فصلنامه علمي - پژوهشي گياه و زيست بوم
سال 7، ويژه نامه شماره 2-29،

# ارائه یک روش آسان برای استخراج و خالص‌سازی DNA از گیاهان دارویی

فرهاد حریری اکبری[1]*، منصور امیدی[2]، علیرضا اطمینان[3]، مهدی شفیعی[4]، سعید پروانه[5]، رضا بورد[1]

**چکیده**

استخراج DNAی ژنومی با کیفیت و کمیت بالا یکی از اساسی‌ترین نیازهای ژنومیکس به شمار می‌آید. امکان استخراج DNA، از بعضی از بافت‌های مختلف گیاه وجود دارد ولی بهتر است استخراج DNA از برگ‌های تازه انجام شود. به علت حضور ترکیبات آلی و متابولیت‌های ثانویه بسیار زیاد از قبیل پلی‌ساکاریدها، آلکالوئیدها، تانن‌ها و ترکیبات فنولی، ترپنوییدها و غیره در بافت گیاهان دارویی، استخراج DNA به سهولت انجام نمی‌گیرد، بنابراین یافتن روشی مناسب برای کاهش این ترکیبات بسیار مفید به نظر می‌رسد، زیرا اساس تحقیقات مولکولی از جمله مهندسی ژنتیک و ژنومیکس، DNAی با کیفیت و خالص می‌باشد. در این تحقیق، DNAی ژنومی در خانواده‌های مختلف گیاهان دارویی از بافت‌ها و اندام‌های مختلف استخراج شده است، از جمله برگ، ساقه گیاه شوید (*Anethum graveolense*)، داتوره (*Dutora steramonium*)، گندواش(*Artemisia annua*)، کالوس و بافت‌های غیرتخصصی (مریستمی) گیاهان در حال انقراض از جمله گیاه مشک بو (*Ducrosia anethifolia*)، سرخدار (*Taxus baccata*) و گیاه آلوورا (*Aloe vera*). همچنین کمیت و کیفیت DNAی استخراج شده به وسیله الکتروفورز ژل آگارز 1٪ و روش اسپکتوفوتومتری مشخص می‌گردد. نتایج نشان می‌دهد که DNAی ژنومی استخراج شده نسبتا خالص و مطلوب است و در صورت آلودگی به متابولیت‌های مختلف روش‌های خالص‌سازی به کار گرفته شده است. در این تحقیق ما تلاش کردیم روشی مناسب، سریع و کارآمد که در همه جا در دسترس باشد را برای استخراج DNAی ژنومی از گیاهانی که دارای ارزش دارویی هستند، ارائه دهیم.

**کلمه‌های کلیدی:** گیاهان دارویی، استخراج DNA، الکتروفورز، ژل آگاروز، خالص‌سازی DNA

1- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران
2- دانشگاه تهران، گروه زراعت، تهران، ایران
3- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه، گروه زراعت، کرمانشاه، ایران
4- دانشگاه زابل، گروه بیوتکنولوژی، زابل، ایران
5- دانشگاه زابل، گروه باغبانی، زابل، ایران
* مسئول مکاتبه. (Hariri.farhad267@gmail.com)

