نعمت جميل عبد الباقي

Friday, December 24, 2010
3:07 PM

مجلة ام سلمة للعلوم مجلد 6(2) 2009

استخدام مؤشرات بصمة الدنا المتضاعف DAF (DNA Amplification Fingerprint) في دراسة التنوع الوراثي للرز *Oryza sativa* L.

نعمت جميل عبد الباقي*

تاريخ قبول النشر 2008/7/13

الخلاصة:

اجريت هذه الدراسة لتحليل التنوع الوراثي لـــ 10 اصناف من الرز الشائعة في العـــراق باســـتخدام واحدة من مؤشرات الدنا DNA markers وهي مؤشرات بصمة الدنا المتضاعف (DNA amplification fingerprint) (DAF). تم تجربة ستة بادئات اظهرت النتائج عدم الحصول على نواتج تضاعف باســـتخدام البادئات OPT.14 وOPM.5 ، في حين اظهر البادئان OPX.8 و OPT.2 حـــزم مشـــتركة بـــين جميـــع الاصناف المدروسة. اما البادئان OPN.7 وOPX.1 فقد اظهرا نواتج تضـــاعف متباينـــة بـــين الاصـــناف المدروسة. وكان عدد الحزم الناتجة من استخدام احدهما (OPN.7) 16 حزمة، ولقد تم ايجاد 10 نسق وراثي كان متميزاً في الاصناف العشرة من الرز مما امكن تمييزهم باستخدام هذا البادئ وايجاد البصـــمة الوراثيـــة لهذه الاصناف، اما عدد الحزم الناتجة من استخدام البادئ الثاني OPX.1 فكان 13 حزمة. ولقد انـــتج هـــذا البادئ 8 انواع من انواع النسق كان متميزاً لستة اصناف امكن تمييزها وايجاد البصمة الوراثية لها باستخدامه ومن هذا يستنتج امكانية تشخيص الاصناف العشرة المدروسة بتطبيق مؤشرات الـــ DAF باستخدام بـــادئين فقط مما يدل على زيادة المعلومات التي يمكن الحصول عليها باستخدام عدد قليل من البادئات في هذا النـــوع من المؤشرات.

كلمات مفتاحية: بصمة الدنا المتضاعف، تنوع وراثي، نسق وراثي، مؤثرات الدنا.

المقدمة

يقصد بـــالتنوع الـــوراثي الاختلافـــات الموجودة بين الافراد او التجمعات Populations التابعة لنوع معين والتي تتكـــون بتـــأثير القـــوى التطوريـــة Evolutionary forces او نتيجـــة عمليات التربية [1] ويعد التنـــوع الـــوراثي احـــد الجوانب الاساسية للتنوع الحيوي Biodiversity والتي تعني التنوع الموجود بين الانواع المختلفـــة والحيوانات والكائنـــات الدقيقـــة والنباتـــات فـــي مجتمعاتها الطبيعية وان المحافظة على مســـتوى عالٍ من التنوع الحيوي ضروري جـــداً للحفـــاظ على ثبات النظام البيئي [2].

ان دراسة التنوع الوراثي بين الانـــواع مهم للدراسات التصنيفية، وفي تحديد هوية النوع لما لذلك من جوانب تطبيقية كثيرة وخاصـــة فـــي حفظ تلك الانواع وفي عمليات تنقية البذور وذلك باستبعاد البذور التي لا تتطابق مع البذور الاصلية وكذلك لحفظ حقوق مربي النبات عنـــد اكتشـــافه لصنف جديد، فضـــلاً عـــن اجـــراء الدراســـات التطورية والبيئية عليها [3].

* جامعة بغداد– كلية العلوم– قسم علوم الحياة

لقد اعتمدت الصفات المظهرية Morphological traits في بادئ الامر كمؤشرات وراثية Genetic markers للتمييز بين الاصناف الا ان لها بعض المحددات منها انها تتأثر كثيراً بالظروف البيئية وتستند بظهورها على العديد من العوامل الوراثية [4]، اما المؤشرات الوراثية المعتمدة على المحتوى البروتيني والمتناظرات الانزيمية Isozymes والتي استخدمت كطرق تميزية وتصنيفية [5] فقد ظهرت عليها بعض التحفظات كون ان هذه المؤشرات غير كفوءة بدرجة كافية للكشف عن التباينات بشكل مستقر وشامل اضافة الى قلة مؤشراتها وتحددها بنوعية النسيج والمرحلة العمرية من جهة وتأثرها بالبيئة من جهة اخرى[6].

