استخدام تقانات البصمة الوراثية DNA Fingerprinting في تمييز أصناف نخيل التمر

اعداد: الدكتور حسام سعد الدين محمد خير الله
قسم البستنة / كلية الزراعة / جامعة بغداد

إن التطورات الوراثية والمظهرية التي طرأت على نوع نخلة التمر عبر آلاف السنين أدت الى ظهور تغايرات طبيعية ضمن أفراده وذلك كنتيجة لتغيرات البيئة خلال تلك العصور بحيث تطورت مجتمعات من نخيل التمر متأقلمة مع تلك التغيرات فظهرت ضمن أفراد النوع تغايرات مستمرة ومتوارثة في الخصائص الفسيولوجية والمظهرية والوراثية ضمن مفهوم الصنف الزراعي Cultivar ويمكن المحافظة على خصائص ومميزات أصناف النخيل وبقائها عن طريق اكثارها بطريقة الفسائل Offshoots إذ يستمر توارث وانتقال تلك الخصائص من جيل الى جيل، إلا أن الاستمرار بالإكثار الخضري لمدة طويلة جداً من الزمن تصل الى مئات أو آلاف السنين تؤدي الى حصول تغايرات وراثية في الصنف المزروع وذلك كنتيجة لحصول طفرات وراثية Genetic Mutations أو كنتيجة للاصابة بالفايروسات Viruses وفي كلتا الحالتين ينشأ بعض الأفراد المتشابهة والتابعة للصنف الأصلي تسمى بالسلالة Clone وهكذا تكون السلالة في النخيل تعبيراً عن الحد الأدنى من التغايرات الوراثية والمظهرية. ان من المشاكل الأساسية التي تواجه التوسع في زراعة النخيل وإنتاجه هي الاختلافات الوراثية والبيئية الكبيرة جداً مما يجعل صعوبة التميز بين الأصناف المختلفة في المراحل الأولية ولذلك استخدمت العديد من المؤشرات الوراثية من قبل الباحثين والمزارعين في تحقيق هذا الهدف.

ان **المؤشر الوراثي Genetic marker** هو صفة مميزة تستخدم للأستدلال على وجود موقع معين locus على الكروموسوم أو المجين، وأن معرفة هذا الموقع يساعد على دراسة توارث صفة معينة أو جين معين فالجينات القريبة جداً من المؤشر تتوارث معه.

وهناك عدة أنواع من المؤشرات الوراثية المستخدمة في التوصيف الوراثي لأنواع وأصناف النخيل مثل المؤشرات المظهرية والمؤشرات البروتينية أو الأنزيمية والخلوية فضلاً عن مؤشرات الدنا DNA markers. وتبعاً لنوع المؤشرالوراثي المستخدم يختلف مفهوم **البصمة الوراثية Genetic fingerprint** فعند استخدام البروتينات فأن البصمة الوراثية تعني نمط توزيع الحزم المفصولة بالترحيل على الهلام والناتجة من تحليل المحتوى البروتيني للافراد المدروسة، أما عند استخدام مؤشرات الدنا فأن البصمة الوراثية تعني نمط توزيع الحزم المتباينة والناتجة من تقطيع الدنا المجيني للأفراد المدروسة.

