Archive of SID

مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ٦ شماره ٢ صفحه های ٩٩ تا ١١٠ (١٣٨٤)

مقایسه شش روش استخراج DNA از گیاه انار[1]

COMPARISON OF SIX GENOMIC DNA EXTRACTION METHODS FROM POMEGRANATE (*PUNICA GRANATUM* L.)

ذبیح اله زمانی, علی سرخوش, محمد رضا فتاحی مقدم و علی عبادی[2]

چکیده

استخراج DNA ژنومی با کمیت و کیفیت مناسب در آزمایشگاه‌های ژنومیکس ضروری می باشد. استخراج DNA از بافت‌های گیاهان چوبی از جمله درختان میوه افزون بر وجود کربوهیدرات ها با مشکل مواد پلی‌فنلی نیز روبرو است که بر کیفیت DNA اثر منفی می‌گذارد، بنابراین روش های استخراج که این مواد را به تواند به حداقل برساند بسیار مطلوب هستند. در این آزمایش شش روش استخراج DNA شامل: ١- ورابی و همکاران[3] (٢١) ٢- دلاپورتا و همکاران[4] (١٤) ٣- زیگن هاگن و همکاران[5] (٢٢) ٤- دویل و دویل[6] (١٥) ٥- لودهی و همکاران[7] (١٦) ٦- موری و تامپسون[8] (١٧) از گیاه انار که از نظر مواد پلی‌فنلی شاخص است، برای گزینش بهترین روش مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. به عنوان مواد گیاهی برای استخراج DNA، برگ‌های جوان، برگ‌های بالغ، برگ‌های پیر، پوست میوه و گوشت دانه مورد استفاده قرار گرفت. کیفیت و کمیت DNA ژنومی استخراج شده با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری، الکتروفورز در ژل آگارز، برش با آنزیم های برشگر و با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مورد مقایسه قرار گرفتند. در پایان با توجه به کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، روش ورابی و همکاران (٢١) برای برگ‌های جوان، بالغ، پیر و سمت‌هایی از میوه و روش موری و تامپسون (١٧) برای برگ‌های جوان گزیده شدند. بیشترین مقدار DNA با کیفیت خوب به میزان ٦٤/٧ میکروگرم از هر گرم بافت برگی جوان با روش ورابی و همکاران (٢١) به دست آمد که با مقدار DNA به دست آمده از برگ‌های بالغ (٦٢/٤ میکروگرم) تفاوت چندانی نداشت. با توجه به نتایج، روش استخراج ورابی و همکاران برای استخراج DNA از بافت‌های مختلف گیاهان مشابهی که مواد پلی‌فنلی و پلی‌ساکاریدی بالایی دارند، قابل توصیه است.

واژه‌های کلیدی: استخراج DNA، انار، آنزیم‌های برشگر، درختان میوه، پی‌سی‌آر, مواد پلی‌فنلی.

مقدمه

امروزه مباحث ملکولی از اهمیت روز افزونی در بررسی های علوم زیستی برخوردار بوده و استخراج اسیدهای نوکلئیک (DNA و RNA) اولین گام در این بررسی ها است. در بسیاری از موارد، استخراج مواد ژنتیکی با محدودیت هایی همراه است که تغییر در ترکیب و pH بافر استخراج توانسته است در بهبود کمیت و کیفیت DNA و RNA استخراج شده موثر باشد (١٦). استخراج DNA ژنومی از گیاهان چوبی که افزون بر ترکیب های پلی‌ساکاریدی زیاد، دارای متابولیت‌های ثانویه فراوان مانند پلی‌فنل ها و تانن ها هستند از گذشته با

١- تاریخ دریافت: ٨٣/١٢/٣ تاریخ پذیرش: ٨٤/٥/٢٤

٢- به ترتیب دانشیار, دانشجوی کارشناسی ارشد, استادیار و دانشیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی, دانشگاه تهران, کرج, جمهوری اسلامی ایران.

٣- Vroh Bi *et al.* ٤- Dellporta *et al.* ٥- Ziegenhagen *et al.* ٦- Doyle and Doyle

٧- Lodhi *et al.* ٨- Murry and Thompson

www.SID.ir

Archive of SID

مشکل هایی همراه بوده است (۹, ۱٦). هر چند این مشکل ها با استفاده از روش‌هایی مانند سانتریفیوژ با دور بالا و شیب غلظتی سزیم کلراید (CsCl) تا حدود زیادی بر طرف گردیده است، اما در برخی از شرایط به دلیل محدودیت‌های ویژه لزوم به کارگیری روش هایی که کمتر نیاز به وسایل پیشرفته آزمایشگاهی داشته باشد و با هزینه کمتری به توان DNA قابل استفاده از لحاظ کمی وکیفی به دست آورد به طور کامل احساس می شود. وجود ترکیب های فنلی در محلول DNA استخراج شده، باعث جلوگیری از فعالیت آنزیم های DNA پلیمراز مانند *Taq* پلیمراز در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و همچنین جلوگیری از کار آنزیم‌های برشگر می شود (۱۰). به همین منظور آزمایش هایی توسط پژوهشگران مختلف روی گیاهان متفاوت صورت گرفته است (۹، ۱۰, ۱۳).

انار[۱] از جمله درختان میوه‌ای است که از دیرباز در ایران کشت و کار می شده است و هم اکنون ایران به عنوان بزرگترین تولید کننده انار در دنیا محسوب می‌شود. ایران دارای ژرم پلاسم غنی انار بوده و در سال های اخیر بیش از ۷٦۰ ژنوتیپ و نمونه انار از استان های مختلف کشور در مجموعه[۲] شهرستان یزد جمع‌آوری شده است (٤). مجموعه‌های دیگری از انار نیز در شهرستان‌های ساوه و ورامین وجود دارند، که تعداد نمونه‌های کمتری را شامل می‌شوند. ارقام انار در ایران به دلیل گوناگونی و قدمت کشت و کار دارای تشابه اسامی و یا تشابه ژنوتیپی زیادی در نواحی مختلف است. اگر چه شناسایی ژنوتیپ‌های انار در برخی نواحی ایران از روی ویژگی های مرفولوژیکی به صورت محدودی در گذشته انجام شده است (۲, ٤) اما به دلیل تاثیر عوامل محیطی روی این ویژگی ها استفاده از روش های مولکولی برای شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌ها و ارقام اجتناب ناپذیر شده است. شناخت گوناگونی ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی همچون RAPD[۳]، AFLP[٤]، SSR[٥] و ISSR[٦] در طراحی برنامه‌های بهنژادی امروزی اجتناب ناپذیر است. همچنین روش‌های مولکولی در طبقه‌بندی ذخایر توارثی و مدیریت آسان‌تر در حفظ و نگهداری مجموعه‌های ژنتیکی نیز نقش بسزایی دارد. استخراج DNA ژنومی با کمیت وکیفیت بالا یکی از نیازهای اساسی, در پژوهش با اهداف یاد شده و همچنین پژوهش هایی مانند همسانه‌سازی ژن[۷] و ایجاد کتابخانه‌های ژنومی[۸] است.

