

## KANATLI HAYVAN ETLERİNDE ET ORİJİNİNİN RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) YÖNTEMİYLE TESPİTİ

Ali Arslan<sup>1</sup>@ O. İrfan İlhak<sup>1</sup> Ö. Pelin Bozkurt<sup>1</sup> Pınar Şeker<sup>1</sup>

### Identification of Poultry Meat Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Technique

**Özet :** Bu çalışmada, 2 farklı, 10 bazlık oligonükleotid primer (primer 1- CAA TCG CCG T, Primer 2- CCA CAG CAG T) kullanılarak, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) yöntemiyle 8 farklı tür kanatlı hayvan etinde (tavuk, hindi, martı, devekuşu, ördek, kaz, bıldırcın, keklik) tür tespiti yapıldı. PCR işlemi 94 °C'de 45 sn, 36 °C'de 45 sn, 72 °C'de 60 sn olmak üzere toplam 45 siktusta gerçekleştirildi. Sonuç olarak, RAPD yöntemi ile kanatlı hayvan etlerinde tür tespitinin yapılabileceği, böylece et türlerinin orijini tespit edilerek tüketicinin aldatılması engelleneceği gibi toplumun tüketmediği hayvan etlerinin daha kolay, hızlı ve güvenilir bir şekilde saptanabileceği tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Kanatlı Etleri, Tür Tayini, RAPD

**Summary :** In this study, meats of 8 poultry species (chicken, turkey, gull, ostrich, duck, goose, quail, partridge) were identified by random amplified polymorphic DNA (RAPD) method using two different primers of 10 nucleotides each (primer 1- CAA TCG CCG T, primer 2- CCA CAG CAG T). A 45-cycilus PCR (each cycle; 45 s at 94°C, 45 s at 36°C, and 60 s at 72°C) was performed for identification of poultry flesh. Results concluded that RAPD is a practical, rapid, and reliable method that can be used for identification of poultry meats in control of adulteration of consumers from exposure to the flesh that the society normally does not consume.

**Key Words:** Poultry Meat, Identification, RAPD

#### Giriş

Özellikle az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde hayvansal protein yetersizliğine bağlı olarak et ve ürünleri yüksek fiyatla satılmaktadır. Buna bağlı olarak gelir düzeyi düşük tüketicilerin ucuz et ve ürünlerine olan talepleri artmaktadır. Bazı işletmeciler bunu bir fırsat bilip daha çok ekonomik kazanç elde etmek amacıyla çok ucuz bir şekilde sağladıkları toplumun tüketmediği hayvan etlerini doğrudan veya et ürünlerine karıştırarak satışa sunabilmektedirler (İlhak ve Arslan, 2003; İlhak, 2004; Girish ve ark., 2004). Toplumun tüketmediği hayvan etleri kullanılarak hileli üretimler yapılmakta, buna bağlı olarak gıda kontrol hizmetleri zorlaşmakta ve halk sağlığı önemli ölçüde tehdit edilmektedir. Ülkemizde de boyutları belli olmamakla birlikte böyle etlerin doğrudan veya ürüne dönüştürülerek satışa sunulduğu zaman zaman görsel ve yazılı basında vurgulanmaktadır (Kamber, 1993; İlhak, 2004). Buna bağlı olarak türe özgü zoonoz ve zoonoz olmayan bir çok has-

talık yayılmakta, tüketici sağlığı riske edilmekte, tüketicinin dini inançları hiçe sayılmakta ve ekonomik açıdan da önemli kayıplar olmaktadır (Koh ve ark., 1998; Verkaar ve ark., 2002; İlhak ve Arslan, 2003).