وبظهور مؤشرات الدنا DNA marker فقد اصبحت من الادوات المهمة لدراسة التنوع الوراثي والخيار الذي لا بديل له في تطوير الخطط الملائمة لحفظ الانواع [7] وبتوسع استعمال الـ PCR تم تطوير مجموعة من المؤشرات تستند على التفاعل التضاعفي لسلسلة (PCR) منها مؤشرات الـ (DNA Amplification Fingerprint) DAF بصمة الدنا المتضاعف والمكتشفة من قبل [8] وهي احد انواع مؤشرات الـ MAAP (Multipel Amplification Amplicon Profiling) (النواتج المتضاعفة المتعددة العشوائية) والتي تتضمن استخدام بادئات عشوائية مفردة ترتبط بالمواقع المكملة لها على جانبي شريط الدنا ليتم تضاعف المنطقة الواقعة بين موقعين للارتباط تكون قريبة من بعضها الى درجة كافية ليقوم انزيم بلمرة الدنا Taq DNA Polymerase بعمله بالتضاعف، ويمكن الكشف عن التباينات بوجود او عدم وجود القطع المتضاعفة التي تظهر على شكل حزم على الهلام والناتجة من تغير موقع ارتباط البادىء بالمجين [9]. وقد استخدمت مؤشرات الـ DAF في دراسة التنوع الوراثي وايجاد البصمة الوراثية للعديد من النباتات مثل فول الصويا[10] والبطاطا الحلوة [11] والفستق [12]. وبالنظر لقلة الدراسات على المستوى الجزيئي لنبات الرز ولاهمية هذا المحصول، لذا فقد جاءت هذه الدراسة للكشف عن التباينات الوراثية بين اصناف الرز الشائعة في العراق وتسليط الضوء عن التنوع الوراثي لهذا المحصول باستثمار مؤشرات الدنا ومنها مؤشرات بصمة الدنا المتضاعف DAF.

المواد وطرائق العمل

1- تحضير النماذج:

تم الحصول على حبوب عشرة اصناف من الرز *Oryza sativa* L. في العراق وهي من مجموعة (Indica group) وذلك من محطة ابحاث المحاصيل الحقلية التابعة الى وزارة الزراعة ومن تكنولوجيا البذور التابع الى وزارة العلوم والتكنولوجيا وهي: عنبر محلي- عنبر ابيض- عنبر قصير- اباء 1 - اباء 2 - عنبر فرات- عنبر بغداد- عنبر مناذرة- العباسية- بسمتي العراق. زرعت حبوب الرز للاصناف العشرة وتم غمرها بالماء حتى ظهور الاوراق لعزل الدنا منها.

2- عزل وتوصيف الدنا:

تمت عملية عزل دنا اصناف الرز وفقاً لطريقة [13] المعتمدة على طريقة [14] والتي اعتمدت نفسها في عزل دنا اصناف الرز من قبل [15]. كما تم قياس تركيزه وتقدير نقاوته استناداً الى [15] و[16].

3- تحضير تفاعلات الــ DAF :

تم استخدام الطريقة المعتمدة مــن قبــل [17] في تحضير هذا النوع مــن التفــاعلات إذ أستخدم لذلك المحلول المنظم لانزيم البلمرة PCR buffer بقوة 10x ويتألف من 100 ملــي مــولر مــن التــرس الحامضــي Tris HCl ذو الاس الهيدروجيني 8.3 و50 ملي مولر مــن كلوريــد البوتاســـــيوم KCl و0.001% جيلاتــــــين، النيوكليوسيدات منقوصــة الاوكسـجين الثلاثيــة الفوسفات (dNTPs) وتشمل (dTTP ، dGTP ، dATP ، dCTP) وكلوريـــد المغنيســـيوم $MgCl_2$ وانـــزيم بلمـــرة الـــدنا Taq DNA Polymerase ، زيت معدني اضافة الى جهـــاز المبلمر الحراري الحلقي Thermocycler نـــوع hybrid كما تم اختيار بادئات Primers عشوائية مجهزة من شركة Operon technologies هذه البادئات هي:

رقم البادئ	3→5 تتابع البادئ
OPD.14	CTTCCCCAAG
OPM.5	GGGAACGTGT
OPN.7	GGGACCGGAG
OPT.2	GGAGAGACTC
OPX.1	CTGGGCACGA
OPX.8	CAGGGGTGGA

4- خطوات العمل:

يتم اجراء جميع الخطوات تحــت هــود معقم وبارتداء القفازات ووضع كافة المحاليل على الثلج. تتضمن خطوات العمل ما يلي:

1. تحضير خليط التفاعل Master Mix وذلــك باضافة المكونات ادناه الى انبوبة معقمة حجم 1.5 مليلتر وكالاتي:

المكونات	الحجم لعشر عينات	التركيز النهائي
ماء مقطر	150	
محلول منظم بقوة 10x	25	1x
dNTPs	25	200 ملي مول
كلوريد المغنيسيوم	10	6 ملي مول
البادئ	30	30 بيكومول
انزيم التضاعف	2	2.5 وحدة

