنسروهای تهیه شده از خرده گوشت‌ها، بدین صورت عمل می‌شود که تکه‌های گوشت اضافه آمده از گوشت‌ها پس از قالبگیری برای کنسروهای یک تکه روی یک سینی جمع می‌شود و سپس توسط دستگاه به صورت اتوماتیک یا توسط نیروی انسانی و درون قوطی‌های فلزی قرار می‌گیرد (۱۰).

به طور کلی، در بحث فرآوری محصولات شیلاتی در برخی موارد مشاهده می‌شود که تولیدکنندگان، ماهی‌های بی‌کیفیت را با ماهی‌های با کیفیت بالاتر مخلوط می‌کنند تا سود بالاتری را برای گونه‌های تجاری با ارزش کم‌تر دریافت کنند (۱۱). این اقدامات متقلبانه بر بازار ماهی تأثیر منفی می‌گذارند. ابتکارات

لازم برای افزایش آگاهی عمومی و ایجاد ابزارهای مؤثر برای احراز هویت محصولات می‌تواند نوع گونه ماهی را شناسایی و از ایجاد تقلب جلوگیری کند. شناسایی قابل اعتماد ماهی برای جلوگیری از برچسب‌گذاری اشتباه در بازارهای ماهی امری است که ضروری به نظر می‌رسد (۱۲). امروزه استفاده از رویکردهای مولکولی برای شناسایی گونه‌های ماهی به دلیل کاهش محدودیت‌های مرتبط با سیستم‌های شناسایی مبتنی بر مورفولوژیک و فقدان تخصص در شناسایی گونه‌های ماهی پیشنهاد شده است (۱۳). در سال‌های اخیر، بارکدگذاری مولکولی به عنوان بهترین روش در علم پزشکی قانونی برای شناسایی گونه‌ها مطرح شده است (۱٤). بارکد گذاری DNA روشی است که توالی‌های متغیر ژنتیکی DNA را با تنوع درون گونه‌ای کم اما بین گونه‌ای بالا برای تمایز بین گونه‌ها اعمال می‌کند و به عنوان یک روش عملی در ردیابی مواد غذایی استفاده می‌شود. از این‌رو، از نشانگرهای زیستی مختلفی برای شناسایی ماهی استفاده می‌گردد (۱۵).

یکی از آشناترین و هدفمندترین نشانگرهای DNA سیتوکروم میتوکندری است که در زمینه‌های پزشکی قانونی، طبقه‌بندی و اکولوژیکی کاربردهای مشترکی دارد (۱٦). استفاده از ژن سیتوکروم یک انتخاب عاقلانه برای شناسایی انواع گونه‌های مختلف ماهی، جوجه‌ها و دام می‌باشد و بسیاری از پژوهش‌گران آن را در طبقه‌بندی سیستماتیک و زیست‌محیطی مولکولی گزارش نمودند (۱۷). در مقایسه با ژن‌های هسته‌ای، DNA میتوکندریایی (mtDNA) به دلیل تعداد تقسیم زیاد، اینترون کم‌تر، ترکیب مجدد کم و وراثت مادرانه برای بارکدگذاری DNA مناسب‌تر است (۱۸).

اگرچه DNA در مرحله استریلیزاسیون حرارتی فرآیند کنسرو نیز تخریب می‌شود؛ اما، به دست آوردن قطعات کوچک با اختلاف کافی در توالی امکان تمایز و شناسایی حتی گونه‌های بسیار نزدیک را نیز دارد. در یک سلول DNA هسته‌ای و میتوکندریایی به طور بالقوه برای اهداف شناسایی گونه در دسترس می‌باشند؛ اما با این حال، DNA میتوکندریایی ترجیح داده می‌شود. هدف اصلی این مطالعه، توسعه روش تشخیص دقیق گونه‌های رایج ماهی تن کنسروی با استفاده از تکنیک DNA barcoding برای دو نوع کنسرو در آب نمک و روغن بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: بدین منظور از برندهای موجود در بازار کنسروهای ماهی تن جمع‌آوری شد. پس از بررسی مشخصات موجود روی قوطی‌های تن، این اطلاعات اعم از نوع گونه ماهی مورد استفاده و نوع گوشت یک تکه یا خردشده ثبت گردید. از هر برند حداقل سه نمونه و دو زیر نمونه تهیه شد، که یک زیرنمونه برای انجام تشخیص استفاده و زیرنمونه دیگر برای تکرارپذیری احتمالی لازم، در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (۱۹).

سنتز پرایمر: عمده مطالعات صورت گرفته در حوزه تقلب در محصولات آبزیان به کمک ژن‌های موجود میتوکندریایی صورت می‌گیرد. بر همین اساس، در مطالعه حاضر از ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ که ناحیه بسیار کلیدی در شناساسی افراد می‌باشد و اصطلاحاً در بارکدینگ به کار گرفته می‌شود، استفاده شد. سنتز پرایمرها بر اساس اطلاعات موجود در منابع مختلف صورت پذیرفت. لازم به ذکر است توالی پرایمر این ژن در تمام آبزیان تقریباً یونیورسال می‌باشد. این پرایمرها شامل: VF2_t1، FishF2_t1، FishR2_t1، FR1d_t1، L5956, H6558 و MiniBarcode بود که از مطالعات قبلی گرفته شد (۲۰، ۲۱).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در آزمایش **DNA** بارکدینگ برای تشخیص تقلب در کنسروهای ماهی تن.