Kırmızı etlerde tür tayininde duysal niteliklere, anatomik farklılıklara, kılın histolojik farklılığına, doku yağlarının özelliklerine ve etlerdeki glikojen miktarına dayanan yöntemlerin yanısıra immunolojik, elektroforetik ve DNA hibridizasyon yöntemleri de kullanılmıştır (Wintero ve ark., 1990; Ebbehøj ve Thomsen, 1991a, 1991b; Della ve ark., 1997; Buntjer ve Lenstra, 1998; Zhang ve ark., 1999; Brodmann ve Moor, 2003; Saez ve ark., 2004). Ancak immunolojik yöntemlerle kanatlı etlerinde tür tayininin güvenilir olmadığı belirtilmiştir (Hird ve ark., 2003). Bununla birlikte kanatlı etlerinde morfolojik özelliklere ve duysal farklılıklara bakarak tür tayininin yapılabilmesi neredeyse imkansızdır. Bu yöntemlerde karşılaşılan güçlükler ve bazı dezavantajlar nedeniyle kanatlı et ve et ürünlerinin orijininin tespit edilmesi için doğru sonuç

veren, basit ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir (Rodriquer ve ark., 2003).

Moleküler biyolojide son yıllarda kaydedilen hızlı gelişmeler, özellikle DNA'nın in vitro olarak çok kısa sürede çoğaltılmasını sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (Polymerase Chain Reaction=PCR) geliştirilmesi bitki, bakteri ve hayvan türlerinin orijininin tespit edilmesinde büyük kolaylık sağlamış ve başarıyla kullanılmıştır (Lee ve Chang, 1994; Meyer ve ark.,1995; Fach ve ark., 1999; Lin ve Tsen, 1999; Partis ve ark., 2000; Aguado ve ark., 2001; Fabio ve ark., 2002; Verkaar ve ark., 2002; Alves ve ark., 2002). DNA ip-likçikleri, dört temel bazın (Adenin, Timin, Guanin, Sitozin) değişik sırada yan yana ve karşılıklı dizilmesinden oluşur, bunlar canlılar için çok önemli olan genetik bilgileri taşırlar ve bu bilgiler bazların diziliş sırası ile yakından ilgilidir. Farklı türlerin DNA'ları birbirine uymaz. Bu durum türler arasında genetik farklılıkları oluşturur (Arda, 1995). PCR tekniğinde DNA'nın bu özelliklerinden yararlanılarak tür ayırımı yapılmaktadır. Bu amaçla PCR ile PCR tabanlı olan Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ve Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemleriyle et türlerinin tespiti yapılmıştır (Meyer ve ark., 1994; Appa Rao ve ark.,1996; Matsunaga ve ark., 1999; Lockley ve Bardsley, 2002; Sawyer ve ark., 2003; İlhak ve Arslan, 2003; Sasazaki ve ark., 2004). Hopwood ve ark. (1999), PCR yöntemi ile 80, 100 ve 120 °C'de 30 dakika ısı işlem uygulanmış kanatlı etlerinde tür tespitini yapmışlardır. Başka bir çalışmada (Weder ve ark., 2001), yine PCR yöntemiyle 26 farklı balık ve 17 farklı hayvan türü tespit edilmiştir.

RAPD, kullanılan kısa oligonükleotid primerlerin hedef DNA dizisinde birden fazla yere bağlanarak bu bölgeleri çoğaltması ve çoğaltılan DNA segmentlerinin jel elektroforezde yürütülmesi işlemidir. Jel elektroforezde oluşan DNA bantları karşılaştırılarak türlerin ayırımı yapılmaktadır. Bu yöntem bitki, bakteri ve hayvan türlerinin tespitinde başarıyla kullanılmaktadır (Welsh ve McClelland 1990; Çetinkaya,1998).

Bu çalışmada, iki farklı 10 bazlık oligonükleotid primer kullanılarak RAPD yöntemi ile kanatlı etlerinde tür tespiti yapıldı. RAPD yönteminin toplumun tükettiği ve tüketmediği kanatlı etlerinin tür tespitinde rutin bir analiz yöntemi olarak kullanılmasının avantaj ve dezavantajları tespit edildi.