تمزج المكونات جيــداً بخلطهــا بالــــ Vortex لمدة 30 ثانية ثم توضع في المنبذة لعدة ثواني، ثم توزع محتويات الانبوبة على 10 انابيب صغيرة بحجم 0.5 مليلتر معلمة باسماء اصــناف الرز العشرة وبواقع 24 مايكروليتر من الخلــيط لكل انبوبة ثم يضاف 1 مـــايكروليتر مــن دنـــا العينات الى الانبوبة الخاصة بهـــا بتركيـــز 2.5 نانوغرام/مايكروليتر ليصبح الحجــم النهــائي 25 مايكروليتر تمزج جيداً وتوضع بالمنبذة لعدة ثواني ثم يضاف (15-20) مـــايكروليتر مــن الزيــت المعدني وتوصد الانابيب وتوضع فــي المبلمــر الحراري الحلقي وفق البرنامج التالي:

دورة واحدة بدرجة 94°م لمدة اربعة دقائق ثم 40 دورة كل دورة تتضمن: 92°م لمدة دقيقة واحدة و35°م لمدة دقيقة واحدة و72°م لمدة دقيقة واحدة ثم دورة واحدة بدرجة 72°م لمدة خمس دقائق. بعدها ترفع الانابيب من المبلمر الحراري وتؤخذ 2.5 مايكروليتر من تحت الزيت المعدني وتمزج مع 3 مايكروليتر من محلول التحميل STR وترحيلها على هلام متعدد الاكريلامايد.

2. تحضير هلام متعدد الاكريلامايد Polyacrylamide Preparation

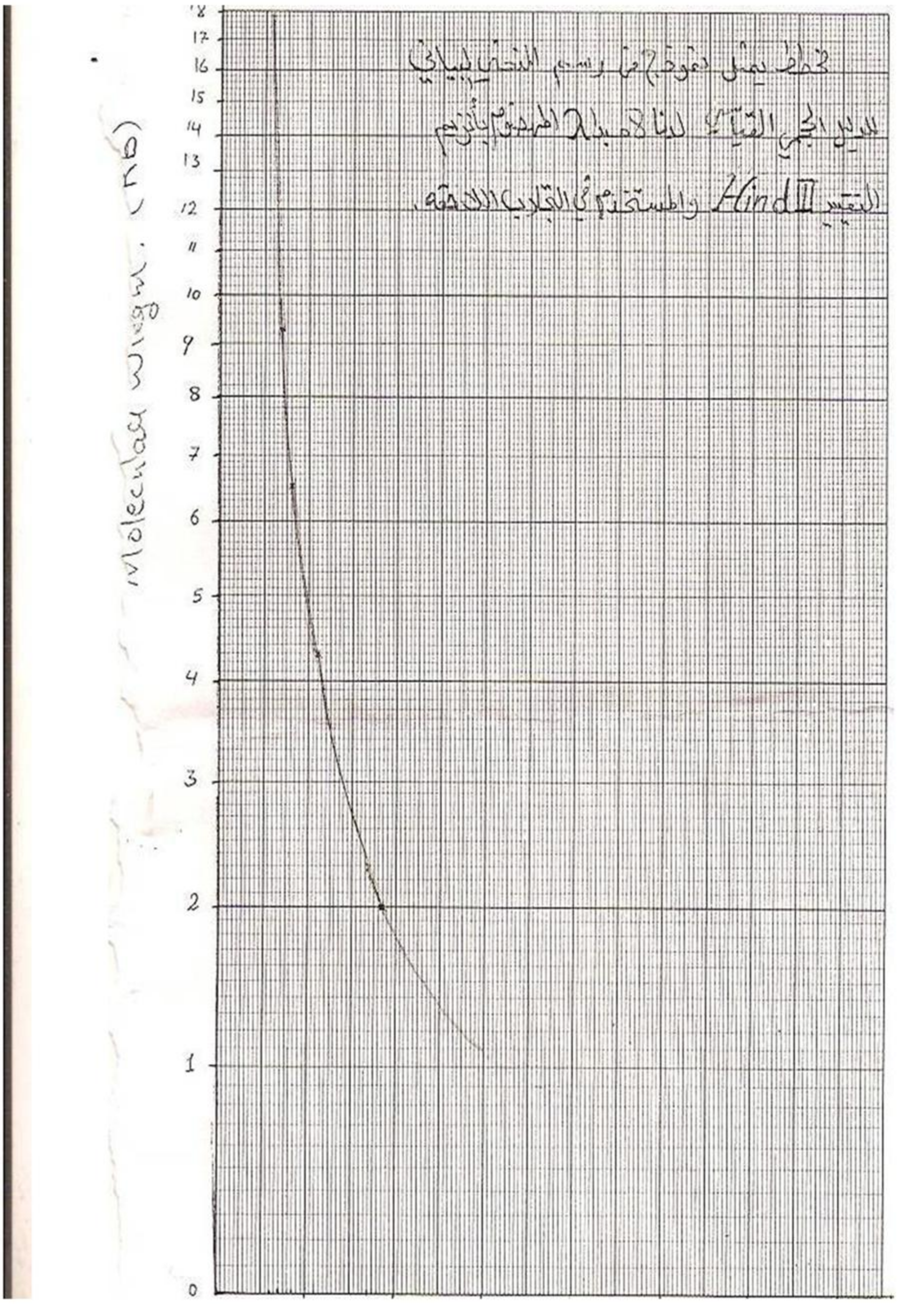
وفقاً لما وصف في Technical manual الوارد من الشركة المجهزة Promga (DNA Silver staining system 1993). حضر هلام متعدد الاكريلامايد بتركيز 6 % لترحيل عينات الدنا المتضاعف بعد تفاعلات الـ DAF اعتماداً على [18] وذلك بتحضير 75 مل منه باستخدام المكونات التالية:-