مؤشرات الدنا DNA Markers

إن التطـــور الســـريع الـــذي حصـــل فـــي مجـــال علـــم الأحيـــاء الجزيئيـــة Molecular Biology والنجاحـــات المســـتمرة التـــي حققتهـــا الهندســـة الوراثية Genetic Engineering وخاصة في عقد الثمانينيات والتسعينيات من القـــرن المنصرم قد وفرت الأدوات المناسبـــة للتحلـــيل الجـــزيئي للمـــادة الـــوراثية (الدنا DNA) التي تتحكم في صفات الكائنات الحية مما أدى إلى ثورة في مجال المؤشرات الوراثية ومنهـــا مؤشرات الدنا . وتعرف **مؤشرات الدنا DNA markers** بأنها تتابعات مـــن الـــدنا يمكـــن الاستدلال بها على موقع معين على الكروموسوم او المجين تستخدم لدراسة العلاقات الوراثية بين الأفراد وإيجاد البصمة الوراثية لكونها تعكس الاختلافات في المعلومات الوراثية المخزونة فيهم، وهذه الاختلافات تكون ناتجة أما من الحذف Deletion ، او الأدخال Insertion ، او اعادة الترتيب Rearrangement للنيوكليوتيدات في مجين الأفراد المدروسة لاي سبب كان كالطفرات الوراثية لذلك اعتمدت في دراسات التصنيف الجزيئـــي Molecular taxonomy والدراسات التطورية Evolutionary studies وفي بناء الخرائط الوراثيـــة Genetic Mapping كما أصبحت مـــن الأدوات المهمـــة لدراســـة التنـــوع الـــوراثي Genetic Diversity , اذ تعد الاختيار الذي لا بديل له في تطوير الخطط الملائمة لحفظ الأنواع، وبما ان هذه المؤشرات تعكس الاختلافات مباشرة على مستوى القواعد المكونة للدنا ونظـــراً لان مجين الكائنات الحية الراقية يحتوي على الملايين من هذه القواعد لـــذلك فـــان اعـــداد هـــذه المؤشرات كبيرة جداً وبالتالي فان لها القدرة على الكشف عن مئات المواقـــع Ioci ولعـــدة أليلات للموقع الواحد.

تمتاز هذه المؤشرات مقارنة بالمؤشرات الوراثية الأخرى بمزايا عديدة إذ مـــن خـــلال استخدامها يمكن تجاوز العديد من المثالب التي حدث من انتشار المؤشرات السابقة ومن ابرز هذه المميزات إنها تظهر التغاير الذي يحدث على مستوى الدنا مباشرة و كما هو معروف فان الدنا هو المادة الوراثية المستقرة التي لا تتأثر بالبيئة لذا امتازت هذه المؤشرات بالاستقرارية Stability بعكس المؤشرات الوراثية المعتمدة على الصفات المظهرية التي تتأثر بشكل كبير بالظروف البيئية، وكذلك امتازت هذه المؤشرات بكونها تعتمد على مادة الدنا الموجودة فـــي جميع خلايا الكائن وبشكل متساوٍ لذا فان تحليل أي جزء من ذلك الكـــائن وفـــي أي مرحلـــة عمرية سوف يعكس بالنتيجة حالة الكائن الوراثية وعلى نحو دقيق مما منح هذا النـــوع مـــن المؤشرات الشمولية وجعلها تتفوق على المؤشرات المعتمدة على تحليل المحتوى ألبروتينـــي لذلك الكائن او حتى على ما تمثله هذه البروتينات من متناظرات إنزيمية , ومـــن المميـــزات الاخرى لمؤشرات الدنا هي قدرتها على كشف أعداد كبيـــرة مـــن التباينـــات Numerous

Polymorphic مما جعلها قادرة على إيجاد أي اختلاف مهما كان طفيفاً وبين أقرب الأفراد فضلاً عن قدرتها على تتبع التغيرات الوراثية عبر الأجيال كونها تستند إلى قوانين مندل في التوارث كما تبرز أهمية مؤشرات الدنا من خلال تطبيقاتها الواسعة وفي شتى المجالات ومن أهمها في ايجاد البصمة الوراثية DNA Fingerprinting والتمييز والتشخيص المبكر لاصناف السلالات وتحديد القرابة بينها والتمييز المبكر للجنس في النباتات ومساعدة مربي النبات في تسهيل مهمة التضريب والتهجين او تطوير أصناف جديدة من خلال تحديد مستوى التغايرات وكذلك فحص نقاوة البذور وحفظ حقوق مربي النبات لتمييز الأصناف المقاومة للأمراض والكشف المبكر عن الإصابات المرضية .

