استفاده از نشانگر مولکولی در تایید اصالت ماهی و تشخیص تقلب

منا ایوز[۱]، مهدی ذوالفقاری*[۲]، مجتبی نصراصفهانی[۳]، حامدپاک‌نژاد[۴]

۱- گروه علوم صنایع غذایی و فناوری، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران

۲- گروه عمل آوری فرآورده‌های شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،گرگان، ایران

۳- گروه شیمی، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران

۴- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،گرگان، ایران

نویسنده مسئول: zolfaghari.mz@gmail.com

چکیده:

برای بررسی تطابق نوع ماهی درج شده بر روی برچسب فراورده های دریایی با محتویات آنها روشهای مختلفی وجوددارد. هدف این تحقیق بررسی اصالت نوع ماهی مصرفی در مقایسه با برچسب درج شده بر روی کنسرو ماهی تن و توسعه روش DNA barcoding برای این منظور می باشد. در این مطالعه از کنسروماهی تن پرشده با گوشت یک تکه و تهیه شده در آب نمک و روغن و کنسروماهی تن پرشده با گوشت خرد شده و تهیه شده در آب نمک و روغن استفاده شد. برای این کار، پس از جمع‌آوری برندهای مختلف کنسرو ماهی تن از نقاط مختلف کشور استخراج DNA انجام و کیفیت و کمیت آن بررسی شد و سپس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای ژن سیتوکروم اکسیداز۱،واکنش زنجیره ایی پلیمراز برای تکثیر ژن مورد نظر انجام گرفت. سپس میزان اختصاصیت پرایمرها بررسی گردید. در نهایت توالی یابی انجام شد. نتایج نشان داد که از میان پرایمرهای مورد استفاده تنها یک پرایمر با دستورالعمل طراحی شده توانست برای نمونه‌های مورد بررسی به طور اختصاصی عمل کند. نتایج حاصل از توالی‌یابی نشان داد که تقلب در کنسرو ماهی تن خرد شده و فراوری شده در آب نمک در مقایسه با گوشت یک تکه و فراوری شده در روغن بیشتر بود و به طور کلی از ۱۰۰ نمونه کنسرو مورد بررسی،۲۰ مورد عدم تطابق برچسب گزارش شد. این روش به دلیل سرعت و دقت بالا و اختصاصی بودن، حتی برای کنسروهای تهیه شده در آب نمک و روغن 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.

کلمات کلیدی: تقلب، کنسرو ماهی تن،واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ، سیتوکروم اکسیداز۱

۱-مقدمه

مصرف کنسرو ماهی به خصوص کنسرو ماهی تن به علت استفاده راحت و آسان در کشور رو به افزایش است.(۸) به طوری که ظرفیت صنعت کنسروسازی ماهی ایران ۱۳۴ واحد بوده که حدود ۷۱۷ میلیون قوطی در سال ظرفیت دارند. که ظرفیت عملیاتی این صنعت ۵۶۴ میلیون قوطی در سال می‌باشد. توسعه این صنعت به نحوی است که از ۳۳ محصول فرآوری شده شیلاتی، ۱۲ محصول آن کنسروی بوده است.(۷)

تن ماهیان مورد استفاده در کنسرو در ایران به طور عمده شامل ماهیان ارزشمندی نظیر گیدر (تن زردباله)، ماهی هوور، هوور مسقطی ، ماهی زرده می‌باشد. طبق استانداردهای غذا و دارو تولیدکنندگان موظف به درج نوع ماهی مورد استفاده در تولید کنسرو هستند. با توجه به ارزش اقتصادی بالای ماهیان تن مذکور و علاقه‌مندی بیشتر مصرف کنندگان به خرید کنسرو این ماهیان، این کنسروها جایگاه بهتری در سبد خرید مصرف کنندگان دارند. همواره این احتمال وجود دارد در صنعت تولید کنسرو تن ماهیان نیز همچون بسیاری از صنایع غذایی دیگر تولید کنندگان به منظور دستیابی به سود بیشتر اقدام به جایگزینی گونه های کم ارزش به جای گونه هایی که قیمت بالایی داشته و مورد پسند مصرف کنندگان می باشد نموده و با نصب برچسب جعلی روی محصولات خود باعث می شوند مصرف کننده بدون هیچ اطلاعی هزینه بیشتر از محصول ارزش واقعی محصول خریداری شده پرداخت کند.(۵) به طور کلی تقلب از دیدگاه های اقتصادی، مذهبی و سلامتی حایز اهمیت است .(۱۴و۲۰) بنابراین ابتکارات لازم برای افزایش آگاهی عمومی و ایجاد ابزارهای موثر برای احراز هویت محصولات می‌تواند نوع گونه ماهی را شناسایی و از ایجاد تقلب جلوگیری کند. برای شناسایی اصالت گوشت حلال و تفکیک آن از گوشت حرام از واکنش زنجیره ای پلیمراز و سایر روشهای پروتئینی استفاده شده است که در این بین بیشتر مطالعات برپایه واکنش زنجیره ای پلیمراز و با بکارگیری تکنیکهای مختلف آن بوده است.(۱۰)

منجزی و همکاران طی پژوهشی، تعداد ۱۸ نمونه شامل ۵ برند وارداتی کنسرو ماهی و ۱ برند داخلی از ۶ فروشگاه در شمال شهر تهران بررسی نمودند. نتایج بیانگر وجود گونه‌های مختلف غیر از گونه‌ی برچسب شده روی کنسروهای مورد نظر بود.(۱۸)

میرخانی و همکاران (۱۳۹۲) به بررسی وجود ماهی تن هوور معمولی موجود در ۴۸ نمونه کنسرو موجود در بازار تهران با استفاده از واکنش زنجیره ایی پلیمراز پرداختند. نتایج حاصل حاکی از وجود گونه هایی غیر از نمونه اصلی در کنسروها بود.(۱)

هاشم زادگان و همکاران (۱۳۹۳) در تحقیقی به بررسی همبرگرهای شهر تهران در ارتباط با اثبات وجود پروتئین سویا بر خلاف برچسب تایید شده به همراه گوشت گاو در تمامی نمونه‌های همبرگر ممتاز پرداختند.(۲)