يوريا يُوزن منها 31.5 غم وبتركيز 0.5x و 40 % اكريلامايد بتركيز 6 % تخلط جيداً هذه المكونات و تذوب بشكل كامل ثم يصب الهلام ، بعدها ترحل العينات كهربائياً وباستخدام الدليل ألحجمي وهو البلازمد PGEM المهضوم بثلاثة إنزيمات قاطعة وهي *Sin* 1 , *Rsa* 1 , *Hin*f 1 منتجة 15 قطعة معروفة الحجم الجزيئي وكالاتي:

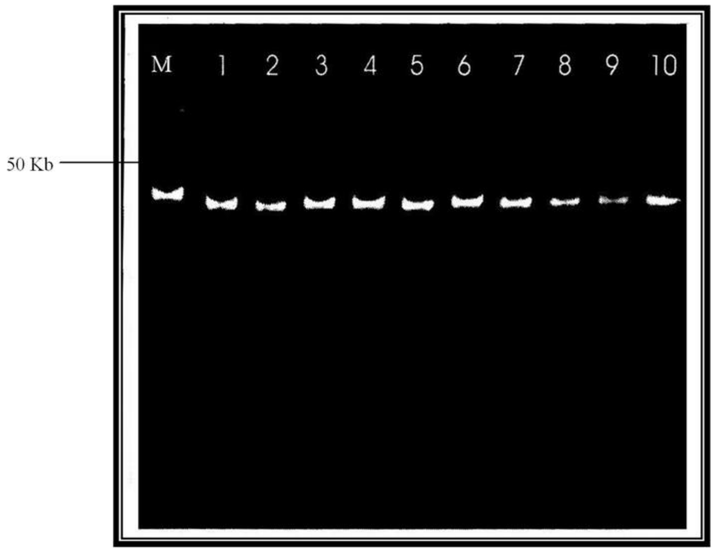
36, 45, 65, 75, 126, 179, 222, 350, 396, 460, 571, 676, 1198, 1605, 2645 زوج قاعدي. يؤخذ منه 5 مايكروليتر ويضاف إلى 2.5 مايكروليتر من محلول التحميل Blue / Orange 6x كما يضاف 2.5 مايكروليتر من محلول التحميل إلى 2.5 مايكروليتر من عينة دنا الرز الناتجة من تفاعلات الـ DAF تنبذ لثواني لسحب المكونات إلى أسفل الانبوبة. تفصل خيوط الدنا المزدوجة وتحول إلى خيوط مفردة بواسطة تسخينها لدقيقتين على درجة 95°م ومباشرةً تغمر في الثلج، ثم يتم تحميل العينات بحجم نهائي يتراوح (5–6) مايكروليتر من عينات الدنا المتضخم ومحلول التحميل في الحفر، وبعد انتهاء وقت الترحيل الذي يستغرق حوالي الساعتين يتم فصل الجهاز عن الكهرباء ثم تنقل الزجاجة الحاوية على الهلام وبهدوء إلى حاوية تحتوي 2 لتر من محلول الصبغة (نترات الفضة $AgNO_3$) وتوضع على الهزاز لفترة ثلاثون دقيقة. بعدها تنقل الزجاجة إلى حاوية فيها ماء مقطر غير ايوني وترج على الهزاز لفترة عشرة ثواني ثم ترفع وتوضع مباشرة وبسرعة في محلول التظهير ولفترة من (5–2) دقائق لحين ظهور حزم الدليل ألحجمي وحزمة عينة الدنا تترك لساعات حتى يجف الهلام ثم يصور.

