در
زراعت و باغبانی شماره ۷۳، زمستان ۱۳۸۵
پژوهش سازندگی

بررسی اجزای موثر در کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده از گونه‌های سیکلامن موجود در ایران

• **میترا اعلائی**، دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج - دانشگاه تهران
• **روح انگیز نادری**، استادیار گروه باغبانی، گروه باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج - دانشگاه تهران
• **احمد خلیقی**، گروه باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج - دانشگاه تهران
• **(مرحوم) علی وزوائی**، گروه باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج - دانشگاه تهران
• **سیدعلیرضا سلامی**، دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج - دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: مرداد ماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: تیرماه ۱۳۸۵

Email: mitra_alaey@yahoo.com

چکیده

استخراج DNA ژنومی با کمیت و کیفیت مطلوب از نیازهای بنیادی زیست شناسی مولکولی است. استخراج DNA از بافت گیاه به علت حضور کربوهیدرات‌ها، تانن‌ها، ترکیبات پلی‌فنلی و پروتئین‌ها که بر کیفیت DNA اثر منفی می‌گذارد با مشکلاتی روبروست. لذا روش استخراجی که بتواند این مواد را به حداقل برساند باید تشخیص و مورد استفاده قرار گیرند. در این تحقیق چهار روش استخراج DNA شامل: ۱- Murray و Thampson ، ۲- Doyle و Doyle ، ۳- Dellaporta و همکاران، ۴- Lodi و همکاران به منظور انتخاب بهترین روش استخراج DNA از گیاه زینتی سیکلامن مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. برای استخراج DNA، برگ‌های جوان و برگ‌های بالغ مورد استفاده قرار گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با هر چهار روش، با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری، الکتروفوز بر روی ژل آگارز ۱٪، بررسی الگوی برش پذیری نمونه‌های DNA توسط اندونوکلئازهای محدود کننده (*EcoR*I) و همچنین با انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز(PCR) مورد مقایسه قرار گرفتند. در نهایت با توجه به کمیت و کیفیت DNA استخراج شده و نتایج حاصل از PCR، روش Murray و Thompson به منظور استخراج DNA با خلوص بالا از برگ‌های جوان و بالغ این گیاه زینتی انتخاب شد. بیشترین مقدار DNA با کیفیت مطلوب از یک گرم بافت برگی جوان به مقدار ۳۹۵ ng/µl (۷۹µg/g) با روش Murray و Thompson بدست آمد.

کلمات کلیدی: استخراج DNA، سیکلامن، کمیت و کیفیت DNA، PCR

www.SID.ir

Pajouhesh & Sazandegi No:73 pp: 11-16

Study on effective components on the quantity and quality of genomic DNA extracted from Iran cyclamen species

By: Alaey M.,Post Graduate Student, Assistant Professor, ., R. Nader., A. Khalighi., A. Vezvaeoi (passed away) and A. R. Salami.,Professor, Associated Professor and Ph.D student of Department of Horticulture,Facultuy of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.

Genomic DNA extraction with a high quantity and quality is a basic requerment in molecular biology. DNA extraction from plant tissue because of presence of polysaccharids, tanens, phenolic compounds and proteins faced with some problems that negatively affect the DNA quality. DNA extraction methods should be identified to reduce these compounds. In order to select the best genomic DNA extraction method from cyclamen tissues, four DNA extraction methodsluded (1) Murry and Thampson (1980), (2) Doyle and Doyle (1990), (3) Dellaporta et al (1983) and (4) Lodhi et al (1994) were compared. Young and well expanded mature leaves were used for DNA extraction. Quantity and quality of extracted genomic DNA were compared by applying the spectophotometric, agarose gel electrophoresis, treatment with restriction endonuclease (*EcoRI*) and polymerase chain rection (PCR). Ultimately, considering the quantity and quality of DNA and the results of PCR, the method of Murry and Thampson (1980) was recomended for high pure DNA extraction in this ornamental plant. Highest amount of DNA 395 ng/µl (79 µg/g) was obtained from 1.0 g young tissue with good quality.

Keywords: Genomic DNA extraction, Cyclamen, DNA quality and quantity, PCR.

