PCR-RFLP UYGULAMALARININ SU ÜRÜNLERİNDE KULLANIM ALANLARI

Ercüment AKSAKAL, Orhan ERDOĞAN

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ, ZİRAAT FAKÜLTESİ, SU ÜRÜNLERİ BÖLÜMÜ
eaksakal@atauni.edu.tr

ÖZET

Son yıllarda su ürünleri sahasında yaygın olarak kullanılan metotlardan birisi de PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)–RFLP (Restriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizmi) uygulamalarıdır. Bu metot ile türlerin, kendilerine has genetiksel özellikleri kullanılarak ayırımları yapılabilmektedir. Taze, dondurulmuş ve hatta işlenmiş örneklerin hangi orijinden olduğu, morfolojik olarak birbirine çok benzeyen su canlılarının birbirlerinden farklılıkları tespit edilebilir. Ayrıca bu yöntem taksonomik açıdan yaşanan sıkıntıların giderilmesinde, seleksiyon ve mutasyon tespitinde de kullanılmaktadır. Bu amaçla sucul organizmadan alınan doku örneğinden total DNA izole edilir. DNA üzerinde istenilen bölge PCR yardımıyla amplifiye edilir. PCR ürünü restriksiyon enzimleri ile kesilerek sonuçlar değerlendirilir. Bu yöntem basit, hızlı, düşük maliyetli ve güvenilirdir.

Anahtar Kelimeler: Su Ürünleri, DNA, PCR, RFLP

THE USE AREAS OF PCR-RFLP APPLICATION IN AQUACULTURE

ABSTRACT

Recently, the most widely methods used in aquaculture is PCR (Polymerase Chain Reaction)-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) application. Species can be distinguished with this method by using properties of them. Aquatic species which are morphologically the most resembles each other and tissue samples, fresh and frozen can be identified. In addition to this, the method can be used in taxonomically difficulties, selection and determination of mutations. Firstly, total DNA is isolated from aquatic organism and desire region is amplified by using PCR. PCR yield is digested with restriction enzymes and results are evaluated. This method is very simples, fast, very cheap and reliable.

Keywords: Aquaculture, DNA, PCR, RFLP

Giriş

Su ürünleri, giderek büyüyen bir sektör olma yolunda farklı bilim alanlarıyla yapılan entegre çalışmalara sahne olmaktadır. Son yıllarda moleküler düzeyde yapılan çalışmaların su ürünlerinde kullanımı ile ilgili literatürlerde bir çok çalışmaya rastlanmaktadır (Akasaki *et al.,* 2006; Bardakci *et al.,* 2006). Moleküler teknikler özellikle morfolojik olarak ayırımında zorluk çekilen türlerin tespitinde rahatlıkla kullanılabilmektedir. Çünkü morfolojik olarak farklılığı ayırt edilemeyen türlerde mutlaka genetiksel farklılık vardır.

Günümüzde artık yalnızca taze ürünlerde değil dondurulmuş ve işlenmiş ürünlerin orijininin tespitinde de basit, hızlı, ucuz ve güvenilir olan metotlar tercih edilmektedir. Moleküler teknikler bu özellikleri içermesi yanında bilim alanındaki popularitesi ve kabul edilebilirlik oranının oldukça yüksek oluşu nedeniyle bir çok çalışmada tercih edilen bir yol olmuştur.

Moleküler teknikler içerisinde bu amaçla en çok kullanılan yöntemlerden birisi PCR (Polymerase chain reaction-Polimeraz Zincir reaksiyonu)-RFLP (Restriction fragment