زانیاد و همکاران (۲۰۲۰) از روش بارکد گذاری در شناسایی انواع محصولات دریایی فیله نامشخص اقیانوس آرام، باله‌های سینه-ای برای استیک، فیله پلوک کوبیده، مخلوط ماهی کاد، ماهی ساردین کنسرو شده و سوش ماهی قزل آلا استفاده کردند.(۲۳)

اثر فناوری به کار رفته در تولید کنسرو ماهی تن بر توانایی استخراج DNA و تشخیص مولکولی PCR در مطالعه حیدرزاده (۲۰۱۵) نشان داده شده است. طبق این گزارش میزان راندمان استخراج DNA در کنسرو آب نمک به طور معنی داری کمتر از کنسرو در روغن ماهی تن بود که این امر نشان دهنده لزوم توسعه و بهینه سازی فناوری تشخیص مولکولی DNA گوشت برای کنسرو آب نمک علاوه بر کنسرو ماهی در روغن می باشد.(۹)

با توجه به تحقیقات انجام شده مشخص گردید تاکنون مطالعه‌ای در مورد بررسی قابلیت استفاده از روش تشخیص مولکولی فرآورده کنسرو ماهی تن تولید شده در آب نمک و روغن بر مبنای DNA صورت نگرفته است، همچنین وضعیت میزان تقلب در بازار کنسرو ماهی تن در ایران نامشخص است. از این رو، بررسی وضعیت بازار ایران از این حیث نیز ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین در این تحقیق از واکنش زنجیره ایی پلیمراز برای تشخیص دقیق گونه‌های رایج ماهی تن کنسروی فراوری شده در آب نمک و روغن استفاده شد و اختصاصیت پرایمرها بررسی شد و میزان عدم تطابق برچسب نمونه ها اعلام شد.

۲- مواد و روش ها

جمع آوری نمونه: بدین منظور از برندهای وجود در بازار کنسروهای ماهی تن جمع آوری شد. پس از برررسی مشخصات موجود روی قوطی‌های تن، این اطلاعات اعم از نوع گونه و روش فرآوری آن نظیر کنسرو در آب نمک یا کنسرو در روغن و نوع گوشت یک تکه یا خردشده ثبت گردید. از هر برند سه نمونه تهیه شد، و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد .

۲-۱-استخراج DNA:

به منظور استخراج DNA، به میزان ۲۵ میلی‌گرم از نمونه گوشت کنسرو توسط ازت مایع و هاون چینی کاملا پودر و در ادامه با استفاده از کیت DNA xPLuS ساخت شرکت سیناکلون و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید.(۳)

۲-۲- 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. میزان ۰/۴ گرم آگارز با ۴۰ میلی‌لیتر بافر TAE۱[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 بر اساس بار الکتریکی DNA، از سمت منفی به سمت مثبت حرکت آن مورد بررسی قرار گرفته شد. جهت رویت DNA بر روی ژل از رنگ DNA Safe Stain استفاده گردید (۱۷و۲۰).

۲-۳- ارزیابی کمیت DNA: به این منظور از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. مقدار جذب نوری نمونه‌ها در طول موج۲۶۰-۲۸۰ نانومتر و نسبت ۲۸۰/۲۶۰ به وسیله دستگاه اندازه‌گیری و ثبت گردید. اگر نسبت رقت ۱/۸ = A1/A2 باشد، DNAاستخراجی 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 معمولا 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 (۲۱).

۲-٤- انتخاب پرایمر:

[1] Tris-Acetate-EDTA

پرایمرهای بکار رفته در این پژوهش در جدول شمار۱ ارایه گردیده است.انتخاب و سنتز آغازگرها بر اساس اطلاعات موجود در منابع مختلف صورت پذیرفت. لازم به ذکر است توالی آغازگرهای این ژن در تمام آبزیان تقریبا یونیورسال می‌باشد.(۱۲و۲۶)

۲-۵- واکنش زنجیر ه ایی پلیمراز

فرآیند PCR: آماده‌سازی نمونه‌ها برای انجام PCR طبق جدول ۲ انجام گرفت. مخلوط به مدت ۱۰ ثانیه میکس شده، سپس میکروتیوب حاوی مواد در دستگاه PCR قرار گرفت. طبق برنامه داده شده به دستگاه جدول۳و۴ عملیات تکثیر انجام گرفت. (۱۲و۲۶)

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش زنجیره ایی پلیمراز برای تشخیص تقلب در کنسروهای ماهی تن

کد	پرایمر	توالی
VT	VF2_t1	TGTAAAACGACGGCCAGTCAACCAACCACA AAGACATTGGCAC
FFT	FishF2_t1	TGTAAAACGACGGCCAGTCGACTAATCATAA AGATATCGGCAC
FRT	FishR2_t1	CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGAC CGAAGAATCAGAA
FT	FR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCC GAARAAYCARAA
LC	L5956-COI	ACAAAGACATTGGCACCCT
HC	H6558-COI	CCTCCTGCAGGGTCAAAGAA
MB	MiniBarcode	ATCACAAAGACATTGGCACCCT

جدول۲:بهینه سازی مواد مورد نیاز برای انجام فرآیند PCR نمونه‌های مورد بررسی

مواد	ماکرولیتر
PCR Master Mix	۱۵
F Primer	۱
R Primer	۱
DNA	۱
H2O	۷

جدول۳:برنامه اول تکثیر ژن بکار برده شده در واکنش زنجیر ه ایی پلیمراز

دما(درجه سانتیگراد)	زمان	مراحل واکنش زنجیره ایی پلیمراز

۹۵	۵ دقیقه		دناتوراسیون اولیه
۹٤	۳۰ ثانیه	دناتوراسیون	تکثیر
۵۵	٤۰ ثانیه	اتصال	
۷۲	۱ دقیقه	طویل سازی	
	٤۰	تعداد سیکل	
۷۲	۱۰ دقیقه		طویل سازی نهایی

جدول ٤: برنامه دوم تکثیرژن در واکنش زنجیره ایی پلیمراز

دما(درجه سانتیگراد)	زمان		مراحل واکنش زنجیره ایی پلیمراز
۹۵	۵ دقیقه		دناتوراسیون اولیه
۹٤	۳۰ ثانیه	دناتوراسیون	تکثیر
۵۰	٤۵ ثانیه	اتصال	
۷۲	۱ دقیقه	طویل سازی	
	۳۵	تعداد سیکل	
۷۲	۱۰ دقیقه		طویل سازی نهایی