Code	Primer	Sequence
VT	VF2_t1	TGTAAAACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC
FFT	FishF2_t1	TGTAAAACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
FRT	FishR2_t1	CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA
FT	FR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA
LC	L5956-COI	ACAAAGACATTGGCACCCT
HC	H6558-COI	CCTCCTGCAGGGTCAAAGAA
MB	MiniBarcode	ATCACAAAGACATTGGCACCCT

استخراج DNA: پس از تهیه کنسروهای موجود در بازار، نمونه‌برداری لازم به منظور صحت‌سنجی اطلاعات موجود روی برچسب کنسرو، ثبت شده و نمونه‌ها برای استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور استخراج DNA، به میزان ۲۵ میلی‌گرم از نمونه گوشت کنسرو توسط ازت مایع و هاون چینی کاملاً پودر و در ادامه با استفاده از کیت DNA xPLuS ساخت شرکت سیناکلون و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید (۲۲).

ارزیابی کیفیت DNA: به این منظور از دستگاه الکتروفورز افقی استفاده شد. برای ارزیابی کیفی DNA استخراج شده از ژل آگاروز ۱ درصد استفاده گردید. برای این منظور بر اساس سینی ژل، آگارز تهیه شد؛ از آن‌جایی که اغلب سینی‌های الکتروفورز ٤٠ میلی‌لیتر می‌باشند، میزان ۰/٤ گرم آگارز با ٤٠ میلی‌لیتر بافر TAE[1] مخلوط و با کمک مایکروویو، ژل آماده و پس از کاهش دما ژل در سینی ریخته شد. برای ارزیابی DNA استخراج شده، نمونه آماده شده از DNA به چاهک‌های موجود روی ژل منتقل شده و براساس بار الکتریکی DNA، از سمت منفی به‌سمت مثبت حرکت آن مورد بررسی قرار گرفته شد. جهت رویت DNA بر روی ژل از رنگ DNA Safe Stain استفاده گردید (۲۳، ٢٤).

ارزیابی کمیت DNA: به این منظور از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. مقدار جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲٦۰-۲۸۰ نانومتر و نسبت A۲۸۰/۲٦۰ به وسیله دستگاه اندازه‌گیری و ثبت گردید. اگر نسبت رقت A1/A2 = ۱/۸ باشد، DNA استخراجی دارای کیفیت مناسب است و اگر این نسبت بزرگ‌تر از ۱/۸ باشد، DNA دارای ناخالصی RNA بوده و اگر کم‌تر از این مقدار باشد نشانه ناخالصی فنول و پروتئین است. پروتئین معمولاً در ۲۸۰ نانومتر و پلی‌ساکاریدها در۲۳۰ نانومتر جذب زیادی دارند. بنابراین، میزان آلودگی محصول به پروتئین و هیدرات‌های کربن از طریق میانگین این جذب‌ها تشخیص داده شد (۲۵).

فرآیند PCR: پس از اطمینان از کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با کمک پرایمرهای سنتز شده نمونه‌ها PCR شدند. به منظور انجام عملیات PCR از کیت مستر میکس PCR استفاده شد. آماده‌سازی نمونه‌ها برای انجام PCR بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده به ترتیب زیر صورت گرفت. پرمیکس پرایم تک، DNA الگو، مخلوط پرایمر Forward و Reverse با استفاده از آب دیونیزه استریل به حجم نهایی رسید. مخلوط به مدت ۱۰ ثانیه میکس شده، سپس میکروتیوب حاوی مواد در دستگاه PCR قرار

1- Tris-Acetate-EDTA

گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر اساس پروتکل عمومی به شرح زیر اجرا گردید: ۵ دقیقه فاز Denaturation اولیه و سپس ۳۵ چرخه تکراری از ٦۰ ثانیه Denaturation در دمای ۹٤°C، ٤۰ ثانیه Annealing در ٥٤°C تا ٦٤°C به صورت شیب دمایی (این دما بستگی به دمای ذوب پرایمر دارد) و ۳۰ ثانیه Extension در دمای ۷۲°C، سپس یک دوره پایانی Extension در دمای ۷۲°C انجام شد. در پایان محصول PCR روی ژل آگارز که با رنگ DNA safe stain رنگ‌آمیزی و الکتروفورز شده و تصاویر بررسی شدند. در نهایت دما و غلظت مناسب برای اتصال پرایمرها به DNA و عدم تشکیل پرایمر دایمر، برای هر پرایمر تعیین گردید. پس از انجام PCR و اطمینان از حصول باندهای مورد نظر نمونه‌ها جهت ارزیابی و صحت برای توالی‌یابی بر اساس پروتکل شرکت توالی‌یابی‌کننده آماده‌سازی شد.

تجزیه و تحلیل اطلاعات: روش نمونه‌برداری براساس نمونه‌برداری تصادفی بود. تجزیه و تحلیل اطلاعات براساس تعیین درصد عدم تطابق برچسب‌گذاری صورت گرفت. پس از توالی‌یابی نمونه با کمک برنامه‌های هم‌چون Bioedit و MEGA توالی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. هم‌چنین، جهت صحت نتیجه توالی ابتدا توالی‌های در بانک ژن با کمک ابزار BLAST ارزیابی و در نهایت بر اساس BOLD داده‌ها مقایسه شده و گونه ماهی مورد استفاده در نمونه کنسرو مشخص شد (۲۳).