مقدمه

در دو دهه اخیر بیوتکنولوژی کشاورزی چشم اندازهای امیدوار کننده‌ای را ارائه نموده است. با دستیابی به روش‌های مهندسی ژنتیک برای جداسازی و انتقال ژن‌ها، مقدمات لازم جهت ایجاد گیاهان تراریخت ایجاد گردیده است. بنابراین چنانچه مشخص است، مباحث مولکولی از اهمیت روزافزونی در مطالعات علوم مختلف زیستی برخوردار بوده و شاید بتوان گفت استخراج اسیدهای نوکلئیک اولین گام در انجام این مطالعات باشد. در اختیار داشتن دستورالعمل‌های کارآمد به منظور نمونه‌گیری و دستورزی در انجام کارهای مولکولی در آزمایشگاه بسیار مهم است. در بسیاری از موارد استخراج مواد ژنتیکی با محدودیت‌های همراه می‌باشد که تغییر در ترکیب و pH بافر استخراج توانسته است در بهبود کمیت و کیفیت DNA استخراج شده مؤثر باشد (۱۳). روش‌هایی که نیاز به تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی نداشته باشد و با هزینه کمتری بتوان DNA قابل استفاده از لحاظ کمی و کیفی بدست آورد، بسیار مورد اهمیت است. وجود ترکیبات بازدارنده در محلول DNA استخراج شده باعث جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های تک پلیمراز در واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) و همچنین مانع عمل آنزیم‌های برشگر می‌شود(۶). در این راستا آزمایشاتی توسط پژوهشگران مختلف بر روی گیاهان مختلف صورت گرفته است (۶، ۸، ۱۳).

سیکلامن ایرانی (*Cyclamen persicum*)گیاهی زینتی از تیره Primulaceae بوده و از جمله گیاهانی است که بومی ایران می‌باشد (۵،۲). به علت شرایط آب و هوایی مناسب، ایران یکی از مراکز مهم رویش سیکلامن محسوب می‌شود (۱). به نظر می‌رسد ایران دارای ژرم پلاسم غنی سیکلامن باشد که این امر جمع‌آوری ژنوتیپ‌های مختلف و ایجاد کلکسیون‌هایی از این گیاه را ممکن می‌سازد بنابراین ارزیابی و طبقه‌بندی ژرم پلاسم از مراحل مهم حفاظت این گیاه محسوب می‌شود. اگر چه شناسایی ژنوتیپ‌های سیکلامن در دانشکده کشاورزی کرج با استفاده از صفات مورفولوژیکی به صورت محدودی در گذشته انجام شده است اما به دلیل تأثیر عوامل محیطی روی این صفات، استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌ها و ارقام مختلف آن اجتناب ناپذیر است. در این راستا استخراج و تهیه نمونه‌های مطلوبDNA از نظر کمیت و کیفیت برای انجام برنامه‌های مرتبط با این امر از جمله کاربرد نشانگرهای مولکولی چون AFLP, RAPD ضروری است.

روش‌های مولکولی، مدیریت آسانتر حفظ و نگهداری مجموعه‌های ژنتیکی را از طریق طبقه‌بندی ذخایر توارثی ممکن می‌سازد و استخراج DNA ژنومی با کمیت و کیفیت بالا یکی از نیازهای اساسی در تحقق اهداف یاد شده می‌باشد. روش‌های مختلفی به منظور استخراج DNA در گیاهان مختلف ارائه شده است. جهت استخراج DNA از گیاهان زینتی و درختان میوه از روش Doyle و Doyle استفاده شده است (۹، ۱۱، ۱۲). روش استخراج Lodi و همکاران (۱۳) برای استخراج DNA از مو، سیب، زردآلو، هلو، گیلاس و گل میمون به‌کار رفته است. روش Murry,Thompson (۱۴) به منظور استخراج DNA از گیاهانی مانند برنج، گندم، توتون، کلم و زیتون ، سیب زمینی و گل رز به‌کار رفته است. Csaikl و همکاران (۹) روش استخراج دلاپورتا را به عنوان روش مؤثر برای استخراج DNA از نمونه‌های برگی صنوبر، سپیدار، کاج، بلوط، ذرت و برخی از گل‌های زینتی معرفی کردند. این روش استخراج توسط Buldewo و همکاران (۷) برای گل میمون نیز به کار رفته است. روش استخراج Doyle و Doyle توسط Jenderek و همکاران بر روی گونه‌های

Archive of SID
www.SID.ir

مختلف ختمی‌گزارش شده است (۱۲).

