

# Identificación de Moluscos de Interés Comercial con Análisis de DNA en Yucatán, México

LUIS ALFONSO RODRÍGUEZ GIL, YIGALL RODRÍGUEZ ROMERO, CARLOS REYES SOSA,  
JORGE TELLO CETINA y ROBERTO ZAMORA BUSTILLOS

*Instituto Tecnológico de Mérida*

*División de Estudios de Posgrado, Laboratorio de Aprovechamiento de Recursos Marinos.*

*Km-5 Carretera Mérida, Progreso. A.P. 9-11*

*C.P. 97118 Mérida, Yucatán, México*

## RESUMEN

La identificación de especies de interés comercial está tomando mucha importancia en la industria agroalimentaria tanto para que la empresa pueda controlar sus materias primas como para evitar fraudes en el etiquetado de productos procesados. La autenticación de los productos comercializados es un grave problema desde el momento en que se pierden las características externas en el procesamiento del producto haciendo imposible la identificación de la especie de origen. Por lo que, la finalidad del presente trabajo consistió en desarrollar la técnica basada en el Polimorfismos de Fragmentos de Restricción del ADN (RFLP), utilizando enzimas endonucleasas de restricción para identificar especies de moluscos de interés comercial en el estado de Yucatán. Los resultados indican que la enzima de restricción Sau3AI fue la única endonucleasa polimórfica que cortó el ADN de las especies en varios fragmentos, obteniéndose bandas que las diferencian entre si. La especie *Fasciolaria tulipa* presentó 4 bandas, *Pleuroploca gigantea* presentó 2 bandas y las especies del Género *Strombus gigas* y *S. costatus* presentaron dos bandas iguales lo que no permitió diferenciar a estas dos especies.

PALABRAS CLAVES: PCR, RFLP, enzimas de restricción

## Commercial Mollusk Identification Using DNA Análisis in Yucatán, Mexico

There has been increasing attention in the seafood industry to properly identify seafood products to avoid fraudulent labeling; new Technologies have placed a major role in that effort. Commercial product authentication is a serious problem since the external characteristics are lost due to processing, thus making it impossible to identify species origin. This study consisted of developing a technique based on Polymorphisms from DNA Restriction Fragments (RFLP), using endonucleasa restriction enzymes to identify mollusks of commercial importance in the state of Yucatan. The results indicated that restriction enzyme Sau3AI was the only capable polymorph endonucleasa to cut, detect, and characterize DNA from the species into several fragments, obtaining strands that are different from each other. The specie *Fasciolaria tulipa* showed 4 strands, *Pleuroploca gigantea* showed two strands and the species from the Genre *Strombus gigas* and *S. costatus* showed two equal strands which could not be differentiated between the two species.

KEY WORDS: PCR, RFLP, restriction enzymes

## INTRODUCCION

El certificado de origen de muchos alimentos es de vital importancia para un comercio legal de los productos y principalmente de los alimentos marinos que han sido procesados, ya que no se observa su morfología y por lo tanto, no pueden ser clasificados taxonómicamente. En nuestro medio en la Península de Yucatán es costumbre ingerir alimentos de origen marino frescos como: ceviches mixtos de moluscos y de filetes de pescado; Procesados como: la raya pinta, el tiburón-cazón y el bacalao Noruego. También es fácil confundir el origen de los caracoles marinos del Género de los *Strombus* y de los Género *Fasciolaria* como lo es el *Fasciolaria tulipa* y del Género *Pleuroploca* como lo es el *Pleuroploca gigantea* en cuanto a su autenticidad. Por lo que, en muchas ocasiones se duda de su auténtico origen. Ante esta situación, el enfoque de este trabajo es usar la ampliación de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) de seleccionadas regiones de la mitocondria como el gen 16S rRNA, seguido del análisis de los sitios restricción de fragmentos de DNA amplificados para diferenciar cuatro caracoles marinos dos del mismo Género como son el *Strombus gigas* y el *S.*