تاریخ دریافت: زمستان 1388 تاریخ پذیرش: پاییز 1389



Archive of SID
www.SID.ir

## مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی در ایران و سایر نقاط جهان به عنوان محصولات اصلی و فرعی بسیار ارزشمند می‌باشد، لذا پر واضح است که تعیین ویژگی‌های ژنتیکی، مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و اکولوژیکی این دسته ازگیاهان، به منظور بهره برداری پایدار اقتصادی، اهداف بهداشتی و سلامتی و همچنین حفظ تنوع موجود در عرصه‌های طبیعی مراتع کشور و جلوگیری از حذف گونه‌های در حال انقراض ضروری به نظر می‌رسد (کریمی، 1377). گیاهان دارویی به دلیل داشتن ترکیبات متابولیت ثانویه که خاصیت دارویی دارند از اهمیت روز افزونی برخوردار هستند زیرا در حال حاضر به دلیل مقاوم بودن عوامل بیماریزا به داروهای شیمیایی و آنتی بیوتیکها نیاز به منابع جایگزین در جهت رفع نیازهای بهداشتی، سلامتی و همچنین کاهش مضرات مواد شیمیایی احساس می‌شود (Pirttii, 2001). در این بین، مباحث مولکولی از اهمیت روز افزونی در مطالعات مختلف علوم زیستی برخوردار می‌باشند، با استفاده از ابزارهای بیوتکنولوژی از جمله روش‌های مهندسی ژنتیک و تهیه کتابخانه ژنی امکان حفظ و نگهداری ژرم پلاسم میلیاردها ژنوتیپ در حجم کم و هزینه پایین ممکن است، و همچنین استفاده از ژنومیکس (که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به انواع متنوع مارکرهای مولکولی اشاره کرد)، و با مشخص شدن میزان تنوع ذخایر وراثتی و روابط ژنتیکی بین افراد در یک گونه، که از اهداف مهم و ارزشمند اصلاح گونه‌های گیاهی بشمار می‌رود، می‌توان گفت استخراج اسیدهای نوکلئیک اولین و مهم‌ترین گام در انجام این مطالعات باشد(فارسی، 1382 ؛ قره یاضی، 1375). در اختیار داشتن دستورالعمل‌های کارآمد، آسان و کم هزینه به منظور استخراج DNA به منظور نمونه‌گیری و دست‌ورزی در انجام کارهای مولکولی در آزمایشگاه بسیار مهم و ضروری است، همچنین در بسیاری از موارد استخراج مواد ژنتیکی با محدودیت‌هایی همراه می‌باشد که تغییراتی در شرایط، و مواد مورد استفاده در استخراج توانسته است کمیت و کیفیت DNA استخراج شده را بهبود بخشد (نقوی، 1384 ؛ وجدانی، 1375). این تحقیق با مطالعه و انجام آزمایشات گوناگون باروش‌های مختلف استخراج ژنوم بر روی گیاهان متنوع دارویی، به یک روش مناسب، جهت استخراج ژنوم از گیاهان دارویی شوید، گندواش، داتوره، مشک بو، سرخدار، و آلوورا دست یافته که همگی از گیاهان دارویی و دارای سطح بالایی از ترکیبات متابولیتی و آروماتیک هستند، که این موضوع خود نشان دهنده کارایی بالای این روش در استخراج ژنوم گیاهان دارویی با متابولیت ثانویه بالا است. در جهت نشان دادن اهمیت گیاهان دارویی سه گیاه را در این مقاله به عنوان نمونه ذکر کرده‌ایم.

گیاه دارویی شوید یا شبت با نام علمی (*Anethum graveolense*) و مشک بو یا مشگک (*Ducrosia anethifolia*) گیاهانی علفی و یک و یا چند ساله از خانواده‌ی چتریان (Apiaceae) می‌باشد. این گیاهان به رنگ سبز، دارای ارتفاع حدود 80- 10سانتی‌متر و بدون کرک می‌باشد. ساقه‌ی گیاه به صورت متعدد، از قاعده دارای انشعابات دوشاخه‌ای می‌باشد. این انشعابات به صورت شاخه‌های کم و بیش منشعب و به حالت ایستاده یا خیزان می‌باشد. بخش‌های پایینی گیاه دارای دو برگ بلند به طول 16- 10 سانتی‌متر بوده و پهنک آن‌ها دارای بریدگی سه تایی است. گل‌ها به رنگ‌های سفید، زرد تا کمی قرمز دیده می‌شود که



Archive of SID

www.SID.ir

به صورت گل آذین چتر مرکب می‌باشند (مجنون حسینی، 1386).

سابقه‌ی استفاده‌ی دارویی و غذایی از این گیاهان در ایران و هند و سایر نقاط دنیای قدیم در حدود 1500 سال قبل از میلاد می‌رسد و موارد استفاده گسترده از اندام رویشی و بذر و اسانس‌های این گیاهان می‌باشد. متابولیت‌های ثانویه پر اهمیت این گیاهان از قبیل دکارون، دآلفافلاندرون، و لیمونن، همچنین افزون بر این مواد فلاونوئید (Flavonid) و کومارین (cumarine) و گزانتوان (Xanthon)، دکانال نرمال (n-decanal، ضد قارچی)، دودکانال (dodecanal، ضد باکتری)، آلفا -پینن (α-pinenen دافع حشرات در حشره‌کش‌ها، درمان سوختگی و بریدگی پوست)، بتا - میرسن (β-myrcene، معطرکننده‌ی چای) و لینالوئول (linalool، ایجاد کف در شوینده‌های بهداشتی) را نام برد، هم در این گیاهان وجود دارند (یزدی، 1383)، این گونه‌های دارای اثرات ضد میکروبی، شل‌کننده‌ی عضلانی و تسکین‌دهنده می‌باشند و در تولید داروهای ضد افسردگی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند و در طب سنتی از این گیاه برای رفع کمردرد و سردرد استفاده می‌شود، در نتیجه استفاده از روش‌های مولکولی در جهت درک تنوع موجود در بین جمعیت‌های مختلف این گیاهان و همچنین دستکاری ژنتیکی در مسیر ساخت و افزایش تولید متابولیت‌های مفید گامی در جهت رفع نیاز کشور به محصولات گیاهان دارویی می‌باشد (مصطفوی، 1384).