## Materyal ve Metot

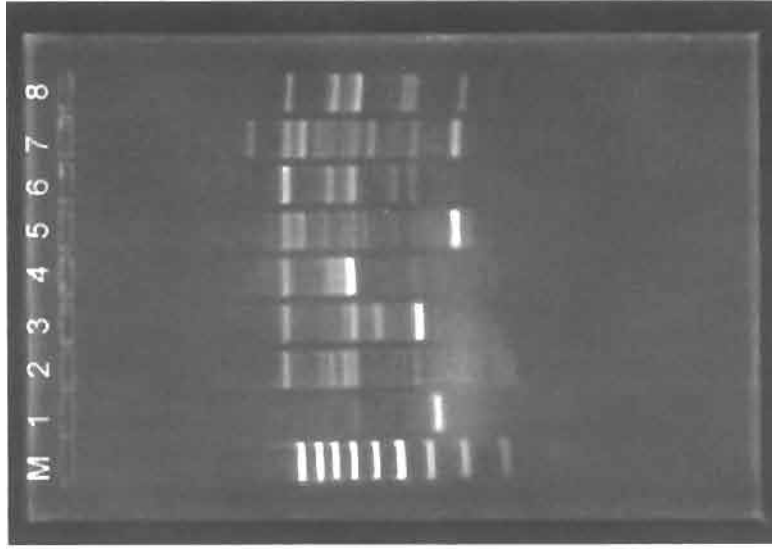
Çalışmada tavuk, hindi, bildircin, keklik, kaz, ördek, devekuşu ve martı eti kullanılmıştır. Etler DNA ekstraksiyonu yapıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

### DNA Ekstraksiyonu

Et örneklerinden Kohı ve ark. (1998)'nin bildirdiği ekstraksiyon yöntemi modifiye edilerek DNA izole edildi. Örneklerden yaklaşık 1 g alınarak 15 ml'lik polypropilen tüplere konuldu ve üzerine 4 ml TNES solusyonu (20 mM Tris pH 8,150 mM NaCl,10 mM EDTA, %0.2 SDS) eklenerek homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra 750 µl alınarak 1,5 ml'lik ayrı bir eppendorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 10 µl proteinaz K (200 mg/ml) ve 50 µl %10 SDS ilave edilerek kuvvetlice çalkalandı ve 56°C'ye ayarlı çalkalamalı benmaride 1 gece bekletildi. Daha sonra süspansiyona 6 M NaCl'den 250 µl ilave edilerek 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda üst sıvıdan 500 µl ayrı bir eppendorf tüpüne aktarılarak üzerine 300 µl fenol + kloroform + izoamilaikol (25:24:1) ilave edilerek kuvvetlice karıştırıldı ve 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıdan 400 µl alınarak üzerine 400 µl kloroform eklendi, karıştırma işleminden sonra tekrar santrifüj edildi. Üst sıvıdan 300 µl ayrı bir eppendorf tüpüne alındı üzerine -20°C'lik absolut ethanol'dan 300 µl ve 30 µl sodyum asetat ilave edilerek vortekslendi, DNA'nın çökmesi için 2 saat -80°C'de bekletildi. 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üst sıvı alındı. Pelletin üzerine 300 µl %70'lik alkol eklendi ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Sonra alkol boşaltılarak, pelletin kuruması için tüpün ağzı 30 dakika açık bekletildi. Dipte kalan kuru pellet 200 µl steril distile su ile sulandırılarak PCR için hedef DNA olarak kullanıldı.