*costatus*. Y otros dos caracoles uno del Género *Fasciolaria* denominado *Fasciolaria tulipa* y el otro del Género *Pleuroploca gigantea*. Los dos primeros *Strombus gigas* y *S. costatus* por su similitud en su textura y color blanco son muy fáciles de confundir a pesar que tiene diferentes precios. La misma situación se presenta con los caracoles *Fasciolaria tulipa* y *Pleuroploca gigantea* que son muy fáciles de confundir a pesar que tiene diferentes precios El Caracol rosado *Strombus gigas*, el caracol blanco *S. costatus*, el caracol campechano *Fasciolaria tulipa* y el caracol *Pleuroploca gigantea* están siendo diferenciados por ampliación de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de unos 950 pares de bases (bp) de fragmentos conservados de la mitocondria del gen 16S rRNA, seguido por los análisis de los sitios de restricción con la enzimas endonucleasas siguientes: la Hind III, Taq I, Alu I, y Sau3AI. Se espera tener que las enzimas de restricción mencionadas rindan fragmentos diferentes de pares de bases con los productos de PCR para poder diferenciar a las cuatro especies. Estos marcadores genéticos pudieran ser una herramienta de mucho uso para detectar fraudulencia en la sustitución del *Strombus gigas* por *Strombus costatus* o de *Pleuroploca gigantea* por

*Fasciolaria tulipa* que tienen similaridad en textura y color pero difieren en precio.

Para poder identificarlos se han estado usando diferentes técnicas como la electroforesis, la cromatografía o técnicas inmunológicas, usando las proteínas solubles del músculo de las especies a identificar.

Para identificar peces y moluscos se han usado frecuentemente proteínas solubles de los músculos utilizando la electroforesis (LeBlanc y LeBlanc 1994, Gallardo *et al.* 1995), cromatografía (Osman *et al.* 1987, Armstrong *et al.* 1992 o técnicas inmunológicas (Verrez-Bagnis y Escruche-Roberto 1993). Sin embargo, las desventajas de tales métodos son su dependencia sobre la caracterización segura de las proteínas. Muchas proteínas son termolábiles, pierden su actividad biológica rápidamente, son sujetos a modificaciones en diferentes tipos de células y su presencia está en función de las células a hacer examinadas.

Por lo que, es preferible analizar el DNA en vez de las proteínas para identificar el origen de las especies (Bartlett y Davison 1992). La mayoría de los análisis de DNA para identificar las especies de peces y moluscos se han basado sobre la amplificación de las regiones conservadas mitocondrial de DNA (Ram *et al.* 1996, Carrera *et al.* 1998, Céspedes *et al.* 1998). Los genes mitocondriales son altamente conservados entre vertebrados e invertebrados, incluido en los peces (Moritz *et al.* 1987, Kocher *et al.* 1989) y la transmisión del material mtDNA es usualmente maternal y no hay recombinación.

Dos genes ribosomales de RNA (rRNA) son encontradas en los animales en el genoma mitocondrial: el pequeño 12S (aproximadamente 819 - 935 bp en vertebrados) y el gen grande rRNA 16S aproximadamente de 1571 - 1649 bp. Por lo que, el uso de la ampliación la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) de regiones seleccionadas como el 16S rRNA seguido del análisis del sitio de restricción de los fragmentos de DNA amplificados servirá para diferenciar a los cuatro caracoles marinos *Strombus gigas*, *S. costatus*, *Fasciolaria tulipa* y *Pleuroploca gigantea* mismos que son consumidos en nuestra región ya sea frescos o procesados.

### MÉTODOS GENÉTICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

En la actualidad existe un importante número de herramientas metodológicas que han sido utilizadas para la identificación de moluscos y peces usando las proteínas solubles del músculo, como la electroforesis, cromatografía, técnicas inmunológicas y la determinación de DNA.

#### Electroforesis de Proteína

Con el advenimiento de la electroforesis de proteínas a fines de los años de 1960 se pudieron afrontar los problemas en la discriminación de unidades biológicas y la evaluación de la variabilidad genética utilizando productos directos de un gen. No obstante, en ocasiones las isoenzi-

mas no muestran suficiente variabilidad para resolver ciertos problemas en la evaluación de la diversidad genética (Skibinski 1994). Esto último representa una limitante para su empleo, por ello, y en la medida de lo posible, es aconsejable utilizar una gran parte de los marcadores disponibles para evaluar la variabilidad genética.

