تطبيق تقنية PCR-RAPD في تحديد التباين الوراثي للابقار المحلية في محافظة بابل

محمد حسن دخيل

فرع الصحة العامة/ كلية الطب البيطري/جامعة القاسم الخضراء

Mohammed_aldakeel@yahoo.com

الخلاصة:

تهدف الدراسة الحالية لايجاد الابعاد الوراثية مابين سلالتين من الابقار العراقية الموجوده في محافظة بابل (سلالة الرستاكي المحلي و الفريزيان المهجن مع المحلي). استخدمت تقنية التضخيم العشوائي لجزيئات ال DNA بعد عمل استخلاص لل DNA من دم الابقار المذكورة انفا، وتم استخدام ستة بوادئ في هذه الدراسة. تم فحص نواتج ال PCR والذي استعمل لتضخيم الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين بواسطة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (Agaros gel)، حيث اخذ ناتج ال PCR، وحل على هلام الاكاروز 0.8% وذلك لمعرفة نوعية الحزم وتركيزها. نجحت البوادئ المستخدمة في تقنية ال-RAPD-PCR في تضخيم اجزاء ال DNA للسلالتين السابقة الذكر. مقدار البعد الوراثي مابين السلالتين (1.25±0.8)، في حين قدرت النسبة المئوية للاختلاف بين سلالة الهولشتاين فريزيان المهجن والرستاكي المحلي وباستخدام كل البوادئ فكانت (63.3±1.33) .

الكلمات المفتاحية: سلالة الرستاكي المحلي، الغريزيان الهجين، التباين الوراثي، الابعاد الوراثية.

Application of RAPD-PCR Technology in Determining the Genetic Variation of Local Cows in Babylon Governorate

Abstract

The present study to find out the genetic distance between two breeds from Babylon cattle (Holstein crossbred with local breed and Restaky local breed). Polymer chain reaction DNA were used after DNA extraction from the blood of cattle, six primers were used in this study. The results of PCR were checked by used gel agaros, where taking the results of PCR and lowed on 0.8% from gel agaros to find out the quality and concentration of DNA. All the primers that used in RAPD-PCR technique for DNA extraction to two breeds were succeeded, (1.25±0.8). The overall average genetic distance was 1.25±0.8 between these two breeds, while the average percentage differences were estimated for all primers to these two breeds (63.3±1.33).

Key worda: Genetic Polymorphism, Genetic Distance, Restaky Local Breed, Holstein Crossbred.

المقدمة

تعد الابقار عنصرا رئيسيا من عناصر الثروة الحيوانية في العراق فهي الاكثر انتشارا بين المربين المحليين لما تمتلكه من انتاج متنوع سواء أكان حليبا ام لحما. حيث ترتبط ابقار الحليب بما تشمل عليه منتجاتها من مركبات عالية القيمة الغذائية مثل البروتين والدهون والسكريات والاملاح المعدنية والفيتامينات وجميعها ضرورية للانسان في جميع مراحل حياته كما يعد الحليب في حد ذاته علاجا للكثير من الامراض التي تصيب الانسان، ومن هنا زاد الاهتمام بانتاج ماشية الحليب عالميا خلال الاونه الاخيرة بعد ان ازداد الطلب على الحليب ومنتجاته وبعد ان اصبح استهلاك تلك المنتجات وتداولها من المقاييس الهامه لتقدم الشعوب و وعيها الثقافي والصحي. انتاج ماشية الحليب (Dairy Cattle) من الانشطة الزراعية التي تعود على القائمين بها بالربح الوفير لما يتميز به هذا الانتاج من الكفاءة الانتاجية العالية اذا ما قورنت بالانواع الاخرى من الحيوانات الحقلية (السنوسي وصلاح، ١٩٩٦).