گونه‌ی *Artemisia annua* متعلق به خانواده‌ی *compositeae* است. دارای برگ‌هایی شبیه به برگ‌های سرخس، گل‌های زرد روشن، و دارای بویی شبیه به کافور است. ارتفاع آن حدود 2m، و دارای یک ساقه است که شاخه‌ها برگ‌های آن به صورت متناوب آرایش یافته‌اند. طول برگ‌ها بین 5-2/5 است. نام‌های دیگر این گیاه شامل *Sweet Anni*، *sweet wormwood* است (لاری، 1381). در سال 1971 ثابت شد که عصاره‌ی این گیاه دارای فعالیت ضد مالاریاست. در پی آن در 1972 عوامل فعال آرتیمیزینین از گیاه جدا و ساختار شیمیایی آن مشخص شد. این ماده در تریکوم‌های غده‌ای برگ‌ها و ساقه‌ها وجود دارد و در قسمت‌های بالایی گیاه که تازه رشد کرده‌اند تمرکز بیش‌تری دارند، از طرفی این گیاه دارای خواص ضدسرطان است و دارای خاصیت توکسیک انتخابی برای برخی سلول‌های سرطان سینه و برخی از انواع سرطان پروستات است(Baraldi, 2008).

اکثر این گیاهان بومی ایران و قسمت‌هایی از افغانستان می‌باشد. در ایران این گیاه در استان‌های کرمان، گلستان، مازندران، خراسان، یزد، سمنان، هرمزگان، سیستان و بلوچستان، اصفهان، لرستان، بوشهر و تهران رویش دارند (یزدی، 1383).

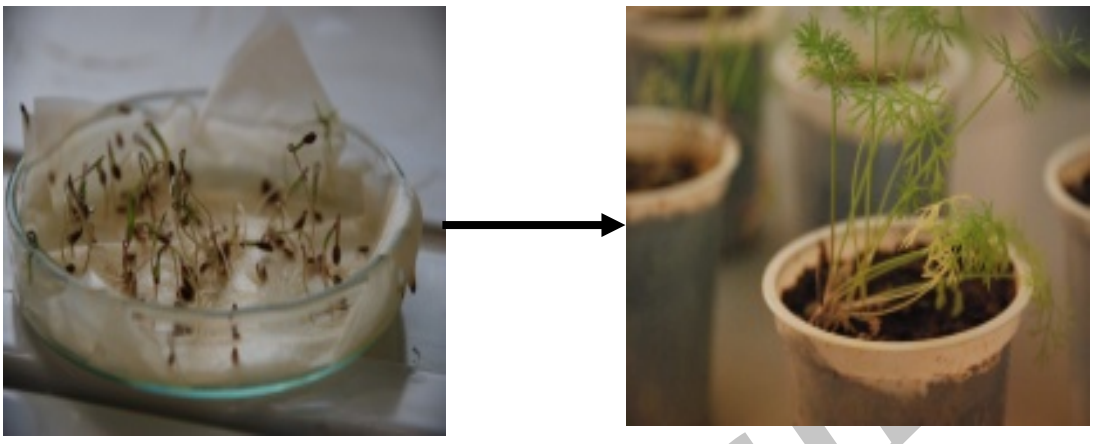
## مواد و روش‌ها

### کشت گیاه و تولید کالوس

در مورد گیاه شوید ابتدا بذرهای گیاهان از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری و در ظروف پتری دیش بر روی کاغذ صافی مرطوب قرارگرفت و بعد از جوانه‌زنی به گلدان‌های پلاستیکی منتقل گردید. هنگامی که طول گیاه به 10 تا 15 سانتی‌متر رسید و همچنین برگ‌ها به اندازه کافی رشد کرده باشند برای انجام عمل استخراج آماده است (شکل 1).