#### Análisis del ADN

Los esfuerzos científicos fueron encaminados a la búsqueda de marcadores cada vez más variables o polimorfos. En los inicios de la década de 1980 surgen nuevos métodos para el análisis directo del gen. Un hallazgo que permitió el auge en la utilización de la variabilidad del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) es la existencia de un ADN extranuclear, el ADN mitocondrial (ADNmt), que reveló altos niveles de diversidad nucleotídica a nivel de especie y subpoblaciones (Avisé y Larsman 1983, Brown 1985). Otro ADN extranuclear presente en plantas es el ADN cloroplástico (ADNcl) (Chase y Palmer 1989).

El ADN que no codifican para productos proteicos se encuentra exento de presiones selectivas, evoluciona más rápidamente que otras regiones, volviéndolo interesante para el análisis de la heterogeneidad entre unidades biológicas inferiores a la especie, ya que el número de caracteres diagnósticos aumenta de manera exponencial (Kimura 1990).

La utilización de ADN mitocondrial (ADNmt) como herramienta genética en estudios poblacionales se realiza por medio del método conocido como Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción o "RFLP" por sus siglas en inglés. Esto implica el uso de enzimas de restricción que reconocen una corta secuencia específicas de bases (cuatro, cinco o seis) del ADN y corta la cadena en un sitio de la secuencia específica conocido como palíndromo. Las enzimas de restricción que reconocen secuencias grandes producirán un menor número de fragmentos, ya que estas secuencias estarán presentes en un menor número de veces en el genoma. Típicamente, las enzimas de restricción que reconocen una secuencia de seis bases producirán de uno a ocho fragmentos de ADNmt, mientras que las que reconocen cuatro bases producirán de tres a seis veces más fragmentos que las hexonucleasas (Ferris y Berg 1987, Tegelstrom 1992). De esta forma, utilizando varios tipos de enzimas, se obtiene una serie de fragmentos de diferentes tamaños que se pueden separar por electroforesis. Obviamente, el número de fragmentos producidos será equivalente al número de sitios de reconocimiento que tenga una molécula de ADNmt de un organismo dado (Avisé y Lansman 1983). Esto complementa la baja resolución de la técnica de proteína. Dada la especificidad de las endonucleasas, cualquier cambio a nivel de bases dentro de la secuencia de reconocimiento, es decir una mutación puntual, es detectado, produciéndose, una pérdida o ganancia para la restricción enzimática.

Comparando la ubicación de los sitios de restricción,

es posible obtener el grado de similitud o divergencia genética entre especies relacionadas o entre las diferentes poblaciones de una especie.

El ADN mitocondrial es una molécula circular de 15,000 a 18,000 pares de bases (pb) de longitud en los vertebrados y codifica para dos ARN ribosomales, 22 ARN de transferencia, 13 polipéptidos y la región de replicación (Ferris y Berg 1987). Aunque el ADNmt contribuye con menos del 1% del genoma total de cada célula, posee dos características importantes: una tasa de evolución rápida y se hereda por vía materna (Brown *et al.* 1979). El ADNmt evoluciona de 5 - 10 veces más rápido que el ADN nuclear proporcionando por lo tanto una visión amplificada de las diferencias entre poblaciones. Esta alta tasa evolutiva se ha atribuido a la combinación de dos factores: una elevada tasa de mutación y una elevada tasa de fijación de esas mutaciones. Esto puede ser favorecido por una deficiencia, o inclusive carencia, de una efectiva función editora en el complejo de replicación y de un sistema reparador eficiente (Brown *et al.* 1979).

La utilización del ADNmt se vio enriquecida con la técnica de la Reacción en Cadena de Polimerasa ("PCR"), el cual permite amplificar regiones altamente variables del ADN mt tales como 12S RNA, 16S RNA, Citocromo Oxidasa, Citocromo b, región Control "D - loop". Para estos genes mitocondriales diversos autores han diseñado iniciadores ("Primer") universales que permiten utilizarlos para amplificar ADNmt de diferentes taxones (Hillis *et al.* 1996).