اگرچه روش‌های بسیاری به منظور استخراج DNA از بافت‌های گیاهان مختلف صورت گرفته است اما تحقیقات در خصوص استخراج DNA در سیکلامن ناچیز بوده و گزارشات معدودی در مورد استخراج DNA از سیکلامن ارایه شده است (۷ ، ۱۶). این در حالی است که با توجه به اهمیت این گیاه بسیار ارزشمند و تنوع بالای آن، استخراج DNA مطلوب از این گیاه به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین قرابت گونه‌های مختلف آن امری بسیار ضروری است.

به منظور دستیابی به این هدف روش‌های استخراج DNA ژنومی فوق‌الذکر که قبلا برای برخی از گیاهان گزارش شده بودند به منظور تعیین بهترین روش استخراج DNA، از گیاه سیکلامن مورد استفاده قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

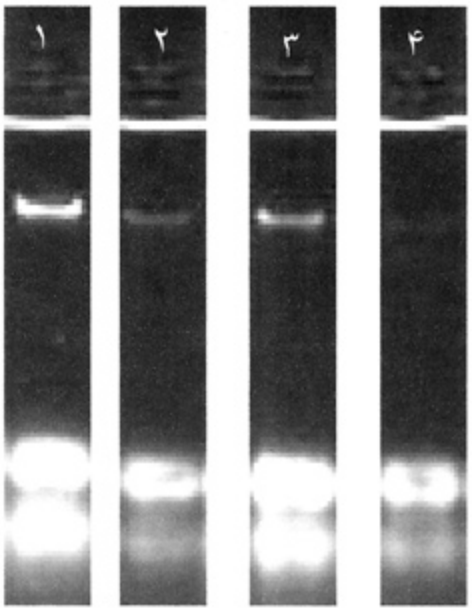
چهار روش استخراج DNA ژنومی بر روی نمونه‌های برگی جوان و بالغ گیاه سیکلامن به صورت فاکتوریل، در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. برای تجزیه داده‌های آماری از نرم افزار SAS استفاده گردید. نمونه‌های برگی سیکلامن در اواسط دی ماه ۱۳۸۳ از گلخانه دانشکده کشاورزی تهیه شدند. مقدار یک گرم نمونه‌های برگی در تمام روش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. برای استخراج DNA با روش‌های مذکور، از مواد شیمیایی متعددی در ترکیب با یکدیگر و یا در مراحل مختلف استخراج و بعد از آن استفاده گردید. چهار روش استخراج ۱- Murry,Thompson (۱۴) ۲-Lodi و همکاران (۱۳) ۳- Dellaporta و همکاران (۱۰) ۴- Doyle و Doyle (۱۱) برای بدست آوردن DNA از برگ‌های سیکلامن مورد استفاده قرار گرفت.

پس از استخراج DNA با روش‌های مذکور، رسوب‌های DNA[1] حاصل با اتانول ۷۵ درصد شستشو داده شدند و پس از خشک کردن در ۲۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر حل شده و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. استوک‌های DNA برای استفاده در مراحل بعدی در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از چهار روش اسپکتروفتومتری[2]، الکتروفورز روی ژل آگارز[3] بررسی الگوی برش‌پذیری DNA توسط آنزیم برشگر EcoRI و از طریق واکنش زنجیرهای پلیمراز[4] مورد بررسی قرار گرفت.

با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب محلول‌های رقیق شده DNA به نسبت ۱:۵۰ (۲۰ میکرولیتر محلول استوک DNA به‌علاوه ۹۸۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل) در طول موج ۲۶۰ نانومتر (طول موج جذب اسیدهای نوکلئیک) و ۲۸۰ نانومتر (طول موج جذب پروتئین‌ها) اندازه‌گیری و در نهایت نسبت جذب نوری محلول‌های DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (r=۲۶۰/۲۸۰) که شاخص میزان خلوص DNA می‌باشد بدست آمد. همچنین غلظت استوک DNA با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

غلظت DNA (نانوگرم در میکرو لیتر) = مقدار جذب در ۲۶۰nm × ۵۰ × ضریب رقت (۵۰)

در روش اسپکتروفتومتری DNA، هر واحد جذب در طول موج ۲۶۰nm معادل ۵۰ میکروگرم در میکرولیتر DNA دو رشته‌ای است و اگر



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز DNA مربوط به نمونه‌های برگی جوان سیکلامن حاصل از چهار روش استخراج. در هر چاهک مقدار مساوی از محلول DNA استخراجی (۵ میکرولیتر) که از یک گرم ماده گیاهی استخراج و در آب دو بار تقطیر استریل حل شده است بارگذاری گردیده است. شماره‌ها به ترتیب از راست به چپ روش‌های ۱- Thompson و Murry ۲-Lodi و همکاران ۳- Dellaporta و همکاران ۴- Doyle و Doyle می‌باشند.