ان سلالة الهولشتاين- فريزيان افضل سلالات الابقار المنتجة للحليب (Prasad, 2009)، موطنها الاصلي هولندا ومنها انتقلت الى بقية انحاء العالم وبضمنها العراق اذ ضربت مع مختلف انواع السلالات المحلية فانتجت سلالات محلية محسنة كلما زادت نسبة جينات الهولشتاين فيها زادت القيمة الانتاجية لتلك السلاله. اما سلالة الرستاكي فهي من السلالات العراقية العريقة التي تنتشر في العراق وخاصة في منطقة الفرات الاوسط وبعض المناطق الجنوبية، ويعتقد منشا هذه السلالة دولة الهند اذ وجدت انها تحمل جزء من دم (Zebu) الهندية، والتي من مواصفاتها المظهرية تحتوي على السنام الذي يكون في نهاية الرقبة من منطقة الظهر ويمتاز ابقار المناطق الحارة بهذا السنام العضلي (عزيز وعطا الله، ١٩٨٦). تعد محافظة بابل وبالاخص اطرافها الشمالية والجنوبية مناطق زراعية خصبة تشتهر بتربية الابقار والاغنام والجاموس، الا ان الابقار تكون الاكثر عددا. يعتبر ال DNA المادة الوراثية المسؤولة عن نقل الصفات الوراثية من جيل الى اخر بالكائنات الحية (الملاح وسفيان، 2000). ان استخدام تقنية الترحيل الكهربائي (gel electrophoresis) ساعدت في تحديد ومعرفته نقاوة ال DNA (Bhatt *et al.*, 2008). ان تقنية التضخيم العشوائي المتعدد الاشكال لقطع ال DNA من التقنيات المهمه التي تساعد في قياس وتحديد الابعاد الجينيه ما بين الافراد في الكائنات الحية ومن ثم يمكن تحديد الخرائط الجينية لافراد باختلاف انواعهم. تستخدم تقنية RAPD-PCR لمعرفة مدى التقارب الوراثي ما بين الافراد، حيث تقوم على اساس تضخيم المادة الوراثية (DNA) باستخدام بوادئ محددة (Williams *et al.*, 1990 ؛ Ramisha *et al.* 2002).

جمع عينات الدم:

تم سحب نماذج الدم من الوريد الوداجي (Jugular vein) بواقع عينة لكل حيوان، وبمقدار 5ml لكل عينه باستعمال محقنه طبية متخصصه لسحب الدم من الحيوانات وبسعة 10ml، وبعد ان تم تنظيف منطقة سحب الدم وتعقيمها بالكحول الاثيلي 70% وضعت نماذج الدم في تيوبات تحتوي على مانع تخثر الدم EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic). تم حفظ نماذج الدم المسحوب بدرجة حرارة -4ºC لحين اجراء عملية استخلاص DNA .

استخلاص ال DNA من الدم:

اخذت عينات الدم الى المختبر تحت درجة حرارة منخفضة باستخدام الثلج، و تم استخلاص ال DNA من الدم الكلي باستخدام طريقة (Bunce *et al.*, 1995) مع بعض التحويرات: اخذ 1ml من الدم المجموع بجو نقي ومعقم من الحيوانات وتم وضعه في تيوبات تحوي 0.1ml من مادة مانعة التخثر (EDTA)، مع اضافة 3ml من محلول A والذي يتكون مما يلي: (1M Tris-HCL: 1ml, Sucrose: 10.9g and Mg Cl2: 47mg) حلت هذه المواد السابقة الذكر في 50ml من الماء المقطر، و بذلك كانت جاهزة للعمل. حركت العينات ببطء لمدة 10 دقائق. وحضنت عند درجة 37ºC لمدة 5 دقائق. وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي و بواقع 10,000 دورة/ دقيقة، لمدة 5دقائق. اخذ الراسب واضيفة له 2ml من محلول B و يرج قليلا"، علما ان محلول B يتكون مما يلي: (1M Tris-HCL: 35ml, 0.5 M EDTA-NO2: 15ml and NaCl: 0.876g) حضن الناتج عند درجة 52ºC ولمدة 10 دقائق. اضافة 500µl من مادة (Sodium acetate). حضن عند درجة 65ºC ولمدة 20 دقيقة. نضيف 500µl من الكحول المثلج. و رجت العينات بجهاز الرج لمدة 60 دقيقة.ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي عند

10,000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق. أخذ الطافي واضيف له بما يساويه من مادة (ice cold propanol). حضن الناتج عند درجة 20ºC- لمدة 30 دقيقة، ثم وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق. غسل الراسب المتكون بمادة الكحول بتركيز 70% وبواقع 1ml. ثم وضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق. طرد الطائف وجفف الانابيب الحاوية على ال DNA بالهواء الجوي بصورة كاملة، واضيف له بعدها مادة TE buffer بواقع 300µl. تركت بدرجة حرارة الغرفة الى اليوم التالي، وفي اليوم التالي قيست نقاوتها بواسطة جهاز ال Nano drop المجهز من شركة Thermo Scientific الامريكية، وكانت معظم العينات بنقاوة 1.6 -1.9.