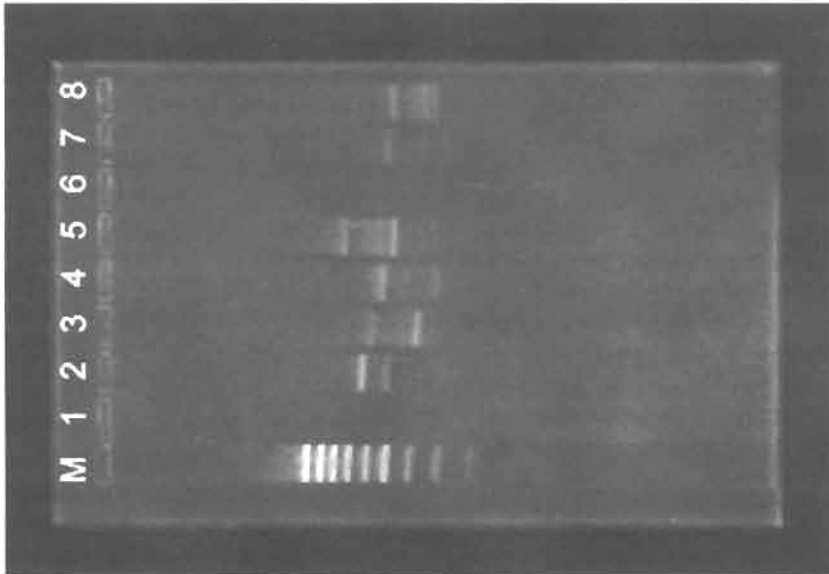
### PCR

PCR işlemi, PCR Sprint (ThermoHybaid, England) cihazı ile yapıldı. Toplam hacmi 50 µl olacak şekilde eppendorf tüpe 5 µl 10xPCR buffer (Fermentas,Hanover,USA), 7.5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM deoksınükleotidtrifosfat (dNTP's), 2 U Tag DNA polimeraz (Promega, Madison, USA), 2.5 µl 20-25 pmol primer ve 5 µl hedef DNA konuldu. Çalışmada CAA TCG CCG T (primer 1) ve CCA CAG CAG T (primer 2) oligonükleotid dizilişine sahip primerler (Integrated DNA Technologies, Inc.) kullanıldı. Hazırlanan eppendorf tüpleri thermocycler cihazına yerleştirilip, 94°C'de 45 sn, 36°C'de 45 sn, 72°C'de 60 sn olmak üzere toplam 45 siklusta



Şekil 1. Primer 1 ile çoğaltılan kanatlı hayvan DNA'larından elde edilen RAPD profillerinin agaroz jel elektroforezdeki görünümleri.

M-marker, 1- tavuk, 2- hindi, 3- martı, 4- devekuşu, 5- ördek, 6- kaz, 7- bıldırcın, 8- keklik



Şekil 2. Primer 2 ile çoğaltılan kanatlı hayvan DNA'larından elde edilen RAPD profillerinin agaroz jel elektroforezdeki görünümleri.

M-marker, 1- tavuk, 2- hindi, 3- martı, 4- devekuşu, 5- ördek, 6- kaz, 7- bıldırcın, 8- keklik

PCR işlemi gerçekleştirildi. Çoğaltılan DNA segmentleri %1.5'lik agaroz jele (Sigma) yüklenerek 2 saat 100 voltta elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez işleminden sonra agaroz jel ethidium bromide (0.5 µg/ml) ile boyanarak UV transilluminator'de gözlemlendi ve fotoğrafi çekildi (Poloroid 322 Kamera ve T667 film).

### Bulgular

Çalışmada kullanılan kanatlı hayvanlara ait DNA'ların primer 1 kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezdeki görünümleri şekil 1'de, primer 2 kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezdeki görünümleri ise şekil 2'de verilmektedir. Primer 1 ile elde edi-



len bantlar (RAPD profili) birbirleriyle karşılaştırıldığında 8 farklı tür kanatlı hayvana ait RAPD profillerinin birbirlerinden farklı olduğu ve profillere bakarak etlerin kolaylıkla birbirlerinden ayırt edilebildiği görülmektedir (Şekil 1). Primer 2'nin ise kanatlı hayvanlardan tavuk ve kaz için RAPD profili vermediği, hindi, martı, devekuşu, ördek, bıldırcın ve keklikte oluşan RAPD profilleri incelendiğinde ise her hayvana ait oluşan RAPD profillerinin birbirinden farklı olduğu ve böylelikle bu hayvanlara ait etlerin ayırt edilebildiği görülmektedir (şekil 2).