نسبت مقدار جذب محلول DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به مقدار جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۱/۹-۱/۷ باشد نشان دهنده این است که جذب عمدتاً توسط اسیدهای نوکلئیک صورت گرفته و کیفیت DNA حاصله مطلوب است و از خلوص لازم برخوردار است.

با استفاده از الکتروفورز DNA در روی ژل آگارز ۱٪ کیفیت باند DNA هر نمونه مشخص شد. برای هر نمونه ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری و ۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل مخلوط شد و در چاهک‌های ژل آگارز ۱٪ درصد در شرایط بافری TBE تخلیه گردید.

ژل آگارز به مدت یک ساعت با ولتاژ ثابت ۱۰۰ الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، DNA در زیر نور (UV) در دستگاه Geldoc شرکت UVP آمریکا، مشاهده و عکس‌برداری شد. علاوه بر این با توجه به مقادیر محاسبه شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری، مقادیر مساوی از DNA حاصله از روشهای مختلف استخراج به منظور هضم آنزیمی با آنزیم *EcoRI* مورد استفاده قرار گرفت و در نهایت پس از انجام هضم، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز با ولتاژ ثابت ۶۰ ولت الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، نمونه‌های برش خورده در زیر نور UV مشاهده و عکس برداری شد. به این منظور، مقدار ۱ میکرو گرم DNA به همراه ۱ میکرولیتر آنزیم EcoRI و ۲ میکرولیتر بافر با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- تجزیه واریانس اثرات نوع روش استخراج و نوع برگ (جوان- بالغ) برغلظت DNA استخراجی و نسبت جذب هر یک از نمونه ها

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		غلظت DNA (ng/µl)	نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰
نوع روش استخراج DNA	۳	۱۴۸۷۶۱/۳۷**	۲/۱۲**
نوع برگ (جوان/ بالغ)	۱	۳۸۱۲/۷۶**	۰/۶۲**
نوع روش استخراج× نوع برگ	۳	۲۱۵/۵۳*	۰/۱*
خطا	۱۶		

** و * به ترتیب شان دهنده معنی‌دار بودن اختلافات بین تیمارها در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ می‌باشد

گرفتند. با استفاده از آغازگر تصادفی ده نوکلئوتیدی TIBMBD-oq با توالی 5CCA CGGTCAG قابلیت تکثیر DNAهای استخراج شده در واکنش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ دو لیتر با اجزاء زیر انجام گرفت:

۲ میکرولیتر بافر PCR (۱۰x)، ۰/۶ میکرولیتر MgCl (۵۰mM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰mM)، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر (۱۰µM)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم تک پلیمراز (۵U/µl) و ۳ میکرولیتر DNA (۵ng). شرایط PCR با چرخه دمایی بصورت یک سیکل ۴ دقیقه در دمای ۹۴درجه سانتیگراد و ۳۵ سیکل به صورت ۹۲ درجه سانتیگراد یک دقیقه، ۳۵ درجه سانتیگراد یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد دو دقیقه و در نهایت یک سیکل ۷۲درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر[۶] Bio-Rad انجام گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس آزمایشات اسپکتروفتومتری (جدول ۱) نشان داد که هم کمیت و هم کیفیت DNA استخراجی تحت تاثیر روش استخراج و نوع برگ از لحاظ سن فیزیولوژیکی می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها (شکل ۲) نشان داد که DNA استخراج شده توسط روش Thompson و Murry برای برگ‌های جوان و هم برگ‌های بالغ از کمیت و کیفیت بهتری نسبت به سایر روش‌ها برخوردار بود. در مقدار ۱ گرم ماده برگی بیشترین مقدار DNA به میزان ۳۹۵ نانوگرم بر میکرولیتر (۷۹µg/g) برای برگ‌های جوان و ۳۵۵ نانوگرم بر میکرولیتر (۷۰µg/g) برای برگ‌های بالغ با روش Thompson و Murry بدست آمد. در روش Doyle و Doyle اگر چه کیفیت برای برگ‌های جوان مطلوب است اما مقدار DNA حاصله ۱۲۲/۵ نانوگرم بر میکرولیتر (۲۴/۲µg/g) و کمتر از روش Thompson و Murry بود. نتایج حاصل از الکتروفوز در ژل آگارز تصدیق کننده نتایج بدست آمده از روش اسپکتروفتومتری بود.