نتایج و بحث

برای انجام تکثیر قطعات DNA و انجام آزمایش‌های مربوط به PCR از پرایمرهای موجود در مطالعات قبلی استفاده شد و آن‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که زمانی که اندازه قطعات DNA به حجم bp ۷۰۰ بود، تکثیر قطعات به درستی صورت نمی‌گرفت، از این‌رو، DNA به قطعات کوچک‌تر با طول bp ۲٦۰-۲۸۰ برش داده شدند. در این مرحله، با استفاده از پرایمرهای مذکور و شرایط بیان شده در جدول ۲ تکثیر موفقی صورت گرفت و نتایج به دست آمده برای توالی‌یابی مستقیم ارسال شدند. مشخص گردید که از بین پرایمرهای مورد استفاده پرایمر کد MB به عنوان پرایمر اختصاصی عمل کرده و تمام تکثیرها بر اساس این پرایمر صورت گرفت (جدول ۲). بررسی‌ها نشان داد که قطعات DNA تکثیر شده برای بررسی، قطعات مناسبی بودند که هیچ گونه شکستگی و یا بی‌نظمی در آن‌ها مشاهده نشد و قطعات به‌دست آمده از این تکثیر از کیفیت خوبی برخوردار بودند. پس از بررسی و تأیید DNA های موجود، نمونه‌ها برای توالی‌یابی مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۲- پرایمر مورد استفاده در آزمایش DNA بارکدینگ برای تشخیص تقلب در کنسروهای ماهی تن.

Code	Primer	Sequence	Reference
MB	MiniBarcode	F:ATCACAAAGACATTGGCACCCT R: AATGAAGGGGGGAGGAGTCAGAA	Inoue et al. 2001

برای انجام توالی‌یابی، ابتدا بررسی‌هایی که انجام شد مشخص گردید زمانی که طول قطعات از حداقل ۲٦۱ تا حداکثر ۲۷۱bp متغیر بود، نمونه‌ها قابل توالی‌یابی بودند. نتایج حاصل نشان داد که از ۱۰۰ نمونه کنسرو تنها ۲۰ نمونه با آن‌چه که روی آن برچسب‌گذاری شده بود، تفاوت داشت و این اختلاف در ۸۵ درصد موارد به کنسروهای پرشده با گوشت خرد شده مشاهده گردید. و تنها ۱۵ درصد (در سه

مورد در کنسروهای تهیه شده از گوشت یک تکه مشاهده شد. بر اساس نتایج حاصل از توالی‌یابی، از ۱۰۰ کنسرو مورد بررسی، ۸۰ نمونه دارای ۹۷ درصد شباهت ژنتیکی به تن ماهیان بودند. با این وجود در ۱۸ نمونه ۹۰ درصد شباهت ژنتیکی به شورت ماهیان با نام علمی *Sillago sihama* مشاهده گردید. این ماهی در مناطق کم‌عمق خلیج‌ها و دریاها زندگی می‌کند، اگرچه ارزش غذایی قابل‌توجهی دارد، اما چون محتویات درون قوطی کنسرو با برچسب روی آن تفاوت داشت، این مورد نیز به عنوان تقلب در نظر گرفته شد. هم‌چنین، ۱ نمونه دارای ۸۳ درصد شباهت به ماهی *Pristolepis rubripinnis* است. این ماهی در سال ۲۰۱۲ توسط Britz در آب‌های بخش جنوبی اقیانوس هند شناسایی شد و نام فارسی آن برگ ماهی است. این گروه نزدیک‌ترین خانواده به آنابانتیده (ماهیان گورامی) است و این گروه را گاهی به عنوان زیرگروه خانواده آنابانتیده می‌شناسند. هم‌چنین، ۱ نمونه از ۲۰ مورد تقلب دارای شباهت ۷۵ درصد به راس مرمری بود. این گونه با نام علمی *Halichoeres hortulanus* متعلق به آب‌های اقیانوس هند است که گاهی به صورت اتفاقی به دریای عمان و خلیج‌فارس وارد می‌شود. به طور کلی، در این راستی آزمایی، برچسب روی قوطی کنسروها به میزان ۸۰ درصد درست بود و میزان ۲۰ درصد خلاف آن‌چه که ذکر شده بود، مشاهده شد. هم‌چنین، بر اساس شکل ۲ مشاهده شد که بیش‌ترین درصد عدم تطابق مربوط به شورت ماهیان می‌شد. این ماهیان چون در مناطق کم‌عمق زندگی می‌کنند، صید آن‌ها همراه با ماهیان تن طبیعی است.

جدول ۳- عدم تطابق گونه‌های شناسایی شده در نمونه‌های کنسرو با نوع گوشت خردشده تن ماهی.