۲-۶- الکتروفورز

از دستگاه الکتروفورز افقی استفاده شد . محصولات واکنش زنجیر ه ایی پلیمراز روی ژل آگاروز که با رنگ DNA safe stain رنگ آمیزی شده است برده شدند. در چاهک اول ژل، محلول Lader را و در باقی چاهکها محصول PCR هر یک ازنمونه های

مورد بررسی به کمک بافر سنگین کننده،بارگذاری شدند. پس از پایان الکتروفورز، از ژل عکس گرفته شد. به منظور عکس برداری از ژل آگارز از دستگاه مستندسازی ژل، با نام ژل داک(مدل بیورد، ایکس آر) استفاده شد. پس از انجام PCR و اطمینان از حصول باندهای مورد نظر نمونه‌ها جهت ارزیابی و صحت برای توالی یابی بر اساس پروتکل شرکت توالی یابی کننده آماده سازی شد.(۲۳)

۲-۷- بررسی اختصاصییت واکنش زنجیر ه ایی پلیمراز

به منظور تایید اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده با توجه به نزدیک بودن توالیها و بررسی دقت تکنیک و شرایط آزمون، هریک از پرایمرها با DNA نمومه ها مورد آزمون قرار گرفت تا در صورت اتصال غیراختصاصی و ایجاد باندهای اضافی نامطلوب آن مورد مشخص و از بدست آمدن نتایج مثبت نادرست جلوگیری به عمل آید.

۲-۸- تجزیه و تحلیل اطلاعات: پس از توالی یابی نمونه با کمک برنامه‌های همچون Bioedit و MEGA توالی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. و گونه ماهی مورد استفاده در نمونه کنسرو مشخص شد. (۱۷)

۲-۹- بررسی آماری:

تحقیق حاضر از لحاظ هدف، از نوع کاربردی و از نظر نحوه گردآوری داده‌ها، از نوع میدانی بود. محدوده مکانی این تحقیق تا حد امکان شهرهای مختلف کشور در نظر گرفته شد. جامعه آماری کنسروهای برندهای مختلف موجود در فروشگاه‌ها و سوپرمارکت های شهرهای مختلف بودند. نمونه برداری به روش تصادفی ساده انجام شد.

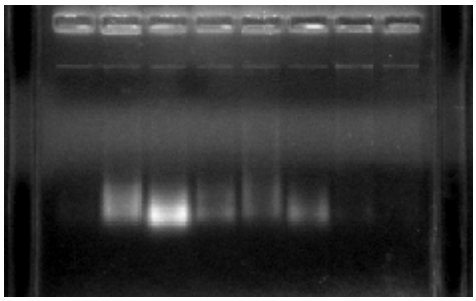
این تحقیق به لحاظ تجزیه و تحلیل داده‌ها به منظور بیان و یا توضیح میزان عدم تطابق محتوا با اطلاعات برچسب در هر قوطی کنسرو، تحقیق کیفی است. همچنین چون این تحقیق به توصیف ویژگی‌ها و مشخصات محتوای کنسرو می پردازد و به دنبال امکان یا عدم امکان تشخیص گوشت در هر فرآورده با روش DNA barconding بوده و همچنین حضور یا عدم حضور ماهی مورد انتظار در هر کنسرو را بررسی می کند، از نوع توصیفی می باشد. برای ترسیم نمودارها و محاسبه درصدها از نرم افزار Excell استفاده گردید.(۱۷)

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراجی از تن ماهی کنسرو شده

۳-۱-۱- استفاده از روش الکتروفورز افقی برای سنجش کیفیت

باندهای ایجاد شده در تصاویر، قوی، شفاف و روشن بود و این یعنی کیفیت DNAاستخراجی مناسب بوده وحاوی میزان کمی از آلودگیهای پروتئینی، فنولی و RNA بوده است. درمورد نمونه های دارای باند ضعیف یا دارای پخش شدگی زیاد، استخراج دوباره انجام شد (شکل ۱). به این طریق کیفیت DNA های استخراج شده به منظور استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمراز مورد تایید قرار گرفت.



شکل ۱:نتایج سنجش کیفیت DNA استخراجی

۳-۱-۲- استفاده از روش طیف سنجی جذبی[۱] برای سنجش کمیت

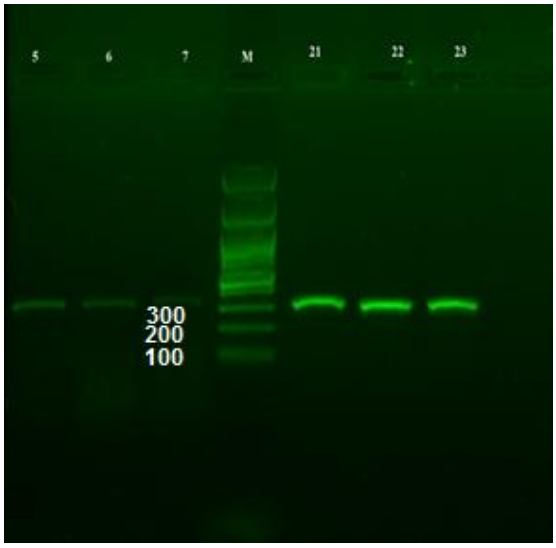
با استفاده از دستگاه نانودراپ میزان جذب در طول موج ۲۶۰nm و ۲۸۰nm محاسبه گردید. نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ بیانگر چگونگی کمیت می باشد. نمونه هایی که این نسبت برای آنها بین ۱/۸ تا ۲ بود استفاده گردید و در مورد سایر نمونه ها استخراج DNA تکرار شد(شکل ۲و۳).