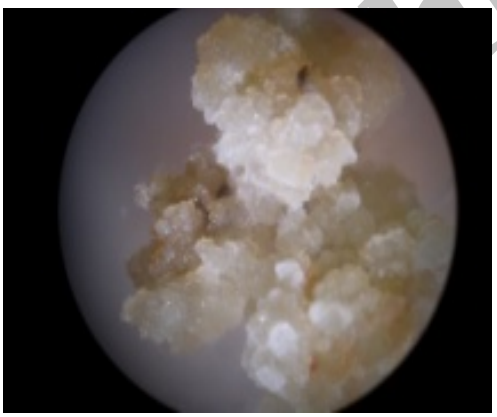


Archive of SID
www.SID.ir



**شکل 1- نمایی از گیاهان کاشته شده**

بذور گیاه مشک بو در محیط کشت موراشی و اسکوگ (MS, 1962) با گلوکز در مقدار 3-2 ٪ و آگار به مقدار 8 g/L، تنظیم‌کننده‌های رشد از جمله اکسین و سیتوکنین در غلظت‌های 2mg/L و 1 محیط کشت، درفضای کاملاً تاریک و دمای 26 و 24 درجه سانتی‌گراد به منظور تولید کالوس، کشت گردید (شکل 2)، (اشتری، 1387). گیاهان دیگری نیز در مزرعه و گلخانه برای تولید گیاهچه و برگ تازه کاشته شده بودند (شکل 3).



**شکل 2- نمایی از کالوس**

**شکل 3- نمایی از گلخانه**



www.SID.ir

## استخراج DNA

برگ و کالوس‌های تولید شده را در هاون (اتوکلاو شده و قرارگرفته در فریزر20-) به کمک نیتروژن مایع کاملاً آسیاب کرده (نقوی، 1386) و به تیوب‌های 1/5 ml انتقال می‌دهیم. به هر یک از تیوب‌ها 900 میکرولیتر محلول بافر استخراج SDS 4% (0/4 گرم SDS در 10 سی‌سی محلول تریس، EDTA، NaCl) اضافه کرده و به مدت 45 دقیقه در بن ماری 65 درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم (لازم به ذکر است که بایستی عمل اینورت کردن به صورت متناوب صورت پذیرد. به هر یک از تیوب‌ها 300 میکرولیتر استات پتاسیم اضافه شده و به مدت 25 دقیقه در ظرف محتوی یخ قرار می‌دهیم. تیوب‌ها را در دمای 3 درجه سانتی‌گراد، به مدت 15 دقیقه و در12000 rpmسانتریفوژ می‌کنیم. 750 میکرولیتر از مایع فوقانی را کشیده، به تیوب جدید انتقال داده و 750 میکرولیتر ایزوپروپانول به آن اضافه می‌کنیم و 5 دقیقه در دمای آزمایشگاه 25 درجه سانتی‌گراد) قرار می‌دهیم. مجددا تیوب‌ها را در دمای 3 درجه سانتی‌گراد، به مدت 15 دقیقه و در 12000 rpm سانتریفوژ می‌کنیم. مایع فوقانی را دور ریخته وتیوب‌ها را به مدت 20 تا 30 دقیقه در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم. تا Pellet (شکل 4) به طور کامل خشک شود. در صورت وجود آلودگی (بعد از سنجش کمیت و کیفیت ژنوم استخراج شده و رنگ رسوب) با متابولیت‌ها مراحل خالص‌سازی انجام خواهد شد (Ribeiro, 2007).

**شکل 4- pellet شفاف به دست امده است که نشان دهنده‌ی نبود آلودگی می‌باشد**



www.SID.ir

## خالص‌سازی

به هریک از تیوب‌ها 700 میکرولیتر آب دیونیزه (DDW) اتوکلاو شده اضافه نموده، به مدت 1 ساعت در 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود، تپ می‌زنیم تا Pellet تشکیل شده در انتهای تیوب کاملاً حل شود و سپس محلول کلرفرم 24/ایزوآمیل الکل 1 (24:1) به حجم 700 ماکرولیتر افزوده می‌شود و برای مدت 20 ثانیه به آرامی و خوب تکان داده شود تا امولسیون یکنواختی بدست آید. سانتریفیوژ با دورrmp 13000 به مدت 10 دقیقه که دو فاز تشکیل می‌شود: فاز زیری کلرفرم ایزوآمیل الکل و فاز رویی محلول حاوی DNA. فاز رویی به تیوپ 2 میلی‌لیتری جدید منتقل گردیده و 0.1 حجم مایع فوقانی سدیم استات (3 مولار، pH = 8) اضافه می‌کنیم. 2/5 برابر حجم مایع فوقانی الکل مطلق می‌زنیم (100٪) و سپس 5 دقیقه صبر می‌کنیم تا آبگیری شود. سانتریفیوژ با دور rmp 13000به مدت 10 دقیقه، مایع فوقانی را دور ریخته و به pellet، 100 ماکرولیتر الکل 70٪ می‌زنیم. الکل را خارج کرده و در اینکوباتور به مدت 20 تا 30 دقیقه در 37 درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم تا کاملاً خشک شود و سپس 100 ماکرولیتر محلول TE و یا آب مقطر (DDW) اضافه می‌کنیم و نمونه‌ها را در یخچال 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌کنیم به مدت 1 ساعت و بعد به خوبی تپ می‌زنیم تا DNA به خوبی مخلوط و رقیق شود (Worden, 2009).