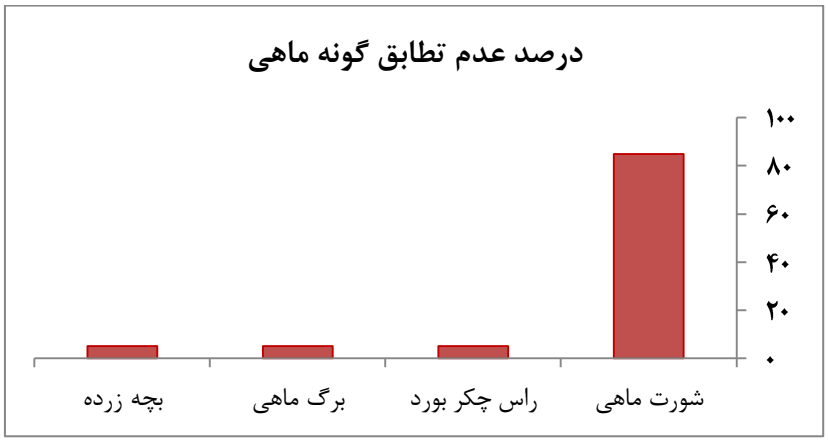
کد دسترسی بانک ژن	گونه تشخیص داده شده	میزان شباهت (درصد)	طول قطعه	مشخصات نمونه	نوع گوشت	کد نمونه
JF434990.1	*Halichoeres hortulanus*	٪۷۵	۲٦٦	ماهی تن	خردشده	89-141686-1-R
JF494530.1	*Sillago sihama*	٪۹٤/۷۸	۲٦۹	ماهی تن	خردشده	90-141687-2-R
MN512097.1	*Sillago sihama*	٪۹۵/۳۲	۲٦٦	ماهی تن	خردشده	91-141688-3-R
92-141689-4-R	*Sillago sihama*	٪۹٦/۹٤	۲٦۸	ماهی تن	خردشده	92-141689-4-R
JF494530.1	*Sillago sihama*	٪۹۷/۹۵	۲٦٦	ماهی تن	خردشده	42-144989-5-R
JF494530.1	*Sillago sihama*	٪۹۹/۱۸	۲٦۳	ماهی تن	خردشده	29-143150-16-R
JF494530.1	*Sillago sihama*	٪۹۸/۳۵	۲٦۲	ماهی تن	خردشده	30-143151-17-R
JF494530.1	*Sillago sihama*	٪۹۹/۱۸	۲٦۳	ماهی تن	خردشده	20-143155-18-R
MG923398.1	*Pristolepis rubripinnis*	٪۸۳/۱۳	۲٦۱	ماهی تن	خردشده	21-1413156-19-R
JF494530.1	*Sillago sihama*	٪۹۷	۲٦۷	ماهی تن	خردشده	22-143157-20-R
JF494530.1	*Sillago sihama*	٪۹۹/۵۷	۲٦۳	ماهی تن	خردشده	24-143159-22-R
JF494530.1	*Sillago sihama*	٪۹۹/۵۷	۲٦۷	ماهی تن	خردشده	93-141690-5-R
EF609617.1	*Sillago sihama*	٪۹۸/۷۲	۲٦۷	ماهی تن	خردشده	32-143066-6-R
EF609617.1	*Sillago sihama*	٪۹٦/۱۷	۲٦٦	ماهی تن	خردشده	31-143070-8-R
EF609617.1	*Sillago sihama*	٪۹٦/۱۷	۲٦٦	ماهی تن	خردشده	26-143147-13-R
EF609617.1	*Sillago sihama*	٪۹۵	۲٦۵	ماهی تن	خردشده	28-143149-15-R

توجه: در این جدول مشاهده می‌گردد که از ۱٦ مورد عدم تطابق صورت گرفته در برچسب کنسرو ماهی تن، ۱٤ مورد به خانواده شورت ماهیان، ۱ مورد به خانواده برگ ماهی و ۱ مورد متعلق به گونه راس مرمری بود. این موارد نشان می‌دهد که عدم تطابق صورت گرفته می تواند مورد انتظارباشد چرا که میزان ماهی شورت که به طور عمده در مناطق صید ماهی تن فراوان است، بیش‌تر از سایر گونه‌هاست

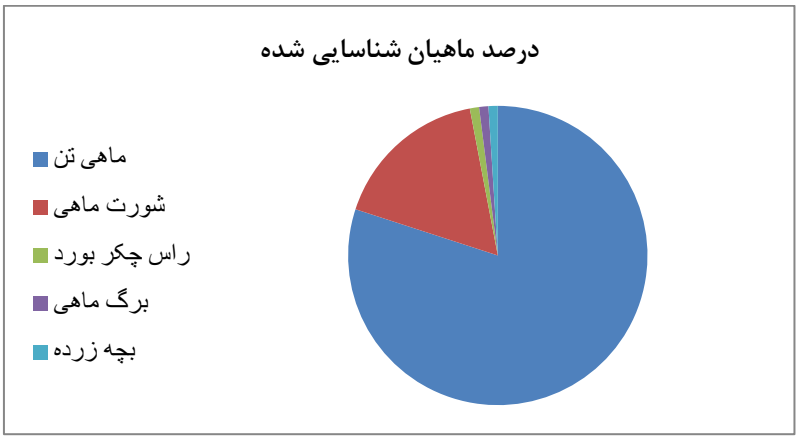
جدول ٤- گونه‌های ماهی در تقلب شده شناسایی شده در نمونه‌های کنسرو با نوع گوشت یک تکه تن ماهی.

کد دسترسی بانک ژن	گونه تشخیص داده شده	میزان شباهت (درصد)	طول قطعه	مشخصات نمونه	نوع گوشت	کد نمونه
JF494530.1	*Sillago sihama*	٪۹۹/۹۵	۲۷۱	ماهی تن	یک تکه	43-144990-20-R
EF504530.1	*Sillago sihama*	٪۹۹/۵۷	۲۶۳	ماهی تن	یک تکه	23-143158-21-R
JF494530.1	*Sillago sihama*	٪۹۹/۵۷	۲۶۳	ماهی تن	یک تکه	25-143160-23-R
JF494530.1	*Auxis thazard*	٪۹۹/۶	۲۶۳	ماهی تن	یک تکه	27-143160-23-R

توجه: در این جدول مشاهده می‌گردد که از ٤ مورد تقلب صورت گرفته در کنسرو ماهی تن تهیه شده از گوشت یک تکه ۳ مورد به خانواده شورت ماهی تعلق دارند



شکل ۱- میزان تنوع ماهیان استفاده شده در کنسروهای ماهی تن با عدم تطابق گونه.