النتائج والمناقشة

تم عزل الدنا الكلي لاصناف الرز بكميات مناسبة وبمعدل يتراوح بين 300-400 مايكروغرام لكل 3 غم من النسيج ونقاوة تتراوح بين 1.65-1.85 . ومن خلال ترحيل 2 مايكروليتر من الدنا المجيني لاصناف الرز على هلام الاكاروز وبتركيز 1% تبين ان الحجم الجزيئي للدنا كان بحدود 50Kb بالمقارنة مع 2 مايكروليتر من دنا العاثي لامبدا غير المهضوم شكل(1).



Distance (cm)



شكل (1): عينات الدنا المعزولة من اصناف الرز المدروسة والمرحلة على 1% من هلام الاكـــاروز حيث يمثل M الدليل الحجمي القياسي المتكون من دنا لامبدا السليم بتركيز 100 نانوغرام

وتمثل الارقام تسلسل الاصناف كما يلي:

1. عنبر محلي 2.عنبر ابيض 3.عنبر قصير 4.اباء 1 5.اباء 2

6.عنبر فرات 7.عنبر بغداد 8.عنبر مناذرة 9.العباسية 10. بسمتي العراق

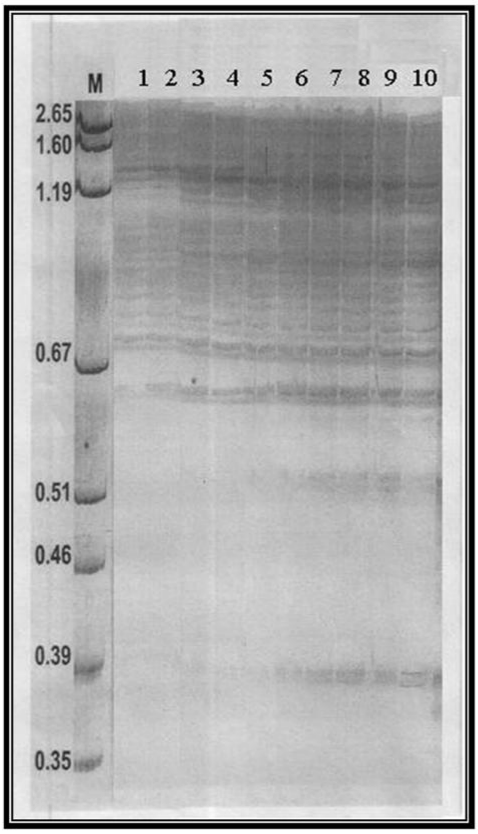
وبعد ضبط جميـــع مراحـــل التفاعـــل، اظهرت مؤشرات الـــ DAF نتائج مختلفة وفقـــاً للبادئات المستخدمة مع 10 اصناف من الرز وكما يلي:

1- البادئان OPD.14 وOPM.5

لم يتم الحصول على أي نواتج تضاعف باستخدام البادئين وهذا يعود الـــى عـــدم وجـــود المواقع المكملة لهذين البادئين في مجـــين الـــرز وهذا يتفق مع [19] والذين لم يتمكنوا من تميـــز عزلات *Discula destructive* باســـتخدام 10 مـــن البادئـــات العشـــرية وبتطبيـــق مؤشـــرات الـــDAF.

2- البادئان OPX.8 وOPT.2

تم الحصول على حزم مشـــتركة بـــين جميع العينات الـــ 10 المستخدمة في هذه الدراسة باستخدام هذين البادئين شكل (2). وهذا يتفق مـــع [20] واللذان وجدا بانه من مجموع 359 بـــادئ اظهـــــر 342 بـــــادئ حزمـــــاً متشـــــابهة Monomorphic bands بين العينات المدروسة، وان وجود الحزم المشتركة يعود ربمـــا لارتبـــاط البـــادئ بمنـــاطق التشـــابه مـــن مجـــين الـــرز Concerved sequences ولا يمكـــن الاعتمـــاد على هذه الحزم في ايجاد البصـــمة الوراثيـــة او دراسة العلاقة الوراثية لانه في الحالتين فان وجود الحزم المتباينة فقط هي التي تفي بالغرض، لـــذلك تم اهمال هذه النتائج والاعتماد على نتائج البادئات التي اظهرت حزماً متباينة فقط.