Las etapas para la obtención de RFLP's son: extracción de ADN, amplificación por "PCR" del fragmento de interés, visualización del ADN, digestión con enzimas de restricción.

Por esta razón el objetivo de este trabajo es el de usar la ampliación de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) de la región seleccionada de la mitocondria como es el gen 16S rRNA, seguido del análisis de los sitios restricción de fragmentos de DNA amplificados para diferenciar a los caracoles como el rosado *Strombus gigas*, el caracol blanco *Strombus costatus*, el caracol campechano *Fasciolaria tulipa* y el caracol chapel *Pleuroploca gigantea* para certificar la autenticidad del origen de la parte comestible (músculos del pie) en fresco y procesados.

## MATERIALES Y METODOS

### Area de Muestreo

La colecta de los caracoles: *Strombus gigas* (Linnaeus 1758), *Strombus costatus* (Gmelin 1791), *Fasciolaria tulipa* (Linnaeus 1758) y *Pleuroploca gigantea* (Kiener 1840). se efectuó en el Parque Nacional Arrecife Alacranes. Este está ubicado a 72 millas náuticas (130 km) de la costa Norte de la Península de Yucatán entre los 22°37' y 22°22' Latitud Norte y los 89°33' y 89°48' Latitud Oeste.

### Extracción del ADN Total

Con una hoja de bisturí se dispuso a cortar una sección de tejido localizando la parte más gruesa del tejido y cortando una sección de 2 x 2 cm. De esta sección obtenida se corta de nuevo obteniendo un pequeño fragmento del centro se tritura esta sección obtenida con el fin de romper o destruir la mayor cantidad posible de células. Se deposita la sección triturada en un tubo Eppendorf añadiéndole 180 µL de Buffer ATL, este Buffer tiene la función de lizar las células, además de amortiguar el pH, inmediatamente después se le agrega 40 µL de Proteinasa, se homogeniza la muestra y se somete a un baño maría a 55°C de 1 a 3 horas, homogenizando durante el baño maría cada 15 minutos.

Inmediatamente se le agrega Buffer AL a 200 µL, a una temperatura de 70° C durante 10 minutos homogenizando cada cinco minutos. Al finalizar el baño maría se agregan a la muestra 200 µl de alcohol absoluto homogenizando y centrifugando a 8000 rpm durante 1 minuto. Después de la centrifugación se obtienen un precipitado el cual se toma únicamente el líquido y se deposita en microcolumnas (las microcolumnas utilizadas son: DNEASY mini columna almacenada a 15° - 25°C) que son centrifugadas a 8000 rpm durante uno minuto. Se agrega Buffer AW1 500 µL y se centrifuga por un minuto, se agrega Buffer AW2 500 µL y se centrifugan durante tres minutos, finalmente se agrega Buffer AE a 200 µL y centrifugan por un minuto.

En este último paso teóricamente se obtuvo el DNA siguiendo con la técnica de electroforesis.

Para la extracción del ADN total del tejido se utilizó un kit denominado "Dneasy Tissue" marca (Qiagen). La concentración del ADN total se realizó por comparación de bandas en geles de agarosa al 0.8% y teñidos con bromuro de etidio.

### Reacción en Cadena de Polimerasa

La utilización de los siguientes "primers" 16S-1: 5' CAC CAC AAC ATA CAT ACC C-3' (19 mer) y 16S-2: 5'-CGT TAA ACC CAT AGT CAC AG-3' (20 mer) sintetizados por la compañía (ISOGEN, Utrecht) los cuales sirvieron para amplificar un fragmento de la región 16S RNA ribosomal de genoma mitocondrial. La amplificación se realizó con un termociclador Perkin-Elmer (Gene Amp "PCR" System 2400). La concentración de los componentes para una reacción 1X con un volumen total de 50 µL. Se muestra en la tabla siguiente.

La amplificación de este fragmento de ADN se realizó siguiendo los protocolos reportados por Hillis *et al.* (1996) incluyendo un total de 35 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos (Tabla 2).

### Condiciones de Electroforesis

La migración de los productos de "PCR", se realizaron en geles de agarosa al 0.8 % en una cámara horizontal con Buffer TAE 1X a 60 miliAmperes durante 90 minutos. Los fragmentos de ADN fueron estimados con un marcador de peso molecular (50 pb DNA Step lader, promega), la tinción se llevó a cabo con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV.