شکل ۲- درصد گونه‌های شناسایی شده در نمونه‌های برندهای مختلف کنسرو تن ماهی‌های ایران.

اصالت و قابلیت ردیابی محصولات غذایی در همه سطوح فرآیند تولید از مواد اولیه گرفته تا محصولات نهایی از اهمیت اساسی برخوردار است. احراز هویت هم‌چنین یک جنبه اصلی برای برچسب‌گذاری دقیق مواد غذایی است که برای کمک به مصرف‌کنندگان در انتخاب انواع مناسب محصولات غذایی مورد نیاز است. طی سال‌های گذشته، روش‌های مختلف برای تشخیص کیفیت مواد غذایی عمدتاً براساس تجزیه و تحلیل‌های هدفمند یا بدون هدف ابداع شده است. از زمان‌های بسیار قدیم

تاکنون، مواد غذایی توسط انسان دستکاری و تغییر می‌شود تا خواص کیفی آن‌ها بهبود یابد. تعداد فرآورده‌های غذایی پس از اصلاح برای بهبود خواص ارگانولپتیک و طولانی شدن ماندگاری در بازار، در دو قرن اخیر به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته است. متأسفانه دستکاری مواد غذایی برای اهداف غیرقانونی (به عنوان مثال استفاده از مواد اولیه ارزان‌تر در تولید فرآورده‌هایی که به عنوان محصولات غذایی تولید شده با موارد اولیه گران‌تر معرفی می‌شوند) نیز به روشی گسترده تبدیل شده است (۲۶). تقلب در مواد غذایی هنگامی اتفاق می‌افتد که ماده‌ای به طور جزئی یا کامل با سایر اجزای غذایی غیرمجاز جایگزین شود و وجود آن در برچسب مواد غذایی مشخص نباشد. تقلب در مواد غذایی نه تنها برای مصرف‌کنندگان، بلکه برای تولیدکنندگان و توزیع‌کنندگان در سطح جهانی به یک نگرانی تبدیل شده است (۲۷، ۲۸).

این نگرانی‌ها موجب تدوین قانون برای ایجاد روش‌های قابل اعتماد برای ارزیابی کیفیت و الزامات ایمنی کل زنجیره تأمین مواد غذایی گردید (۲۹). قوانین برچسب‌گذاری مواد غذایی اتحادیه اروپا از اساسنامه‌های مختلف تهیه شده و برای اطمینان از اصل عملکرد صحیح بازار داخلی، اطلاع‌رسانی و محافظت از مصرف‌کننده و حمایت از بازارهای کشاورزی و اطمینان از ثبات بازار اتحادیه اروپا طراحی شده است (۳۰، ۳۱).

تاکنون، شناسایی گونه‌های موجود در غذا از طریق روش بارکدگذاری DNA در چندین پژوهش در مورد محصولات دریایی از برندهای مختلف به بازار و نمونه‌های خریداری شده در بازارهای ماهی با موفقیت انجام شده است (۳۲، ۳۳، ۳٤، ۳۵، ۳٦).

از میان ۹ نشانگر اصلی DNA که مشخص شده است به نظر می‌رسد که بیش‌ترین مطالعات روی ژن‌های میتوکندری به ویژه ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ و b متمرکز شده است. از آن‌جا که چندین نسخه از DNA میتوکندری در داخل سلول وجود دارد، به احتمال زیاد قطعه داخل این ژنوم را بیش‌تر از ژنوم هسته‌ای تقویت می‌کند. DNA میتوکندری به طور کلی بسیار سریع‌تر از DNA هسته‌ای تکامل می‌یابد؛ بنابراین، امکان جدا شدن و شناسایی حتی گونه‌های نزدیک به یکدیگر را فراهم می‌کند. DNA میتوکندری از مادر به ارث می‌رسد، هاپلوئید می‌باشد و تحت ترکیب مجددی قرار نمی‌گیرد بنابراین مطالعه آن را آسان‌تر و ساده‌تر می‌کند. به همین دلایل، بیش‌تر مطالعات به جای DNA هسته‌ای بر روی ژنوم DNA میتوکندری (mtDNA) متمرکز شده‌اند (۳۷، ۳۸).

در پژوهش حاضر مشخص گردید که از بین ۱۰۰ نمونه ۲۰ نمونه با آن‌چه که روی قوطی کنسرو نوشته شده بود، مطابقت نداشت. یعنی، ۱۷ نمونه شباهت ژنتیکی به شورت ماهیان داشتند، هم‌چنین، ۳ نمونه دارای دارای بیش‌ترین قرابت ژنتیکی به گونه‌های راس چکربورد، برگ ماهی و بچه زرده بود. به این معنا که در این راستی‌آزمایی، برچسب روی قوطی کنسروها به میزان ۸۰ درصد درست بود و میزان ۲۰ درصد خلاف آن‌چه که ذکر شده بود، مشاهده شد. در تطابق با نتایج این پژوهش، میرخانی و همکاران (۱۳۹۲) به بررسی وجود ماهی تن هوور معمولی در ٤۸ نمونه کنسرو موجود در بازار تهران با استفاده از روش DNA بارکدینگ پرداختند. نتایج آن‌ها بیانگر وجود گونه *Auxis thazard* و *Coryphaena hipprus* و *Platypterus Istiphorus* بود و نمونه اصلی که باید در کنسروها باشد، ۲۳ درصد بوده است (۳۹). البته در پژوهش حاضر، بیش‌ترین میزان تقلب در کنسروهای تهیه شده از گوشت خرد شده مشاهده شد. زیرا، در این روش پر کردن قوطی‌های کنسرو که یا به صورت اتوماتیک یا به صورت دستی توسط نیروی انسانی انجام می‌گیرد، ممکن است گوشت‌های به جا مانده از