استخراج DNA با روش Lodi و همکاران و Dellaporta و همکاران نتایج مطلوبی نشان نداد به طوری‌که براساس نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر، اعداد بین ۱ تا ۱/۲ بدست آمد، که این موضوع در الکتروفوز DNA نیز تائید گردید (شکل ۱). بر اساس مقایسه میانگین‌ها روش Murry,Thompson برای هر دو برگ جوان و برگ بالغ از نظر مقدار DNA حاصله برتر از روش Doyle و Doyle بود (شکل ۲). کیفیت DNA نیز در روش Thompson و Murry نسبت به سایر روش‌ها برتر می‌باشد. نتایج مربوط به آزمایشات هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *EcoRI* نشان داد که در روش Thompson و DAN Murry به‌طور مطلوب برش خورده که بیانگر عملکرد بهتر آنزیم‌های اندونوکلئاز محدودکننده می‌باشد که خود بیانگر خلوص بالاتر و کیفیت بهتر DNAحاصل از این روش استخراج می‌باشد (شکل ۳). در واقع وجود ناخالصی در DNA استخراج شده موجب ممانعت از عمل اندونوکلئازهای محدودکننده از طریق اشغال کردن احتمالی سایت‌های برشی آنها می‌گردد.

طالبی چهار روش استخراج DNA را مورد بررسی و مقایسه قرار داد و در نهایت روش Thompson و Murry را به عنوان روش بهتر از لحاظ کیفیت DNA برای نمونه‌های برگی جوان انار معرفی نمود (۴).

Jenderek و همکاران نشان دادند که روش Doyle و Doyle برای استخراج DNA از گیاه خشتی، از نظر کیفیت DNA قابل قبول ولی از نظر کمیت پایین می‌باشد (۱۲).

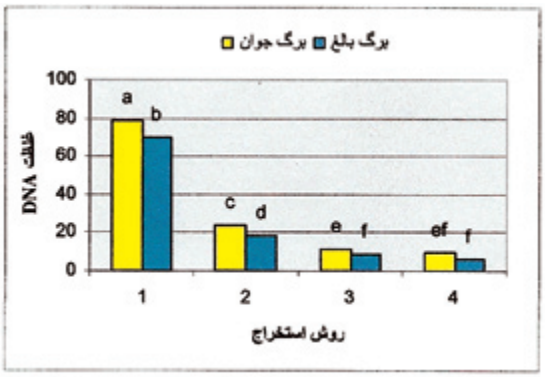
نتایج حاصل از واکنش زنجیرهای پلیمراز نشان داد که DNA استخراجی توسط روش Thompson و Murry (۱۴) از کیفیت لازم برای PCR برخوردار است که وضوح و تعداد باندهای تکثیر شده در مقایسه با سایر روش‌های استخراج DNA ژنومی از این گیاه موید این موضوع می‌باشد (شکل ۳).

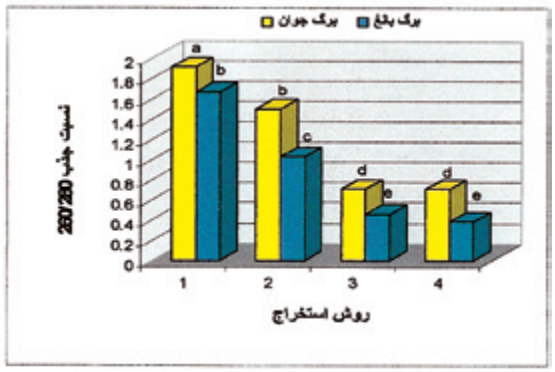
در روش استخراج Murry,Thompson از مواد شیمیایی همچون پلی وینیل پیرولیدن[۷]، کلرید سدیم، CTAB و بتامرکاپتواتانول[۸] در غلظت مناسب استفاده شده است. PVP از طریق پیوندهای هیدروژنی با مواد پلی‌فنلی ایجاد کمپلکس نموده و امکان جداسازی آنها را از DNA فراهم می‌نماید (۳). ماده شیمیایی CTAB به عنوان یک ماده شوینده با مولکول DNA کمپلکس تشکیل داده و آن را از موادی همچون کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها جدا می‌کند. پلی‌ساکاریدهای باقی مانده از جمله موادی هستند که باعث کاهش کیفیت DNA می‌شوند. از وجود NaCl با غلظت ۲/۵-۱ مولار و رسوب در شرایط نمک بالا برای حذف این مواد استفاده می‌شود (۸). بتامرکاپتواتانل به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کرده و از اکسید شدن مواد پلی‌فنلی جلوگیری می‌کند (۶، ۱۵). واکنش نوع گیاه به روش استخراج مطلوب، از شرایط اساسی انتخاب یک روش استخراج است.