استخراج DNA از نمونه‌های برگی جوان گیاه انار ازپیش توسط طالبی بداف و همکاران (٥) گزارش شده است. برای استخراج DNA از درختان میوه از روش دویل و دویل استفاده شده است (۱۳, ۱٥). زیگن‌هاگن و همکاران (۲۲) روشی را برای استخراج DNA از گیاهان چوبی پیشنهاد کردند. روش استخراج لودهی و همکاران (۱٦) برای استخراج DNA از انگور، سیب، زرد آلو، هلو، و گیلاس به کار رفته است. روش موری و تامسون (۱۷) برای استخراج DNA از گیاهان پیشنهاد شده است و استخراج DNA از گیاهانی مانند برنج، گندم، توتون، کلم و زیتون با این روش صورت گرفته است (۱۸, ۱۹). سایکل و همکاران (۱۲) روش استخراج دلاپورتا را به عنوان روشی موثر برای استخراج DNA از نمونه‌های برگی صنوبر، سپیدار، کاج، بلوط و ذرت معرفی کردند. روش ورابی و همکاران (۲۱) برای استخراج DNA از نمونه‌های برگی انگور مورد استفاده قرار گرفته است (۷ , ۲۲).

در این پژوهش روش‌های استخراج DNA ژنومی یاد شده که از پیش برای برخی از درختان میوه و سایر گیاهان چوبی یا علفی گزارش شده بودند بر روی برگ‌های جوان و بالغ انار مورد آزمایش قرار گرفتند. در آزمایشی مشابه یکی از روش های آزمون شده که کیفیت وکمیت DNA بالاتری نسبت به سایر روش ها برای

۱- *Punica granatum* L. ۲- Collection ۳- Randomly Amplified Polymorphic DNA
٤- Amplified Fragment Length Polymorphism ٥- Simple Sequence
٦- Inter Simple Sequence Repeats ۷- Gene Cloning ۸- Genomic Library

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌های برگی جوان و بالغ داشت، روی برگ‌های پیر و قسمت‌هایی از میوه (پوست و قسمت خوراکی) مورد آزمایش قرار گرفت.

مواد و روش ها

شش روش استخراج DNA بر اساس ارائه دهندگان آن ها ۱- ورابی و همکاران (۲۱) ۲- دلاپورتا و همکاران (۱٤) ۳- زیگن هاگن و همکاران (۲۲) ٤- دویل و دویل (۱۵) ٥- لودهی و همکاران (۱٦) و ٦- موری و تامپسون (۱۷) روی نمونه‌های برگی جوان و بالغ گیاه انار مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش روی برگ های جوان و بالغ به صورت فاکتوریل، در قالب طرح به طور کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. برای تجزیه داده‌های آماری از نرم افزار SAS استفاده گردید. در آزمایش دیگری روش گزیده شده روی برگ های پیر، پوست و قسمت خوراکی میوه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد گیاهی

نمونه‌های برگی (جوان و بالغ) در نیمه های خردادماه و نمونه‌های برگی پیر و میوهای انار در اواخر شهریور ماه ۱۳۸۳ از رقم معروف و ملس ترش ساوه, تهیه شدند. مقدار یک گرم نمونه‌های برگی پیر و پوست میوه انار برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. از نمونه‌های آب میوه انار نیز در مقدار یک میلی‌لیتر برای جداسازی DNA استفاده شد.

محلول ها و تجهیزات مورد نیاز

برای استخراج DNA با روش های یاد شده از چندین ماده شیمیایی در ترکیب با یکدیگر و یا در مراحل مختلف استخراج و مراحل بعد از آن استفاده شد که اساس آن ها به شرح زیر می باشد:

آب دوبار تقطیر گندزدایی شده، نیتروژن مایع[۱]، اتیلن دی‌آمین‌تتراستیک اسید[۲] ۰/٥ مولار، سدیم‌دودسیل‌سارکوسینات[۳] ۱۰٪، تریس: اسید کلریدریک (Tris-HCl) ۲ مولار، بتامرکاپتواتانل[٤]، پلی وینیل پیرولیدون[٥]، زغال فعال[٦]، کلروفرم: ایزوآمیل الکل[۷] با نسبت حجمی ۲٤ به ۱، اتانول ۷٥ و ۱۰۰٪، کلرید سدیم ٥ مولار، استات سدیم ٥ مولار، استات پتاسیم ٥ مولار، سود ۱۰ مولار، دستگاه سانتریفیوژ، حمام آب گرم[۸] ٦٥ و ۳۷ درجه سانتی گراد، دستگاه ترموسایکلر[۹] و مواد لازم برای PCR، آنزیم‌های *Eco*RI و *Hind*III، فاژ لامبدا برش خورده با آنزیم *Hind*III، اتیدیوم بروماید ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، آگارز و دستگاه الکتروفورز افقی. لازم به ذکر است که مواد شیمیایی مورد استفاده بیشتر از شرکت‌های Roche و Merck آلمان تهیه شدند.

