انتخاب روش مناسب استخراج DNA برای گونه‌های وحشی جنس Prunus

عبداله خدیوی‌خوب

استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه اراک، اراک

Email: akhadivi@ut.ac.ir, a-khadivi@araku.ac.ir

چکیده

بدلیل در دسترس نبودن نمونه‌های برگی جوان برای گونه‌های اهلی در برخی مواقع و همچنین وجود ترکیبات پلی‌ساکاریدی و پلی-فنولی زیاد در نمونه‌های برگی گونه‌های وحشی، باید یک روش مناسب برای استخراج DNA برای این موارد استفاده نمود. به منظور انتخاب بهترین روش استخراج DNA برای گونه‌های وحشی جنسPrunus، از برگ‌های بالغ 12 گونه وحشی این جنس با استفاده از پنج روش DNA استخراج شد و کیفیت و کمیت و کارایی آن در هنگام PCR بررسی شد. نتایج نشان داد که DNA استخراج شده با روش دویل و دویل (1987) از کمیت و کیفیت بهتری نسبت به سایر روش‌ها برخوردار می‌باشد و از عملکرد بهتری نیز در واکنش PCR برخوردار می‌باشد که روشنی و تعداد باندهای تکثیر شده تأییدکننده این موضوع بود.

مقدمه

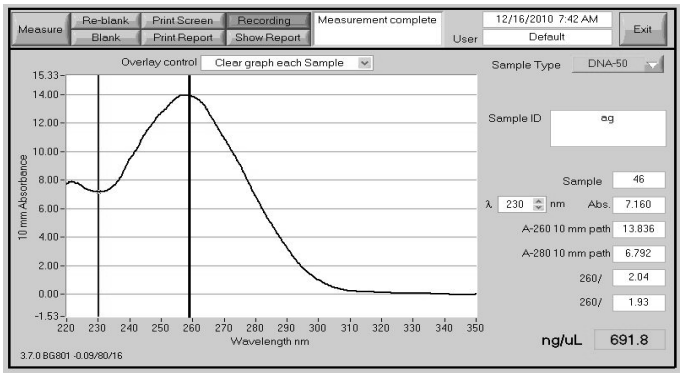
امروزه با پیشرفت علم بیوتکنولوژی، نشانگرهای مولکولی مختلفی برای بررسی روابط فیلوژنتیکی، تهیه نقشه های ژنتیکی گیاهان و حذف نمونه‌های تکراری در بانک ژن ارائه شده است. اکثر این روش‌ها نیاز به استفاده از DNA با کیفیت و خلوص بالا دارند. روش های مختلفی برای استخراج DNA از گیاهان وجود دارد. در بیشتر این روش‌ها سه نکته اساسی مد نظر می‌باشد که شامل کمیت و کیفیتDNA، سرعت استخراج و عملکرد آن در واکنش PCR می‌باشد. استخراج DNA ژنومی از گیاهان چوبی که علاوه بر ترکیبات پلی‌ساکاریدی زیاد، دارای متابولیت‌های ثانویه فراوان مانند پلی‌فنول‌ها و تانن‌ها می‌باشند، از گذشته با دشواری‌هایی همراه بوده است (4). روش‌های مختلفی برای استخراج ماده ژنتیکی از گیاهان ارائه شده است، این روش‌ها برای همه گیاهان قابل استفاده نبوده و DNA با کمیت و کیفیت مطلوب حاصل نمی‌شود، زیرا گیاهان متفاوت دارای مواد گوناگونی از قبیل کربوهیدرات‌ها، فنول‌ها و روغن‌های مختلف می‌باشند که کیفیت DNA را با مشکل مواجه می‌سازند. بنابراین روش‌های استخراج DNA اختصاصی هر گیاه یا گروهی از گیاهان که بتواند اثر این مواد را به حداقل برساند بسیار مطلوب هستند. استخراج موفق DNA ژنومی از نمونه‌های برگی جوان به دلیل پایین بودن ترکیبات پلی‌ساکاریدی، پلی‌فنول‌ها و تانن‌ها در برخی گونه‌های اهلی جنس Prunus همچون گیلاس (P. avium) و هلو (Prunus persica) پیش از این به روش لودهی و همکاران و همچنین موری و تامپسون صورت گرفته است (3 و 4). برخی مواقع بدلیل در دسترس نبودن نمونه‌های برگی جوان برای این گونه‌های اهلی و همچنین وجود ترکیبات پلی‌ساکاریدی و پلی‌فنولی زیاد در نمونه-های برگی گونه‌های وحشی بایستی یک روش مناسب برای استخراج DNA در این مواقع استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

به منظور انتخاب بهترین روش استخراج DNA برای گونه‌های وحشی جنسPrunus، از برگ‌های بالغ 12 گونه وحشی این جنس با استفاده از پنج روش موری و تامسون (1980)، دلاپورتا و همکاران (1983)، دویل و دویل (1987)، لودهی و همکاران (1993) و ورابی و همکاران (1996)1 DNA استخراج شد و کیفیت و کمیت و کارایی آن در هنگام PCR بررسی شد. کمیت و کیفیت DNA بدست آمده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و نانودراپ در طول موج‌های 260 و 280 نانومتر و الکتروفورز DNA در ژل آگاروز با غلظت یک درصد مشخص گردید و برای عملیات PCR آماده شد.