ومن الجوانب العلمية والتطبيقية في مجال إيجاد البصمة الوراثية هو تطوير العديد من مؤشرات الدنا لاستخدامها في التحقق والتأكد من الثبات الوراثي للنباتات الناتجة من الزراعة النسيجية وخاصة النباتات المعمرة كالنخيل وأشجار الفاكهة وغيرها وإصدار شهادة التطابق الوراثي مع الأصل لضمان جودة المنتج ومنع الغش التجاري لحماية حقوق كل من المستثمر والمستهلك.

أنواع مؤشرات ألدنا Types of DNA markers

نتيجة لميزات هذه المؤشرات و مجالات تطبيقاتها الواسعة وبسبب التطور السريع في مجالات علم الأحياء الجزيئي فقد تم استحداث وإيجاد العديد من أنواع مؤشرات ألدنا فقد تم حديثاً تصنيف هذه المؤشرات الى نوعين أساسيين اعتماداً على نوع التقانة المستخدمة في إيجادها والكشف عنها وهي:

اولاً : مؤشرات ألدنا المعتمدة على التهجين الجزيئي :

Molecular hybridization – based DNA markers

لقد ظهرت أولى مؤشرات الدنا المعتمدة على التهجين الجزيئي بعد استثمار الباحثين لانجازين علميين كبيرين هما اكتشاف إنزيمات التقييد Restriction enzymes عام 1968 ووصمة سوذرن Southren blotting عام 1975 في بناء أول تقانه أطلق عليها تباين أطوال قطع التقييد Restriction Fragments Length Polymorphism (RFLP) وتعرف على أنها توارث الاختلافات في مواقع القطع الإنزيمي الذي يتسبب في ظهور أطوال مختلفة من قطع الدنا على هلام الاكاروز . ان منهجية الـ RFLP تعتمد على الاختلافات في طرز التقطيع الذي يحدث بسبب طفرة نيوكليوتيدية واحدة عن موقع القطع او بوساطة القطع المضافة او المحذوفة او المستبدلة عن تلك المواقع مما يؤدي الى تباين اطوال

القطع الناتجة وبوجود المجس prob المعلم اما بمواد مشعة او مواد كيميائية يمكن التعرف على القطع المتباينة بارتباط المجس مع التسلل المكمل ولقد استخدمت هذه المؤشرات في بناء الخارطة الوراثية للانسان وفي مجال تحسين النبات كما استخدمت هذه المؤشرات في بناء الخارطة الوراثية للبطاطا والذرة، وفي مجال التمييز والتشخيص المبكر لجنس نخيل التمر والتشخيص الوراثي لأصناف نخيل التمر لقد ادى استمرار تطوير هذه التقنيات الى تطبيق تقنية الـ DNA – micro array او الـ DNA- chip والتي هي عبارة عن قطعة زجاجية صغيرة بمساحة لا تتجاوز عدة سنتمترات مربعة تحتوي على 10000 موقع وتثبت على تلك المواقع تسلسلات لجينات معينة او نيوكليوتيدات مصنعة فبالتهجين مع الدنا العائد لنسيج معين مثلاً تظهر انواع الجينات الفعالة منها والأهمية الكبيرة لهذه التقنية تكمن في إمكانية الكشف عن أعداد هائلة من المواقع في وقت قصير وكذلك تستخدم في تقنيات البصمة الوراثية وفحص المطابقة للنباتات الناتجة من زراعة الأنسجة النباتية , وعلى الرغم من ان تقنية الـ DNA–chip تمثل تقنية واعدة يتوقع لها مستقبل مشرق خاصة لشركات الإنتاج بزراعة الأنسجة فأنها في الوقت الحاضر تتضمن الكثير من المحددات أهمها الكلفة العالية ومحدودية الاستعمال. ان التقنيات المعتمدة على التهجين بشكل عام تحتاج الى الكثير من الوقت والجهد والكلفة فضلاً عن كميات كبيرة من الدنا وبنقاوة عالية.