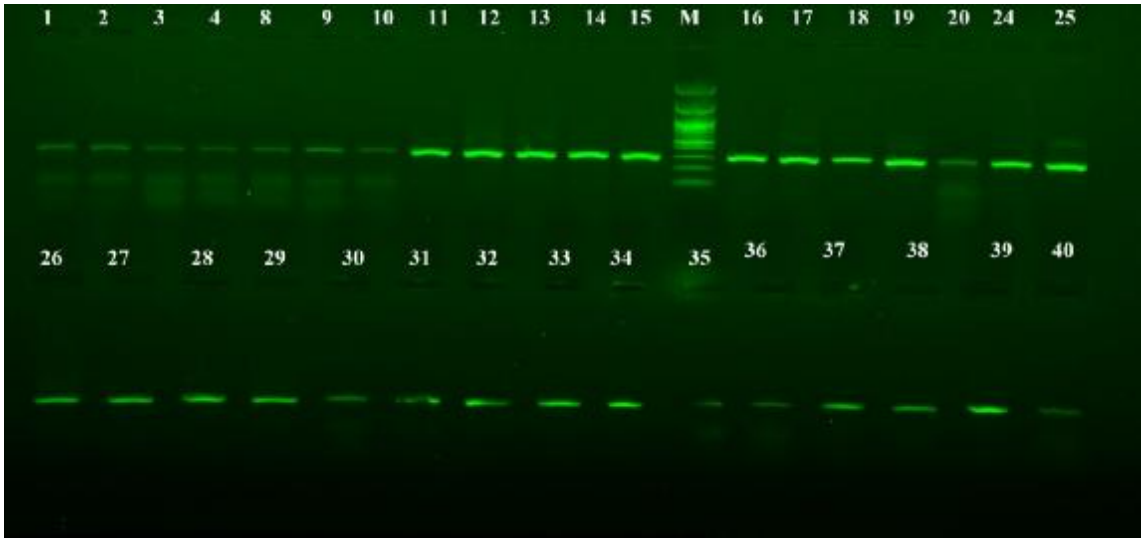
۳-۲- نتایج به دست آمده از شرایط دمایی مناسب برای انجام فرآیند PCR نمونه‌های مورد بررسی

در نمونه حاصل از برنامه اول (جدول ۳) دایمر(یک محصول است که به صورت بالقوه در PCR تولید میشود و به صورت primer dimerکه حاوی پرایمرها هیبرید شده با هم به جای هیبرید شدن هر پرایمر با یک رشته از DNA الگواست. (۲۶)اگر قرار باشد بارها و بارها یک نوع واکنش زنجیرهای پلیمراز انجام شود لازم است تا مقدار پرایمرهای مورد استفاده و دمای اتصال پرایمرها ست گردد. کاهش تعداد سیکلها و کاهش غلظت پرایمرها که با کاهش حجم برداشتی از آنها جهت رفع مشکل دایمرها قابل استفاده است که در این مطالعه تعداد سیکلها کاهش داده شد. همچنین در تکرار نمونه های دیگر در ژل اسمیر(ایجاد حالت سایه ای در پس زمینه شکل)ایجاد شده و همچنین باند ایجاد شده وضوح کافی را نداشتند. به همین خاطر برنامه دوم جهت بررسی نمونه ها مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول۴). برنامه دوم تکثیر ژن به کاربرده شده در دستگاه PCR تصاویری واضحتر نسبت به برنامه اول نشان می دهد(.شکل۲) بنابراین این برنامه به همراه مارکر مناسب روشی مناسب و اثبات شده جهت تشخیص نوع گونه ماهی تن کنسرو شده می باشد.

---

[۱] - Spectrophotometry





شکل۲: نتایج به دست آمده از الکتروفورز محصول PCR برای نمونه‌های مورد بررسی.

۳-۳- نتایج PCR

پس از بررسی اولیه برنامه انتخابی میزان اختصاصیت پرایمرها بررسی شد نتایج مشخص گردید که از بین پرایمرهای مورد استفاده پرایمرمینی بارکدینگ (*Minibarcoding*) به عنوان پرایمر اختصاصی عمل کرده و تمام تکثیرها بر اساس این پرایمر صورت گرفت. (شکل ۲) این توالی قابلیت شناسایی گونه های مورد نظر ماهی تن فراوری شده را دارد. این موضوع در تصاویر ژل الکتروفورز مشاهده گردید.(شکل۲)

ناحیه سیتوکروم اکسیداز ۱ میتوکندری در کلیه نمونه ها به طور موفقیت آمیزی با استفاده از واکنش زنجیره ایی پلیمراز تکثیر و توالی یابی شد. سپس توالی توسط پایگاه اطلاعاتی BOLD مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن در جداول ۳و۴و۵و۶وآماده است. نتایج حاصل نشان داد که از۱۰۰ نمونه کنسرو ۸۰ نمونه دارای ۹۷ درصد شباهت ژنتیکی به تن ماهیان بودند. ۲۰ نمونه با آن‌چه که روی آن برچسب‌گذاری شده بود، تفاوت داشت ۱۰ مورد مربوط به کنسروهای پر شده با گوشت خرد شده در آب نمک و ۶ مورد مربوط به کنسروهای پر شده با گوشت خرد شده در روغن می باشد و ۴ مورد مربوط به کنسروپر شده با گوشت یک تیکه در آب نمک و۲مورد مورد مربوط به گوشت یک تیکه در روغن می باشد به طور کل بر اساس جدول۵ بیشترین عدم تطابق برچسب مربوط به کنسروهای پرشده با گوشت خرد شده مشاهده گردید. وهمچنین براساس جدول ۶ در کنسروهای فراوری شده در آب نمک بیشترین عدم تطابق گزارش شد.

در جدول ۷ مشاهده می‌گردد که از ۱۰ مورد تقلب صورت گرفته در کنسرو ماهی تن تهیه شده از گوشت خرد شده و فرآوری شده در آب و نمک، ۷ مورد به خانواده شورت ماهیان، ۱ مورد به خانواده برگ ماهی و ۱ مورد متعلق به گونه راس چکربورد بود. میزان ماهی شورت به طور عمده در مناطق صید ماهی تن فراوان است و این موضوع باعث می شود همراه انواع ماهیان تن صید شود و در مرحله تولید به جای ماهی تن در کنسرو استفاده شود.

در جدول ۸ مشاهده می‌گردد که از ۶ مورد تقلب صورت گرفته در کنسرو ماهی تن تهیه شده از گوشت خرد شده و فرآوری شده در روغن، تمامی موارد به خانواده شورت ماهی تعلق دارند.

در جدول ۹ مشاهده می‌گردد که از ۲ مورد تقلب صورت گرفته در کنسرو ماهی تن تهیه شده از گوشت یک تکه و فرآوری شده درآب و نمک، هر دو مورد به خانواده شورت ماهی تعلق دارند.