الكشف عن DNA:

قبل البدء بخطوات الكشف، حضر هلام الاكاروز و حضر الحوض الخاص به، وغسل و ربط المشط في احد الاطراف مع وضع الاشرطة المطاطية لمنع تسرب مادة الهلام، ثم حضر هلام الاكاروز بتركيز 0.8% (أي 0.8gm يذوب في 100ml من محلول0.5 TBE X مع اضافة 1µl من صبغة بروميد الاثيديوم الزرقاء)، ثم تثبيت قوة التيار الكهربائي 70 فولت حتى وصول الصبغة لنهاية الهلام. حضرت البادئات التي تم الاعتماد عليها في دراستنا من شركة Bioneer بواقع ستة بوادء. وتم تجهيز خليط التفاعل Master Mix ايضا من قبل نفس الشركة سابقة الذكر وكما موضح في جدول رقم (1) و (2) اذ يوضح جدول رقم (1) اسم البادئات وتتابع النيوكليوتيدات الخاصة به. فحص الهلام باستعمال الاشعه فوق البنفسجية UV Transilluminator وبطول موجي 280-260nm كما قدرت النقاوة لل DNA وذلك بقسمة رقم قراءة الكثافة الضوئية والتي عند الطول الموجي 260nm على رقم قراءة الكثافة الضوئية التي على طول موجي 280nm وبذلك فان الحامض النووي يكون نقيا اذا تراوحت النتيجه السابقه من قسمة القرائتين ما بين (2-1.6).

جدول رقم (1): يوضح اسم البادئات وتتابع النيوكليوديدات الخاصة به

ت	اسم البادئات	تتابع البادئات (´3-----´5)
١	OP-16	AGCCAGCGAA
٢	OP-19	CAAACGTCGG
٣	OPB-05	TGCGCCCTTC
٤	OPC-04	CCGCATCTAC
٥	OPM-13	GGTGGTCAAG
٦	OPT-13	GGCTGTGTAG

جدول رقم (2): يوضح خليط التفاعل Master Mix

Components	Volume (20 µl reaction)
-DNA polymears -Each: dNTP(dATP, dCTP, dGTP,dTTP) -Tns-HCl (ph 9.0) -HCl	1 unit 250 mM 10 mM 30 mM 1.5 mM

-Mgcl2 -tracking and stabilizer dye	5 µM

تقنية RAPD-PCR :

اجريت التفاعلات الخاصة بتقنية RAPD-PCR وذلك بالاعتماد على Williams واخرون (1990) باستعمال Master Mixوالمنتج من قبل شركة Bioneer وتم استخدام البادئات التالية OPA-16, OPA-19,OPB-05, OPC-04, OPM-13, OPT-13، وتم تحضير الخليط النهائي من 10µL من الماء المقطر (D.W.)، 5µl Master mix، 1µl من البادئات، 2µl من DNA Tamplate وبتركيز 10ng. تم وضع الخليط السابق الذكر في جهاز البلمره الحراري (PCR) وحسب البرنامج التالي:

Step	Temp.	Time	No.of Cycles
Initial Denaturation	94°C	5 min.	1cycles
Denaturation	94°C	1min.	40 cycle
Annealing	40°C	2 min.	
Extension	72°C	2 min	
Final Extension	72°C	5 min.	1 cycle
End hold	4°C	Indefinite	1 cycle

تم فحص نواتج ال PCR والذي استعمل لتضخيم الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين بواسطة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (Agaros gel)، حيث تم اخذ 5µl من ناتج ال PCR، ومرر على هلام الاكاروز 0.8%، وبقوة التيار الكهربائي 70 فولت، حتى وصول الصبغة الى نهاية الهلام وذلك لمعرفة نوعية الحزم وتركيزها. بالاعتماد على وجود اوغياب ال DNA لمختلف العينات المستخدمة بالتجربة، جمعت نتائج تقنية التضخيم العشوائي للاشكال المتعددة للDNA ، ولغرض معرفة العلاقة الوراثية مابين سلالاتين (الفريزيان المهجن والرستاكي المحلي تم الاعتماد على معادلة القيم المتشابة Similarity (Nei and Li, 1979) والتي تنص على:

Similarity = 2nxy / nx + ny

ومن ثم تم تقدير النسبة المؤية للابعاد الوراثية مابين السلالاتين السابقة الذكر وحسب القانون التالي:

Genetic distance = 1-(2nxy / nx + ny) X 100

حيث ان nxy: هي عدد الباندات التي اشتركت بها السلالتين والتي رمز للسلالة الاولى الفريزيان المهجن (x)، ولسلالة الرستاكي المحلي (y) .

nx : عدد الباندات الكلية لسلالة الفريزيان المهجن .

ny: عدد الباندات لسلالة الرستاكي المحلي

النتائج والمناقشة:

نجحت البادئات المستخدمة في تقنية ال RAPD-PCR في تضخيم اجزاء ال DNA للسلالتين السابقة الذكر وكما موضح بالجدولين (3) و (4).

جدول (3) : نتائج تضخيم البرايمرات الستة المستخدمة لسلالة الفريزيان المهجنة باستخدام تقنية الRAPD

اسم البرايمر	عدد الحزم (الباندات) الكلي	التشكل الوراثي		الوزن الجزيئي (bp)
		مجموع الحزم المتباينة	نسبة الحزم المتباينه %	
OPS-01	14	6	42.86	100-1500
OPS-04	8	5	62.50	200- 1495
OPS-05	11	7	63.64	122-675
OPS-10	10	3	30.00	300-1050
OPS-12	12	5	41.67	130-600
OPS-14	13	6	46.15	200-768
المجموع	68	32	47.80	340-1380

بينت النتائج الموضحة بالجدول (3) وتبعا للبادئات السته المستخدمة لسلالة الفريزيان المهجن بأن أعلى عدد من الباندات ظهرت مع البادئ OPS-01 والتي بلغت 14 باندا، في حين ادنى عدد من البادئات كانت بواقع 8 باندات مع البرايمرOPS-04، وبلغت عدد الباندات الناتجة الكلية هي 68 باندا، في حين بلغت عدد الباندات المتباينه 32 باندا وبنسبة 47.80 % وهذا التباين يتقارب مع ما وجده (Fadhil *et al*,. 2013) حيث بلغت عدد البادئات المتباينه 33 باندا، وهناك دراسة اخرى اجريت على سلالة Bahadawari breed و التي تعتبر احدى سلالات الجاموس العالمي حيث بلغت عدد الباندات المتباينه وراثيا لسلالة 32 باندا (Barwar *et al*. 2008). بينما اعطى كلا من البادئان OPS-04 وOPS-12 عددا من الباندات المتباينه بلغت 5 باندات وبنسبة 62.50 % و41.15 %على التوالي. اما البادئين OPS-01 وOPS-14 فقد اعطت عدد من الباندات المتباينه والتي بلغت 6 باندات وبنسبة 42.86 % و46.15% على التوالي.

نلاحظ تفوق البادئ OPS-05 على بقية البادئات في نسبة التشكل الوراثي، اذ وصلت هذه النسبة الى 63.64% وهذا يدل على ان هذا البادئ قد نجح في الكشف عن التباين الوراثي مابين افراد سلالة الهولشتاين فريزيان المحلية بالمقارنة مع بقية البادئات المستخدمة في نفس التجربة. ومن جانب اخر نلاحظ اقل نسبة تشكل وراثي مابين الافراد كانت مع البادئ OPS-10 حيث بلغت 30.00 % .

جدول رقم (4): نتائج تضخيم البادئات السته المستخدمة لسلالة الرستاكي المحلية بإستخدام تقنية الRAPD

اسم البادئ	عدد الحزم (الباندات) الكلي	التشكل الوراثي		الوزن الجزيئي (bp)
		مجموع الحزم المتباينة	نسبة الحزم المتباينه %	
OPS-01	10	6	60.00	100-1500
OPS-04	13	5	38.46	340- 1120
OPS-05	7	4	57.14	200-897
OPS-10	12	6	50.00	100-1370

OPS-12	9	3	33.33	250- 890
OPS-14	11	7	63.43	560-1230
المجموع	62	31	50.43	970-1450