ثانياً : مؤشرات الدنا المعتمدة على تفاعل تضاعف سلسلة الدنا

Polymerase Chain Reaction (PCR) Based Markers:

لقد تم وصف التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR لاول مرة من قبل الباحث Kary Mullis في عام 1985على أساس أن عمل هذه التقانة هو مضاعفة قطعة معينة من الدنا المنتجة من المجين الكلي إنزيمياً وخارج الجسم الحي *in vitro* بوجود البادئات Primers والتي تربط بالتتابع المكمل لها على شريط الدنا القالب DNA Template وتعد هذه العملية محاكاة لما يحدث في الطبيعة في جميع الكائنات الحية والتي تتضاعف مادتها الوراثية أثناء الانقسام فالتفاعل بسيط ومحتوياته موجودة منذ قدم الحياة قبل ان ينفذها Mullis خارج الجسم الحي وان هذا الاكتشاف احدث ثورة في عالم البيولوجيا الجزيئية تضاهي الثورة التي أحدثها اكتشاف التركيب المزدوج للدنا من قبل Watson و Crik عام 1953 وعلى الرغم من عدم اهتمام الكثيرين به في البداية لكن اليوم يعد الـ PCR التقنية الأكثر رواجاً في مختبرات الوراثة الجزيئية في جميع أنحاء العالم والأساس الذي تعتمد عليه الكثير من الدراسات على مستوى الدنا وبهذا استحق عليها Mullis جائزة نوبل عام 1993 اذ جعلت امكانية استخدام قطرة دم او شعرة او حتى خلية واحدة لإجراء عمليات الـ PCR

عليها. أما أهم متطلبات الـــ PCR فهي إنزيم بلمـــرة الـــدنا Taq DNA Polymerase ، والبادئـــــات Primers والنيوكليوســـيدات منقوصـــــة الاوكســـجين الثلاثيـــة الفســـفور deoxynucleosid triphosphates والمحلول الدارئ PCR buffer المحتوي على ايونات المغنيسيوم Mg^{++} وقالب الدنا DNA Template, فضلاً عن جهـــاز المبلمـــر الحـــراري Thermocycler ومكونات أخرى، وفيما يأتي توضيح لهذه المتطلبات. وتوجد عدة أنواع من هذه المؤشرات وهي:

1- المؤشرات التي تستهدف مواقع متعددة من المجين

Multilocus Profiling Techniques PCR- based markers:

وهذه تشمل :

أ- **المؤشرات التي تستخدم بادئات عشوائية تماماً** كمؤشرات نســق النـــواتج المتضـــاعفة المتعـــددة العشـــوائية (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling ; MAAP) وهذه تشمل بدورها مؤشرات التفاعل العشوائي متعددة الاشكال لسلسلة الدنا او الـــ RAPD Randomly Amplified Polymorphic DNA – RCR والتفاعل العشوائي لتسلســـل الدنا او الـــ AP – RCR, Arbitrary Primed PCR وبصمة الدنا المتضـــاعفة DAF ، DNA Amplification Fingerprinting.

ب – **المؤشرات التي تستخدم فيهـــا بادئـــات شـــبه عشـــوائية** Semiarbitrary Primers كمؤشـــــرات تبـــــاين أطـــــوال قطـــــع الـــــدنا المتضـــــاعفة أو الـــــ AFLP Amplified Fragment Length Polymorphism

جـــ- **المؤشرات التي تستخدم فيها بادئات متخصصة** كمواقع محددة متوزعة داخل المجـــين كالـــ Alu – PCR ومؤشرات التتابعات القصيرة المتكررة Simple Sequence Repeats – SSR

2- المؤشرات التي تستهدف موقع محدد معروف التسلسل :

Sequence Targeted and Single Locus PCR Markers:

ان تطبيق هذا النوع يحتاج الى معرفة تسلسل موقع الدنا الهدف الذي لـــيس بالضـــرورة ان يكون في النواة بل قد يكون في المايتوكوندريا او الكلوروبلاست في الخلايا النباتية والحيوانية ومن الامثله على هذا النوع من المؤشرات:Alpha–Amylase Gene Analysis

مراحل التفاعل التضاعفي لسلسلة ألدنا PCR stages

لقد تم تحديد تفاعل الـــ PCR بثلاث مراحل او خطوات أساسية تتكرر في كل دورة من دورات التضاعف ولمدة زمنية محددة، شكل (1)، وهذه المراحل هي:

1- المسخ Denaturation

تعد هذه المرحلة الأولى و الأساسية في تحضير دنا القالب مزدوج السلسلة Double strand للعمليات اللاحقة ومن المعروف إن تلك العملية تحدث في الخلية *In vivo* أثناء الطور البيني من الانقسام الخلوي وبواسطة إنزيمي الـ DNA Helicase و الـ Topoisomerase وإذ ان ارتباط الشريطين يكون عن طريق الأواصر الهيدروجينية فقد وجد بان الحرارة العالية ايضاً تؤدي الى فتح الشريطين وقد استثمرت هذه الظاهرة في تحقيق المرحلة الاولى من الـ PCR وذلك برفع درجة الحرارة لمحلول التفاعل والذي يحتوي على قالب الدنا من (92 – 95 مْ) ولوقت يتراوح بين (3 – 5) دقائق للحصول على شريط مفرد ليعمل كقالب لبناء القطعة المكملة لها وتعتمد عملية المسخ على عدد من العوامل كنوعية ومصدر دنا القالب ونوع الإنزيم المستخدم.

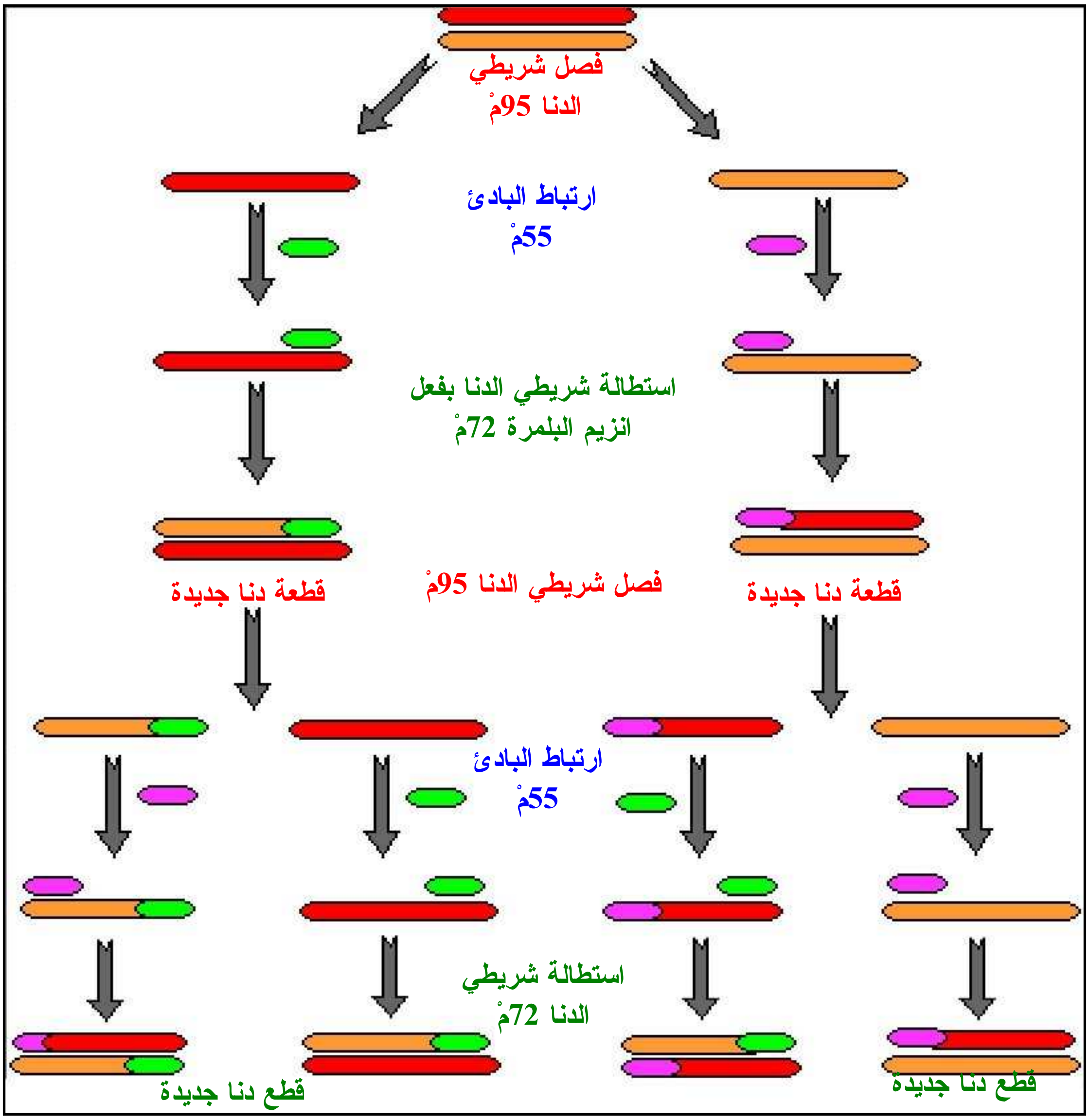
2- مرحلة ارتباط البادئ Primer annealing :