length polymorphism-Restriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizmi) dir (Aksakal, 2005; Akasaki *et al.,* 2006; Bardakci *et al.,* 2006). Bununla birlikte ; SSCP (Single Strained Comformation Polymorphism-Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi) (Cespedes *et al.,* 1999; Rehbein, 2005), VNTR (Variable Number of Tandem Repeats-Değişken Sayılı Ardarda Tekrarlar) (Hansen *et al.,* 1999), Mikrosatelitler veya Basit Dizilim Tekrarları [SSR (Simple Sequence Repeats) ve STR (Short Tandem Repeat)] (O'Connell and Wright 1997), SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms-Tek Nükleotid Polimorfizmleri) (Tao and Boulding, 2003), STS (Sequence Tagged Sites-Dizisi Etkilenmiş Alanlar) (Naruse *et al.,* 2000), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms-Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmleri) (Kocher *et al.,* 1998), RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs-Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) (Partis and Wells 1996), DALP (Direct amplification of length polymorphism-Direkt Çoğaltılmış Uzunluk Polimorfizmi) (Desmarais *et al.,* 1999), IRSs (Internal Repeat Sequences- İç Tekrar Dizileri) (Naruse *et al.,* 2000), ESTs (Expressed sequence tags- DNA dizilerinin belirlenmesi) (Douglas *et al.,* 1999; Naruse *et al.,* 2000), gibi birçok moleküler tekniklerde kullanılmaktadır (Liu and Cordes, 2004). Ancak PCR-RFLP rutin uygulanabilirliği, düşük maliyetli oluşu ve 2-3 gün gibi kısa bir zamanda yapılabilirliği nedeniyle en çok tercih edilen yöntemlerden biridir (Hisar *et al.,* 2006).

MATERYAL VE YÖNTEM

a. DNA İzolasyonu

Örneğe ait doku veya kan örneğinden genomik DNA izole edilir. Su canlılarının poikilotherm olmaları nedeniyle kan üzerindeki çalışmalarda çıkan problemlerden dolayı DNA izolasyonunda kandan ziyade daha çok doku tercih edilmektedir (Asahida *et al.,* 1996; Kai *et al.,* 2005; Chakraborty *et al.,* 2006; Menezes *et al.,* 2006; Niwa and Aruga, 2006). Piyasada mevcut olarak satılan DNA izolasyon kitleride kullanılabilir. Ancak en çok kullanılan metotlardan birisi dokudan Fenol-Kloroform metodu ile DNA izolasyonudur (Asahida *et al.,* 1996).

İzole edilen DNA % 0,8-1'lik agaroz jelinde yürütülür ve UV görüntüleme sisteminde kontrol edilir. Temiz ve net çıkan bant değerlendirmeye alınır. İzole edilen DNA varlığının elektroforezde kontrol edilmesi yetmez. Bununla birlikte spektrofotometrik ölçümlerle hem DNA'nın varlığı tehit edilmeli hem de PCR uygulamalarında kullanılacak konsantrasyonu (200 pg/µL) karşılayacak hacim hesaplanmalıdır. Bu amaçla DNA'nın 260 ve 280 nm deki absorbans değerleri ölçülür. A_{260}/A_{280} =1,8 (> 1,5 de iyi sonuçtur) olması DNA varlığına işarettir. 1,5'in altındaki değerler ise protein varlığına işarettir ki bu istenmeyen bir durumdur.

DNA konsantrasyonun belirlenmesinde ise C (µg/ml) = A_{260} **x** seyreltme faktörü **x** 50 (Ekstriksiyon katsayısı) formülü kullanılır. Hesaplanan bu konsantrasyon bilgisi ışığında PCR da kullanılması gereken 200 pg/µL genomik DNA (genellikle 10 ng) değerini karşılayacak hacim hesaplanır. İstenmeyen sonuçlar elde edildiği takdirde izolasyon işlemleri tekrarlanmalıdır.

b. Çalışılacak gen bölgesi primerlerin seçimi ve Bağlanma Sıcaklığının (Tm) hesaplanması