وضحت النتائج التي ذكرت في الجدول (4) وباستخدام ستة بادئات لسلالة الرستاكي العراقي بأن أعلى عدد من الباندات ظهرت مع البادئ OPS-10 والتي بلغت 12 باندا، وكانت ادنى عدد من الباندات وبواقع 9 باندات مع البادئ OPS-12، وبلغت عدد الباندات الناتجة الكلية هي 62 باندا، في حين بلغت عدد الباندات المتباينه 31 باند وبنسبة 50.43%. اذ اعطى كلا من البادئين OPS-01 و OPS-10 عددا من الباندات المتباينه بلغت 6 باندات وبنسبة 60.00 % و50.00 %على التوالي. تبين لنا بان البادئ OPS-14 تفوق على بقية البادئات في نسبة التشكل الوراثي، اذ وصلت هذه النسبة الى 63.64% وهذا يدل على ان هذا البادئ قد نجح في الكشف عن التباين الوراثي مابين افراد سلالة الرستاكي العراقي بالمقارنة مع بقية البادئات المستخدمة في نفس التجربة. اما اقل نسبة تشكل وراثي مابين الافراد كانت مع البادئ OPS-12 اذ بلغت 33.33 % ، ان هذا يعكس شدة التنوع الحيوي في الابقار العراقية المهجنة وعدم وجود برامج تحسين وراثي منظمة للسلالات العراقية المحلية والمهجنة بالسلالات العالمية.

تكرار الباندات المتشاركة (band share frequency):

كان معدل الباندات المتشارك في نفس السلالة او بين السلالتين (سلالة الهولشتاين المهجن وسلالة الرستاكي المحلي) كما موضح في جدول رقم (5) والشكل (1 و 2)، حيث بلغت التكرارات في سلالة الهولشتاين المهجن ما بين (0.90 الى 0.51) في البادئين (OPS-10 وOPS-05)، وبلغت التكرارات في سلالة الرستاكي المحلي ما بين (1.00 الى 0.59) في البادئين (OPS-10 وOPS-04)على التوالي، في حين كان تكرار المتشابة بين سلالتي الهولشتاين المهجن والرستاكي المحلي من (0.45 الى 0.16) في البادئين (OPS-10 وOPS-12) وكما موضح في جدول رقم (5). وقد تبين ان نسبة التداخل الوراثي ضمن سلالة الرستاكي المحلي عالي (0.750±0.30) بالمقارنه مع التداخل الوراثي ضمن سلالة الفريزيان المهجن (0.680±0.28)، وهذا يتطابق مع ما حصل عليه Barwar وشركائه سنه (2008) و Dakheel وشركاؤه (2013) عندما درس الاول عن الابعاد الجينية لسلالتين من الجاموس وهما الميوراه والبهدواري، حيث وجد بان التداخل الوراثي ضمن سلالة الميوراه عالي بالمقارنة مع سلالة البهدواري، بينما درس الثاني عن سلالتي الميوراه والسورتي ووجد بان التداخل ضمن سلالة الميوراه عالي بالمقارنة مع سلالة السورتي الهنديتان.

جدول رقم (5): يوضح الباندات المتشاركة للسلالتين.

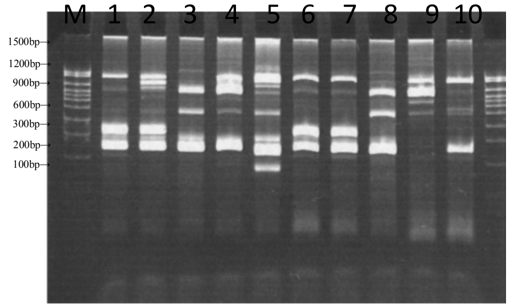
Primers cod	Band sharing frequency		BSF بين السلالتين
	في سلالة الهولشتاين المهجن	في سلالة الرستاكي المحلي	
OPS-01	0.75	0.87	0.27
OPS-04	0.82	0.59	0.31
OPS-05	0.51	0.70	0.20
OPS-10	0.90	1.00	0.45
OPS-12	0.69	0.84	0.16
OPS-14	0.63	0.68	0.25
Overall	0.680±0.28	0.750±0.30	0.270±0.05

الابعاد الوراثية (genetic distance) :

