

(Original Research Paper)

The Use of Molecular Markers in Confirming the Authenticity of Fish and Detecting Fraud

Mona Aivaz¹, Mehdi Zolfaghari^{2*}, Mojtaba Nasr Esfahani³, Hamed Pak Nejad⁴

1- Departement of Food Sciences and Technology, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran.

2- Department of Fisheries products processing 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.

Received:01/01/2023

Accepted:20/02/2023

DOI: [10.71810/jfst.2024.1004797](https://doi.org/10.71810/jfst.2024.1004797)

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 obtained 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.

(مقاله پژوهشی)

استفاده از نشانگر مولکولی در تایید اصالت ماهی و تشخیص تقلب

منا ایوز^۱، مهدی ذوالفقاری^{۲*}، مجتبی نصرافهانی^۳، حامد پاک‌نژاد^۴

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، 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.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۱

DOI: [10.71810/jfst.2024.1004797](https://doi.org/10.71810/jfst.2024.1004797)

چکیده

برای بررسی تطابق نوع ماهی درج شده بر روی برچسب فرآورده های دریایی با محتویات آنها روشهای مختلفی وجود دارد. 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 کنسرو ماهی تن پر شده با گوشت یک تکه و تهیه شده در آب نمک و روغن و کنسرو ماهی تن پر شده با گوشت خرد شده و تهیه شده در آب نمک و روغن استفاده شد. برای این کار، پس از جمع آوری 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 اکسیداز ۱، واکنش زنجیره ایی پلیمرز 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 نمونه های مورد بررسی به طور اختصاصی عمل کند. نتایج حاصل از توالی یابی 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 می گردد.

واژه های کلیدی: تقلب، کنسرو ماهی تن، واکنش زنجیره ای پلیمرز، سیتوکروم اکسیداز ۱.

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 می باشد. 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 می باشد. 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 علاقه مندی 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 (۱۴و ۲۰). بنابراین ابتکارات لازم برای افزایش آگاهی عمومی و ایجاد ابزارهای موثر برای احراز هویت محصولات می تواند 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 پلیمرز و سایر روشهای پروتئینی استفاده شده است که در این بین بیشتر مطالعات بر پایه واکنش زنجیره ای پلیمرز و با به کارگیری تکنیک های مختلف آن بوده است. (۱۰)

منجری 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 گونه های مختلف غیر از گونه ی 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 پلیمرز 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 نمونه های همبرگر ممتاز پرداختند (۲). زانیاد و همکاران (۲۰۲۰) از روش بارکد گذاری در شناسایی انواع محصولات دریایی فیله نامشخص اقیانوس آرام، باله های 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 مطالعه ای 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 می رسد. بنابراین در این تحقیق از واکنش زنجیره ایی پلیمرز برای تشخیص دقیق گونه های رایج ماهی تن کنسروی فراوری شده در

۲-۳- ارزیابی کمیت DNA

به این منظور از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. مقدار جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰-۲۸۰ نانومتر و نسبت ۲۸۰/۲۶۰ به وسیله دستگاه اندازه‌گیری و ثبت گردید. اگر نسبت رقت $A1/A2 = 1/8$ 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 در ۲۳۰ نانومتر جذب زیادی دارند. بنابراین، میزان آلودگی محصول به پروتئین و هیدرات‌های کربن از طریق میانگین این جذب‌ها تشخیص داده شد (۲۱).

۲-۴- انتخاب پرایمر

پرایمرهای بکار رفته در این پژوهش در جدول شماره ۱ 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 تقریباً یونیورسال می‌باشد (۱۲ و ۲۶).

۲-۵- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

۲-۵-۱- 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 جدول ۳ و ۴ عملیات تکثیر انجام گرفت (۱۲ و ۲۶).

آب نمک و روغن استفاده شد و اختصاصیت پرایمرها بررسی شد و میزان عدم تطابق برچسب نمونه‌ها اعلام شد.

۲- مواد و روش‌ها

برای جمع‌آوری نمونه‌ها از برندهای وجود در بازار کنسروهای ماهی تن جمع‌آوری شد. پس از بررسی 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 ازلت 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 (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 TAE^۱ 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 (۱۷ و ۲۰).