وهي المرحلة التي تأتي بعد مرحلة المسخ مباشرة إذ يتم فيها ارتباط البادئات مع التتابعات من القواعد النتروجينية المكملة لها في الشريط المفرد من ألدنا القالب وذلك ببناء الأواصر الهيدروجينية بينهما وتعتمد درجة الحرارة وطول الفترة الزمنية اللازمة لهذه المرحلة على العديد من العوامل التي تحدد كفاءتها , ومنها تركيز وطول البادئ ونسبة احتوائه على قواعد G+C .

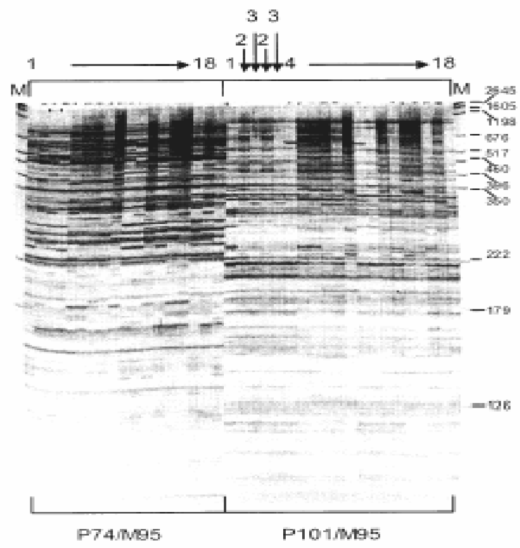
3- مرحلة الاستطالة Extension stage :

وهي المرحلة الاخيرة من تفاعل الـ PCR وتتضمن عملية إضافة الـ dNTPs الى النهاية OH للبادئ عند منطقة ارتباطه بقالب الدنا لتكوين شريط دنا مكمل لذلك القالب من قبل إنزيم البلمرة ، و ان افضل درجة حرارية تتم فيها عملية الاستطالة وهي الدرجة الملائمة لاعطاء أعلى فعالية للإنزيم وهي 72 مْ أما المدة اللازمة لذلك فتختلف حسب نوع المؤشرات المستخدمة والمؤشرات التي تعطي نواتج تضاعف كبيرة الحجم تحتاج الى وقت اطول من تلك التي تعطي نواتج تضاعف قصيرة وذلك لقدرة انزيم البلمرة المستخدم *Taq* DNA polymerase على بناء 35 – 100 نيوكليوتيدة في الثانية وعلى العموم تكون الفترة اللازمة للاستطالة أطول (10 دقائق) في الدورة الأخيرة لتفاعلات الـ PCR وذلك لضمان استطالة جميع نواتج التفاعل. وتجدر الاشارة الى ان عدد الدورات المستخدمة في تفاعلات الـ PCR وهي 40 دورة كافية للحصول على عدد نسخ ملائمة للدنا الهدف بحيث يمكن رؤيتها عند الكشف عنها باستخدام هلام الاكاروز كما ان فعالية الانزيم تقل بعد ذلك العدد من الدورات. اما الكشف عن نواتج الـ PCR فيتم بعدة طرق أكثرها شيوعاً الهجرة الكهربائية باستعمال هلام الاكاروز والتصبيغ باستخدام بروميد الاثيديوم والكشف باستخدام الاشعة فوق

البنفسجية او باستخدام هلام متعدد الاكريل امايد والتصبيغ باستخدام نترات الفضة مع الكشف المباشر بالعين المجردة وان هاتين الطريقتين تستغرقان عدة ساعات.