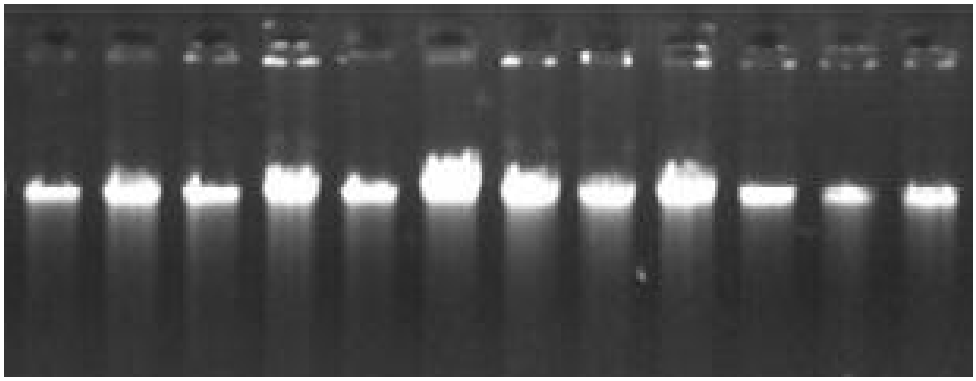
نتایج و بحث

نتایج روش اسپکتروفتومتری و نانودراپ نشان داد که DNA استخراج شده با روش دویل و دویل (1987) از کمیت و کیفیت بهتری نسبت به سایر روش‌ها برخوردار می‌باشد (شکل 1). همچنین مشاهده ژل به دست آمده از بارگذاری حجم‌های مساوی (5 میکرولیتر) از DNA استخراجی از برگ‌ها نشان داد که DNA استخراجی به روش دویل و دویل (1987) نسبت به روش‌های دیگر ضخامت نوار بیشتری داشته و کیفیت بهتری دارد (شکل 2) و نتایج اسپکتروفتومتری و نانودراپ را تأیید نمود. نتایج به دست آمده از واکنش PCR نشان داد که DNA استخراج شده با روش دویل و دویل (1987) از عملکرد بهتری نیز برخوردار می‌باشد که روشنی و تعداد باندهای تکثیر شده تأییدکننده این موضوع بود. شکل 3 نتیجه واکنش PCR روی DNA به دست آمده از نمونه‌های برگی گونه‌های وحشی مورد استفاده را که به روش دویل و دویل (1987) استخراج گردیده است را با استفاده از یک مکان ریزماهواره کلروپلاستی نشان می-دهد.

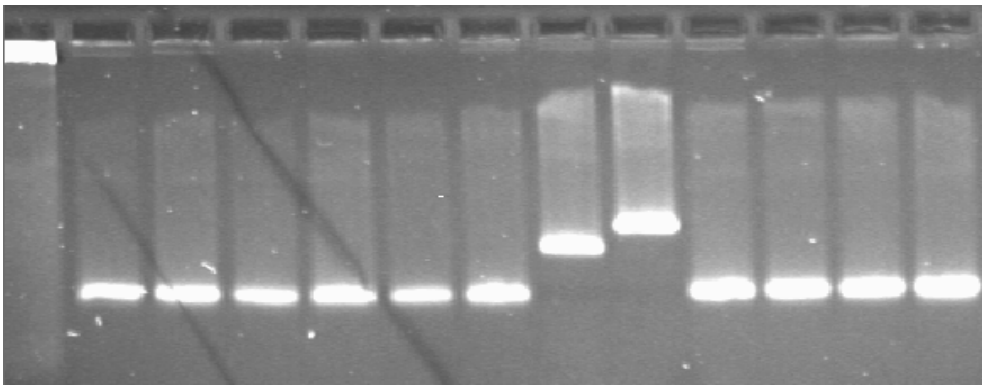


شکل 1- تخمین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با روش دویل و دویل (1987) بوسیله نانودراپ

1- Murray and Thompson (1980); Dellaporta et al. (1983); Doyle and Doyle (1987); Lodhi (1993); Vroh Bi et al. (1996)



شکل 2- کیفیت DNA استخراج شده با روش دویل و دویل (1987) از برگ گونه‌های وحشی مورد مطالعه



شکل 3- عملکرد DNA استخراج شده به روش دویل و دویل (1987) از نمونه‌های برگی گونه‌های وحشی مورد استفاده از طریق واکنش PCR با مارکر ریزماهواره کلروپلاستی

منابع

Dellaporta SL., J.Wood and JB. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation version II. Plant Molecular Biology Reporter. 1: 19-21.

Doyle JJ. and JL.Doyle. 1987. Isolation of DNA from fresh plant tissue. Focus. 12: 13-15.

Khadivi-Khub A., Z.Zamani and N. Bouzari. 2008. Evaluation of genetic diversity in some Iranian and foreign sweet cherry cultivars by using RAPD molecular markers and morphological traits. Hort Environ and Biotech. 49:188-196.

Lodhi MA., Ye GN.,Weeden NF. and Reisch BI. 1993. A simple and efficient method of DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. Plant Molecular Biology Reporter. 12: 6-13.

Murry M. and Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research. 8: 4321-4325.

Vroh Bi I., L.Hraventg, A. Chandelier, G. Mergeai and P. Du Jardin. 1996. Improved RAPD amplication of recalcitrant plant DNA by use of activated charcoal during DNA extraction. Plant Breed. 115: 205-206.

Selection of the suitable method for DNA isolation from wild Prunus species

Abdollah Khadivi-Khub

Assistant professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran

Email: akhadivi@ut.ac.ir, a-khadivi@araku.ac.ir

Abstract:

Genomic DNA extraction with a high quantity and quality is a basic requirement in molecular biology. DNA extraction from wild plant tissue because of presence of polysaccharides and 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 wild Prunus species, five DNA extraction methods were compared. Considering the quantity and quality of DNA and the results of PCR, the method of Doyle and Doyle (1990) was recommended for high pure DNA extraction in these wild plants.

Keywords: Genomic DNA extraction, Wild Prunus species, DNA quality and quantity, PCR.