Örnek üzerinde çalışılacak ilgili bölge tespit edilirken nükleer DNA (nDNA) veya mitokondriyal DNA (mtDNA) üzerindeki bölgeler kullanılır. MtDNA'nın anasal olarak kalıtılması, rekombinasyondan yoksun oluşu, mutasyonunun daha hızlı ve fazla oluşu, gibi nedenlerden dolayı nDNA'ya göre kullanımı daha avantajlı ve daha yaygındır (Brown, 1985; Wilson *et al.,* 1985; Stonekin *et al.,* 1991; Martin, 1992). Örnek üzerinde çalışılacak ilgili bölgeye (örneğin; d-loop, sitokrom-b, ND 4/5, v.s.) veya gene [örneğin; Büyümeyle ilgili Büyüme hormonu (Growth Hormone-GH) ve İnsülin benzeri büyüme

faktörü (Insulin-Like Growth Factor-IGF), Isı stres proteini (Heat Shock Protein-HSP70), detoksifikasyonla direkt ilgili Sitokrom P450 (Cytochrome P450-CYP450) gibi v.s.] ait baz dizilimi bilgilerine gen bankalarından ulaşılabilir (Anonim, 2006a). Şayet çalışılacak örneğe ait herhangi bir bilgi yok ise ya üniversal primerler ya da bu organizmaya yakın akrabalığı olan türlerin baz dizilimleri de kullanılabilir. Bu amaçla gen bankalarından alınan baz dizilimleri farklı programlar kullanılarak değerlendirilir. Bunlardan birisi Bioedit ve ClustalW programlarının kombine bir şekilde kullanılmasıdır (Anonim, 2006b; Anonim, 2006c). Mevcut baz dizilimleri Bioedit programına yapıştırılır, baz dizilimini gösteren bir format elde edilir. Bu format ClustalW programına yapıştırılır. Baz dizilimlerindeki homololog kısımları belirli bir formatta gösteren bu program ile forward ve reverse primer dizaynları yapılır ve gen bankalarından homolojisi kontrol edilir. Şayet homoloji çoğaltmak istediğimiz gen veya bölgeye değilde farklı bir gen veya bölgeye spesifik ise seçilen primerler uygun değildir, primer dizaynı yeniden yapılmalıdır.

PCR programında kullanılacak primerlerin Tm sıcaklığının doğru tespit edilmesi çok önemlidir. Firmalardan alınan primerler için önerilen Tm sıcaklıkları bazen sonuç vermeyebilir. Bu sorunu aşmak için Primer Tm sıcaklığı hesaplayan programlar kullanılabilir (Anonim, 2006b; Anonim, 2006d). Şayet buda sonuç vermezse tüm bilgiler kullanılarak Gradientli PCR'da aynı anda ± 10 °C lik bir sıcaklık aralığı taranarak en uygun Tm sıcaklığı tespit edilebilir.

c. PCR Protokolü

PCR karışımında kullanılan kimyasalların doğru konsantrasyon ve miktarda kullanımı, araştırıcılara uygun taşıma zincirinde ulaştırılmış olması çok önemlidir (Çizelge 1).

Çizelge 1. PCR Karışımı
Table 1. PCR mixture

Bileşenler	Final Konsantrasyonu	Miktar (µL)
PCR Tamponu	10-50 mM	2
dNTP karışımı	0,8-1 mM	0,5
$MgCl_2$	0,5-2,5 mM	1,5
Forward Primer	0,1-0,5 µM	0,5
Reverse Primer	0,1-0,5 µM	0,5
Taq Polimeraz	0,05 ünite/µL	0,5
DNA	200 pg/µL	2
ddH_2O (Steril)	-	7,5

PCR protokolünde amplifiye edilmek istenilen bölgenin kaç baz çifti (bp) uzunluğunda olduğu, döngü sayısının ve uzama safhasındaki sürenin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Çoğaltılmak istenilen bölge yaklaşık 100-200 bp'lik gibi kısa bir baz dizisine sahip bir bölge ise uzama süresi 20 sn kadar kısa tutulabilir. Şayet amplifiye edilecek bölge 1000 bp civarında ise bu süre 45 sn ye kadar çıkarılabilir. Döngü sayısıda aynı şekilde baz çifti uzunluğu arttıkça 25 den 40 a kadar değişen değerlerde olabilir (Çizelge 2).