سایر گونه‌ها که قابلیت تولید کنسرو را دارند، نیز با تکه‌های گوشت ماهی تن مخلوط شود و چون قابلیت تشخیص گوشت پس از پخت به دلیل تغییر ظاهر آن کاهش می‌یابد (۱۰)، که پیشنهاد می‌گردد که برای بررسی محصولات کارخانه‌های تولید کنسرو بررسی‌های صحت‌سنجی بیش‌تر بر بر کنسروهای حاوی خرده گوشت متمرکز گردد.

در پژوهش حاضر، اگرچه، قطعات DNA ممکن بود به خاطر درجه حرارت بالای ناشی از اتوکلاو کنسروها شکسته شده باشد، ولی DNA میتوکندریایی (سیتوکروم اکسیداز ۱) بسیار پایدارتر از DNA سلولی بوده و در پژوهش حاضر استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ که یک قطعه DNA میتوکندریایی نتایج مناسبی را نشان داد. یک نشانگر DNA برای شناسایی در سطح گونه‌ها باید به اندازه کافی بین گونه‌ها (به ویژه نزدیک‌ترین گونه‌ها) متغیر باشد و تغییرات کم درون‌گونه‌ای را نشان دهد. این نشانگر باید برای تعداد زیادی از گونه‌ها به طور گسترده مورد بررسی قرار گیرد تا مقایسه توالی نوکلئوتیدی را از یک نمونه ناشناخته با توالی‌های مرجع در یک پایگاه داده امکان‌پذیر سازد. ژن رمزگذار سیتوکروم اکثر این معیارها را برآورده می‌کند و تا حد زیادی بیش‌ترین ژن مورد مطالعه است (۴۰). به دلیل ویژگی‌های مناسب DNA میتوکندری، این ژنوم کاربرد گسترده‌ای در مطالعات شناسایی فیلوژنتیک و گونه‌ها دارد (۴۱). پژوهش‌های مولکولی بر اساس بارکد DNA یکی از قدرتمندترین ابزارها برای ارزیابی هویت گونه‌ها، ایمنی مواد غذایی، حفاظت از جانوران حیات وحش و شیلات می‌باشد (۴۲). در این بررسی نیز، از میان پرایمرهای مورد استفاده یکی از پرایمرها به صورت اختصاصی عمل کرد. این پرایمر با ایجاد تنها یک قله در منحنی ذوب توانست برای گونه‌های مورد بررسی به صورت اختصاصی عمل کند، در تطابق با نتایج حاصل از پژوهش حاضر، کلنگی و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی تشخیص تقلب در انواع ماهیان خاویاری پرداختند. برای این منظور، DNA استخراج شده از نمونه‌ها با استفاده از سه عدد پرایمر (R1، F1a و F2a)، طراحی شده بر اساس ژن سیتوکروم b، طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شدند. نتایج نشان داد که R1، F1a و F2a گونه‌های ماهیان خاویاری معرفی شدند. هم‌چنین در آن پژوهش پرایمرهای R1 و F2a به‌عنوان یک پرایمر اختصاصی برای گونه ازون‌برون معرفی شدند (۴۳). در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که استفاده از روش DNA بارکدینگ برای تشخیص گونه در کنسروهای تهیه شده در آب و نمک نیز مؤثر است. تفاوتی که کنسرو تهیه شده با آب و نمک نسبت به کنسرو تهیه شده در روغن دارد در این است که شرایط یونی و الکترولیتی متفاوت و شدیدتری دارد. مولکول DNA از دو زنجیره پلی‌نوکلئوتید درست شده است که به صورت مارپیچ آرایش گرفته‌اند. هر نوکلئوتیدی در مولکول DNA از سه بخش اصلی گروه فسفات، قند پنج کربنی و یک جزء آلی نیتروژن‌دار تشکیل شده است. هنگامی که مولکول DNA در معرض حرارت و pH شدید و یا موادی مانند اوره و آمین قرار می‌گیرد، ساختار مارپیچ دوگانه آن دچار تغییراتی می‌شود و به یک ساختار تک رشته تبدیل می‌گردد. هنگامی که تغییر ساختار مولکول DNA اتفاق می‌افتد، برهمکنش‌ها بین دو پایه پیوندی قطع می‌شود و تغییرات مهمی در خواص فیزیکی آن رخ می‌دهد. اما ازجمله مزایای ژنوم میتوکندریایی می‌توان به وراثت مادری، تعداد کپی‌های بالا از هر سلول، سرعت بالای جهش و نوترکیبی اندک و مقاومت حرارتی بالا اشاره نمود. تعداد کپی‌های فراوان DNA میتوکندریایی تضمین‌کننده