پس از استخراج DNA با روش های یاد شده و رسوب دادن آن، رسوب به دست آمده با اتانول ۷٥٪ شستشو داده شد. پس از خشک کردن پلت مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر بافر TE برای حل کردن DNA به آن اضافه شد و به مدت یک شب در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. محلول DNA برای استفاده در مراحل بعدی در فریزر نگهداری شد. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب محلول‌های رقیق شده DNA به نسبت ۱:٤۲ (٥۰ میکرولیتر محلول ذخیره DNA + ۲۰٥۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر گندزدایی شده) در طول موج ۲٦۰

۱- Liquid nitrogen
۲- Ethylendiaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate
۳- Sodium dodecyle sarcosinate
٤- ß-mercaptoethanol
٥- Polyvinylpyrolidone
٦- Active charcoal
۷- Chloroform-isoamyle alcohol(24:1)
۸- Waterbath
۹- Thermocycler

www.SID.ir

Archive of SID

نانومتر (طول موج جذب اسیدهای نوکلئیک) و ۲۸۰ نانومتر (طول موج جذب پروتئین‌ها) اندازه‌گیری و نسبت جذب نوری محلول های DNA در طول موج ۲٦۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (r = A260/A280 که شاخص میزان خلوص DNA می باشد) به دست آمد. همچنین غلظت محلول ذخیره DNA با استفاده از فرمول زیر:

(ضریب رقت)٤۲ × ۵۰ × مقدار جذب نور در ۲٦۰ nm = غلظت DNA (نانوگرم در میکرولیتر)

محاسبه گردید. با استفاده از الکتروفورز DNA در روی ژل آگارز ۱٪، غلظت DNA هر نمونه در مقایسه با غلظت استاندارد نمونه تجاری فاژ لامبدا برش داده شده با آنزیم *Hind*III تخمین زده شد. برای هر نمونه، پنج میکرولیتر DNA استخراج شده با دو میکرولیتر بافر بارگذاری[1] و هشت میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر گندزدایی شده آمیخته شد و در چاهک‌های ژل آگارز ۱٪ درشرایط بافری TAE[2] قرار داده شد. نمونه DNA با غلظت استاندارد نیز، با همان شرایط به کار گرفته شد. ژل آگارز به مدت سه ساعت و با ولتاژ ثابت ٦۰ ولت الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، DNA در زیر نور UV در دستگاه Gel-doc مشاهده و عکسبرداری شد. با توجه به مقادیر محاسبه شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری مقدار مساوی از DNA به دست آمده از روش های مختلف برای هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Eco*RI و *Hind*III مورد استفاده قرار گرفتند و روی ژل آگارز مشابه شرایط یاد شده الکتروفورز شد. با استفاده از آغازگر تصادفی ده نوکلئوتیدی (5́- CTGAACGCT-3́) OPAD02 (۵) ارزیابی قابلیت افزایش DNA های استخراج شده در واکنش PCR مورد بررسی قرار گرفت. واکنش PCR با حجم µl ۲۵، شامل بافر واکنش PCR به صورت X ۱، mM ۱/۷۵ MgCl2، mM ۰/۲ dNTPs، µM ۰/٤ آغازگر، ۱ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز و ۵ نانوگرم DNA و شرایط PCR با چرخه دمایی به صورت یک دوره ٤ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی گراد، تعداد ۳۵ سیکل به صورت ۹۲ درجه سانتی گراد یک دقیقه، ۳۷ درجه سانتی گراد یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد دو دقیقه و در نهایت یک دوره ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad مدل I-Cycler انجام شد. برای تایید روش گزیده شده از برگ های پیر ده ژنوتیپ انار DNA استخراج و با استفاده از پرایمر ده نوکلئوتیدی OPAD02 به عنوان آغازگر تصادفی, واکنش PCR انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی کمیت و کیفیت DNA

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از چهار روش اسپکتروفتومتری، الکتروفورز روی ژل آگارز، برش با آنزیم‌های برشگر و به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مورد بررسی قرار گرفت، که در زیر شرح داده می شود.

۱- اسپکتروفتومتری[3]

در روش اسپکتروفتومتری DNA، میزان جذب برابر با یک در طول موج ۲٦۰ nm معادل ۵۰ میکروگرم در میکرولیتر DNA دو رشته‌ای است و اگر نسبت مقدار جذب محلول DNA در طول موج ۲٦۰ نانومتر به مقدار جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲-۱/۷ باشد نشان دهنده این است که جذب بیشتر توسط اسیدهای نوکلئیک صورت گرفته و کیفیت DNA به دست آمده مطلوب و از خلوص لازم بر خوردار است (۳, ٦). نتایج اسپکتروفتومتری نشان داد که DNA استخراج شده با روش ورابی و همکاران (۲۱) برای هر دو نوع برگ‌های

۱- Loading buffer ۲- Tris-acetate EDTA ۳- Spectrophotometry

www.SID.ir

Archive of SID

جوان و برگ‌های بالغ و روش موری و تامپسون (۱۷) برای برگ‌های جوان از کمیت و کیفیت بهتری نسبت به سایر روش ها برخوردار بودند. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود از میزان یک گرم ماده برگی بیشترین مقدار DNA به میزان ٦٤/٧ میکروگرم برای برگ‌های جوان و ٦٢/٤ میکروگرم برای برگ‌های بالغ با روش ورابی و همکاران (۲۱) به دست آمده است. در روش موری و تامپسون (۱۷) اگر چه کیفیت DNA برای برگ‌های جوان مطلوب است، اما میزان DNA به دست آمده ۵۱ میکروگرم و کمتر از روش ورابی و همکاران (۲۱) بوده است. استخراج DNA با سایر روش ها دارای مواد اضافی زیادی بوده است به طوری که بر اساس نسبت جذب ٢٦٠ به ٢٨٠ نانومتر، اعداد بین ۱ تا ۱/۲ را نشان می‌دهند که این موضوع در الکتروفورز DNA نیز تایید گردید. نتایج به دست آمده از سپکتروفتومتری به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح به طور کامل تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه شدند. بر اساس مقایسه میانگین‌ها (در سطح احتمال ۱٪) روش ورابی و همکاران (۲۱) برای هر دو برگ جوان و برگ بالغ از نظر مقدار DNA به دست آمده برتر از روش موری و تامپسون (۱۷) بود. کیفیت DNA نیز در موارد یاد شده در یک گروه قرار گرفته و نسبت به سایر روش ها برتر است (شکل ۱). طالبی بداف و همکاران (۵) با مقایسه چهار روش استخراج DNA [موری و تامپسون (۱۷)، دویل و دویل (۱۵)، زیگن‌هاگن و لودهی (۲۲)] روش موری و تامپسون (۱۷) را به عنوان روش بهتر فقط از نظر کیفیت DNA برای نمونه‌های برگی جوان انار معرفی نمودند (۵) که با نتایج به دست آمده در آزمایش حاضر بر روی برگ های جوان هماهنگی دارد.

