هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران، ١٤ تا ١٧ شهریور ماه ١٣٩٠،دانشگاه صنعتی اصفهان

مقایسه چند روش استخراج DNA ژنومی در سوسن چلچراغ

ملیحه صیادعالیان (۱)، روح انگیز نادری (۲)، محمد نقی پاداشت دهکائی (۳)

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد و ۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران ۳- استادیار ایستگاه تحقیقات گل و گیاهان زینتی لاهیجان

کیفیت DNA برای تمامی آنالیزهای ژنتیکی که بر روی مارکرهای مولکولی پایه ریزی شده باشد، اساسی است. در اکثر موارد استخراج DNA گیاهی همراه با حضور بازدارنده هایی مانند متابولیت های ثانویه شامل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین ها و تانن ها می باشد. بررسی ۵ روش استخراج DNA ژنومی برای دستیابی به DNA با کیفیت بالا از برگ های علفی و تازه گونه *Lilium ledebourii* انجام شد. در نهایت با توجه به دارا بودن سوسن چلچراغ از مقدار بالای متابولیت های ثانویه، بهترین روش استخراج DNA ژنومی، روش Sharp و همکاران (۱۹۹۸) معرفی شد.

کلمات کلیدی: سوسن چلچراغ، *Lilium ledebourii*، استخراج DNA

مقدمه:

لیلیوم یکی از مهم ترین گل های شاخه بریده در دنیا می باشد و سوسن چلچراغ یکی از گونه های لیلیوم بوده که یک گیاه مهم بومی و در حال انقراض در ایران است.

بررسی تنوع ژنتیکی و قرابت ژنتیکی این گیاه راهی در جهت پی بردن به فزونی ذخایر ژنتیکی ایران بوده که خود قدم ارزشمندی است. مطالعه تنوع ژنتیکی توسط مارکرهای مولکولی در اولین گام وابسته به استخراج DNA ژنومی می باشد.

اندام های گیاه سوسن چلچراغ دارای انواعی از متابولیت های ثانویه می باشند و لذا برای استخراج DNA این گیاه اولین و مهمترین مسئله، انتخاب نوع بافت گیاهی است. برگ سوسن چلچراغ نسبت به سایر اندام ها (سوخ، ساقه و گل) فاقد متابولیت های ثانویه می باشد.(۱) دستیابی به روش استخراج با هزینه کمتر و آسان تر و بدون آلودگی های متابولیت های ثانویه در این گیاه و سایر گیاهان دارای متابولیت های ثانویه بالا مانند گیاهان دارویی قدم مهمی در استفاده از مارکرهای مولکولی است.

مواد و روش ها:

در این مطالعه استخراج DNA ژنومی با روش های دلاپورتا و همکاران (۲)، دویل و دویل (۳)، موری و تامسون (٤)، کواگن و هیلدن (۵)و روش استخراج شارپ و همکاران (٦) روی برگ های جوان کاملا توسعه یافته سوسن چلچراغ مورد بررسی قرار گرفتند.

نمونه های برگی در اواخر بهار و اوایل تابستان از ۷ منطقه دارای سوسن چلچراغ که به صورت بومی وجود دارند، جمع آوری شدند.

برای استخراج DNA توسط روش های نامبرده، از مواد شیمیایی،ابزارهاو دستگاه های گزارش شده در مراحل مختلف استخراج استفاده گردید.

پس از استخراج DNA رسوب حاصل از آن به مدت یک شب درمعرض ۱۵۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید. با استفاده از دستگاه نانودراپ محلول DNA بدست آمده غلظت سنجی شده و کیفیت نمونه ها به وسیله اندازه گیری نسبت جذب نوری طول موج های ۲٦۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (شاخص خلوص DNA) و نسبت طول موج های ۲٦۰ نانومتر به ۲۳۰ نانومتر (شاخص شکستگی DNA) بررسی شدند. همچنین، با استفاده از الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز ۱٪ کیفیت نمونه ها مجددا ارزیابی شد. برای هر نمونه سه میکرولیتر DNA استخراج شده در ترکیب با سه میکرولیتر بافر بار گذاری، دو میکرولیتر ماده ژل رد (Gel red) و هفت میکرولیتر آب دوبارتقطیر در چاهک های ژل آگارز ۱٪ در شرایط بافر TBE قرار داده شد. ژل آگارز به مدت ۹۰ دقیقه در معرض ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز قرار گرفته شدو سپس DNA در زیر نور UV در دستگاه Gel-doc مشاهده و عکس برداری شد.