**Tabla 1.** Componentes para llevar a cabo la amplificación de "PCR".

Componente	Marca	Concentración	Cantidad
Mg Cl <sub>2</sub>	Promega	25 mM	3.0 µL
Buffer	Promega	10 X	5.0 µL
Primer I	Gibco	20 mM	2.5 µL
Primer II	Gibco	20 mM	2.5 µL
DNTP mix	Promega	10 mM	1.0 µL
Taq DNA polimerasa	Promega	5 u/µL	0.4 µL
Agua ultrapura estéril libre de nucleasas	Promega		32.6 µL
ADN MOLDE			3.0 µL
		Total	50.0 µL

**Tabla 2.** Características en temperatura y tiempo del "PCR".

Etapa	Temperatura y tiempo
Desnaturalización de ADN	94 °C por 2 minutos
	94 °C por 30 segundos
Alineación de las cadenas de ADN	48 °C por 30 segundos
Extensión de las cadenas de ADN	72 °C por 1 minuto
	72 °C por 7 segundos

### Digestión de los Productos de "PCR"

La búsqueda de polimorfismo en el fragmento amplificado, se realizó con cuatro enzimas de restricción la Hind III, Taq I, Alu I, y Sau3AI siguiendo las especificaciones proporcionadas por el fabricante (Promega).

La digestión de todas las muestras fueron hechas en un volumen total de 20µL. Con 2 µL de buffer (proporcionados con las enzimas), 0.2 µL de "Bovine Serum Albumin" (B.S.A), 0.5 µL de enzima (10 u/µL), 2.0 µL del producto "PCR" y 15.3 µL de agua estéril libre de nucleasas. La incubación se realizó en un baño maría programable a 55°C durante 1 a 3 horas, con excepción para la enzima Taq I que se realizó a 70°C durante 10 minutos.

Posteriormente se realizó la visualización de los

perfiles de restricción, esto se llevó a cabo en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio. En los geles se observaron patrones de bandas correspondientes a los diferentes fragmentos del ADN obtenido de la digestión. Dichos patrones de bandas se denominan haplotipos.

Si el patrón de bandas obtenido era igual para todos los individuos esta enzima se consideró monomórfica es decir la enzima no encontró sitio de corte en el fragmento y por lo tanto, no informativa para el objetivo de diferenciar los caracoles

Aquellas enzimas que arrojaron patrones de bandas diferentes entre los individuos se consideran polimórficas, y por lo tanto, útiles para la diferenciación de especies de caracol rosado *Strombus gigas*, blanco *S. costatus*, *Fasciolaria tulipa* y chacpel *Pleuroploca gigantea*, respectivamente.