شكل 1. عمليات التضاعف لقطعة دنا بواسطة تفاعل الـــ PCR.



B

شكل 2. A: نمط توزيع الحزم لــ 9 أصناف ذكرية (الأرقام 1–9) و3 أصناف انثوية (الأرقام 10–12) من أصناف النخيل العراقية بأستخدام OPI-14 والخاصة بمؤشرات الــ RAPD (عن الخطيب، 2001).
B: نمط توزيع الحزم لــ 18 صنفاً من أصناف النخيل العراقية بأستخدام توليفة البادئات P74 / M95 و P101 / M95 والخاصة بمؤشرات الــ AFLP (عن Jubrael *et al* , 2005).

ايجاد العلاقة الوراثية والبعد الوراثي

أن الأختلافات في المادة الوراثية (DNA) والتي يمكن الحصول عليها من تطبيق اي من المؤشرات أعلاه يمكن أعتمادها لتحديد البعد الوراثي بين الأنواع والاصناف المختلفة وكالتالي:

1– يتم تحويل النتائج التي ظهرت في الهلام الى جداول التوصيف وذلك بوضع 1 عند وجود الحزمة و 0 عند غيابها. ولغرض ايجاد العلاقة الوراثية بين الأصناف المنتخبة يتم تحويل بيانات التوصيف (Characterization data) الى قيم التشابه (Similarity) المقدرة بأستخدام الحاسوب ضمن برنامج Similarity for Qualitative Data (SIMQUL) الذي يعتمد على معادلة Li و Nei:

Similarity = 2nxy / nx + ny

2– تقديرالنسبة المئوية للبعد الوراثي (Genetic distance) بين الأصناف والتي تعتمد على نتائج التشابه الوراثي وفقا للمعادلة الآتية:

Genetic distance = 1 – (2nxy / nx + ny)× 100

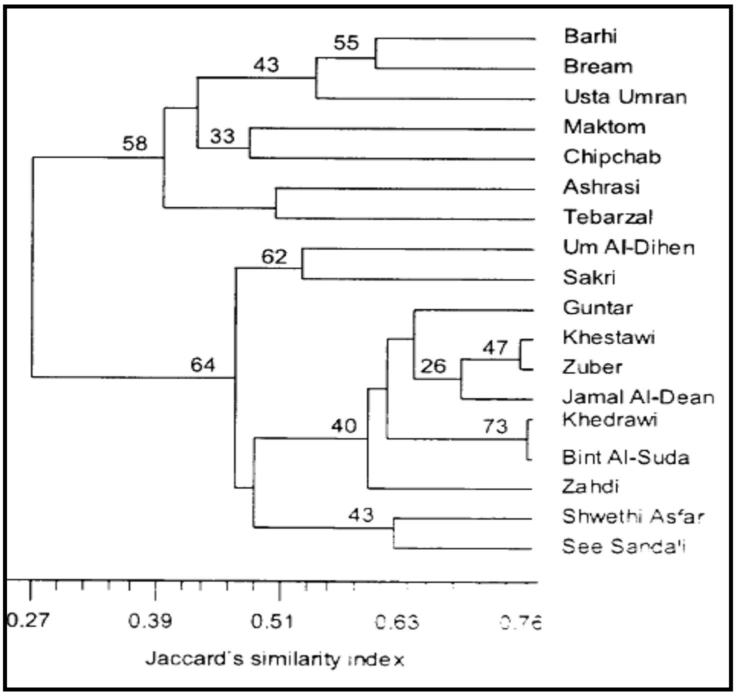
حيث ان : nxy : تمثل عدد الحزم المشتركة بين النموذجين x و y

nx : عدد الحزم الكلية في النموذج x ، ny : عدد الحزم الكلية في النموذج y .