Çizelge 2. PCR Protokolü

Table 2. PCR Protocol

Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
105 (Kapak sıcaklığı)	∞	-
94 (DNA'nın denatürasyonu)	3 dakika	1
94 (DNA'nın denatürasyonu)	20-60 saniye	
45-72 (Tm sıcaklığı)	20-60 saniye	25-40
72 (Uzama safhası)	20-120 saniye	
72	5-8 dakika	1
4 (Bekleme sıcaklığı)	∞	-

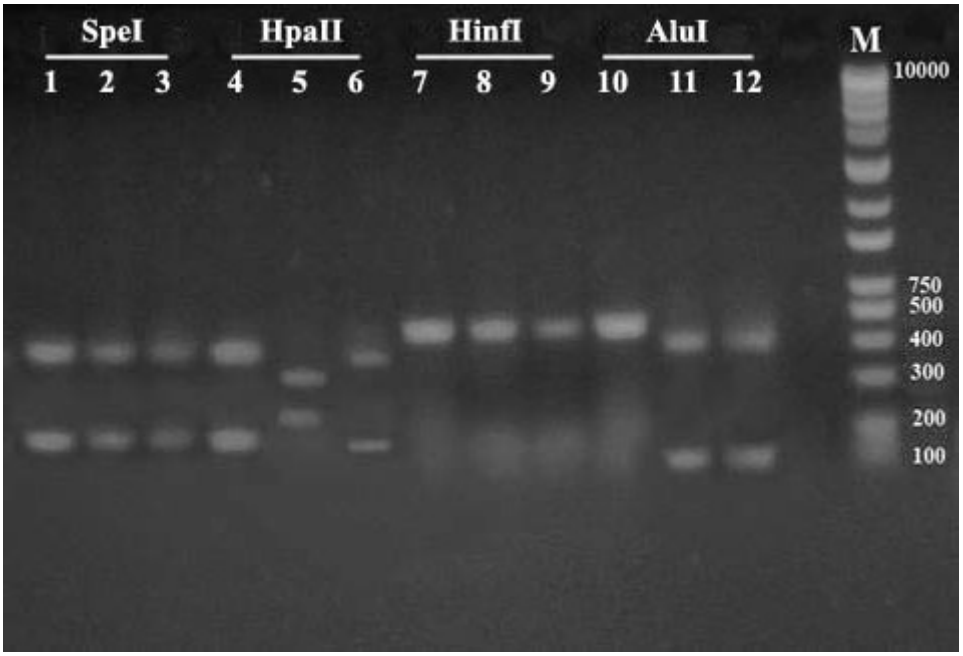
Son yıllarda kullanılan klasik PCR programlarından farklı olarak Hot start PCR (Anonim, 2007a) ve Nested PCR (Anonim, 2007b) da kullanılmaktadır. Hot start PCR, normal protokolde çift zincir DNA nın denatüre olduğu 94 °C de 3 dk lık komutun (Çizelge 2.) öncesine 80 °C de 1 dk lık bir komutun eklenip bu aşamadan sonra Taq DNA polimerazın katılması esasına dayanmaktadır. Nested PCR da ise elde edilen PCR ürününün bir DNA veya gen parçası olduğu düşünülüp, buna tekrar PCR işleminin yapılmasıdır. Elde edilen PCR ürünü % 0,8-1' lik agaroz jelinde yürütülerek deney şartları kontrol edilir.

d. RFLP Uygulamaları

RFLP, bir DNA parçasının bir RE ile kesilmesi olayıdır. RFLP tekniği, PCR metoduyla birlikte, nDNA veya mtDNA üzerindeki bölgelerde kullanılabilmektedir.