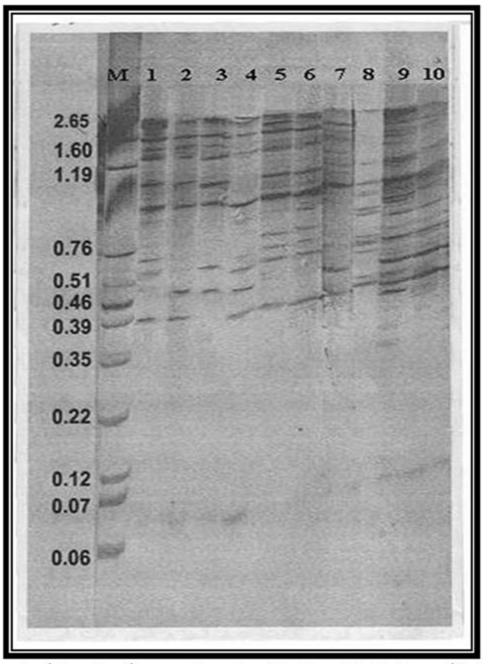
شكل (2): النواتج المتضاعفة من الدنا الكلي لاصناف الرز المدروسة والمرحلة على هلام البولي اكريلامايد 6% باستخدام البادئ OPX.08 مع الدليل الحجمي pGEM المقطع بثلاث انزيمات تقييد وتمثل الارقـام ترتيـب الاصـناف كالاتي:

1. عنبر محلي 2.عنبر ابيض 3.عنبر قصير 4.اباء 1 5.اباء 2 6.عنبر فرات
7.عنبر بغداد 8.عنبر مناذرة 9.العباسية 10. بسمتي العراق

3- البادئان OPN.7 وOPX.1

بالنسبة للبادئ الاول كان عـدد الحـزم الكلية الناتجة من استخدامه 16 حزمة شـكل (3) وهذا العدد يعادل ضعف معدل عدد الحزم الكليـة الناتجة من تطبيق مؤشرات الـــ RAPD [15]. وهذا يعود وبشكل اساسي اضـافة الـى تغييـر ظروف التفاعل من ناحية مكونات التفاعـل الـى استخدام هلام متعدد الاكريلامايد في فصل النواتج المتضاعفة والذي يمتاز بقابليته على فصل قطـع الدنا ذات الاوزان الجزيئية المتقاربة والتي تظهر على هلام الكاروز بشكل حزمة واحدة اذ ان لهذا الهلام وبتراكيز معينة القدرة على فصل قطع الدنا التي تختلف عن بعضها بنيوكليوتيده واحـدة [16] بالاضافة الى استخدام طريقة الكشـف الحساسـة وهي صبغة نترات الفضة القادرة علـى الكشـف عن وجود قطع دنا يصل تركيزها الى البيكوغرام [21] في حين ان حساسية صبغة بروميد الاثيدنوم تصل الى 10 بيكوغرام. امـا الحجـم الجزيئـي

للقطع المتضاعفة باستخدام هذا البادئ فتراوحت بين 70-2645 زوج قاعدي أي ان الحجم الجزيئي لاصغر قطعة متضاعفة كان 70 زوج قاعدي في حين كان الحجم الجزيئي لاصغر قطعة متضاعفة باستخدام مؤشرات الـ RAPD (500) زوج قاعدي [15]، وهذه من مميزات استخدام هلام متعدد الاكريلامايد وهو قدرته على اظهار الحزم ذات الاحجام الجزيئية الصغيرة ولكن في نفس الوقت غير قادرة على فصل القطع ذات الاوزان الجزيئية الكبيرة لذا يقتصر استعماله في انواع المؤشرات التي يتوقع الحصول منها على احجام جزيئية صغيرة فقط ومنها مؤشرات الـ DAF وبالنسبة لعدد الحزم المتشابهة بين جميع الاصناف فقد بلغ 4 حزم في حين بلغ عدد الحزم التي تباينت في ظهورها بين الاصناف 14 حزمة والذي ادى الى اختلاف عدد الحزم الناتجة في كل صنف والذي تروواح بين 7 حزم في الصنف ابـاء 1 الى 16 حزمة في صنف العباسية مما ادى الى ايجاد 10 نسق وراثي تميز هذا النسق في اصناف الرز العشرة المدروسة أي الحصول على بصمة وراثية مميزة لهذه الاصناف باستعمال البادئ OPN.7 بتطبيق مؤشرات الـ DAF.