جدول يمثل قيم الأبعاد الوراثية لعدد من أصناف نخيل التمر العراقية بأستخدام مؤشرات الــ RAPD (عن جبرائيل، 2001)

	برحي 1	أم الدهن 2	اسطه عمران 3	مكتوم 4	كنطار 5	خستاوي 6	زهدي 7	خضراوي 8	بريم 9
برحي 1	0.00000								
أم الدهن 2	0.28473	0.00000							
اسطه عمران 3	0.15108	0.16710	0.00000						
مكتوم 4	0.15993	0.25006	0.14238	0.00000					
كنطار 5	0.30180	0.41150	0.23662	0.17803	0.00000				
خستاوي 6	0.19384	0.33661	0.17629	0.10667	0.14876	0.00000			
زهدي 7	0.19779	0.31995	0.24478	0.21015	0.26271	0.14296	0.00000		
خضراوي 8	0.19779	0.34734	0.22280	0.18909	0.26271	0.16238	0.12629	0.00000	
بريم 9	0.20619	0.35575	0.25319	0.17688	0.16112	0.21079	0.19412	0.19412	0.0000

3- رسم مخطط التحليل التجميعي Dendogram الذي يوضح العلاقات الوراثية بين الاصناف والذي يعتمد قيم الأبعاد الوراثية التي يتم الحصول عليها من الخطوة السابقة وذلك وفقاً لطريقة UPGMA cluster analysis حيث يتم ادخال هذه القيم في الحاسوب الآلي ضمن برنامج (NTSYS-PC) وبالتالي الحصول على مخطط التحليل التجميعي الذي يوضح المجاميع الوراثية القريبة والبعيدة من بعضها البعض.



شكل 3. مخطط التحليل التجميعي يوضح العلاقة الوراثية لــ 18 صنفاً من أصناف النخيل العراقية بأستخدام مؤشرات الــ AFLP وبالأستناد الى دليل التشابه Jaccard (عن Jubrael *et al* , 2005)

المصادر المستخدمة:

- الخطيب، تمارا عدنان. 2000. استخدام مؤشرات التضاعف العشـوائي المتعـدد الاشـكال لسلسلة الدنا (RAPD) في التمييز لجنس واصناف نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L.) في العراق. رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة بغداد- العراق.

- جبرائيل، جلادت محمد صالح . 2001 . التوصيف الوراثي لعدد من أصناف نخيـل التمـر (*Phoenix dactylifera* L.) في العراق بأستخدام مؤشـرات RAPD . مجلـة ابـاء للأبحاث الزراعية . المجلد – 11 ، العدد 1 . ص : 138-148.

- مطر، عبد الامير مهدي. 1991. زراعة النخيل وانتاجه. مطبعة دار الحكمة. جامعة البصرة. العراق. ص 13-157.

- Caetano-Anolles, G. and P.M. Gresshoff. 1997. DNA Markers Protocols, Applications, and overviews. Wiley-Liss, Inc.

- Jubrael, J.M.S.; Udupa, S.M and M. Baum. 2005. Assessment of AFLP-based genetic relation ships among date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties of Iraq. J. Amer. Soc Hort. Sci. 130(3): 442-447.

- Karp, A. Edwards, K. J.; Bruford, M.; Vosman, B.; Morgante, M.; Seberg, O.; Kremer, A.; Boursot, P.; Arctander, P.; Tauz, D. And G. M. Hewitt 1997. Molecular Technologies for biodiversity evaluation: Opportunities and Challenges. Nature Biotech. 15: 625-628.
- Mullis, K. B. 1990. The unusual of the polymerase chain reaction. Scientific American. 13: 36 -43.

- Zaid, A. Hughes, H. G.; Porceddu, E. and F. W. Nicolas. 1999. Glossary of biotechnology and genetic engineering. FAO Research and Technology Paper 7. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome-Italy. M. 99.