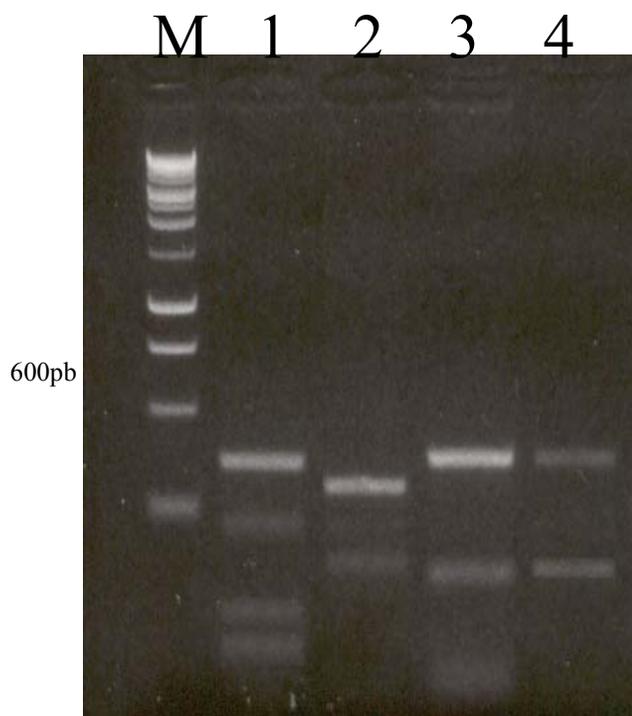
### RESULTADOS

Las enzimas de restricción Hind III, Taq I, Alu I, resultaron ser monomórficas, es decir cortaron el ADN en dos fragmentos y se obtuvieron dos bandas, pero estas bandas fueron iguales para todas las especies. Mientras la enzima de restricción Sau3AI, fue la única endonucleasa polimórfica, ya corto al ADN de las diferentes especies en varios fragmentos, obteniéndose de esta manera bandas que diferencian a las especies. La especie *Fasciolaria tulipa* en el carril 1 presentó 4 bandas, la especie *Pleuroploca gigantea* carril 2 presentó 2 bandas y las especies del Género *Strombus* presentaron dos bandas iguales (Figura 1). Para el Género *Strombus* la enzima Sau3AI resultó ser monomórfica no pudiendo diferenciar a estas dos especies. Los resultados que proporciona este estudio son importantes para hacer estudios futuros sobre la conservación de las poblaciones de estas especies de interés comercial y para estudios evolutivos.

### DISCUSIÓN

#### Impacto Social y Económico

El impacto social es importante, porque, se puede detectar el origen en los alimentos en este caso especial de los caracoles marinos *Strombus gigas*, *Strombus costatus*, *Fasciolaria tulipa* y *Pleuroploca gigantea* ya sea frescos o se procesados una vez que estos han sido desconchados, ya que no se puede averiguar a que géneros y especies pertenecen. En esto se basa la importancia de usar las enzimas de restricción como una herramienta importante haciendo uso de el ADN mitocondrial. En cuanto a lo económico, los análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del ADN amplificado por PCR (PCR-RFLP) del gen 16S rRNA es mucho más fácil y menos costoso que los estudios convencionales del ADN nuclear o el uso de otras técnicas que usan como proteína soluble del músculo como la electroforesis, cromatografía y técnicas inmunológicas.



**Figura 2.** Perfiles de restricción de los productos de PCR en genes 16S rRNA de los caracoles marinos: *Fasciolaria tulipa*, *Pleuroploca gigantea*, *Strombus gigas* y *S. costatus* donde la enzima de restricción SauAI fue la única que corto el ADN en varios fragmentos. Donde M = Estándar de pares de bases, 1. *Fasciolaria tulipa* presentó 4 bandas, 2. *Pleuroploca gigantea* 2 bandas, 3. *Strombus gigas* 2 bandas y 4. *S. costatus* 2 bandas.

### CONCLUSIONES

Esta metodología ha sido usada con seguridad con productos frescos y procesados, una vez que el grado de variación intraespecífica es conocida, sin embargo, su aplicación a productos enlatados puede ser limitado si en el procesamiento de los moluscos el DNA es notablemente dañado.

Esta herramienta genética de contar con el ADN mitocondrial (ADNmt) haciendo uso del método de la reacción en cadena de la polimerasa (ampliación del DNA) acoplado al análisis del polimorfismo de longitudes de los fragmentos de longitud ("PCR-RFLP"), implica el uso de enzimas de restricción que reconoce una corta secuencias específica de pares de bases (4, 5, 6 del ADN) y cortan la cadena en un sitio de secuencia específica.

Por lo que, se obtuvo como conclusión que estos marcadores genéticos son una herramienta para detectar fraudulencia en la sustitución del caracol marino *Strombus gigas* por del caracol marino *Strombus costatus* de igual textura y color pero de menor precio o por el caracol *Pleuroploca gigantea* por el de *Fasciolaria tulipa* también de igual textura y color pero de menor precio.

La enzima de restricción Sau3AI resultó ser la única

de las otras tres enzimas, que puede ser usada como un marcador genético y una herramienta molecular para identificar a los Géneros y a las especies que pertenecen como *Fasciolaria tulipa*, *Pleuroploca gigantea* y a ambos *Strombus gigas* y *S. costatus* que son del mismo Género, a pesar de no poder identificar a las especies del Género *Strombus* por separado.