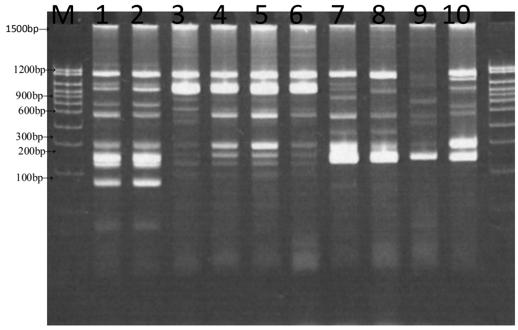
حسبت الابعاد الوراثية لجميع البادئات كما موجود في جدول رقم (6). حيث لوحظ اعلى نسب في البعد الجيني بين السلالتين هو 2.2 مع البادئات OPS-0 ، واقل مسافة جينية بلغت 0.84 مع البادئ OPS-04، وقد بلغ متوسط البعد الجيني 0.8±1.25 بين سلالتي (الهولشتاين المهجن والرستاكي المحلي)، وهذا يتطابق مع ما وجده Barwar وشركائه سنه 2008 عندما درس عن الابعاد الجينية لسلالتين من الجاموس وهما الميوراه والبهدواري وذلك باستخدام تقنية RAPD-PCR، حيث بلغ متوسط البعد الجيني لدراسته حوالي 0.1±1.20. في الدراسة الحالية، لاتوجد فروقات معنوية في الابعاد الوراثية بين السلالتين باستخدام البادئات المحدده.

جدول رقم (6): يوضح الابعاد الوراثية والنسبة المئوية للاختلاف بين سلالة الهولشتاين المهجن والرستاكي المحلي.

Primer cod	النسبة المئوية للاختلاف بين سلالة الهولشتاين المهجن والرستاكي المحلي	الابعاد الوراثية بين سلالة الهولشتاين المهجن والرستاكي المحلي
OPS-01	63	1.6
OPS-04	75	0.84
OPS-05	49	2.2
OPS-10	100	0.98
OPS-12	66	1.3
OPS-14	35	1.05
Overall	63.3±1.33	1.25±0.8



شكل (1): ناتج تفاعل RAPD لتفاعل البلمرة التسلسلي باستعمال OPS-01 لسلالة الفريزيان المهجن



شكل (2): ناتج تفاعل RAPD لتفاعل البلمرة التسلسلي باستعمال OPS-01 لسلالة الرستاكي المحلي

المصادر:

الملاح، ميسر يحيى وسفيان عزيز دبدوب. 2000. علم الوراثة وتطبيقات في تحسين الحيوان. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي– جامعة الموصل– كلية الطب البيطري– جمهورية العراق.

حنا، عزيز كبرو وعطا الله سعيد محمد .1986. مبادىء انتاج الحليب. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – جامعة بغداد– كلية الزراعة– جمهورية العراق. ع ص 125.

السنوسي بن عامر، محمد وصلاح حامد اسماعيل .1996. انتاج ماشية اللبن ورعايتها. جامعة عمر المختار– بنغازي– ليبيا.

Barwar, A., Sangwan, M., L., Kumar, S., and Ahlawat, S.,2008, "Genetic Diversity between Murrah and Bhadawari Breeds of Indian Buffalo using RAPD-PCR". Indian Journal of Biotechnology, 7: 491-495.

Bhattacharya, T., K., Kumar, P., and Sharma, A., 2008, "Animal Biotechnology". *Kalyani Publishers,* New Delhi, India.

Bunce M., O’Neill C.M., Barnardo M.,C., Krausa P., Browning M.,J., Morris P.,J., Welsh K.I.,1995, Photo typing: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 and DQB1 by PCR with 144 primers mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). Tissue Antigens 46, 355-367.

Fadhil, I., A., Singh, R., P., and Dakheel, M., H., 2013,"Differentiation and identification of biological samples obtained from Indian cattle using DNA fingerprinting technology (Minisatellites "VNTR", AFLP and RAPD analysis)". Int. J. Biol. Med. Res. 2013; 4(3):3313-3316 .

Nei, M., and Li, W.,H.,1979, "Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases". Proc. Natl. Acad. Sct. USA, 10: 5269-5273.

Prasad, J., 2009, "Animal Husbandry and Dairy Science". Kalyani Publishers, New Delhi, India.

Ramesha, K., P., Saravanan, T., Rao, M., K., Appannavar, M.M. and Obi Reddy, A., 2002, Genetic Distance among South Indian Breeds of Zebu Cattle Using Random Amplified DNA Markers. Asian-Aust. J. Anim. Sci., 15(3):309-314.

Williams J., G., K., Kubelik A., R., Livak K., J., Rafalski J., A., & Tingey S., V.,1990, "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers". *Nucleic Acids Research* 18, 6531-5.