### Tartışma ve Sonuç

Bu araştırmada, 10 bazlık 2 farklı primer (primer 1-CAA TCG CCG T, primer 2- CCA CAG CAG T) ve tek bir PCR programı kullanılarak kanatlı hayvan etlerinde tür tespiti yapılmıştır.

RAPD yönteminde kullanılan primere göre, gerek tür içinde gerekse türler arasında farklı bantlar elde edileceği için bu yöntemde çok çeşitli sonuçlar alınmaktadır (Koh ve ark., 1998). Elde edilecek DNA bantlarının sayısı kullanılan primere göre değişir. Hatta kullanılan bazı primerlerle hiç bir DNA bandı elde edilmeyebilir. Farklılık primerdeki baz diziliminden kaynaklanır. Değişik baz dizilişlerine sahip primerlerle hedef DNA'nın değişik kısımları çoğaltılarak tamamen farklı RAPD profil sonuçları alındığı belirtilmiştir (Lee ve Chang, 1994; İciar ve Ingrid, 1998; Koh ve ark., 1998). Bu yüzden her hayvan türünde ayrı bir primer kullanılması halinde farklı sonuçlar alınmaktadır. Bu nedenle, kullanılacak primer, orijini saptanacak etlerde sonuç verebilecek baz dizilimine sahip olmalı ve analize alınan bütün hayvan türlerinde de aynı primer kullanılmalıdır (Koh ve ark., 1998).

Türlerin tespitinde daha net bir sonuç alabilmek için az miktarda veya tek bir DNA bandı oluşturan primerlerin kullanılması önerilmektedir (İciar ve Ingrid, 1998). Nitekim, Koh ve ark. (1998), RAPD yöntemiyle hayvan türlerinin ayırımı üzerine yaptıkları çalışmada, 29 farklı 10 bazlık oligonükleotid primer kullanarak en uygun primeri bulmaya çalışmışlardır. Çalışmada bazı primerlerin RAPD yöntemi için uygun olmadığı ortaya çıkmıştır.

RAPD yönteminin başlıca avantajları, spesifik PCR ve RFLP yöntemlerindeki gibi her hayvan türü için tür-spesifik primerin kullanılmasına ve her hayvan türü için ayrı bir PCR işlemine gerek duyulmamasıdır. Ayrıca türlerin DNA dizilişlerinin bilinmesine de gerek yoktur. Rasgele seçilmiş, kısa

oligonükleotid primerler ile ortaya çıkan RAPD profilleri incelenerek, türler arasındaki farklılıklar ortaya konulabilir ve bu sayede et türlerinin orijini tespit edilebilir. Bu avantajlar sayesinde RAPD yöntemiyle et türlerinin tespiti daha kısa sürede ve daha ucuz olarak yapılmaktadır (İciar ve Ingrid, 1998). Dezavantajı ise, kullanılacak her farklı primer ile farklı bir sonuç alınacağından RAPD yönteminin standardize edilmesi gerekmektedir (Koh ve ark., 1998).