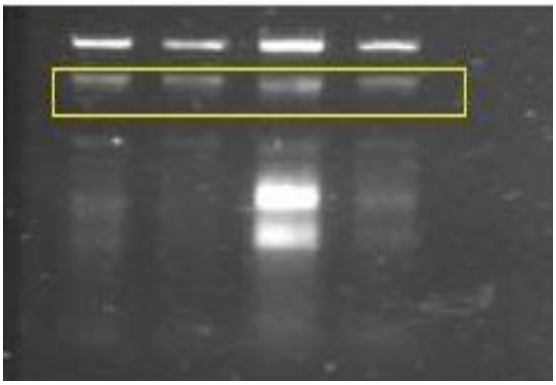
## الکتروفورز ژل آگاروز

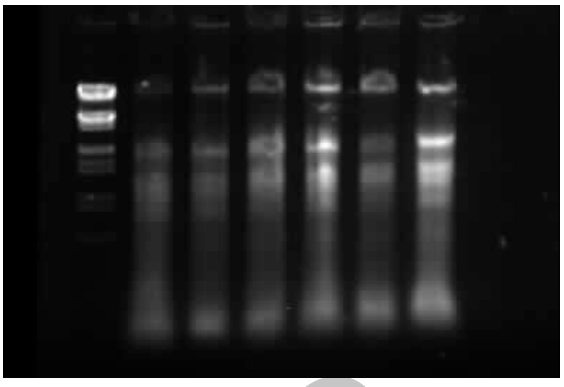
برای تفکیک و جداسازی اسیدهای نوکلئیک از روش‌های مختلفی از جمله کروماتوگرافی تعویض یونی و الکتروفورز می‌توان استفاده کرد که اساس همه آنها بر پایه اختلاف بار الکتریکی می‌باشد (Clark, 2005). در این مطالعه از روش ساده و سریع الکتروفورز ژل آگارز 1٪ استفاده شده است. 5 میکرولیتر از نمونه‌های DNAی آماده شده را با 5 میکرولیتر ماده (Dye) رنگی مخلوط کرده و محتوی 9.5 میکرولیتر را در چاهک‌های ژل آگارز 0/1٪ قرار می‌دهیم. ژل آگارز به مدت 35 دقیقه با ولتاژ ثابت 90 ولت، الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (به مدت 30 دقیقه)، DNA در زیر نور UV در دستگاه Geldoc مشاهده و عکس‌برداری از آن انجام شده است و یا می‌توان توسط دستگاه اسپکتوفوتومتری کیفیت و کمیت DNA را سنجید (شکل 5).



Archive of SID

www.SID.ir





**شکل 5- الکتروفورز ژل آگارز DNA نمونه‌های کالوس گیاه مشک بو DNA،در هر چهار تکرار دارای باند شفاف و کاملاً مشخص می‌باشد (سمت چپ)**

**الکتروفورز ژل آگارز DNA نمونه‌های گیاه شوید همراه با نشانگر (ladder) که نشان دهنده غلظت DNAی استخراج شده می‌باشد (سمت راست)**

## نتایج

ژل الکتروفورز باندهای با وزن زیاد و وضوح زیاد را برای تمام نمونه‌ها نشان می‌دهد، و همچنین این باندها ثابت می‌کنند که DNA حاصل بدون شکستگی هستند و از کیفیت مطلوب برخودار می‌باشد.