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش زنجیره ایی پلیمرز برای تشخیص تقلب در کنسروهای ماهی تن

کد	پرایمر	توالی
VT	VF2_t1	TGTAACGACGCGCCAGTCAACCAACCACA AAGACATTGGCAC
FFT	FishF2_t1	TGTAACGACGCGCCAGTCGACTAATCATAA AGATATCGGCAC
FRT	FishR2_t1	CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGAC CGAAGAATCAGAA
FT	FR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCC GAARAAAYCARAA
LC	L5956-COI	ACAAAGACATTGGCACCCCT
HC	H6558-COI	CCTCCTGCAGGGTCAAAGAA
MB	MiniBarcode	ATCACAAAGACATTGGCACCCCT

جدول ۲- بهینه سازی مواد مورد نیاز برای انجام فرآیند PCR نمونه های مورد بررسی

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

جدول ۳- برنامه اول تکثیر ژن بکار برده شده در واکنش زنجیره ایی پلیمرز

مراحل واکنش زنجیره ایی پلیمرز	زمان	دما (درجه سانتیگراد)
دناتوراسیون اولیه	۵ دقیقه	۹۵
تکثیر	دناتوراسیون	۳۰ ثانیه
	اتصال	۴۰ ثانیه
	طویل سازی	۱ دقیقه
	تعداد سیکل	۴۰
طویل سازی نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲

جدول ۴- برنامه دوم تکثیر ژن در واکنش زنجیره ایی پلیمرز

دما (درجه سانتیگراد)	زمان	مراحل واکنش زنجیره ایی پلیمرز
۹۵	۵ دقیقه	دنا تورا سیون اولیه
۹۴	۳۰ ثانیه	دنا تورا سیون تکثیر
۵۰	۴۵ 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 زنجیره ایی پلیمرز روی ژل آگاروز که با رنگ DNA safe stain آمیزی شده است برده شدند. در چاهک اول ژل، محلول Lader را و در باقی چاهک ها محصول PCR هر یک از نمونه 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 نمونه ها جهت ارزیابی و صحت برای توالی یابی بر اساس پروتکل شرکت توالی یابی کننده آماده سازی شد. (۲۳)

۲-۷- بررسی اختصاصیت واکنش زنجیره ایی پلیمرز

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 نمونه ها مورد آزمون قرار گرفت تا در صورت اتصال غیر اختصاصی 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 برنامه های همچون Bioedit و MEGA توالی ها 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 داده ها، 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 فروشگاه ها و سوپرمارکت های شهرهای مختلف بودند. نمونه برداری به روش تصادفی ساده انجام شد. این تحقیق به لحاظ تجزیه و تحلیل داده ها 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 ویژگی ها و مشخصات محتوای کنسرو می پردازد و به دنبال امکان یا عدم امکان تشخیص گوشت در هر فرآورده با روش DNA barcoding 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

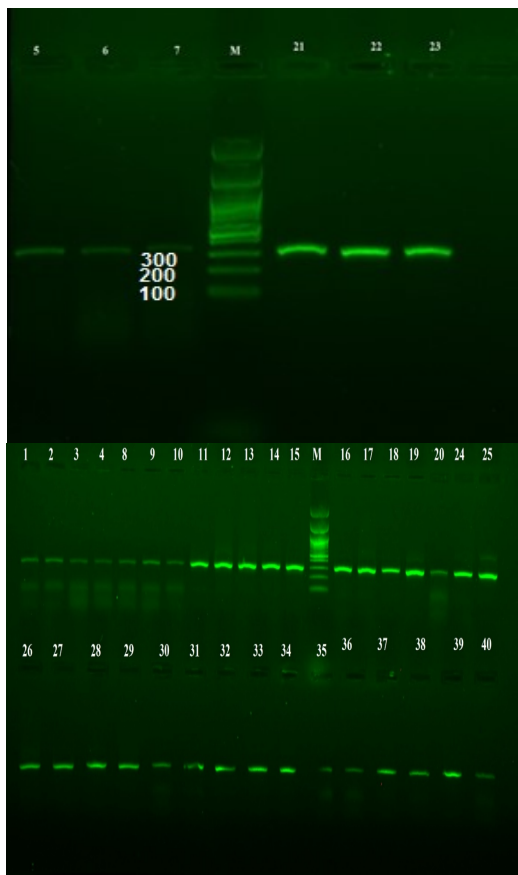
۳-۱- نتایج بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراجی

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 DNA استخراجی مناسب بوده و حاوی میزان کمی از آلودگی های پروتئینی، فنولی و RNA بوده

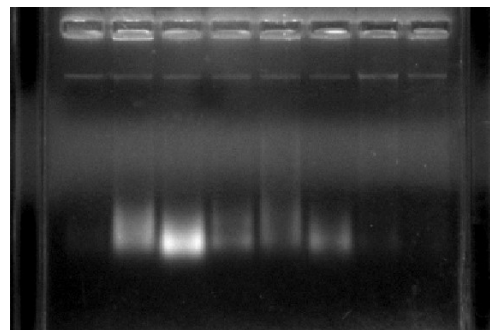
ست گردد. کاهش تعداد سیکل ها و کاهش غلظت پرایمرها که با کاهش حجم برداشتی از آن ها جهت رفع مشکل دایمرها قابل استفاده است که در این مطالعه تعداد سیکلها کاهش داده شد. همچنین در تکرار نمونه های دیگر در ژل اسمیر (ایجاد حالت سایه ای در پس زمینه شکل) ایجاد شده و همچنین باند ایجاد شده وضوح کافی را نداشتند. به همین خاطر برنامه دوم جهت بررسی نمونه ها مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۴). برنامه دوم تکثیر ژن به کاربرده شده در دستگاه PCR تصاویری واضحتر نسبت به برنامه اول نشان می دهد (شکل ۲) بنابراین این برنامه به همراه مارکر مناسب روشی مناسب و اثبات شده جهت تشخیص نوع گونه ماهی تن کنسرو شده می باشد.



شکل ۲- نتایج به دست آمده از الکتروفورز محصول PCR

برای نمونه های مورد بررسی

است. در مورد 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 آن ها بین ۱/۸ تا ۲ بود استفاده گردید و در مورد سایر نمونه ها استخراج DNA تکرار شد (شکل ۳ و ۲).

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

در نمونه حاصل از برنامه اول (جدول ۳) دایمر (یک محصول است که به صورت بالقوه در PCR تولید می شود و به صورت primer dimer که 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 زنجیره ای پلیمراز انجام شود لازم است تا مقدار پرایمرهای مورد استفاده و دمای اتصال پرایمرها

۳-۳- نتایج PCR

پس از بررسی اولیه برنامه انتخابی میزان اختصاصیت پرایمرها بررسی شد. نتایج مشخص گردید که از بین پرایمرهای مورد استفاده پرایمر مینی 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 (شکل ۲). ناحیه سیتوکروم اکسیداز ۱ میتوکندری در کلیه نمونه ها به طور موفقیت آمیزی با استفاده از واکنش زنجیره ایی پلیمرز تکثیر و توالی یابی شد. سپس توالی توسط پایگاه اطلاعاتی BOLD مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن در جداول ۳ و ۴ و ۵ و ۶ و آماده است. نتایج حاصل نشان داد که از ۱۰۰ نمونه کنسرو ۸۰ نمونه دارای ۹۷ درصد شباهت ژنتیکی به تن ماهیان بودند. ۲۰ نمونه با آن چه که روی آن برچسب گذاری 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 کنسرو پر شده با گوشت یک تیکه در آب نمک و ۲ مورد مورد مربوط به گوشت یک تیکه در روغن می باشد به طور کل بر اساس جدول ۵ بیشترین عدم تطابق برچسب مربوط به کنسروهای پر شده با گوشت خرد شده مشاهده گردید. و همچنین براساس جدول ۶ در کنسروهای فراوری شده در آب نمک بیشترین عدم تطابق گزارش شد. در جدول ۷ مشاهده می گردد که از ۱۰ مورد تقلب صورت گرفته در کنسرو ماهی تن تهیه شده از گوشت خرد شده و فراوری شده در آب و نمک، ۷ مورد به خانواده شورت ماهیان، ۱ مورد به خانواده برگ ماهی و ۱ مورد متعلق به گونه راس چکر 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 می گردد که از ۶ مورد تقلب صورت گرفته در کنسرو ماهی تن تهیه شده از گوشت خرد شده و فراوری شده در روغن، تمامی موارد به خانواده شورت ماهی تعلق دارند. در جدول ۹ مشاهده می گردد که از ۲ مورد تقلب صورت گرفته در کنسرو ماهی تن تهیه شده از گوشت یک تکه و فراوری شده در آب و نمک، هر دو مورد به خانواده شورت ماهی تعلق دارند. در جدول ۱۰ مشاهده می گردد که تنها یک مورد تقلب در کنسرو ماهی تن تهیه شده از گوشت یک تکه و فراوری 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 خلیج ها و دریاها زندگی می کند، اگرچه ارزش غذایی قابل 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^۲ است. این ماهی در سال ۲۰۱۲ توسط Britz در آب های بخش جنوبی اقیانوس هند شناسایی شد. همچنین، ۱ نمونه از ۲۰ مورد تقلب دارای شباهت ۷۵٪ به راس چکر^۳ بود گونه متعلق به آب های اقیانوس هند است که گاهی به صورت اتفاقی به دریای عمان و خلیج فارس وارد می شود. یک نمونه نیز بر خلاف برچسب قوطی کنسرو حاوی ماهی بچه زرده بود که با وجود این که 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.