Çalışmada kullanılan, 10 bazlık 2 farklı primerin RAPD profil sonuçları incelendiğinde, primer 1'in çalışmada kullanılan kanatlı hayvanların tümünde tür tayinini ve ayırımını yaptığı, primer 2'nin ise tavuk ve kaz etinde tür tespitini yapamadığı, fakat hindi, martı, devekuşu, ördek, bıldırcın ve keklik etlerinde hem tür tespitini, hem de türler arasındaki RAPD profil farklılıklarını ortaya koyduğu tespit edildi. Deney sonuçları diğer araştırmacılarla (Lee ve Chang, 1994; Koh ve ark., 1998; İciar ve Ingrid, 1998) karşılaştırıldığında RAPD yönteminin yorumlanması açısından bir farklılık görülmedi. Bu çalışmada da kullanılan 2 farklı primer ile 2 farklı RAPD profili elde edildi. Deney sonuçları değerlendirildiğinde, RAPD yöntemi ile kanatlı etlerinde, etlerin orijini tespit edilirken her zaman aynı primerlerin kullanılmasının zorunlu olduğu, farklı primerler ile yapılan analizler sonucunda ortaya çıkan RAPD profillerine bakarak tür tespitinin yapılmasının imkansız olacağı belirtilebilir.

Sonuç olarak, RAPD yönteminin ekonomik, pratik olması, aynı anda çok sayıda örneğin analiz edilmesi, kısa sürede sonuç vermesi gibi nedenlerden dolayı kanatlı etlerinde tür tespitinde kullanılabileceği belirtilebilir. Böylece, iş gücü, zaman ve maddi açıdan da tasarruf sağlanmakla birlikte tüketicinin de aldatılması önlenmiş olacaktır. Gelişmekte olan bir ülke olarak hızlı, duyarlı ve ekonomik olan bu yöntemin gıda laboratuvarlarında yaygınlaştırılarak, et türlerinin orijininin tespitinde kullanılmasının daha doğru olduğu vurgulanabilir.

### Kaynaklar

Aguado, V., Vitas, A.I., Garcia-Jalon I. (2001). Random Amplified Polymorphic DNA Typing Applied to the Study of Cross-Contamination by *Listeria monocytogenes* in Processed Food Products. *J Food Protect.*, 64 (5), 716-720.

Alves, E., Castellanos, C., Ovilo, C., Silió, L., Rodriguez, C. (2002). Differentiation of the raw material of