کمیت آن با دستگاه اسپکتوفوتومتر سنجیده شد که شاخص خلوص (Purity Index) در تابش دو طول موج مختلف260 به 280 نانومتر عدد 1.76 تا 2.01 را نشان می‌دهد که DNA ژنومی از کمیت مناسبی برخوردار است. با توجه به اینکه استخراج DNA از گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن سطح بالای ترکیبات فنولی، آلکالوئیدی، تانینی، روغنی و غیره مشکل و نیازمند روش‌های خالص‌سازی است، ولی با استفاده از بافت‌های تمایز نیافته در این روش، مانند برگ‌های تازه و جوان همچنین کالوس می‌توان (مرحله دوم روش ارائه شده) بدون نیاز به تخلیص، امکان استخراجی DNA را با سرعت بیش‌تر و صرف هزینه کم‌تری مهیا سازد (شکل 6). همان طور که تصویر ژل الکتروفورز نشان می‌دهد بدون به کار بردن RNase، Protease و انجام پروسه تخلیص توسط فنول و کلروفرم ایزوآمیل الکل، DNAی حاصله دارای کیفیت نسبتاً مناسبی می‌باشد (شکل 5).

در صورت آلوده بودن (با توجه به مرحله خالص‌سازی) با خالص‌سازی می‌توان DNAی خالص و مناسب به دست آورد، البته باید به این نکته توجه کرد که انجام مراحل خالص سازی منجر به شکستگی و فشردگی DNA می‌شود، پس دقت در انجام مراحل کار از اهمیت خاصی برخوردار است تا نیازی به تکرار نباشد (شکل 6).

برخی تغییرات در پروسه خالص‌سازی و استخراج از نظر دما، زمان و مقادیر مواد، مورد نیاز می‌باشد که

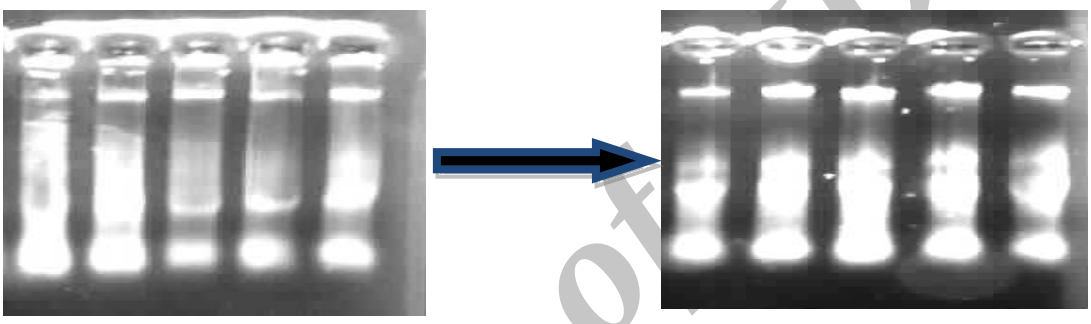


Archive of SID

www.SID.ir

می‌تواند روشی مناسب را در استخراج DNA ژنومی و دیگر تحقیقات مولکولی فراهم کند (Keb, 2002).

در این تحقیق با اعمال روش‌های متـــداول مختلف از جملـــه CTAB، DELLAPORTA، Qiagen DNeasy Mini Plant Kit، و غیره جهت استخراج DNA از گیاهان دارویی نتیجه گرفتیم که DNAی حاصل از این روش ارائه شده، دارای کیفیت بسیار مناسب‌تری برای آزمایشات مولکولی می‌باشد. روش مذکور بسیار کم هزینه است به طوری که این روش نسبت به استفاده از کیت‌های استخراج که امروزه در آزمایشگاه‌های ژنتیک رایج شده است هزینه آزمایش را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد. از طرفی این روش دارای تعداد مراحل کم‌تری نسبت به روش‌های CTAB می‌باشد بنابر این در مدت کوتاه‌تری می‌توان تعداد نمونه‌های بیش‌تری را با کیفیت بهتری استخراج کرد.



**شکل 6- استخراج DNAی ژنومی گیاه شوید (Anethum graveolense)**

**الف- شکل سمت چپ قبل از خالص سازی، ب- شکل سمت راست بعد از خالص سازی**

**شکل سمت راست به مراتب نسبت به سمت چپ دارای DNAی خالص‌تر است. لازم به ذکراست این DNA به اندازه‌ای خالص است که بعد از این مرحله در کارهای مولکولی مثل بررسی تنوع ژنتیکی با مارکر AFLP استفاده شده است.**