RFLP uygulamalarında kullanılabilecek 3000 civarı restrtiksiyon enzimi bulunmaktadır. Bunlardan hangilerinin kullanılacağı hakkında önceden iyi bir araştırma yapmak gerekir. Baz dizilimi belirlenmemiş örneklerde daha da dikkatli olunması gerekir. Çalışılan gen bölgesine ait farklı organizmalardan alınan baz dizilimlerine ait bilgiler (Gen Bankalarından) kullanılmalıdır. Restriksiyon enzimlerine ait bilgilerin değerlendirilmesinde kullanılan program vasıtasıyla (Anonim, 2006e) amplifiye edileceği düşünülen gen bölgesinin baz dizilimi yapıştırılarak enzimlerin kesip kesmedikleri kontrol edilir. Böylece RE seçiminde yapılacak hata minimize edilmiş olur.

RFLP uygulamalarında kullanılacak kimyasalların konsantrasyonlarını ve miktarlarını tespit ederken RE'lerin kataloglarındaki bilgiler kullanılır. Örneğin inkübasyon sıcaklığı ile ilgili olarak; TaqI (65 °C) hariç hemen hemen tüm restriksiyon enzimleri 37 °C de inkübasyona tabi tutulur. PCR ürünü, restriksiyon enzimi, tampon kullanılacak ilgili enzimin kataloğunda yer alan konsantrasyon ve miktarlarda karıştırılarak mineral yağ (reaksiyon karışımının uçmasını önleyici, birkaç damla konulur) ilavesiyle birlikte önerilen zaman dilimi kadar (genellikle 12 saat) inkübasyona bırakılır. İnkübasyon ürünü % 1,5-2'lik agaroz jelinde yürütülerek RFLP sonuçları kontrol edilir. Şekil 1. de *Capoeta spp*. üzerinde yapılan bir çalışmada mtDNA sitokrom-b geninin SpeI, HpaII, HinfI ve AluI restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen tipik bir PCR-RFLP bant profili görülmektedir (Aksakal 2005).



Şekil 1. *Capoeta capoeta capoeta* (1, 4, 7 ve 10), *Capoeta tinca* (2, 5, 8 ve 11) ve *Capoeta capoeta umbla* (3, 6, 9 ve 12) da SpeI, HpaII, HinfI ve AluI restrikyon enzimleriyle RFLP analizi (yaklaşık 400-500 bp'lik PCR ürünü). M: DNA işaretleyici (10.000 bp).
Figure 1. RFLP analysis (about 400-500 bp PCR-amplikon) of *Capoeta capoeta capoeta* (1, 4, 7 and 10), *Capoeta tinca* (2, 5, 8 and 11), *Capoeta capoeta umbla* (3, 6, 9 and 12) with SpeI, HpaII, HinfI and AluI restriction endonucleases. M: DNA marker (10.000 bp).

TARTIŞMA

Moleküler biyoloji alanında yapılan çalışmalarla genetik yapının belirlenmesine yönelik farklı bir yol izlenmiş olup mevcut gen kaynaklarının ve özelliklerinin tespiti, korunması (Anonim, 2006f) için gerekli olan verilerin tespiti daha da kolaylaşmıştır.

Biyolojik çeşitlilik ve mevcut gen kaynaklarının korunumu büyük önem arz etmektedir. Ancak bu alanla ilgili çalışmaların yetersiz oluşu son yıllarda farkedilen bir durum olmakla birlikte bu alanla ilgili çalışmalarda bir artış gözlenmektedir. Moleküler biyolojide en çok kullanılan metotlardan birisi PCR-RFLP dir. Su ürünleri sahasında RFLP tekniği ile PCR ürününün DNA sekansı yapılmadan populasyon ve türlerdeki;