۲- الکترو فورز روی ژل آگارز[۱]

با مقایسه ضخامت باندهای به دست آمده از نمونه‌ها با باندهای DNA استاندارد، غلظت نمونه‌ها تخمین زده شد. شکستگی قطعه های DNA در طی مراحل استخراج که به صورت دنباله در روی ژل دیده می شود به عنوان معیاری برای کیفیت پائین‌تر برای نمونه‌های DNA تلقی می‌گردد. مشاهده ژل به دست آمده از بارگذاری حجم‌های مساوی از DNA استخراجی بافت‌های برگی بالغ انار نتایج اسپکتروفتومتری را تایید نمود و DNA استخراجی از روش ورابی و همکاران (۲۱) بیشترین ضخامت نوار را نشان می‌داد (شکل۲).

۳- هضم آنزیمی[۲] DNA های استخراج شده با آنزیم‌های برشگر

نتایج نشان داد که تنها در روش ورابی و همکاران (۲۱) (برگ‌های جوان و بالغ) و روش موری و تامپسون (۱۷) (برگ‌های جوان) DNA به طور مطلوب برش خورده، بنابراین این دو روش استخراج برای فنونی همچون نشانگرهای RFLP و AFLP که متکی به برش آنزیمی هستند، بسیار مناسب‌تر به نظر می‌رسند در صورتی که در سایر روش های استخراج موادی (پلی‌ساکاریدها، پلی‌فنل‌ها و غیره) که باعث عدم فعالیت آنزیم‌ها می‌گردند. به خوبی برداشته نشده اند. شکل ۳ هضم DNA به دست آمده از برگ‌های بالغ انار با آنزیم برشگر *EcoR*I را نشان می دهد، همان طور که مشاهده می‌شود تنها در روش ورابی و همکاران (۲۱) DNA به طور کامل برش خورده است. برش بهتر DNA نشان دهنده عملکرد بهتر آنزیم‌های برشگر می‌باشد که خود نشانگر خلوص بالاتر و کیفیت بهتر DNA به دست آمده از این روش می‌باشد. در این زمینه می‌توان به نقش زغال فعال، بتامرکاپتواتانول و غلظت بالای NaCl2 در استخراج DNA خالص اشاره کرد (۱, ۲۲).

۱- Gel electrophoresis of DNA ۲- Enzyme digestion

www.SID.ir

Archive of SID

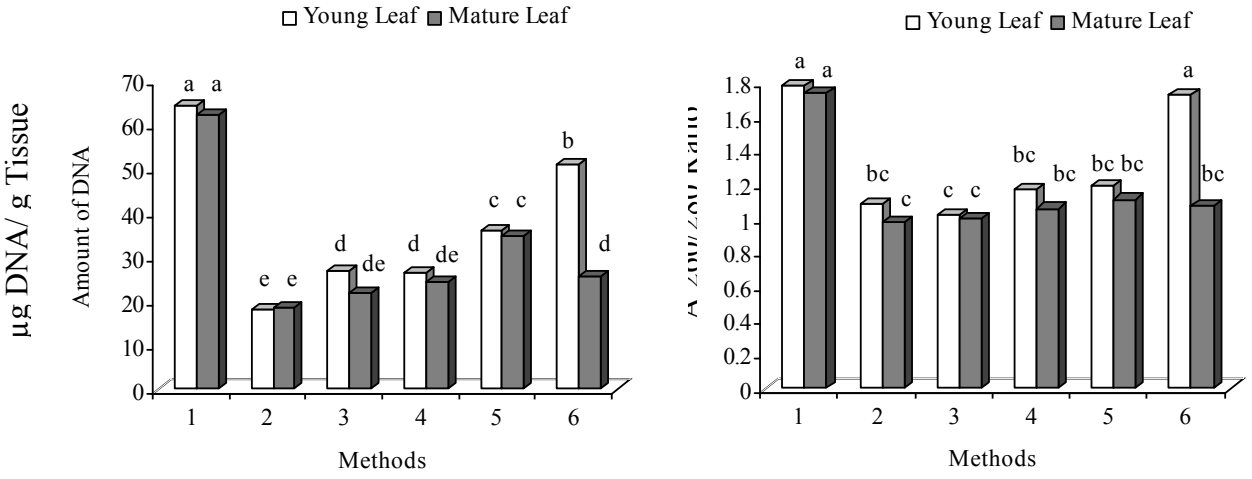

Fig. 1. Comparison of DNA amount (µg) extracted from 1g of plant tissue (left) and its quality based on A260/A280nm ratio (right) from pomegranate young and mature leaves with six DNA extraction methods: 1- Vroh Bi *et al* (21), 2- Dellaporta *et al* (14), 3- Ziegenhagen *et a*l (22), 4- Doyle and Doyle (15), 5- Lodhi *et al* (16) and 6- Murry and Thompson (17), respectively.

† Means with similar letters are not significantly different at 1% level of probability using DMRT.

شکل ۱- مقایسه میانگین میزان DNA حاصله به میکروگرم از یک گرم بافت گیاهی (نمودار سمت چپ) و کیفیت آن بر اساس نسبت جذب در طول موج ۲٦۰ به ۲۸۰ نانومتر (نمودار سمت راست) از برگ های جوان و بالغ انار با ٦ روش استخراج DNA به ترتیب: ۱- ورابی و همکاران (۲۱)، ۲- دلاپورتا و همکاران (۱٤)، ۳- زیگن هاگن و همکاران (۲۲)، ٤- دویل و دویل (۱۵)، ٥- لودهی و همکاران (۱٦) و ٦- موری و تامپسون (۱۷).

† میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۱٪ با آزمون چند دامنه ای دانکن دارای اختلاف معنی داری نمی‌باشند.

۴- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۱] (PCR)

نتایج به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان داد که DNA استخراج شده با روش ورابی و همکاران (۲۱) برای برگ های جوان و بالغ و روش موری و تامپسون (۱۷) برای برگ های جوان از کیفیت لازم برای PCR نیز برخوردار هستند که روشنی و تعداد باندهای افزایش یافته تایید کننده این موضوع بود. شکل ٤ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی DNA به دست آمده از نمونه‌های برگی بالغ انار که با ٦ روش استخراج گردیده است را نشان می‌دهد.