## بحث

با مقایسه بین روش‌های مختلف استخراج DNA، در صورتی گیاه دارای متابولیت‌های زیادی نباشد استفاده از متدهای معمول آزمایشگاهی کار آمد است. ولی در صورتی گیاه دارویی دارای سطح بالایی از مواد متابولیتی است، به خصوص در زمانی که تحت تنش قرار گرفته باشد (شفیعی، 1390)، در این صورت استفاده از پروتکل‌های رایج کارآمد نبوده و یا باید برای بهینه سازی آن زمان زیادی را صرف کرد در صورتی که اعمال این روش در گیاهان دارویی مختلف که از لحاظ تیمار همچنین محیط کشت دارای تنوع بسیار زیادی می‌باشند نشان داد که DNAی ژنومی خوب و قابل قبولی با صرف هزینه و وقت کم قابل حصول می‌باشد. در این روش دیگر نیازی به استفاده از تریتون X-100 و همچنین ماده polyvinylpyrrolidone (PVP)، که در روش‌هایی که بافر CTAB مصرف می‌شود نیست و شوینده sodium dodecyl sulfate (SDS) که در مراحل اول استفاده می‌شود کارایی لازم را جهت لیز کردن



Archive of SID

www.SID.ir

غشاء سلول، و یکنواخت کردن بار پروتئین‌ها دار است (سلوکی، 1385).

بر طبق گزارش Ribeiro *et al* (2007) استفاده از کیت Mini Plant Kit از برگ‌های تازه و جوان DNA بسیار خوبی حاصل می‌شود ولی اگر گیاه تا حدودی دچار تنش شده باشد و یا مسن باشند محصول مولکولی مورد نظر بسیار کاهش یافته و یا کارآمد نیست. محصولات زنجیره پلی‌مرازی(PCR product) این گفته را ثابت می‌کنند، زیرا آنزیم پلی‌مراز (Taq DNA Polymerase) فعالیت پلی‌مرازی خود را به خوبی در حضور متابولیت‌ها انجام نمی‌دهد، متابولیت‌ها مانع فعالیت مواد مورد استفاده در استخراج می‌شوند، همچنین در صورتی که تعداد نمونه‌ها و یا تکرار آزمایش افزایش یابد نتایج خوبی حاصل نمی‌شود. ولی در این روش بعد از استخراج اگر آلودگی به متابولیت مشاهده شود می‌توان در چند مورد (بهتر است یکبار زیرا DNA فشرده شده و یا می‌شکند) مراحل خالص‌سازی را انجام داد. در این روش حتی از برگ‌های زرد و مسن، ژنومی خوب و قابل قبولی به دست آمده است.

بر طبق Al-Saghir (2009) لازم به ذکر است که هیچکدام از این روش‌ها مناسب برای بافت‌های چوبی و خشن مثل ساقه خشن و بذور آن‌ها نبوده و برای استخراج از این بافت‌ها نیاز به روش‌های دیگر می‌باشد. زیرا خرد کردن بافت‌های گیاه در حد سطوح زیر سلولی و فروپاشی اندامک‌های سلولی با متدهایی ساده‌ای که موجود است امکان‌پذیر نیست و این بافت‌ها دارای آلودگی متابولیتی زیادی هستند.

البته با توجه به حذف نیتروژن مایع در روش‌های مبتنی بر کیت این روش‌ها از خطر کم‌تری برخوردار می‌باشند (Keb *et al.*, 2002) ولی این روش‌ها دارای هزینه بیش‌تری هستند و در همه مراکز تحقیقاتی امکان تهیه آن وجود ندارد، در این روش از نیتروژن مایع به دلیل کاهش هزینه و در دسترس نبودن ابزار پیشرفته خردکننده بافت گیاه استفاده شده است، نیتروژن مایع هم نقش شکننده کردن بافت گیاهی را به عهده دارد و هم از فساد سریع بافت خرد شده جلوگیری می‌شود. این تحقیق به دلیل سهولت و استفاده از مواد در دسترس می‌تواند جایگزین خوبی برای روش‌های مبتنی بر کیت باشد.

*Maria et al* (2001)، با استخراج DNA از گیاهان دارویی با ترکیبات آروماتیکی با روش CTAB موفق به استخراج DNAی با کیفیت مطلوب شد ولی زمان زیاد و تعداد بالای مراحل از کیفیت DNA کاسته است و در تحقیقشان نیاز به مصرف PVP و mercaptoethanol بوده است، استفاده از این مواد باید با وسایل مخصوص و دستگاه هود باشد و همچنین اضافه کردن کلرید لیتیوم (Li Cl) در بافر CTAB منجر به جلوگیری از جداسازی RNA از DNA استخراج شده است ولی در روش ذکر شده با اضافه کردن 2 ماکرولیتر RNase در آخرین مرحله اقدام به حذف RNA کرده‌ایم و پروتئین نیز به خاطر استفاده از استات پتاسیم که باعث تجمع آن‌ها شده به آسانی با سانتریفیوژ رسوب داده می‌شود.