در جدول۱۰ مشاهده می‌گردد که تنها یک مورد تقلب در کنسرو ماهی تن تهیه شده از گوشت یک تکه و فرآوری شده در روغن صورت گرفته است که به خانواده شورت ماهی تعلق دارند.

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[۱] داشت . این ماهی در مناطق کم عمق خلیج‌ها و دریاها زندگی می‌کند، اگرچه ارزش غذایی قابل

[۱] *Sillago sihama*

توجهی 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 برگ ماهی[۱] است. این ماهی در سال ۲۰۱۲ توسط Britz در آب‌های بخش جنوبی اقیانوس هند شناسایی شد. همچنین، ۱ نمونه از ۲۰ مورد تقلب دارای شباهت ۷۵٪ به راس چکر[۲] بورد بود گونه متعلق به آب‌های اقیانوس هند است که گاهی به صورت اتفاقی به دریای عمان و خلیج فارس وارد می‌شود. یک نمونه نیز بر خلاف برچسب قوطی کنسرو حاوی ماهی بچه زرده بود که با وجود اینکه ماهی گرانتری نسبت به ماهی هوور بوده اما به دلیل عدم تطابق با برچسب قوطی به عنوان مورد عدم تطابق لحاظ گردید. شکل ۳ میزان تنوع ماهیان استفاده شده در کنسروهای ماهی تن با عدم تطابق گونه را نشان می دهد.

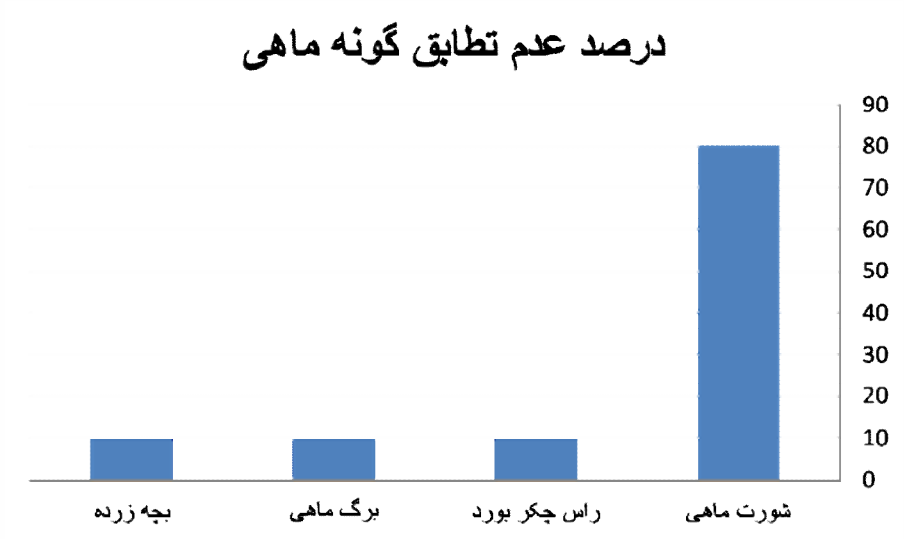
جدول ۵:نتایج بررسی عدم تطابق نوع کنسرو ماهی با برچسب بر اساس نوع گوشت

نوع محصول	تعداد کل	نمونه های دارای عدم تطابق	درصد نمونه های رد شده
کنسرو ماهی با گوشت خرد شده	۵۰	١٦	٪۳۲
کنسرو ماهی با گوشت یک تیکه	۵۰	٤	٪۸

جدول ٦: نتایج بررسی عدم تطابق نوع کنسرو ماهی با برچسب بر اساس نوع فراوری

نوع محصول	تعداد کل	نمونه های دارای عدم تطابق	درصد نمونه های رد شده
کنسرو تن ماهی در آب نمک	۵۰	١٢	٪٢٤
کنسرو تن ماهی در روغن	۵۰	٨	٪١٦

[۱] *Pristolepis rubripinni*
[۲] *Halichoeres hortulanus*



شکل ۳ میزان تنوع ماهیان استفاده شده در کنسروهای ماهی تن با عدم تطابق گونه

جدول ۷ عدم تطابق گونه ماهی شناسایی شده در نمونه‌های کنسرو با نوع گوشت خردشده تن ماهی‌های تهیه شده در آب و نمک.

کد دسترسی بانک ژن	گونه تشخیص داده شده	میزان شباهت(٪)	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

29-143150-16-R	خردشده	ماهی تن	۲۶۳	٪۹۹/۱۸	*Sillago sihama*	JF494530.1
30-143151-17-R	خردشده	ماهی تن	۲۶۲	٪۹۸/۳۵	*Sillago sihama*	JF494530.1
20-143155-18-R	خردشده	ماهی تن	۲۶۳	٪۹۹/۱۸	*Sillago sihama*	JF494530.1
21-3156-۱14 19-R	خردشده	ماهی تن	۲۶۱	٪۸۳/۱۳	*Pristolepis rubripinnis*	MG923398.1
22-143157-20-R	خردشده	ماهی تن	۲۶۷	٪۹۷	*Sillago sihama*	JF494530.1

جدول ۸ عدم تطابق گونه ماهی شناسایی شده در نمونه‌های کنسرو با نوع گوشت خردشده تن ماهی‌های تهیه شده در روغن.

کد نمونه	نوع گوشت	مشخصات نمونه	طول قطعه	میزان شباهت(٪)	گونه تشخیص داده شده	کد دسترسی بانک ژن
93-141690-5-R	خردشده	ماهی تن	۲۶۷	٪۹۹/۵۷	*Sillago sihama*	JF494530.1
32-143066-6-R	خردشده	ماهی تن	۲۶۷	٪۹۸/۷۲	*Sillago sihama*	EF609617.1
31-143070-8-R	خردشده	ماهی تن	۲۶۶	٪۹۶/۱۷	*Sillago sihama*	EF609617.1
26-143147-13-R	خردشده	ماهی تن	۲۶۶	٪۹۶/۱۷	*Sillago sihama*	EF609617.1
27-143148-14-R	خردشده	ماهی تن	۲۶۵	٪۹۶	*Sillago sihama*	EF609617.1
28-143149-15-R	خردشده	ماهی تن	۲۶۵	٪۹۵	*Sillago sihama*	EF609617.1

جدول ۹ عدم تطابق گونه ماهی شناسایی شده در نمونه‌های کنسرو با نوع گوشت یک تکه تن ماهی‌های تهیه شده در آب و نمک.