- Genetik varyasyon değerleri hesaplanarak mevcut gen kaynakları tespit edilebilir, soy ağacı oluşturularak genetiksel açıdan benzerlikler hesaplanabilir.
- Morfolojik özelliklerine göre ayırımı yapılamayan su canlılarının ve ayırt edilemeyecek yaş veya büyüklükteki örneklerin ayırımını yaparak taksonomik açıdan yaşanan sıkıntılar aşılabilir.
- Taze, dondurulmuş ve hatta işlenmiş örneklerin hangi orijinden olduğu rahatlıkla tespit edilebilir.
- Ekonomik öneme sahip olmayan su canlılarına ait etlerin ekonomik öneme sahip olan su canlılara ait et olarak satılması gibi ticari sahtekarlık olayları belirlenebilir.
- Seleksiyon uygulamalarında kullanılabilir.
- Mutasyon taramalarında kullanılabilir.
- Basit, hızlı, düşük maliyetli ve güvenilir bir metottur.
- Kullanımı çok yaygındır, bilim alanındaki kabul edilebilirlik oranı ve popularitesi oldukça yüksektir.

SONUÇ

Moleküler biyoloji alanında kullanılan tekniklerin ilerlemesi ve yaygın olarak kullanılmaya başlamasıyla birlikte su ürünlerinde bu tekniklerinin kullanımı çok yaygın bir hal almıştır. Genetik verilerin değer ve önemininin bilincine varılarak, ülkemizin biyolojik çeşitlilik ve gen kaynakları varlığı açısından sahip olduğu zenginlikler unutulmamalı, bu sahada yapılacak çalışmalara daha da ağırlık verilerek mevcut gen kaynaklarınında koruma altına alınması gereklidir.

KAYNAKLAR

Akasaki, T., Yanagimoto, T., Yamakami, K., Tomonaga, H. and Sato, S., 2006. Species Identification and PCR-RFLP Analysis of Cytochrome b Gene in Cod Fish (Order Gadiformes) Products. Journal of Food Science, Vol. 71, 190-195.

Aksakal, E., 2005. Aras, Karasu ve Çoruh Havzalarından Yakalanan *Capoeta sp.*'lerin mtDNA Sitokrom-b Bölgesinde PCR-RFLP Yöntemi ile Genetik Farklılığın Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı, Erzurum, 41 s.

Anonim, 2006a. Genbank, http://www.ncbi.nlm.nih.gov 14 Haziran 2006.

Anonim, 2006b. Bioedit, http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html 01 Temmuz 2006.

Anonim, 2006c. ClustalW, http://www.ebi.ac.uk/clustalw 15 Eylül 2006.

Anonim, 2006d. Primer, http://www.ebi.ac.uk/clustalw_ 30 Ekim 2006.

Anonim, 2006e. Restriksiyon enzimleri, www.restrictionmapper.org 23 Kasım 2006.

Anonim, 2006f. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN), http://www.iucnredlist.org/ 14 Aralık 2006.

Anonim, 2007a. Hot Start PCR, http://www.pcrstation.com/hot-start-pcr/ 12 Ocak 2007.

Anonim, 2007b. Nested PCR, http://www.pcrlinks.com/variants/nested_pcr.htm 18 Ocak 2007.

Asahida, T., Kobayashi, T., Saitoh, K. and Nakayama, I., 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. Fisheries Science 62, 727–730.

Bardakci, F., Degerli, N., Ozdemir, O., and Basibuyuk, H.H., 2006. Phylogeography of the Turkish brown trout Salmo trutta L.: mitochondrial DNA PCR-RFLP variation. Journal of Fish Biology, 68, 36–55.

Brown, W.M., 1985. The mitochondrial genome of animals. In: MacIntyre, R.J. (Ed.), Molecular Evolutionary Genetics. Plenum, New York, 95-130.

Cespedes, A., Garcia, T., Carrera, E., Gonzalez, I., Fernandez, A., Hernandez, P.E., Martin, R., 1999. Application of polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) to identification of flatfish species. Journal of AOAC International, 82(4):903-7.

Chakraborty, A., Sakai, M. and Iwatsuki, Y., 2006. Museum fish specimens and molecular taxonomy: A comparative study on DNA extraction protocols and preservation techniques. J. Appl. Ichthyol. 22, 160-166.