استفاده از این روش درگیاهان نام برده شده در این تحقیق برای اولین بار صورت گرفته و در منابع موارد مشابه که با این گستردگی از خانواده‌های مختلف گیاهان دارویی ژنوم استخراج گردد مشاهده نگردیده. نتایج حاصل از این مطالعه در تحقیقات مولکولی مختلفی از جمله تعیین فاصله ژنتیکی با مارکر مولکولی AFLP و انتقال ژن استفاده شده است.



Archive of SID

www.SID.ir

در خاتمه از همکاران پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی و کلیه اساتید و همکاران محترم مجله گیاه و زیست بوم کمال تشکر را دارم.

## منابع

**اشتری،ر.، و م.سلوکی.**1387. اثر هورمون‌ها و ریزنمونه بر روی کشت بافت گیاه مشگک، پایان‌نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل.

**سلوکی،م.، و ن.ریگی نژاد.** 1385. بیوتکنولوژی گیاهی، ص 113 تا 137.

**شفیعی،م.** 1390. کشت بافت و سوسپانسون گیاه در حال انقراض مشگک، پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل.

**فارسی،م.، و ج.ذوالعلی.** 1382. اصول بیوتکنولوژی گیاهی، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ص 495(ترجمه).

**قره یاضی،ب.** 1375. کاربرد نشانگر DNA در اصلاح نباتات، چهاردهمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات اصفهان.

**کریمی،م.، و ح.فرخی.** 1377. بررسی گیاهان دارویی ایران در مناطق مختلف و تعین گونه‌های دارای اولویت‌های دارویی.

**لاری یزدی،ح.، ر.خاوری نژاد، و ع.روستائیان.** 1381. بررسی کمی ماده ضد مالاریایی آرتمیزینین (Artemisinin) در عصاره گیاه گندواش (Artemisia annua) مناطق شمالی ایران، فصلنامه گیاهان دارویی،1 : 41-37.

**مجنون حسینی،ن.، و س.دوازده امامی.** 1386. زراعت و تولید برخی گیاهان دارویی و ادویه، انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهانی.

**مصطفوی،ا.، و د.افضلی.** 1384.ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه *Ducrosia anethifolia* (DC.) Boiss، دانشکده داروسازی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

**نقوی،م.، و ب.قره یاضی.** 1386. نشانگرهای مولکول، انتشارات دانشگاه تهران.

**نقوی،م.، ب.قره یاضی، و ق. حسینی سالکده.** 1384. نشانگرهای مولکولی، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران.

**وجدانی،پ.** 1375. اهمیت روش‌های حفاظت در محل رویش‌های طبیعی و نقش آن در حفظ و بهره‌برداری از ذخایر گیاهی، مجموعه مقالات کلیدی چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان.



Archive of SID

www.SID.ir

**یزدی، د.، س.شهنازی، و ح.سیفی.** 1383. کاشت داشت و برداشت گیاهان دارویی، انتشارات جهاد دانشگاهی.

**Al-Saghir,M.G.** 2009. Rapid and Efficient Method of Genomic DNA Extraction from Aromatic Plants, *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 273*a–f.*

**Baraldi,R., B.Isacchi, S.Predieri, G.Marconi, and F.F.Vincieri.** 2008. Distribution of artemisinin bioactive flavonoids from Artemisia annua L. during plant growth. Bioachem sys Ecol.. 36: 340-348.

**Clark,D.** 2005. Molecular biology, Elsevier Inc. All rights reserved

**Keb-Llanes.** 2002. Plant DNA Extraction Protocol. Plant Molecular Biology Reporter 20: Pistachio Trees *(Pistacia vera* L.), Academic J ollllais Inc, ISSN 1816-4919

**Pirttii,Ä., A.MarIa, and M.Hirsikorpi.** 2001.DNA Isolation Methods for Medicinal and 299a-299e.

**Ribeiro,R.A., M.B. Lovato.** 2007. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus Dalbergia, Genet. Mol. Res. 6 (1): 173-187

**Worden,A.** 2009. DNA Extraction - CTAB Method. Worden Lab.

Archive of SID

ir