کد نمونه	نوع	مشخصات	طول	میزان	گونه تشخیص داده	کد دسترسی بانک

ژن	شده	شباهت(٪)	قطعه	نمونه	گوشت	
JF494530.1	*Sillago sihama*	٪۹۹/۹۵	۲۷۱	ماهی تن	یک تکه	43-144990-20-R
JF494530.1	*Sillago sihama*	٪۹۹/۵۷	۲۶۳	ماهی تن	یک تکه	23-143158-21-R

جدول ۱۰ عدم تطابق گونه ماهی شناسایی شده در نمونه‌های کنسرو با نوع گوشت یک تکه تن ماهی‌های تهیه شده در روغن

کد دسترسی بانک ژن	گونه تشخیص داده شده	میزان شباهت(٪)	طول قطعه	مشخصات نمونه	نوع گوشت	کد نمونه
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

یکی از جنبه های سلامت و ایمنی محصولات کنسرو ماهی تشخیص تقلبات مربوط به اصالت ماهی بکار رفته در کنسرو می باشد که از نظر اقتصادی و مذهبی نیز حائز اهمیت است.از متداول ترین روش های بررسی این موضوع متدهای مبتنی بر تشخیص DNA و شناسایی پروتئین ها می باشد.(۱و۱۸) یکی از روش های رایج تشخیص پروتوئین استفاده از تکنیک الایزا می باشد.(۱۱) و از آنجایی که استفاده از این روش ها همواره مشکلاتی مانند واکنش های متقاطع و نتایج کاذب را به دنبال دارد و نیز با توجه به اینکه حضور و تشخیص پروتئین یک پارامتر وابسته به سن و نوع گوشت به کار رفته در فراورده می باشد. به نظر می رسد روش های بر پایه تشخیص DNA با استفاده از تکنیک PCR روش های مناسب تری هستند چرا که در اینجا مهم نیست DNA استخراج شده از کدام قسمت گوشت و یا حتی بافت چربی باشد زیرا از هر ناحیه ایی که نمونه استخراج شود قابل تشخیص است. (۱۳) مزیت دیگر این تکنیک نسبت به تجزیه و تحلیل پروتئین این است که اگرچه DNA با پردازش‌های مختلف (کنسرو، گرمایش) ممکن است تغییر کند؛ اما، از مقاومت بیشتری در برابر حرارت نسبت به پروتئین‌ها برخوردار است و همچنان می‌توان

قطعات کوچک DNA با اطلاعات کافی برای شناسایی به روش PCR را تقویت کرد. علاوه بر این، DNA به طور بالقوه می-تواند از هر نمونه‌ای بازیابی شود؛ زیرا تقریباً در تمام سلول‌های موجود زنده وجود دارد. همچنین، به دلیل از بین رفتن کد ژنتیکی و وجود بسیاری از مناطق غیر کد کننده، DNA اطلاعات بسیار بیشتری را نسبت به پروتئین‌ها فراهم می‌کند.(۱۵)

تکنیک های مختلفی در PCR برای شناسایی تقلبات در اصالت محصولات فراوری شده دریایی مورد استفاده قرار گرفته است.(۴و۶)

میرخانی و همکاران (۱۳۹۲) به بررسی وجود ماهی تن هوور معمولی در ۴۸ نمونه کنسرو موجود در بازار تهران با استفاده از روش DNA بارکدینگ پرداختند. نتایج نشان داد گونه اصلی که باید در کنسروها باشد ۲۳ درصد بوده است.(۱) مزیت مطالعه حاضر استفاده از نمونه هایی حاوی انواع ماهی تن نه تنها هوور ، برنامه تکثیر کاربردی ، توسعه روش شناسایی در مورد کنسروهای فراوری شده در آب نمک و حاوی گوشت خرد شده می باشد. در تحقیق 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 (۶)، این مشکل و یا به عبارتی تقلب ممکن است سهوی بوده باشد. که البته پیشنهاد می‌گردد که برای حل این مشکل در کارخانه‌های تولید کنسرو بخشی طراحی گردد که از کنسروها به طور تصادفی برای بررسی این تقلب‌های سهوی با روش‌های مولکولی تست‌های مربوطه صورت گیرد.

الگا و همکاران (۲۰۱۳) از روش Real time-PCR برای تعیین نوع گوشت به کار رفته در محصولات گوشتی تهیه شده از گوشت گوسفند، بوقلمون، مرغ و خوک استفاده کردند . در چهار نمونه (۱۰درصد) عدم تطابق برچسب گزارش شد. مزیت روش بکار گرفته شده در مطالعه الگا و همکاران تعیین میزان گوشت در نمونه مورد بررسی می باشد.(۲۴) علت استفاده از واکنش زنجیره ایی دراین مطالعه صرف هزینه کمتر و کفایت مسئله ایمنی و کنترل کیفیت در اثبات حضور یا عدم حضور گونه مورد بررسی می باشد. بنابراین مطالعه حاضر موجب به صرفه بودن انجام آزمون های شناسایی نوع گوشت ماهی در فراورده های کنسروی ماهی می باشد.

در روش های مولکولی شناسایی و اطمینان از DNA تکثیر شده با توالی پرایمر انتخاب شده یک مرحله حساس و ضروری است. در این بررسی نیز، از میان پرایمرهای مورد استفاده یکی از پرایمرها به صورت اختصاصی عمل کرد.شرایط بهینه سازی شده واکنش زنجیره ایی پلیمراز اختصاصیت پرایمرهای بکار رفته در این مطالعه را اثبات کرد همچنین مشاهده باندهای مربوط به نمونه ها این مطلب راتایید کرد ، در تطابق با نتایج حاصل از تحقیق حاضر، کلنگی و همکاران (۲۱۲) 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 پلی‌مرازتکثیر شدند. نتایج نشان داد پرایمرهای R1 و F2a به‌عنوان یک پرایمر اختصاصی برای گونه ازون‌برون معرفی شدند.(۱۶)