پس از به دست آمده نتایج یاد شده، روش استخراج ورابی و همکاران (۲۱) بر روی نمونه‌های برگی پیر و همچنین بخش هایی از میوه انار نیز مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج به دست آمده از اسپکتروفتومتری،

۱- Polymerase Chain Reaction (PCR)

www.SID.ir

Archive of SID

الکتروفورز ژل آگارز، برش آنزیمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (شکل های ٥, ٦) نشان داد که این روش برای استخراج DNA از این مواد گیاهی مناسب است. با استفاده از نتایج اسپکتروفتومتری میزان DNA و کیفیت آن (نسبت جذب ٢٦٠ به ٢٨٠ نانومتر) به ترتیب از یک گرم نمونه برگی پیر ٤٥ میکروگرم و ١/٧، یک گرم پوست میوه ٣٠ میکروگرم و ١/٦ و یک میلی‌لیتر آب میوه ٢٥ میکروگرم و ١/٧ اندازه گیری شد.

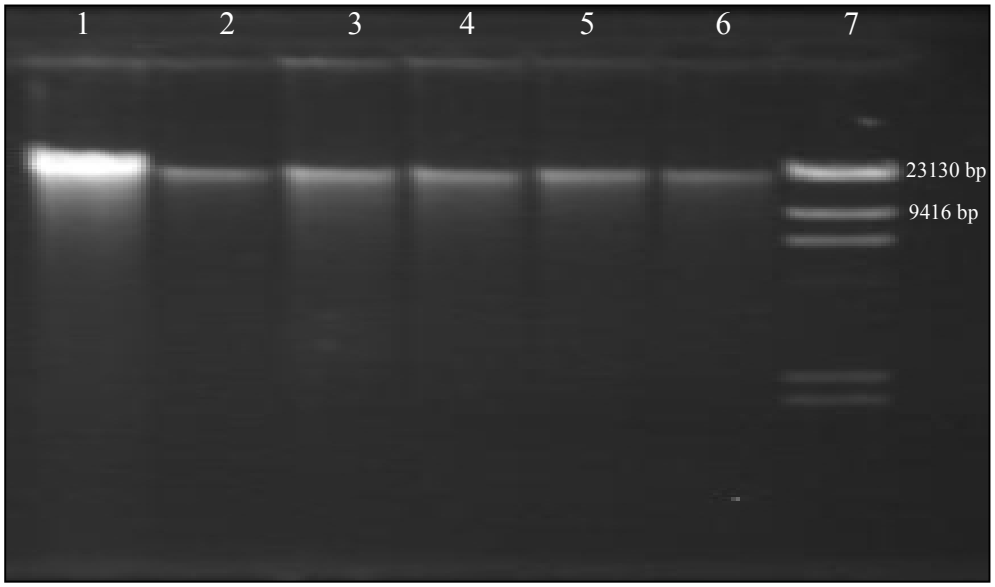

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of DNA from mature leaves of pomegranate, by six extraction methods. Equal volumes of extracted DNA (5 µl) obtained from 1 g plant material and dissolved in 200 µl TE buffer were loaded in wells. Lines from left are methods of: 1- Vroh Bi *et al*. (21), 2- Dellaporta *et al*. (14), 3- Ziegenhagen *et al.* (22), 4- Doyle and Doyle (15), 5- Lodhi *et al*. (16) and 6- Murry and Thompson (17), respectively. 7- *Hind* III cut Lambda (λ) DNA as size marker loaded at 300 ng in the right well.

شکل ٢- الکتروفورز ژل آگارز DNA مربوط به نمونه‌های برگی بالغ انار به دست آمده از شش روش استخراج. در هر چاهک میزان مساوی از محلول DNA استخراجی (٥ میکرولیتر) که از یک گرم ماده گیاهی استخراج و در ٢٠٠ میکرولیتر بافر TE حل شده بارگذاری شده است. شماره خط ها به ترتیب از چپ به راست روش‌های ١- ورابی و همکاران (٢١)، ٢- دلاپورتا و همکاران (١٤)، ٣- زیگن‌هاگن و همکاران (٢٢)، ٤- دویل و دویل (١٥)، ٥- لودهی و همکاران (١٦) و ٦- موری و تامپسون (١٧). ٧- فاژ لامبدا برش خورده با آنزیم *Hind* III به عنوان مارکر اندازه (سمت راست) که به میزان ٣٠٠ نانوگرم در ژل بارگذاری شده است.

طالبی‌بداف و همکاران (٥) روش استخراج DNA موری و تامپسون برای برگ های جوان انار را مناسب تشخیص دادند. در آزمایش حاضر نیز روش موری و تامپسون (١٧) برتری خود نسبت به چهار روش دیگر برای استخراج DNA از برگ های جوان انار را نشان داد. اما روش ورابی و همکاران (٢١) نسبت به روش موری و تامپسون (١٧) در مورد نمونه‌های برگی بالغ برتری بارزی نشان داد. روش ورابی و همکاران (٢١) برای استخراج DNA از برگ های پیر ده ژنوتیپ به کار گرفته شد و DNA به دست آمده از آن مورد افزایش RAPD قرار گرفت که نتایج به دست آمده از آن در شکل ٦ مشاهده می گردد. باندهای به دست آمده نشان از انجام مطلوب

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش بر روی DNA به دست آمده از همه ژنوتیپ‌ها داشت و کیفیت DNA به دست آمده از برگ های پیر با این روش را تایید نمود.