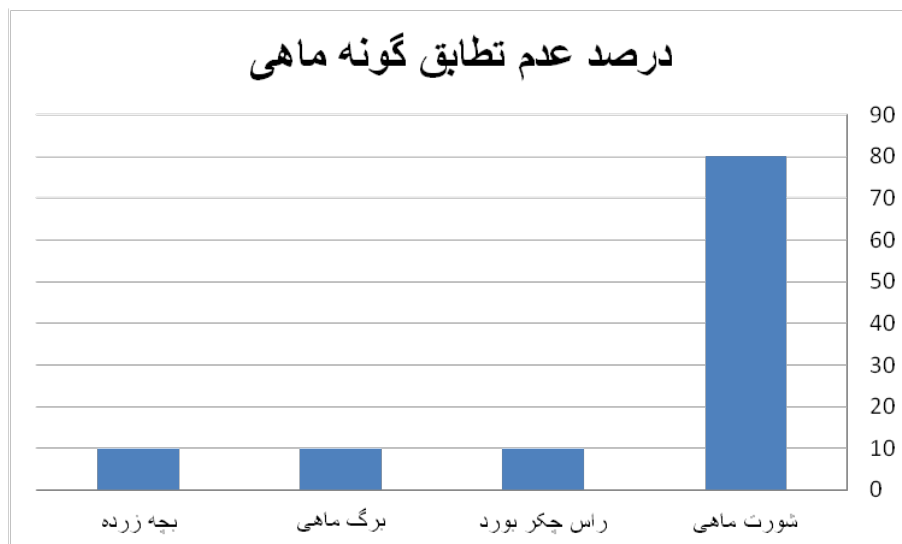
1- *Sillago sihama*2- *Pristolepis rubripinni*3- *Halichoeres hortulanus*

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	۱۶	۳۲٪
کنسرو ماهی با گوشت یک تیکه	۵۰	۴	۸٪

جدول ۶- 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	۱۲	۲۴٪
کنسرو تن ماهی در روغن	۵۰	۸	۱۶٪



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	<i>Halichoeres hortulanus</i>	۷۵%	۲۶۶	ماهی تن	خردشده	89-141686-1-R
<u>JF494530.1</u>	<i>Sillago sihama</i>	۹۴/۷۸	۲۶۹	ماهی تن	خردشده	90-141687-2-R
<u>MN512097.1</u>	<i>Sillago sihama</i>	۹۵/۳۲	۲۶۶	ماهی تن	خردشده	91-141688-3-R
92-141689-4-R	<i>Sillago sihama</i>	۹۶/۹۴	۲۶۸	ماهی تن	خردشده	92-141689-4-R
JF494530.1	<i>Sillago sihama</i>	۹۷/۹۵	۲۶۶	ماهی تن	خردشده	42-144989-5-R
JF494530.1	<i>Sillago sihama</i>	۹۹/۱۸	۲۶۳	ماهی تن	خردشده	29-143150-16-R
JF494530.1	<i>Sillago sihama</i>	۹۸/۳۵	۲۶۲	ماهی تن	خردشده	30-143151-17-R
JF494530.1	<i>Sillago sihama</i>	۹۹/۱۸	۲۶۳	ماهی تن	خردشده	20-143155-18-R
MG923398.1	<i>Pristolepis rubripinnis</i>	۸۳/۱۳	۲۶۱	ماهی تن	خردشده	21-3156-۱14 19-R
JF494530.1	<i>Sillago sihama</i>	۹۷	۲۶۷	ماهی تن	خردشده	22-143157-20-R