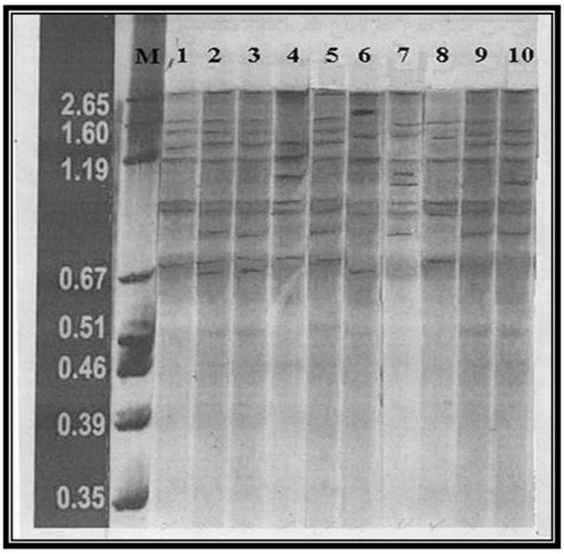
شكل (3): النواتج المتضاعفة من الدنا الكلي لاصناف الرز المدروسة والمرحلة على هلام البولي اكريلامايد 6% باستخدام البادئ OPN.07 مع الدليل الحجمي pGEM المقطع بثلاث انزيمات تقييد وتمثل الارقام ترتيب الاصناف كالاتي:

1. عنبر محلي	**2.عنبر ابيض**	**3.عنبر قصير**	**4.اباء 1**	**5.اباء 2**
6.عنبر فرات	**7.عنبر بغداد**	**8.عنبر مناذرة**	**9.العباسية**	**10. بسمتي العراق**

اما بالنسبة للبادئ OPX.1 فقد تم الحصول على 13 حزمة باستخدام هذا البادئ شكل (4). وهذا العدد من الحزم كان اعلى من عدد الحزم الناتجة من استخدام كل بادئ من البادئات الـ 20 المستخدمة في مؤشرات الـ RAPD [15]، تراوحت الاحجام الجزيئية للقطع

المتضاعفة بين (420-2650) كليو زوج قاعدي اما عدد الحزم الناتجة من استخدام هذا البادئ مع كل صنف فقد تراوحت بين (7-10) حزمة (7 حزم في الاصناف: اباء1 وعنبر فرات وعنبر مناذرة الى 10 حزم في الاصناف عنبر ابيض، عنبر قصير عنبر بغداد). وهذا الاختلاف ناتج من اختلاف عدد المواقع المكملة لتسلسل البادئ في تلك الاصناف والناتجة من الاختلاف في المادة الوراثية لها والتي يمكن الكشف عنها باستخدام مؤشرات الدنا. وكان عدد الحزم المتشابهة بين جميع العينات المدروسة 4 في حين كانت عدد الحزم التي تباينت من ظهورها بين الاصناف 9 حزم اختلفت هذه الحزم في ظهورها بين الاصناف مما ادى بدوره الى ايجاد عدة انواع من النسق الوراثي (DAF Patterns) بلغ 8 انواع كان هذا النسق متميزاً في 6 اصناف من الرز والذي يعني ايجاد بصمة وراثية لها باستخدام هذا البادئ وهذه الاصناف هي:

عنبر محلي، اباء 1، اباء 2، عنبر فرات، عنبر بغداد، عنبر مناذرة كما تميز الصنف عنبر فرات بوجود حزمة ذات وزن جزيئي 2558 كيلو زوج قاعدي ظهرت في هذا الصنف فقط دون بقية الاصناف مما يجعل امكانية الاستفادة منها كمؤشر خاص بالصنف Cultivar specific marker ويمكن استرجاع الحزمة من الهلام وكلونتها وتصميم البادئات الملائمة استناداً على تسلسلها لتكون بمثابة مجس مرتبط بهذا الصنف خاصة اذا عرفنا بان استرجاع حزمة من هلام الالكريلامايد اسهل بكثير من استرجاع الحزمة من هلام الاكاروز وذلك لاختصار خطوة التنقية فيها.



شكل (4): النواتج المتضاعفة من الدنا الكلي لاصناف الرز المدروسة والمرحلة على هلام البولي اكريلامايد 6% باستخدام البادئ OPX.01 مع الدليل الحجمي pGEM المقطع بثلاث انزيمات تقييد وتمثل الارقام ترتيب الاصناف كالاتي:

1. عنبر محلي 2.عنبر ابيض 3.عنبر قصير 4.اباء 1 5.اباء 2 6.عنبر فرات

7.عنبر بغداد 8.عنبر مناذرة 9.العباسية 10. بسمتي العراق

ومن هذا نستنتج بانه امكن ايجاد بصمة وراثية لعشرة اصناف من الرز الشائعة في العراق المدروسة باستخدام بادئين فقط وبعد تجربة 6 بادئات، وهذه النتيجة مشجعة للاستمرار في هذا النوع من المؤشرات في دراسات مقبلة رغم صعوبة تحقيقها مقارنة بالـ RAPD وذلك

لزيادة المعلومات التي يمكن الحصول عليها مـــن استعمال عدد قليل من البادئات وخاصة اذا كـــان هدف تلك الدراسات ايجاد البصمة الوراثية الـــذي يفضل استخدام المؤشر الذي يحوي على عدد اكبر من الحزم والتي تعني كشفها لعـــدد اكبـــر مـــن المواقع ومن هنا اقترن تسمية الـــDAF لزيـــادة استعماله في مجال البصمة الوراثية.