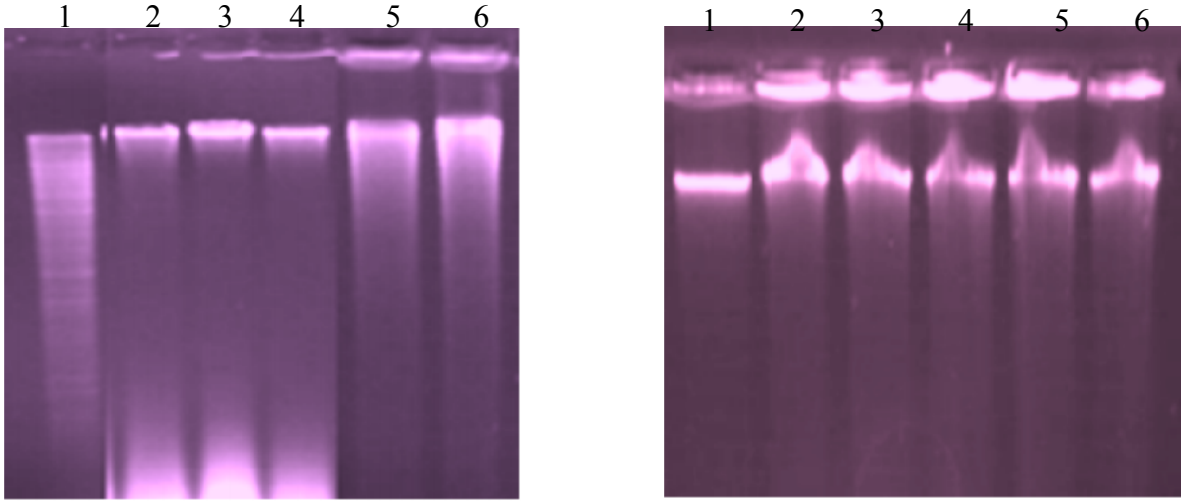

Fig. 3. Digestibility comparison of DNA extracted by six methods from pomegranate mature leaves and cut with *Eco*RI enzyme. Two µg of DNA from each sample was used for enzymatic digestion. Right figure shows the undigested DNA and left figure shows DNA after digesting with *Eco*RI. DNAs were loaded on 1% agarose gel and after run for 3 hr at 60 volts, stained by ethidium bromid and photographed. Number of lines from left to right are methods of 1- Vroh Bi *et al*. (21), 2- Dellaporta *et al.* (14), 3- Ziegenhagen *et al*. (22), 4- Doyle and Doyle (15), 5- Lodhi *et al*. (16) and 6- Murry and Thompson (17), respectively.

شکل ۳- مقایسه برش‌پذیری DNA با آنزیم *Eco*RI به دست آمده با ٦ روش استخراج از نمونه‌های برگی بالغ انار. میزان دو میکرو گرم DNA به دست آمده از نمونه‌های برگی بالغ برای برش آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. شکل سمت راست DNA برش نخورده، و شکل سمت چپ DNA برش خورده را نشان می‌دهد که پس از هضم توسط آنزیم *Eco*RI روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری گردید و پس از سه ساعت در ولتاژ ٦٠ ولت، با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و سپس عکس برداری شد. شماره خط ها به ترتیب روش‌های ۱- ورابی و همکاران (۲۱)، ۲- دلاپورتا و همکاران (١٤)، ۳- زیگن‌هاگن و همکاران (۲۲)، ٤- دویل و دویل (١٥)، ٥- لودهی و همکاران (١٦) و ٦- موری و تامپسون (۱۷) می باشند.

در روش استخراج ورابی و همکاران از سه ماده شیمیایی PVP، زغال فعال و CTAB و غلظت بالای کلرید سدیم و بتامرکاپتواتانول استفاده شده است که از عوامل موثر در افزایش کمیت و کیفیت DNA استخراج شده محسوب می‌شوند. ماده PVP از راه ایجاد پیوندهای هیدروژنی با مواد پلی‌فنلی کمپلکسی را به وجود آورده و امکان جدا سازی آن ها را از DNA فراهم می نماید (۸). زغال فعال از ترکیب هایی است که افزون بر جذب پلی‌فنل ها، توانایی به جذب پیگمان های تیره قهوه‌ای و سیاه (ترکیب های شبه فنلی و ملانین) و سایر ترکیب های ناشناخته رنگی و مواد سمی را داراست (۱, ۲۲). ماده شیمیایی CTAB به عنوان یک ماده شوینده با ملکول DNA کمپلکس تشکیل داده و آن را از موادی همچون کربوهیدارت ها، پروتئین‌ها و غیره جدا می‌کند. پلی‌ساکاریدهای باقی مانده از جمله مواد دیگری هستند که باعث کاهش کیفیت DNA می شوند. از حضور NaCl با غلظت ۱ تا ۲/٥ مولار و رسوب در شرایط نمک بالا برای برداشتن این مواد استفاده می‌شود (۱۱).

www.SID.ir

Archive of SID

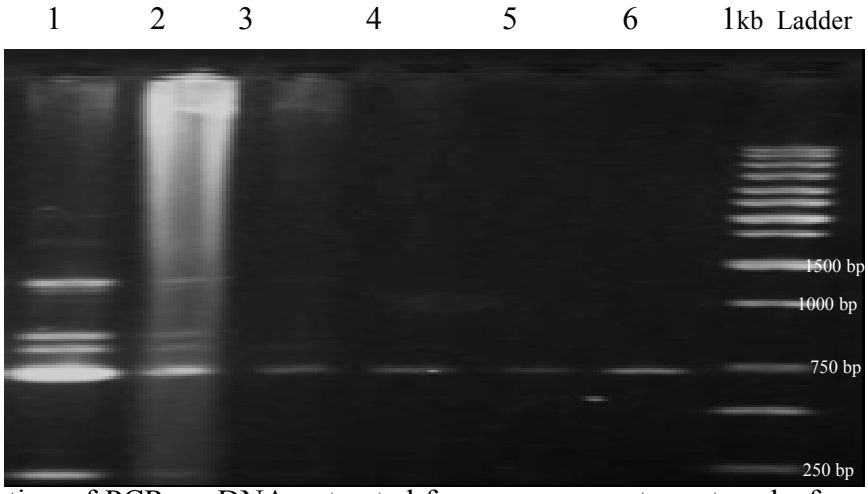

Fig. 4. Application of PCR on DNA extracted from pomegranate mature leaf samples by six methods. Amount of 5 ng DNA of mature leaf samples were used for PCR. Lines from left to right methods of: 1- Vroh Bi *et al*. (21), 2- Dellaporta *et al*. (14), 3- Ziegenhagen *et al*. (22) 4- Doyle and Doyle (15), 5- Lodhi *et al*. (16) and 6- Murry and Thompson (17) respectively.