جدول ۸- عدم تطابق گونه ماهی شناسایی شده در نمونه‌های کنسرو با نوع گوشت خردشده 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	<i>Sillago sihama</i>	۹۹/۵۷	۲۶۷	ماهی تن	خردشده	93-141690-5-R
EF609617.1	<i>Sillago sihama</i>	۹۸/۷۲	۲۶۷	ماهی تن	خردشده	32-143066-6-R
EF609617.1	<i>Sillago sihama</i>	۹۶/۱۷	۲۶۶	ماهی تن	خردشده	31-143070-8-R
EF609617.1	<i>Sillago sihama</i>	۹۶/۱۷	۲۶۶	ماهی تن	خردشده	26-143147-13-R
EF609617.1	<i>Sillago sihama</i>	۹۶	۲۶۵	ماهی تن	خردشده	27-143148-14-R
EF609617.1	<i>Sillago sihama</i>	۹۵	۲۶۵	ماهی تن	خردشده	28-143149-15-R

جدول ۹- عدم تطابق گونه ماهی شناسایی شده در نمونه های کنسرو با نوع گوشت یک تکه تن ماهی های تهیه شده در آب و نمک

کد دسترسی بانک ژن	گونه تشخیص داده شده	میزان شباهت (%)	طول قطعه	مشخصات نمونه	نوع گوشت	کد نمونه
JF494530.1	<i>Sillago sihama</i>	٪۹۹/۹۵	۲۷۱	ماهی تن	یک تکه	43-144990-20-R
JF494530.1	<i>Sillago sihama</i>	٪۹۹/۵۷	۲۶۳	ماهی تن	یک تکه	23-143158-21-R

جدول ۱۰- عدم تطابق گونه ماهی شناسایی شده در نمونه های کنسرو با نوع گوشت یک تکه تن ماهی های تهیه شده در روغن

کد دسترسی بانک ژن	گونه تشخیص داده شده	میزان شباهت (%)	طول قطعه	مشخصات نمونه	نوع گوشت	کد نمونه
JF494530.1	<i>Sillago sihama</i>	٪۹۹/۵۷	۲۶۳	ماهی تن	یک تکه	25-143160-23-R
JF494530.1	<i>Auxis thazard</i>	٪۹۹/۶	۲۶۳	ماهی تن	یک تکه	27-143160-23-R

می توان 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 نمونه ای بازیابی شود؛ زیرا تقریباً در تمام سلول های 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 پروتئین ها فراهم می کند. (۱۵) تکنیک های مختلفی در PCR برای شناسایی تقلبات در اصالت محصولات فراوری شده دریایی مورد استفاده قرار گرفته است (۴ و ۶). 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 قوطی های کنسرو که یا به صورت اتوماتیک یا به صورت

یکی از جنبه های سلامت و ایمنی محصولات کنسرو ماهی تشخیص تقلبات مربوط به اصالت ماهی به کار 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. (۱۸ و ۱۹) یکی از روش های رایج تشخیص پروتئین استفاده از تکنیک الایزا می باشد. (۱۱) و از آن جایی که استفاده از این روش ها همواره مشکلاتی مانند واکنش های متقاطع و نتایج کاذب را به دنبال دارد و نیز با توجه به این که 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 این جا مهم نیست DNA استخراج شده از کدام قسمت گوشت و یا حتی بافت چربی باشد زیرا از هر ناحیه ای که نمونه استخراج شود قابل تشخیص است. (۱۳) مزیت دیگر این تکنیک نسبت به تجزیه و تحلیل پروتئین این است که اگرچه DNA با پردازش های مختلف (کنسرو، گرمایش) ممکن است تغییر کند؛ اما، از مقاومت بیشتری در برابر حرارت نسبت به پروتئین ها برخوردار است و همچنان