نتایج وبحث:

پس از انجام مراحل آزمایشی هر روش، روش های دلاپورتا و همکاران (٢)، دویل و دویل(٣)، کواگن و هیلدن (٥)، و موری و تامسون (٤) در داخل لوله های فالکون ١٥ میلی لیتری انجام میگردند و لذا میزان بافر مصرفی، و در نتیجه مواد مورد نیاز برای استخراج افزایش می یابد؛ اما در روش شارپ و همکاران (٦) استخراج توسط تیوب های ٢ میلی لیتری انجام می شود که مواد مصرفی و تواما هزینه این روش نسبت به سایر روش ها، کاهش می یابد.

همچنین روش های دلاپورتا و همکاران (٢)، و موری و تامسون (٤) در طی مدت زمان کوتاهتر نسبت به سایر روش ها بوده و روش دویل و دویل(٣) بیشترین مدت زمان برای استخراج دارا می باشد که با توجه به کمیت و کیفیت DNA بدست آمده،طول مدت روش اثرقابل توجهی بر نتیجه کمی و کیفی استخراج ندارد.

بررسی کمیت و کیفیت DNA

میزان غلظت DNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ به صورت نانوگرم در میکرولیتر اعلام می شود. نتایج حاصل از دستگاه نانودراپ نشان دادند که DNA استخراجی توسط روش شارپ و همکاران (٦) علاوه بر دارا بودن غلظت بالایی از DNA، دارای DNA با کیفیت بالا (عدم آلودگی و شکستگی) می باشد.

علاوه بر دستگاه نانودراپ، با استفاده از پهنای باندهای حاصل در ژل، غلظت نسبی DNA استخراجی مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت. شکستگی DNA استخراج شده در طی مراحل استخراج به صورت دنباله بر روی ژل قابل مشاهده می باشد که برای تشخیص کیفیت DNA استخراج شده، شاخص مناسبی است.

با توجه به این شاخص، در روش شارپ و همکاران (٦)، کمتریت دنباله برای DNA در ژل مشاهده شد.

منابع:

1- Farsam, H., M. Amanlou and Gh. Amin. 2003. Anatimical And Phytochemical Study of Lilium ledebourii (BAKER) BOISS., A Rare Endemic Species in Iran. Daru. Vol: 11 No.4.
2- Dellaporta, S., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation:Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1:19-21.
3- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissues. Focus 12:11-15.
4- Murry, M. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Res. 8:4321-4325.
5- DNeasy. Plant Handbook: Protocol:Purification of Total DNA from Plant Tissue (Mini Protocol). Available at:http://www.qiagen.com. Accessed: 10-11-2008.
6- Sharp, P.J., M. Kreis, P.R. Shewry and M.D. Gale. 1987. Location of β-amylase Sequense in Wheat and its Relatives. Theor appl Genet. 75:286-290.

Evaluation of some Genomic DNA Extraction methods in Sousan-e Chehel Cheraagh (*Lilium ledebourii*)

Sayadalian M.[1], Naderi, R.[2], Padasht.D, M.N. [3]
1 MSc Student , Department of Horticultural Science, University of Tehran, Karaj, Iran
2 Associate Professor, Department of Horticultural Science, University of Tehran, Karaj, Iran
3 Ornamental Plants Research Station of Lahijan, Lahijan, Iran
sayadalian@yahoo.com

The quality of DNA is essential for all genetic analysis based on molecular markers. In the most situations, DNA extraction being with presence of inhibitors such as secondary metabolites contains alkaloids, flavonoids, saponins and tannins. In this research five methods of DNA extraction have been evaluated for procure to DNA with high quality from fresh and vegetative leafs of *Lilium ledebourii*.
Therefore, *Lilium ledebourii* contains high level of secondary metabolites, Sharp method is the best protocol for this plant DNA extraction.