### LITERATURA CITADA

- Armstrong, S.G., D.N. Leach, and S.G. Wyllie. 1992. The use of HPLC protein profiles in fish species identification. *Food Chemistry* **44**:147-155.
- Awise, J.C. and R.A. Lansman. 1983. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations on higher animals. Pages 147-164 in: M. Nei and R.K. Koehn (eds.) *Evolution of Genes and Proteins*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts USA.
- Bartlett, S.E. and W.S. Davidson. FINS (forensically informative nucleotide sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Biotechniques* **12**(3):408-11.
- Billington, N. and P.D.N. Herbert. 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science* **48**:80-94.
- Brown, W.M., M. George, and A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **76**:1967-1971.
- Brown, W.M. 1985. The mitochondrial genome of animals. Pages 95-130 in: R.J. MacIntyre (ed.) *Evolutionary Genetics*. Plenum, New York, New York USA.
- Carrera, E., T. García, A. Céspedes, I. González, A. Fernández, P.E. Hernández, and R. Martín. 1999. Salmon and Trout Analysis by PCR-RFLP for Identity Authentication. *Journal of Food Science* **64**(3):410-413.
- Céspedes, A., T. García, I. González, B. Sanz, P.E. Hernández, and R. Martín. 1998. Identification of flatfish species using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction analysis of the cytochrome b gene. *Journal of Food Science* **63**:206-209.
- Chase, M.W. and J.D. Palmer. 1989. Chloroplast DNA systematic of lipid monocolts: resources, feasibility, and an example from the Orchidaceae. *American Journal of Botany* **76**:1720-1730.
- DeSalle, R., A.K. Williams, and M. George. 1993. Isolation and characterization of animal mitochondrial DNA. *Methods in Enzymology* **224**:176-203.
- Ferris, S.D. and W.J. Berg. 1987. The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and fishery management. Pages 277-300 in: B. Ryman y F. Utter (eds.) *Population Genetics and Fishery Management*. University of Washington Press, Seattle, Washington USA.
- Gallardo, J.M., C.G. Sotelo, C. Pifeiro, and R.I. Perez-Martin. 1995. Use of capillary zone electrophoresis for fish species identification. differentiation of flatfish species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**:1238-1244.
- Kocher, T.D. and W.J. Lee. 1998. Genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* **148**:1225-1232.
- LeBlanc, E.L., S. Singh, and R.J. LeBlanc. 1994. Capillary zone electrophoresis of fish muscle sarcoplasmic proteins. *Journal of Food Science* **59**(6):1267-1270.
- Meyer, R., C. Höfelein, J. Lüthy, and U. Candrian. 1995. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *Journal of JAOAC International* **6**:1542-1551.
- Moritz, C., T.E. Dowling, and W.M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecological Systematics* **18**:269-292.
- Osman, M.A., S.H. Ashoor, and P.C. Marsh. 1987. Liquid chromatographic identification of common fish species. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry* **70**(4):618-625.

- Ram, J.L., Ram, M.L., and Baidoun, F 1996. Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**:2460-2467.
- Rehbein, H., G. Kress, and T. Schmidt. 1997. Application of PCR-SSCP to species identification of fishery products. *Journal of Food and Agriculture* **74**: 35-41.
- Skibinski, D.O.F. 1994. The potential of DNA techniques in the population and evolutionary genetics of aquatic invertebrates. Pages 177-199 in: A.R. Beaumont (ed.) *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman & Hall, London, UK.
- Slote, C.G., C. Piñeiro, J.M. Gallardo, and R.I. Pérez-Martín. 1993. Fish species identification in seafood product. *Trends in Food Science Technology* **4**:395-401.
- Tegelstrom, H. 1992. Detection of mitochondrial DNA Fragments. Pages 89-113 in: A.R. Hoelzel (ed.) *Molecular Genetics Analysis in Populations. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, England.
- Unsel, M., B. Beyermann, P. Brandt, and R. Hiesel. 1995. Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR Methods and Application* **4**:241-243.
- Verrez-Bagnis V. and I. Escriche-roberto I. 1993. The performance of ELISA and dot-blot methods for the detection of crab flesh in heated and sterilized surimi-based products. *Journal of Food and Agriculture* **63** (4):445-449.