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 (۱۰ درصد) عدم تطابق برچسب گزارش شد. مزیت روش بکار گرفته شده در مطالعه الگا و همکاران تعیین میزان گوشت در نمونه مورد بررسی می‌باشد (۲۴). علت استفاده از واکنش زنجیره ایی در این مطالعه صرف هزینه کمتر و کفایت مسئله ایمنی و کنترل کیفیت در اثبات حضور یا عدم حضور گونه مورد بررسی می‌باشد. بنابراین مطالعه حاضر موجب به صرفه بودن انجام آزمون‌های شناسایی نوع گوشت ماهی در فراورده‌های کنسروی ماهی می‌باشد. در روش‌های 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 پلیمرز اختصاصیت پرایمرهای بکار رفته در این مطالعه را اثبات کرد همچنین مشاهده باندهای مربوط به نمونه‌ها این مطلب را تایید 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 پلیمرز تکثیر شدند. نتایج نشان داد پرایمرهای R1 و F2a به‌عنوان یک پرایمر اختصاصی برای گونه ازون برون معرفی شدند. (۱۶) استفاده از DNA میتوکندریایی به دلایلی مانند تعداد کپی‌های فراوان آن در تمام سلول‌ها و پایین بودن احتمال نوترکیبی آن نسبت به سایر انواع ژن‌ها از ارجحیت برخوردار است. ضمن این که مقاومت حرارتی و تعداد کپی‌های بالای این ژن شانس بقای آن را در شرایط مختلف افزایش داده و تضمین‌کننده مقدار کافی محصول PCR در آزمایشات می‌باشد (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 اکسیداز ۱) بسیار پایدارتر از DNA سلولی بوده و در تحقیق حاضر با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ 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 و فیش بال^۲ و فلاس^۳) انجام گرفت از ژن سیتوکروم اکسیداز برای تشخیص نوع ماهی به کار رفته در محصول استفاده شد. و عدم تطابق برچسب تنها در مورد کنسرو ماهی تن مشخص شد (۱۹). Tarmizia و 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 سیتوکروم اکسیداز ۱ استفاده شد. نتایج حاصل از توالی‌های تقویت شده تنها توانست سه

1 -Sushi

2 -Meat ball

3 -Fish floss

(ژن میتوکندری) حتی زمانی که محصول تحت فرایند شدید حرارتی قرار داشته، می‌باشد. در این مطالعه روش DNA barcoding بر مبنای واکنش زنجیره ایی پلیمرز در تشخیص نوع ماهی بکار رفته در کنسروهای فراوری شده در آب نمک بهبود داده شد. نهایتاً 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 به کارگیری روش های نوین برای کشف تقلبات در مواد غذایی را بیش از پیش آشکار می‌کند.

۵- سپاسگزاری

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

۶- 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، بیات، م. بررسی تطابق مواد اولیه اصلی درج شده در برجسب همبرگرهای ممتاز شهر تهران توسط آنالیز مولکولی. نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی. ۱۳۹۳؛ ۶(۴): ۴۹-۵۶.
3. Aryaiejad S. h, Kavousi K, Fatuhi L, Mousavi Movahedi A. Detection of adulteration in meat products based on DNA sequence. *Science Cultivation*. 2017; 8(2): 143-147. (In persian)
4. Barcaccia G, Lucchin M, Cassandro M. DNA barcoding as a molecular tool to track down mislabeling and food piracy. *Diversity*. 2015; 8(1): 2-6.
5. ElShehawy S. M, Farag Z. S. Safety assessment of some imported canned fish using chemical, microbiological

نمونه یعنی فیله پولاک کوبیده، سوش ماهی قزل آلا و کنسرو ساردین را شناسایی کند (۲۲). در تحقیق حاضر نیز توانستیم با استفاده از ژن میتوکندری نتایج قابل اعتمادی به دست آوریم. فشار اسمزی 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 زنجیره ایی و برنامه کاربردی تکثیر نوع ماهی به کار رفته در کنسروهای 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 آب نمک و روغن استفاده کرد و کیفیت و کمیت DNA استخراج شده را با روش های اسپکتوفتومتری و ژل آگارز تعیین کرد و 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 به دست آمده از کنسرو روغنی ۹۵ درصد و آب نمکی ۷۵ درصد گزارش شد. (۹)