شکل ٤- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی DNA به دست آمده از نمونه‌های برگی بالغ انار که با ٦ روش استخراج گردیده است. میزان ٥ نانوگرم DNA از نمونه‌های برگی بالغ انار برای واکنش PCR استفاده گردید. خط ها به ترتیب از چپ به راست روش‌های ١- ورابی و همکاران (٢١)، ٢- دلاپورتا و همکاران (١٤)، ٣- زیگن‌هاگن و همکاران (٢٢)، ٤- دویل و دویل (١٥)، ٥- لودهی و همکاران (١٦) و ٦- موری و تامپسون (١٧).

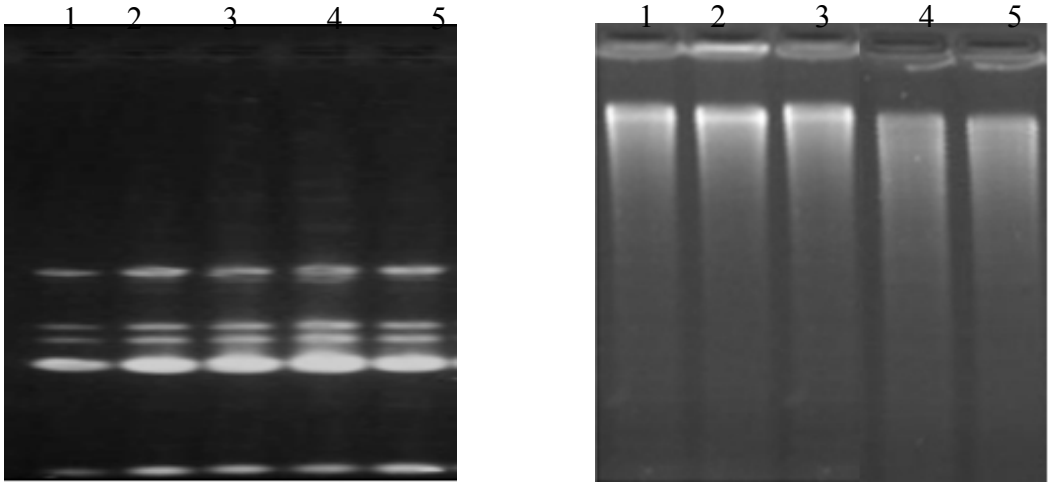

Fig. 5. Results of enzymatic digestion and PCR reaction on the DNA extracted by Vorh Bi *et al* (21) method from different parts of pomegranate plant. Right figure is DNA digestion (2µg) by *Eco*RI enzyme and left figure is the result of PCR reaction. Number of lines from left are DNA extracted from: 1- Fruit peel, 2- Aril, 3- Old leaf, 4- Mature leaf and 5- Young leaf, respectively.

شکل ٥- نتیجه برش آنزیمی و واکنش PCR بر روی DNA استخراج شده با روش ورابی و همکاران (٢١) از قسمت‌های مختلف گیاه انار. شکل سمت راست هضم DNA (مقدار دو میکروگرم) با آنزیم برشگر *Eco*RI و شکل سمت چپ نتایج واکنش PCR را نشان می‌دهند. شماره خط ها به ترتیب از چپ به راست DNA استخراجی از ١ – پوست میوه، ٢- بخش خوراکی میوه، ٣- برگ پیر، ٤- برگ بالغ و ٥- برگ جوان می‌باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

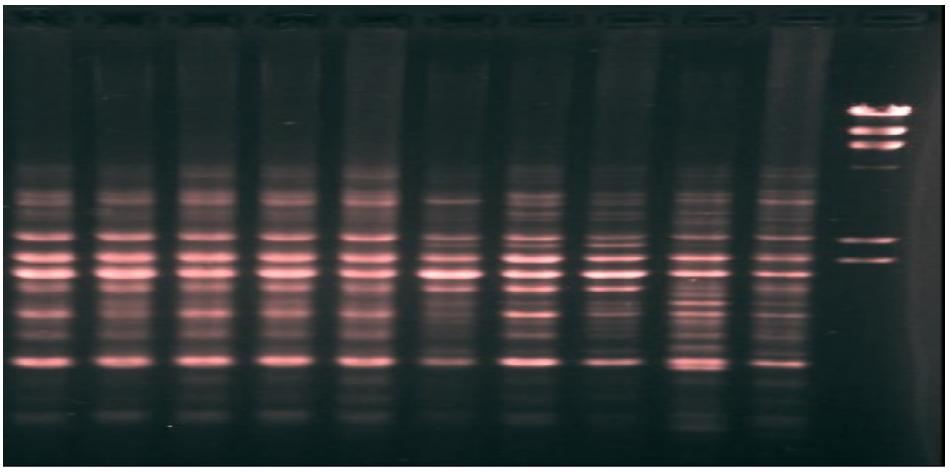

Fig. 6. Application of PCR reaction using ten-nucleotide (10 mer) primer OPAD02 on DNA of 10 different pomegranate genotypes. DNA extracted from old leaves and 5 ng used for each reaction. Right line is *Hind*III cut Lambda phage DNA as size marker.

شکل ٦- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمر ده نوکلئوتیدی OPAD02 روی DNA (5 ng) استخراج شده از برگ‌های پیر ده ژنوتیپ مختلف انار. خط سمت راست DNA فاژ لامبدا برش خورده با آنزیم *Hind*III به عنوان مارکر اندازه می‌باشد.