المصادر:

1. Karp, A., Edwards, K.J., Buford, M., Funk. S., Vosman, B., Morgante, M. and Hewitt, G.M. 1997, Molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and techniquies. Nature Biotechnology.15:625-628.
2. Tilman, D., Wedin, D. and Knopps, J. 1996, Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. Nature.379:718-720.
3. Karp, A. and Edwards, K.J. 1997, DNA Markers: a global overview, In: Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, P.M. (Eds) DNA markers, Protocols, Application and Overview. Now York.:1-13.
4. Staub, J.E., Serquen, F.C. and Gupta, M. 1997, Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. Hort. Sci. 31:729-741.
5. Stuber, C.W. and Khanna, K.R. 1991, Isozyme markers and their significance in crop improvement. Biochemical aspects of crop improvement. CRC Press, Boca Raton, USA.:59-77.
6. Kraic, J., Horvath, L., Gregova, E. and Zak, I. 1995, Standard methods for electrophoretic separation of wheat glutenins and gliadins by SDS-PAGE. Rostl Vyr. 41:219-223.
7. Paterson, A.H., Tanksly, S.D. and Sorrell, M.E. 2004, DNA Markers in plant improvement. Adv. Agron.46:39-90.
8. Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. 1991, DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology. 9:553-557.
9. Wilde, J. Waugh, R. and Powell, W. 1992, Genetic fingerprinting of Theobroma clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. Theor. Appl. Genet. 83:871-877.
10. Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, P.M. 1996, A method for profiling nucleic acid of unknown sequence using arbitrary oligonucleotide primers US. Patent. 5:413-414.
11. Jarret, R.L. and Austin, D.F. 1994, Genetic diversity and systematic relationship in sweet potato (*Ipomoea batatas*) and related species as revealed by RAPD analysis. Genet. Res. Crop. Evol.41:165-173.
12. He, G., Prakash, C.S. and Jarret, R.L. 1997, Analysis of genetic diversity in sweet potato (*Ipomoea batatas*) germplasm collection using DNA amplification fingerprinting. Genome. 38:938-945.
13. Weigand, F., Baum, M. and Udupa, S. 1993, DNA molecular marker techniques. Technical manual. No.20 International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria.
14. Sahgi-Maroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgens, R.A. and Allard, R.W. 1984, Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:8014-8018.
15. Al-Judy, N.J. 2004, Detecting of DNA fingerprints and genetic relationship analysis in local and Improved Rice (*Oryza sativa L.*) varieties in Iraq using RAPD

19. Trigiano, R., Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J., Weaver, K.R. and Gresshoff, P.M. 2002, DNA amplification fingerprinting of doywood anthracnose Fungi Proc. South. Nurs. Assn. 15:10-17.
20. He, G. and Prakash, C.S. 1997, Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea L.*) Euphytica,. 97:143-149.
21. Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, P.M. 1992, DNA amplification fingerprinting of bacteria. Appl. Microbiol. Biotech. 38:70-76.
markers. Ph.D. a thesis. Baghdad University. College of Science.
16. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989, Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. Cold spring Harbor. N.Y.
17. Caetano-Arolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. 1994, DNA amplification fingerprinting with very short primers. Plant Mol. Biol. Rep.19:18-25.
18. Bassam, B.J., Caetano-Arolles, G. and Gresshoff, P.M. 1991, Fast and Sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 38:70-76.

Use of DAF markers (DNA Amplification Fingerprint) to Assess Genetic Diversity of Rice (*Oryza satival* L.)

*Neamat J. Al-Judy**
* Biology Dept. – College of Science - Baghdad university

Key Words: DNA Amplification Fingerprint, genetic diversity, genetic pattern, DNA Markers

Abstract

This study was carried out to assess genetic diversity of ten cultivars of Rice *(Oryza sativa L.)*. One of DNA markers based on Polymerase Chain Reaction (PCR) was used namely DAF markers (DNA Amplification Fingerprint). Six primers were tested, the results showed, that no amplification products using the primers OPD.14 and OPM.5. Two primers (OPX.8 and OPT.2) produced monomorphic band across all cultivars, while only two primers generated polymorphic bands. The number of total bands produced from one of them (OPN.7) were sixteen. Also this primer produced ten polymorphic profiles (DAF patterns) which were unique to the ten cultivars that could be distinguished. The number of total bands generated by primer OPX.1 were thirteen and this primer produced eight polymorphic patterns which was unique for distinguishing six cultivars. This means that DAF markers were able to identify all rice cultivars using only two primers reflecting the high potentialities of these markers for their applications in fingerprinting.