۴- نتیجه گیری

شرایط بهینه سازی شده آزمون واکنش زنجیره ایی پلیمرز، 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 به کار رفته در فناوری کنسرو اثر منفی در واکنش زنجیره ایی پلیمرز و تشخیص گونه ماهی نداشته است که بدلیل پایداری حرارتی DNA

- Chain Reaction techniques. PhDthesis, Budapest University.
14. Karimi M, Zeinali S. PCR (Translation). Authors: Mc Pherson MJ and Moller SG, *Tehran Andisheye Zohor Publication*, 84-117. [In Persian]
15. Kitpipit T, Sittichan K, d Thanakiatkrai P. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products, *Food Chemistry*. 2014; 16(3): 77-82.
16. Kolengi M. H, Farahmand H, Aghilinejad S. M, Akbarzadeh A. 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*. 2012; 1(2): 51-62.
17. Miandare H. K, Farahmand H, Akbarzadeh A, Ramezanpour S, Kaiya H, Miyazato M, Nikinma M. Developmental transcription of genes putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate. *General and Comparative Endocrinology*. 2013; 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. DNA barcoding for identification of processed tuna fish in Indonesian market. *Jurnal Teknologi*. 2016; 12(78) :2-4.
20. Parchami nejad F, Hosseini SE, Tafvizi F, Tajabadi Ebrahimi M, Sharifan A. Fraud identification in beef sausage in Tehran province using mitochondrial genes of animal species. *Food Hygiene*. 2014;4(13): 81-97.
21. Parkhemi nejad F, Hosseini S. A, Tawafi F, Tajabadi Ebrahimi M, Sharifan A. 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*. 2013; 4(1): 81-97. (In persian)
- and sensory methods. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. 2019; 45(4) : 389-394.
6. Fernandes T. J, Amaral J. S, Mafra I. DNA barcode markers applied to seafood authentication: An updated review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021; 61(22) : 3904-3935.
7. Fiorino G. M, Garino C, Arlorio M, Logrieco A. F, Losito I, Monaci L. Overview on untargeted methods to combat food frauds: a focus on fishery products. *Journal of food quality*. 2018; 13(2):46-55.
8. Ganjeh A, Monfared A, Solanzadeh N. The Effect of Different Vegetable Oils on the Sensory Evaluation and Quality of Canned Tuna Fish. *Journal of Health System Research*. 2017; 13(3):278-284.
9. Heidarzadeh M. Selection the Most Suitable Method for DNA Extraction from Muscle of Iran's Canned Tuna, *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering*. 2015; 88(9):16-20.
10. Hoseini H, Barazandegan Kh, Akhoondzadeh A, Shemshadi B, tavakoli H, Khaksar R. Determination the kind of meat content of Patties marketed in Tehran in. *Journal of Food Science and Technology*. 2009; 9(3): 95-100. [In Persian]
11. Hoseini H, Rokni N, Kaamkar A. Collagen and Related Indices of Quantitative Values Indicators in Quality Control of Heated Red Meat Products in Iran. *Journal of Food Science and Technology*. 2006; 3(4): 23-30. [In Persia]
12. Inoue J. G, Miya M, Tsukamoto K, Nishida, M. 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*. 2001; 52(4):311-320.
13. Janosi, A., 2006. Species specific detection of meat by Polymerase

22. Tarmizi D, Zainuddin Z. DNA Barcoding: A Tool To Deect Fraud In Seafood Products. *Big Data In Agriculture*. 2020; 2(1):20 -22.
23. Teletchea F, Bernillon J, Duffraisie M, Laudet V, Hänni C. Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples. *Journal of Applied Ecology*. 2008; 45(3): 967-975.
24. Ulca P, Balta H, Çagın I, Senyuva H. Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods. *Meat Science*. 2013; 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, Hebert P. D. DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society. *Biological Sciences*. 2005; 360(1462): 1847-1857.