در روش ورابی و همکاران (۲۱) نسبت به سایر روش ها از غلظت بالاتر NaCl (۲ مولار) استفاده شده است. در این روش غلظت بالای بتامرکاپتواتانول (۵٪) که به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کرده و از اکسید شدن مواد پلی‌فنلی جلوگیری می کند (۱۰, ۲۰) به کار گرفته شده است که در افزایش کارایی روش ورابی و همکاران (۲۱) موثر است. موارد یاد شده شده عواملی هستند که باعث شده DNA استخراج شده با روش ورابی و همکاران (۲۱) از تمام قسمت‌های گیاهی مورد آزمایش از کمیت و کیفیت مناسبی برخوردار باشد. برگ های جوان نسبت به سایر قسمت‌های گیاه دارای ترکیب های پلی‌ساکاریدی و مواد ثانویه کمتر هستند. این مسئله باعث شده که در بیشتر موارد جهت استخراج DNA از برگ های جوان استفاده شود (۱۰، ۱۳، ۱۵, ۱۹). در برخی موارد نشان داده شده است که از قسمت‌های مختلف گیاه می توان برای استخراج DNA استفاده کرد. استراس و همکاران[۱] (۲۰) برای بررسی ارقام گیلاس با استفاده از مارکرهای مولکولی SSR و AFLP از قسمت‌های پوست و گوشت میوه برای استخراج DNA استفاده کردند. استخراج DNA برای بررسی گوناگونی ژنتیکی مرکبات از برگ های بالغ و پیر صورت گرفته است (۱۱). احمد و همکاران[۲] (۹) برای بررسی گوناگونی ژنتیکی ژنوتیپ های پسته با استفاده از مارکر مولکولی SSR از مغز و پوسته استخوانی میوه برای استخراج DNA استفاده کردند (۹). استخراج DNA با کمیت و کیفیت مطلوب از سایر قسمت‌های گیاه به جز برگ های جوان می تواند یک برتری در آزمایشگاه های ژنومیکس باشد چرا که امکان تهیه DNA در زمان‌های مختلف فراهم خواهد بود. در این آزمایش نشان داده شد که از روش ورابی و همکاران (۲۱) به علت ترکیبات موجود در بافر استخراج و مراحل انجام آن می توان از گیاه انار افزون بر برگ‌های جوان از سایر قسمت‌های دیگر هم برای استخراج DNA با کیفیت مطلوب استفاده کرد. استفاده از بافت های میوه برای استخراج DNA این امکان را فراهم می آورد که نمونه های موجود در بازار نیز قابلیت بررسی های ژنومی داشته باشند. در پایان می توان چنین بیان کرد که روش موری و تامپسون به دلیل این که از مواد شیمیایی کمتری استفاده شده و زمان کمتری برای استخراج DNA لازم دارد

۱- Struss *et al.* ۲- Ahmad *et al.*

www.SID.ir

Archive of SID

برای نمونه‌های برگی جوان که مشکل های کمتری دارند دارای برتری نسبی است. اما استخراج DNA از بافت‌هایی که دارای مواد مشکل زای بیشتری هستند مانند برگ‌های بالغ و مسن و همچنین بافت‌هایی مانند پوست میوه و به احتمال پوست تنه و ریشه با روش ورابی و همکاران (۲۱) موفقیت آمیزتر خواهد بود.

منابع REFERENCES

۱- باقری، ع. ۱۳۷٦. مبانی کشت بافت های گیاهی. دانشگاه فردوسی مشهد. ۳٥٤ ص.

۲- زمانی، ذ. ۱۳٦۹. بررسی خصوصیات مرفولوژیکی انارهای منطقه ساوه. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

۳- سلیمانی، ف. ۱۳۸۲. ژنتیک عملی. نشر ماهرنگ. ۱۷۲ ص.

٤- شهر بابکی، ح. ۱۳۷۷. پراکندگی وتنوع ارقام انار در ایران. نشر آموزش کشاورزی. ۲٦٥ ص.

٥- طالبی بداف، م.، م. بهار و ب. شریف نبی. ۱۳۸۲. تنوع ژنتیکی برخی از ارقام انار در ایران با استفاده از نشانگر RAPD. مجموعه مقالات سومین کنگره بیوتکنولوژی ایران. ۳٤٥-۳٤۳.

٦- فارسی، م. و ج. ذوالعلی. ۱۳۸۲. اصول بیوتکنولوژی گیاهی. انتشارات دانشگاه مشهد. ٤۹٥ ص.

۷- فتاحی مقدم، م. ر. ۱۳۸۲. کاربرد نشانگرهای مولکولی DNA در شناسایی و اصلاح انگور بیدانه. رساله دکتری. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

۸- کدخدایی، س. ۱۳۸۲. روش ساده وکم هزینه جهت جدا سازی اسید های نوکلئیک از گیاهان حاوی مواد پلی ساکاریدی و پلی فنلی زیاد: بهینه سازی روش استخراج DNA در بادام. مجموعه مقالات سومین کنگره بیوتکنولوژی ایران. ٤۱۹-٤۱۷.

9. Ahmad, R., L. Ferguson and S. Southwick. 2003. Identification of pistachio (*Pistacia vera* L.) nuts with microsatellite markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128:898-903.
10. Bushra, C., Y. Afshan, H. Tayyab and S. Riazuddin. 1999. Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. Plant Mol. Biol. Rep. 17:1-7.
11. 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. 21:177-186.
12. Csaikl, U.M., H. Bastian, R. Brettschneider, S. Gauch, A. Meir, M. Schauerte, F. Scholz, C. Sperisen, B. Vornam and B. Ziegenhagen. 1998. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: A fast universal mini-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. Plant Mol. Biol. Rep. 16:69-86.
13. Degani, C., J. Deng, A. Beiles, R. El- Batsri, M. Goren and S. Gazit. 2003. Identifying lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivars and their genetic relationships using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128:838-845.
14. Dellaporta, S., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation:Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1:19-21.
15. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissues. Focus 12:11-15.
16. Lodhi, M.A., G.N. Ye, N.F. Weeden and B.I. Reisch. 1998. A simple and efficient method of DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Mol. Biol. Rep. 12:6-13.
17. Murry, M. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Res. 8:4321-4325.
18. Nikoloudakis N., G. Banilas, F. Gazis and P. Hatazopoulos. 2003. Discrimination and genetic diversity among cultivated olives of Greece using RAPD markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128:741-746.
19. Porebski, S.L., G. Baily and B.R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Mol. Biol. Rep. 15:8-15.

www.SID.ir

Archive of SID
20. Struss D., R. Ahmad and S. Southwick. 2003. Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128:904-909.
21. Vroh Bi, I., L. Hraventg, A. Chandelier, G. Mergeai and P. Du Jardin. 1996. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by use of activated charcoal during DNA extraction. Plant Breeding 115:205-206.
22. Ziegenhagen, B., P. Guillemaut and F. Scholz. 1993. A procedure for mini-preparation of genomic DNA from needles of silver fir (*Abies alba* Mill.). Plant Mol. Biol. Rep. 11:117-121.
www.SID.ir