- the Iberian pig meat industry based on the use of amplified fragment length polymorphism. *Meat Sci.*, 61, 157-162.
- Appa Rao, K.B.C., Bhat, K.V., Totey, S.M. (1996). Detection of species-specific genetic markers in farm animals through random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Genetic Analysis: Biomol Eng.*, 13 (5), 135-138.
- Arda M. (1995). *Biyoteknoloji, (Bazı Temel İlkeler), Kükem Derneği Bilimsel Yayınlar No: 3, Ankara.*
- Brodmann, P.D., Moor, D. (2003). Sensitive and semi-quantitative TaqMan real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family Mammalia in food and feed. *Meat Sci.*, 65, 599-607.
- Buntjer, J.B., Lenstra, J.A. (1998). Mammalian Species Identification by Interspersed Repeat PCR Fingerprinting. *J Ind Microbiol Biot.*, 21, 121-127.
- Çetinkaya, B. (1998). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Temel Prensipler. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 12 (2), 149-156.
- Della, J.H., Helen, C.P., Ian, D.L. (1997) Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes. *Food Chem.*, 60 (3), 437-442.
- Ebbehoj, F.K., Thomsen, D.P. (1991a). Differentiation of Closely Related Species by DNA Hybridization. *Meat Sci.*, 30, 359-366.
- Ebbehoj, F.K., Thomsen, D.P. (1991b). Species Differentiation of Heated Meat Products by DNA Hybridization. *Meat Sci.*, 30, 221-234.
- Fabio, C., Eliana, M., Alberto, P., Carlo, C. (2002). Identification of the goose species (*Anser anser*) in Italian "Mortara" salami by DNA sequencing and a Polymerase Chain Reaction with an original primer pair. *Meat Sci.*, 61, 291-294.
- Fach, P., Dilasser, F., Grout, J., Tache, J. (1999). Evaluation of a Polymerase Chain Reaction-based Test for Detecting *Salmonella* spp. in Food Samples: Probable *salmonella* spp. *J Food Protect.*, 62 (12), 1387-1393.
- Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S.R., Viswas, K.N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B.M., Bhaskar, S. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Sci.*, 66, 551-556.
- Hird, H., Goodier, R., Hill, M. (2003). Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplicon visualisation with vistra green. *Meat Sci.*, 65, 1117-1123.
- Hopwood, J.A., Fairbrother, S.K., Lockley, K.A., Bardsley, G.R. (1999). An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. *Meat Sci.*, 53, 227-231.
- Iciar, M., Ingrid, M.Y. (1998). Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Res Int.*, 31 (6-7), 459-466.
- İlhak, İ., Arslan, A. (2003). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Yöntemiyle Sığır, Koyun, Keçi ve Yabani Domuz Etinin Ayırt Edilmesi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 17 (1), 59-63.
- İlhak, O.İ. (2004). Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Yöntemi ile Et Türlerinin Belirlenmesi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.*
- Kamber, U. (1993). Fermente Türk Sucuklarında Et Orijininin ELISA ile Belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
- Koh, M.C., Lim, C.H., Chua, S.B., Chew, S.T., Phang, S.T.W. (1998). Random amplified Polymorphic DNA (RAPD) Fingerprints for Identification of Red Meat Animal Species. *Meat Sci.*, 48 (3/ 4), 275-285.
- Lee, C.J., Chang, G.J. (1994). Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification. *Forensic Sci Int.*, 67, 103-107.
- Lin, J.S., Tsen, H.Y. (1999). Development and Use of Polymerase Chain Reaction for the Specific detection of *Salmonella* Typhimurium in Stool and Food Samples. *J Food Protect.*, 62 (10), 1103-1110.
- Lockley, A.K., Bardsley, R.G. (2002) Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA. *Meat Sci* 61, 163-168.
- Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., Shinmura, Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci.*, 51, 143-148.
- Meyer, R., Candrian, U., Lüthy, J. (1994). Detection of Pork in Heated Meat Products by the Polymerase Chain Reaction. *J AOAC Int.*, 77 (3), 617-622.
- Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J., Candrian, U. (1995). Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis: A simple method for species identification in food. *J AOAC Int.*, 78 (6), 1542-1551.
- Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T., Murby, J. (2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Sci.*, 54, 369-376.
- Rodriguez, M.A., García, T., Gonzales, I., Asensio, L., Mayoral, B., Lopez-Calleja, J., Hernandez, P.E., Martín, R. (2003). Development of a polymerase chain reaction assay for species identification of goose and

---

mule duck in foie gras products. *Meat Sci.*, 65, 1257-1263.

Saez, R., Sanz, Y., Toldra, F. (2004). PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Sci.*, 66, 659-665.

Sasazaki, S., Itoh, K., Arimitsu, S., Imada, T., Takasuga, A., Nagaishi, H., Takano, S., Manen, H., Tsuji, S. (2004). Development of breed identification markers derived from AFLP in beef cattle. *Meat Sci.*, 67, 275-280

Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., McDowell, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control.*, 14, 579-583.

Verkaar, E.L.C., Nijman, I.J., Boutaga, K., Lenstra, J.A. (2002). Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Sci.*, 60, 365-369.

Weder, J.K.P., Rehbein, H., Kaiser, K.P. (2001). On the specificity of tuna-directed primers in PCR-SSCP analysis of fish and meat. *Eur Food Res Technol.*, 213,139-144.

Welsh, J. and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18, 7213-7218.

Wintero, A.K., Thomsen, P.D., Davies, W. (1990). A Comparison of DNA- Hybridization, Immunodiffusion, Countercurrent Immunoelectrophoresis and Isoelectric Focusing for Detecting the Admixture of Pork to Beef. *Meat Sci* 27: 75- 85.

Zhang, G., Zheng, M., Zhou, Z., Ouyang, H., Lu, Q. (1999). Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Sci.*, 51, 233-236.