استفاده از DNA میتوکندریایی به دلایلی مانند تعداد کپی های فراوان آن در تمام سلول ها و پایین بودن احتمال نوترکیبی ان نسبت به سایر انواع ژن ها از ارجحیت برخوردار است. ضمن اینکه مقاومت حرارتی و تعداد کپی های بالای این ژن شانس بقای آن را در شرایط مختلف افزایش داده و تضمین کننده مقدار کافی محصول PCR در آزمایشات می باشد.(۲۰) در پژوهش حاضر، اگرچه، قطعات DNA ممکن بود به خاطر درجه حرارت بالای ناشی از اتوکلاو کنسروها شکسته شده باشد، ولی DNA میتوکندریایی (سیتوکروم اکسیداز۱) بسیار پایدارتر از DNA سلولی بوده و در تحقیق حاضر با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز۱ که یک قطعه DNA میتوکندریایی مقاوم بود، توانستیم به تقلبات موجود در کنسروهای تن ماهیان در برندهای مختلف موجود در بازار ایران پی ببریم. همچنین در تحقیقی که در کشور اندونزی در سال ۲۰۱۶ برای چهار محصول ماهی تن به صورت (کنسرو شده سوشی[۱] وفیش بال[۲] و فلاس[۳]) انجام گرفت از ژن سیتوکرو اکسیداز برای تشخیص نوع ماهی بکار رفته در محصول استفاده شد.و عدم تطابق برچسب تنها در مورد کنسرو ماهی تن مشخص شد.(۱۹)

Tarmiziaو Zainudd (۲۰۲۰) از روش بارکد گذاری DNA به عنوان ابزاری برای کشف تقلب در محصولات غذاهای دریایی استفاده نمودند. هدف اصلی این مطالعه بررسی تأثیر روش PCR در شناسایی انواع محصولات دریایی شامل فیله نامشخص اقیانوس آرام، باله‌های سینه‌ای برای استیک، فیله پلوک کوبیده، مخلوط ماهی کاد، ماهی ساردین کنسرو شده و سوش ماهی قزل آلا بود. با استفاده از کیت استخراج DNA بافت نمونه‌ها، DNA ژنومی با موفقیت از همه‌ی نمونه‌ها استخراج شد. از ژن سیتوکرو اکسیداز ۱ استفاده شد. نتایج حاصل از توالی‌های تقویت شده تنها توانست سه نمونه یعنی فیله پولاک کوبیده، سوش ماهی قزل آلا

[۱] Sushi
[۲] Meat ball
[۳] Fish floss

و کنسرو ساردین را شناسایی کند. (۲۲)در تحقیق حاضر نیز توانستیم با استفاده از ژن میتوکندری نتایج قابل اعتمادی به دست آوریم.

فشار اسمز ی و حرارت در طول فراوری کنسرو تهیه شده در آب نمک باعث کاهش کیفیت و کمیت DNA استخراجی می شود که این مورد باعث کاهش دقت روش PCR در تشخیص نوع گونه می گردد در پژوهش حاضر توانستیم با بهینه سازی روش واکنش زنجیر ه ایی و برنامه کاربردی تکثیر نوع ماهی به کار رفته در کنسرو های فراوری شده در آب نمک را تشخیص دهیم.و با کاهش هزینه ها و زمان آزمون نتایجی دقیق به دست آمد . حیدر زاده در سال ۲۰۱۵ طی تحقیقی از روش های مختلف برای استخراج DNA ماهی تن کنسرو شده در اب نمک و روغن استفاده کرد و کیفیت و کمیت DNA استخراج شده را با روش های اسپکتوفتومتری و ژل آگارز تعیین کردو در نهایت بهترین روش استخراج را معرفی کرد.

DNA استخراج شده به روش Wizard و CTBA کمترین آلودگی به پروتئین و RNA و سایر مواد داشت.همچنین خرد شدن و تکه شدن DNA در طی استخراج به این دو روش کمتر اتفاق افتاد و DNA استخراجی بیشترین غلظت و بهترین کیفیت را داشت که این مورد به عواملی مهمی مانند طول زمان استخراج و نوع مواد شیمیایی به کار رفته بستگی دارد.که با نتایج تحقیق فوق همخوانی داشت همچنین میزان غلظت DNA استخراجی در کنسرو آب نمکی و روغن نیز تفاوت داشت به طوری که غلظت بدست آمده از کنسرو روغنی ۹۵ درصد و آب نمکی ۷۵ درصد گزارش شد. (۹)

٤- نتیجه گیری کلی

شرایط بهینه سازی شده آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز، اختصاصی بودن پرایمر به کار رفته در این مطالعه را اثبات کرد. همچنین مشاهده باندهای مربوط به نمونه ها این مطلب را تایید کرد که مواد و شرایط بکار رفته در فناوری کنسرو اثر منفی در واکنش زنجیر ه ایی پلیمراز و تشخیص گونه ماهی نداشته است که بدلیل پایداری حرارتی DNA (ژن میتوکندری) حتی زمانی که محصول تحت فرایند شدید حرارتی قرار داشته، می‌باشد.در این مطالعه روش DNA barcoding بر مبنای واکنش زنجیره ایی پلیمراز در تشخیص نوع ماهی بکار رفته در کنسروهای فراوری شده در آب نمک بهبود داده شد. نهایتا یافته های پژوهش نشان داد مسئله تقلب در فرارده های کنسرو ماهی تن در کشور وجود دارد و این امر لزوم نظارت مستمر و منظم نهاد های ناظر بر بهداشت و سلامت جامعه در کنار بکارگیری روش های نوین برای کشف تقلبات در مواد غذایی را بیش از پیش آشکار می کند.

٥- **سپاسگزاری**: با سپاس از دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و دانشگاه آزاد نجف آباد که در انجام این کار همکاری نمودند.

٦- منابع

۱. میرخانی، ش.، چنگیزی،ر.، شجاعی، ل. ۱۳۹۲. بررسی و راستی آزمایی برخی نمونه های کنسرو ماهی تن هوور معمولی (unnus tonggol) موجود در بازار ایران با استفاده از روش DNA Barcoding دومین همایش ملی امنیت غذایی، سواد کوه.

۲. هاشم‌زادگان، م.، تفویضی، ف.، حسینی، س. و بیات، م. ۱۳۹۳. بررسی تطابق مواد اولیه اصلی درج شده در برچسب همبرگرهای ممتاز شهر تهران توسط آنالیز مولکولی. نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی،جلد۶، شماره۴،۵۶-۴۹.