کمیت زیاد و کافی محصول PCR حتی در زمان وجود مقدار کمی از نمونه‌های گوشت خام یا پخته شده می‌باشد، چراکه تعداد کپی‌های باالی DNA میتوکندریایی، کوچک، دورشته‌ای و حلقوی بودنشان در سلول، شانس بقای آن‌ها تحت شرایط مختلف حرارتی را افزایش می‌دهد (۳۱). هم‌چنین، Ghouri و همکاران (۲۰۲۰) از ژن سیتوکروم b میتوکندری برای بارکدگذاری DNA و احراز هویت دقیق‌تر ۱۱ گونه آب شیرین و ٦ گونه ماهی دریایی استفاده کردند. سیتوکروم b با استفاده از PCR تکثیر و طول متوسط خوانش آن ۱۱٤۱ جفت باز بود. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک نشان داد که بسیاری از گونه‌های ماهیان آب شیرین به دلیل اینکه در یک خانواده بودند در یک رده و جایگاه بودند. در حالی که، گونه‌های ماهی دریایی در فاصله‌های دور از هم جمع می‌شدند. براساس این روش، همه گونه‌های ماهی را می‌توان براساس مشخصات منحصربه‌فرد SNP[1] (پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی) شناسایی نمود (٤٤).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ۸۰ درصد از نمونه‌های کنسرو تون ماهیان ایران که مورد آزمایش قرار گرفته بود، مطابقت داشته و کماکان ۲۰ درصد کنسروهای تولیدی فاقد رعایت صحت مندرجات در برچسب محصول می‌باشند که لازم است بازرسی‌ها و نظارت‌ها بر این صنعت با روش‌های نوین بهبود یابد. هم‌چنین استفاده از روش DNA barcoding برای تشخیص گونه ماهی مورد استفاده در تولید کنسرو ماهی با وجود اعمال شرایط حرارتی و فشار بالا طی فرآیند تولید کنسرو، قابل‌استفاده و معتبر می‌باشد.

منابع

1. Smith, M., & Hiemstra, C. (eds.). (1986). Smith's Sea Fishes. Grahamstown, South Africa: JLB Smith Institute of lchthyology.
2. Lane, I. W., & Comac, I. (1996). Sharks Still Don't Get Cancer. New York: Avery.
3. FAO. (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture-Meeting the sustainable development goals. Rome. FAOSTAT Internet information at www.fao.org.
4. Hosseini, M., Dabagh Moghadam, A., & Adeli, A. (2019). Evaluation of barriers to consumption and purchase of fish among different consumer groups (Case: AJA personnel). *Utilization and Cultivation of aquatics*. 9 (3), 55-71. [In Persian]
5. Ganjavi, M., Ezzatpanah, H., Givianrad, M. H., & Shams, A. (2010). Effect of canned tuna fish processing steps on lead and cadmium contents of Iranian tuna fish. *Food chemistry*, 118 (3), 525-528.
6. Ghouri, M., Ismail, M., Javed, M., Khan, S.H., Munawar, N., Umar, A. B., Nisa, M., Aftab, S. O., Amin, S., Khan, Z., & Ahmad, A. (2020). Identification of Edible Fish Species of Pakistan through DNA Barcoding. Frontiers Marine Science. November, 7, 554183.
7. 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.
8. Iranian Fisheries Statistical Yearbook, (2018). 33p.
9. Pecoraro, C., Crobe, V., Ferrari, A., Piattoni, F., Sandionigi, A., Andrews, A.J., Cariani, A., & Tinti, F. (2020). Canning processes reduce the DNA-based traceability of commercial tropical tunas. *Foods*, 9 (10), 1372.

1- Single nucleotide polymorphism

10. Razavai Shirazi, H. (2018). Technology of marine products: principles of preservation and processing. Naghsh Mehr, 390p.
11. Cawthorn, D. M., Steinman, H. A., & Witthuhn, R. C. (2012). DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. *Food Research International*, 46 (10), 30-40.
12. Peivasteh-Roudsari, L., Rahmani, A., Shariatifar, N., Tajdar-Oranj, B., Mazaheri, M., Sadighara, P., & Khaneghah, A. M. (2020). Occurrence of histamine in canned fish samples (Tuna, Sardine, Kilka and Mackerel) from markets in Tehran. *Journal of food protection*, 83 (1), 136-141.
13. Zhang, J. B., & Hanner, R. (2011). DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39 (1), 31-42.
14. Dawnay, N., Ogden, R., McEwing, R., Carvalho, G. R., & Thorpe, R. S. (2007). Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic science international*, 173 (1), 1-6.
15. Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., ... & Labra, M. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food research international*, 50 (1), 55-63.
16. Beamish, R. J., & Rothschild, B. J. (eds.). (2009). The Future of Fisheries Science in North America. Berlin: Springer Science & Business Media.
17. Fernandes, T. J., Costa, J., Oliveira, M. B., & Mafra, I. (2017). DNA barcoding coupled to HRM analysis as a new and simple tool for the authentication of Gadidae fish species. *Food Chem.* 230, 49-57. **doi: 10.1016/ j.foodchem. 2017.03.015.**
18. Nicolè, S., Barcaccia, G., Erickson, D. L., Kress, J. W., & Lucchin, M. (2013). The coding region of the UFGT gene is a source of diagnostic SNP markers that allow single-locus DNA genotyping for the assessment of cultivar identity and ancestry in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *BMC research notes*, 6 (1), 1-13.
19. Maleki, A., Ghorbani, M., Hamid, M., Sadeghi Mahonek, A. R., & Khameri, M. (2017). Detecting the presence of pig derivatives in meat samples and suspicious highly processed foods using real-time polymerase chain reaction method. *Food Science and Technology*, 75 (15), 13-22. [In Persian]
20. Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society B: *Biological Sciences*, 360 (1462), 1847-1857.
21. Inoue, J. G., Miya, M., Tsukamoto, K., & Nishida, M. (2001). Complete mitochondrial DNA sequence of Conger myriaster (Teleostei: Anguilliformes): novel gene order for vertebrate mitochondrial genomes and the phylogenetic implications for anguilliform families. *Journal of Molecular Evolution*, 52 (4), 311-320.
22. Aryainejad, Sh., Kavousi, K., Fatuhi, L., & Mousavi Movahedi, A. A. (2017). Detection of adulteration in meat products based on DNA sequence. *Science Cultivation*, 8 (2), 143-147. [In Persian]
23. Miandare, H. K., Farahmand, H., Akbarzadeh, A., Ramezanpour, S., Kaiya, H., Miyazato, M., ... & Nikinmaa, M. (2013). Developmental transcription of genes putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate. *General and Comparative Endocrinology*, 182, 41-47.
24. Kitpipit, T., Sittichan, K., & Thanakiatkrai, P. (2014). Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. *Food Chemistry*, 163, 77-82.
25. Parkhemi-Nejad, F., Hosseini, S.A., Tawafi, F., Tajabadi Ebrahimi, M., & Sharifan, A. (2013). Identification of adulterations in coldcuts and sausages made from beef based on the identification of mitochondrial genes of animal species in Tehran province. *Food Hygiene*, 4 (1), 81-97. [In Persian]