عوامل فوق باعث گردید DNA استخراج شده با روش Thompson و Murry (۱۴) از برگ‌های گیاه سیکلامن از کمیت و کیفیت مناسبی

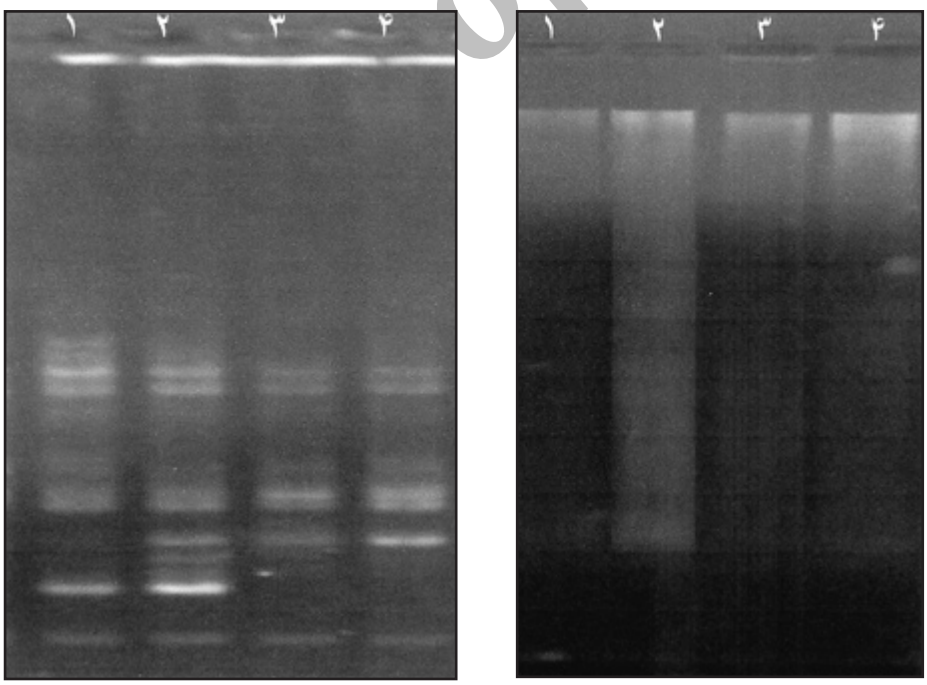
Archive of SID

www.SID.ir





شکل ۲- مقایسه میانگین مقدار DNA حاصل به میکروگرم از یک گرم بافت برگی گیاه سیکلامن (نمودار سمت چپ)
و کیفیت آن بر اساس نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر (نمودار سمت راست) از برگ های جوان و بالغ سیکلامن با ۴ روش مختلف استخراج
DNA به ترتیب ۱- Thompson و Murry ۲-Lodi و همکاران ۳- Dellaporta و همکاران ۴- Doyle و Doyle



شکل ۳- سمت چپ: واکنش زنجیرهای پلیمراز با استفاده از آغازگر TIBMBD-۰۹ بر روی DNA حاصل از نمونه‌های برگی سیکلامن
که با ۴ روش استخراج گردیده است. سمت راست: و آزمون هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم برشی Halic به ترتیب از چپ به راست روش‌های
۱- Thompson و Murry ۲-Lodi و همکاران ۳- Dellaporta و همکاران ۴- Doyle و Doyle ۷

www.SID.ir

برخوردار باشـد. برگ‌های جوان نسبت به سایر قسمت‌های گیاه دارای مواد پلی‌سـاکاریدی و مواد ثانویه کمتر هسـتند. این مسئله باعث شد در بیشتر موارد جهت استخراج DNA از برگ‌های جوان استفاده شود. (۶، ۱۱ ، ۱۳). در نهایـت می‌توان چنین بیان کـرد کـه روش Murry,Thompson برای استخراج DNA با کمیت و کیفیت مطلوب از نمونه‌های برگی جوان و بالغ سیکلامن بهترین روش استخراج DNA محسوب می‌شود.