3. Aryainejad, S.h., Kavousi, K., Fatuhi, L. and Mousavi Movahedi, A. 2017. Detection of adulteration in meat products based on DNA sequence. *Science Cultivation*, 8(2): 143-147.(In persian)
4. Barcaccia, G., Lucchin, M. and Cassandro, M. 2015. DNA barcoding as a molecular tool to track down mislabeling and food piracy. *Diversity*, *8*(1) :2-6.
5. ElShehawy, S.M. and Farag, Z.S. 2019. Safety assessment of some imported canned fish using chemical, microbiological and sensory methods. *The Egyptian Journal of Aquatic Research,* 45(4) : 389-394.
6. Fernandes, T.J., Amaral, J.S. and Mafra, I. 2021. DNA barcode markers applied to seafood authentication: An updated review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(22) : 3904-3935.
7. Fiorino, G.M., Garino, C., Arlorio, M., Logrieco, A.F., Losito, I. and Monaci, L. 2018. Overview on untargeted methods to combat food frauds: a focus on fishery products. *Journal of food quality*, 13(2):46-55.
8. Ganjeh, A., Monfared, A. and Solanzadeh, N. 2017 .The Effect of Different Vegetable Oils on the Sensory Evaluation and Quality of Canned Tuna Fish. *Journal of Health System Research*, 13(3):278-284.
9. Heidarzadeh, M. 2015. Selection the Most Suitable Method for DNA Extraction from Muscleof Iran's Canned Tuna, *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering*, 88(9):16-20.
10. Hoseini, H., Barazandegan, Kh., Akhoondzadeh, A., Shemshadi, B., tavakoli, H. and Khaksar, R. 2009. Determination the kind of meat content of Patties marketed in Tehran in. *Journal of Food Science and Technology*,9(3): 95-100. [In Persian]

11. Hoseini, H., Rokni, N. and Kaamkar, A. 2006. Collagen and Related Indices of Quantitative Values Indicatorsin Quality Control of Heated Red Meat Products in Iran. *Journal of Food Science and Technology*,3(4): 23-30. [In Persia]

12. Inoue, J.G., Miya, M., Tsukamoto, K. and 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.

13. Janosi, A.2006. Species specific detection of meat by Polymerase Chain Reaction techniques. PhDthesis, Budapest University.

14. Karimi, M., and Zeinali, S. PCR (Translation). Authors: McPherson MJ and Moller SG, *Tehran Andisheye Zohor Publication*, 84-117. [In Persian]

15. Kitpipit, T., Sittichan, K.and Thanakiatkrai, P. 2014. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products, *Food Chemistry*,16(3): 77–82.

16. Kolengi, M. H., Farahmand, H., Aghilinejad, S. M. and 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.

17. Miandare, H. K., Farahmand, H., Akbarzadeh, A., Ramezanpour, S., Kaiya, H., Miyazato, M., and Nikinma, M. 2013. Developmental transcription of genes putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate. *General and Comparative Endocrinology*, 18(2): 41-47.

18. Monjezi, N., 2010. Verification of some canned sardine fish samples available in the Iranian market using DNA Barcoding method. Security،Savadkuh،https://civilica.com/doc/303486

19. Nurilmala, M., Widyastuti, U., Kusuma, WA., Nurjanaha, N., Wulansari, N., Widyatuti, Y. 2016.DNA barcoding for identification of processed tuna fish in Indonesian market. *Jurnal Teknologi*, 12(78) :2-4.

20. Parchami nejad, F., Hosseni, SE., Tafvizi, F., Tajabadi Ebrahimi, M. and Sharifan, A.2014. Fraud identificationin beef sausage in Tehran province using mitochondrial genes of animal species. *Food Hygiene*,4(13): 81-97.

21. Parkhemi nejad, F., Hosseini, S. A., Tawafi, F., Tajabadi Ebrahimi, M. and Sharifan, A. 2013. Identification of adulterations in cold cuts 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)

22. Tarmizi, D. and Zainuddin, Z. 2020. DNA Barcoding: A Tool To Deect Fraud In Seafood Products. *Big Data In Agriculture*, 2(1):20 -22.

23. Teletchea, F., Bernillon, J., Duffraisse, M., Laudet, V. and Hänni, C. 2008. Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples. *Journal of Applied Ecology*,45(3): 967-975.

24. Ulca, P,. Balta, H,. Çagın, I., Senyuva, H. 2013. Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods. *Meat Science*, 94(4): 280–284.

25. Viljoen, GJ., Nel, L., Crowther, J. 2005. Molecular Diagnostic Pcr handbook.. Published by Springer.

26. Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. and Hebert, P.D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society. *Biological Sciences*, 360(1462): 1847-1857.

The use of molecular markers in confirming the authenticity of fish and detecting fraud

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

1- Departement of Food Sciences & Technology, Najafabad branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran

2- Department of Seafood Sciences & Technology , Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3- Department of Chemistry, Najafabad branch, Islamic Azad University , Najafabad, Iran

4- Department of Aquatics Reproduction and culture. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Corresponding Author: Mehdi Zolfaghari, zolfaghari.mz@gau.ac.ir

Abstract

There are different ways to assess the lable of marine product with their actual contents. The aim of this study was to compare the authenticity of the fish with the label on the canned tuna and to improve the identification technique is applied. Canned tuna stuffed with one piece meat in brine , oil and canned tuna stuffed with chopped meat in brine , oil were use . samples were abtained from different city of Iran. DNA extraction was performed on all samples and its quality and quantity were investigated. And then, polymerase chain reaction with designed primers for cytochrome oxidase 1 gene was performed . Then the accuracy and specificity of primers were evaluated using principle

program . Finally, sequencing was performed and the results showed that among the examined primers one primer could work specifically for the examined samples. Most of fraud were in canned tuna with chopped meat in brine compared to one piece meat in oil, and out of 100 canned samples examined, 20 mis labeling were reported. Due to its high speed , accuracy and specificity, this method is very useful for to indentify of fraud in tuna canned prepared in brine and oil, that DNA fragments may be lost during the canning process, and is recommended to investigate the amount of fraud of processed foods.

keywords: fraud, canned tuna, Polymerase chain reaction (PCR), Cytochrome oxidase 1.