26.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. Article ID 1581746, 13p.
27.López-López, P., García-Ripollés, C., & Urios, V. (2014). Food predictability determines space use of endangered vultures: implications for management of supplementary feeding. *Ecological Applications*, 24 (5), 938-949.
28.Spink, J., & Moyer, D. C. (2011). Defining the public health threat of food fraud. *Journal of food science*, 76 (9), 157-163.
29.Wulff, T., Nielsen, M. E., Deelder, A. M., Jessen, F., & Palmblad, M. (2013). Authentication of fish products by large-scale comparison of tandem mass spectra. *Journal of proteome research*, 12 (11), 5253-5259.
30.Gao, Z., Liu, Y., Wang, X., Wei, X., & Han, J. (2019). DNA mini-barcoding: a derived barcoding method for herbal molecular identification. *Frontiers in plant science*, 10, 987.
31.FAO (Rome) FishStats database, (2004).
32.Barcaccia, G., Lucchin, M., & Cassandro, M. (2015). DNA barcoding as a molecular tool to track down mislabeling and food piracy. *Diversity*, 8 (1), 2.
33.Moosavi-Movahedi, A. A., Ariaeenejad, S., Kavousi, K., & Fotuhi, L. (2018). DNA primer method for detecting fraud in meat products. *Science Cultivation*, 8 (2), 143-147.
34.Pardo, M. Á., & Jiménez, E. (2020). DNA barcoding revealing seafood mislabeling in food services from Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*, 91, 103521.
35.Baez Rodriguez, N. M. (2022). Using DNA barcoding to identify seafood fraud in Puerto Rico. [Doctoral dissertation]
36.Fernandes, T. J., Amaral, J. S., & Mafra, I. (2021). DNA barcode markers applied to seafood authentication: An updated review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61 (22), 3904-3935.
37.Riley, J. S., & Tait, S. W. (2020). Mitochondrial DNA in inflammation and immunity. EMBO reports, 21, 4. p.e49799.
38.Pazhenkova, E. A., & Lukhtanov, V. A. (2019). Nuclear genes (but not mitochondrial DNA barcodes) reveal real species: Evidence from the Brenthis fritillary butterflies (Lepidoptera, Nymphalidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 57 (2), 298-313.
39.Mirkhani, Sh., Chengizi, R., & Shujaei, L. (2012). Investigation and verification of some samples of canned Hoover tuna (unnus tonggol) available in the Iranian market using the method. DNA Barcoding. The second national conference on food security, Sawad Kouh. **https://civilica.com/doc/303484.**
40.Casper, R. M., Jarman, S. N., Deagle, B. E., Gales, N. J., & Hindell, M. A. (2007). Detecting prey from DNA in predator scats: a comparison with morphological analysis, using Arctocephalus seals fed a known diet. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 347 (1-2). 144-154.
41.Bravi, C. M., Lirón, J. P., Mirol, P. M., Ripoli, M. V., Peral-García, P., & Giovambattista, G. (2004). A simple method for domestic animal identification in Argentina using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene. *Legal Medicine*, 6 (4), 246-251.
42.Wan, Q. H., & Fang, S. G. (2003). Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species. *Forensic science international*, 131 (1), 75-78.
43.Kalengi, M. H., Farahmand, H., Aghilinejad, S. M., & Akbarzadeh, A. (2012). Introduction of cytochrome b gene as a suitable gene to identify the identity of caviar and sturgeon fish of the Caspian Sea. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 1 (2), 51-62.
44.Ghouri, M. Z., Ismail, M., Javed, M. A., Khan, S. H., Munawar, N., Umar, A. B., Aftab, S. O., Amin, S., Khan, Z., & Ahmad, A. (2020). Identification of edible fish species of Pakistan through DNA barcoding. *Frontiers in Marine Science*, 7, 554183.