Cocolin, L., Dagaro E., Manzano M., Lanari D. and Comi G., 2000. Rapid PCR-RFLP Method for the Identification of Marine Fish Fillets (Seabass, Seabream, Umbrine and Dentex). Journal of Food Science., 65, 8.

Desmarais, E., Lanneluc, I. and Lagnel, J., 1999. Direct amplification of length polymorphisms (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species. Nucleic Acids Research, , Vol.26, No.6, 1458-1465.

Douglas, S.E., Gallant, J.W., Bullerwell, C.E., Wolff, C., Munholland, J. and Reith, M.E., 1999. Winter Flounder Expressed Sequence Tags: Establishment of an EST Database and Identification of Novel Fish Genes. Mar. Biotechnol. 1, 458–464.

Hansen, M.M., Taggart, J.B.and Meldrup, D., 1999. Development of new VNTR markers for pike and assessment of variability at di- and tetranucleotide repeat microsatellite loci. Journal of Fish Biology, 55, 183–188.

Hisar, O., Erdogan, O., Aksakal, E., and Aras Hisar, S., 2006. Authentication of fish species using a simple PCR-RFLP method. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh 58(1), 62-65.

Kai, W., Kikuchi K., Fujita M., Suetake H., Fujiwara A., Yoshiura Y., Ototake M., Venkatesh B., Miyaki K. and Suzuki Y., 2005. A genetic linkage map for the tiger pufferfish, Takifugu rubripes. Genetics: Published Articles Ahead of Print, published on June 21.

Kocher, T.D., Lee, W.J., Sobolewska, H., Penman, D. and McAndrew, B., 1998. A Genetic Linkage Map of a Cichlid Fish, the Tilapia (Oreochromis niloticus), Genetics, 148:1225-1232.

Liu, Z.J. and Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238, Review, 1 –37.

Martin, A.P., 1992. Application of mitochondrial DNA sequence analysis of cytochrome b gene in Salmo salar. Aquaculture, 95, 225-233.

Menezes, M.R., Ikeda, M., and Taniguchi, N., 2006. Genetic variation in skipjack tuna Katsuwonus pelamis (L.) using PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA D-loop region. Journal of Fish Biology, 68 (Supplement A), 156–161.

Naruse, K., Fukamachi, S., Mitani, H., Kondo, M., Matsuoka, T., Kondo, S., Hanamura, N., Morita, Y., Hasegawa, K., Nishigaki, R., Shimada, A., Wada, H., Kusakabe, T., Suzuki, N., Kinoshita, M., Kanamori, A., Terado, T., Kimura, H., Nonaka, M., and Shima, A., 2000. A Detailed Linkage Map of Medaka, Oryzias latipes: Comparative Genomics and Genome Evolution, Genetics, 154: 1773–1784.

Niwa, K. and Aruga, Y., 2006. Identification of currently cultivated Porphyra species by PCR-RFLP analysis. Fisheries Science, 72: 143–148.

O'Connell, M. and Wright, J.M., 1997. Microsatellite DNA in fishes. Reviews in Fish Biology and Fisheries 7, 331-363.

Partis, L. and Wells, R.J., 1996. Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Molecular and Cellular Probes, Volume 10, Number 6, 435-441.

Rehbein, H., 2005. Identification of the fish species of raw or cold-smoked salmon and salmon caviar by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. Eur. Food Res. Technol., 220:625–632.

Stonekin, M., Hedgecock D., Higuchi L., Vigilant L. and Erlich H.A., 1991. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-spesific oligonucleotide probes. Am. J. Human Genet. 48, 370-382.

Tao, W.J. and Boulding, E.G., 2003. Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (Salvelinus alpinus L.). Candidate genes for growth rate QTLs in fish, Heredity, 91,60–69.

Wilson, A.C., Cann R.L., Carr S.M., George Jr.M., Gyllensten U.B., Helm-Bychowski K.M., Higuchi R.G., Palumbi S.R., Prager E.M., Sage R.D. and Stoneking M., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biol. J. Linn. Soc., 26, 375-400.