پاورقی‌ها

1- DNA pellet
2- Spectrophotometery
3- Agarose gel electrophoresis
4- Polemerase Chain Reaction (PCR)
5-Loading buffer
6-Thermal cycler
7-Polyvinylpyrolidon
8-B-mercaptoethanol

منابع مورد استفاده

۱ - خلیقی، ا. ۱۳۸۲؛ گلکاری و پرورش گیاهان زینتی . انتشـارات روزبهان. ۳۹۲ صفحه.

۲ -روی، آ . لارسون. گلکاری جلد دوم . سازمان پارک‌ها و فضای سبز شهر تهران. ۴۵۲ صفحه.

۳ -کدخدایی، س. ۱۳۸۲؛ روش سـاده و کم هزینه جهت جداسـازی اسـیدهای نوکلییک از گیاهان حاوی مواد پلی‌سـاکاریدی و پلی فنلی زیاد: بهینه سازی روش استخراج DNA در بادام. مجموعه مقالات سومین کنگره بیوتکنولوزی ایران.

۴ -طالبی، م.۱۳۸۲؛ تنوع ژنتیکی برخی از ارقام انار در ایران با اسـتفاده از نشانگر RAPD. مجموعه مقالات سومین کنگره بیوتکنولوژی ایران.

۵ -نادری، ر. ۱۳۷۹؛ بررسی محلول‌های غذایی، تیمارهای هورمونی و شیمیایی بر روی صفات کمی‌و کیفی چهار ژنوتیپ سـیکلمن ایرانی . رساله دکترا، گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.

6–Bushra, C., Y. Afshan., H. Tayyab and S. Riazuddin. 1999; Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. Plant. Mol. Bio. Rep. 17: 1-7.

7-Buldewo, S. and Y. F. Jaufeerally-Fakhim. 2002; Isolation of Clean and PCR-Amplifiable DNA From *Anthurium andreanum*. Plant Molecular Biology Reporter 20: 71a–71g.

8- Cheng, Y. J., W. W. Guo., H. L. Yi., X. M. Pang and X. Deng. 2003; An efficient protocol for genomic DNA extraction from Citrus species. Plant. Mol. Bio. Rep. 21:177a-177g.

9-Csaikl, U. M., H. Bastian., R. Brettschneider., S. Gauch., A. Meir., M. Schauert., F. Schols., C. Sperisen., B. Vornam and B. Ziegenhagen. 1998; Comparative analyziz of different DNA extraction protocols: A fast universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evalution and phylogenetic studies. Plant. Mol. Bio. rep 16: 69-86.

10-Dellaporta. S. L., J. Wood and J. .B Hicks.1983; A plant DNA minipreparation:Version II.Plant Mol. Bio. Rep.1(14):19-21.

11-Doyle, J. J. and J. L. Doyle.1990; Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. Vol.12: 11-15.

12-Jenderek, M. M., K. A. Shierenbeck and A. J. Olney. 1997; Development of random amplified polymorphic DNA markers characteristic of *Hibiscus rosa-sinensis* and *H.syriacus*. Center For Irrigation Technology .

13-Lodi, M. A., G. N. Ye., N. F. Weeden and B. I. Reisch.1994; A simple and efficient method DNA extraction from grapevine caltivars and vitis species. Plant Mol. Bio.Rep.Vol 12. pp.6-13.

14-Murray, M. and W. F. Thompson. 1980; Rapid isolation of molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Research. 8: 4321-4325.

15-Porebski, S., L. Grant Bailey and B. R. Boum. 1997; Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant. Mol. Bio. Rep. 15(1): 8-15.

16-Zhang, J., M. B. McDonald and P. M. Sweeney.1997; Testing for genetic purity Petunia and Cyclamen seed using random amplified polymorphic DNA markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci.32(2): 246-247.

Archive of SID

www.SID.ir