روشی موثر برای استخراج DNA ژنومی از ۷ گونه مهم ورد در ایران

زهره جبارزاده، حسن صالحی و مرتضی خوشخوی
بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

چکیده

وردها جزء گیاهان زینتی مهم در جهان هستند. استخراج DNA از گونه های ورد مشکل است، زیرا این گیاهان دارای مقدار زیادی از انواع پلی‌ساکاریدها، پلی فنل‌ها و سایر ترکیبات هستند. این ترکیبات نه تنها عملکرد DNA را کاهش می دهند، بلکه آن را غیر قابل استفاده برای پژوهش های آنالیز مولکولی می‌کنند. برای رفع این مشکل، در این پژوهش روشی ساده، سریع و در عین حال موثر برای استخراج DNA مورد بررسی قرار گرفت. در این روش ابتدا یک بافر شستشو قبل از استخراج استفاده شد تا مواد زائد سلولی، پلی‌ساکاریدها و آب اضافی قبل از استخراج حذف شوند. بعد از این مرحله، از بافر استخراج استفاده شد تا میزان متابولیت‌های ثانویه را کاهش دهد. رسوب پلی‌ساکاریدها توسط CTAB/NaCl و حذف پروتئین‌ها توسط کلروفرم: ایزوآمیل الکل باعث خالص شدن DNA شد. DNA جداسازی شده با این روش توسط دستگاه اسپکتروفتومتری مورد سنجش قرار گرفت: A_{260}/A_{230} (رسوب پلی فنل ها و پلی ساکاریدها) و A_{260}/A_{280} (آلودگی پروتئینی). در این پژوهش700-1000µg DNA به ازاء هر گرم وزن تر برگهای ورد به دست آمد که برای پژوهش های آنالیز مولکولی بسیار مناسب است.

مقدمه

وردها جزء گیاهان زینتی مهم و اقتصادی هستند که بیش از ۲۰۰ گونه و ۱۸۰۰۰ رقم دارند. به نظر می رسد که با توجه به گوناگونی مورفولوژیکی وردها، تفاوت های ژنتیکی بین آنها زیاد باشد، بنابراین برای طبقه بندی دقیق تر نیاز به فنون و نشانگرهای مولکولی مانندRFLP و نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR نظیر RAPD, AFLP، SSR وISSR دارند. این روش های آنالیز مولکولی نیاز به استخراج DNA دارند. متاسفانه وردها دارای مقدار زیادی پلی ساکاریدها، پلی فنل ها و سایر متابولیت های ثانویه هستند که سبب می شوند DNA برای پژوهش های بیولوژی مولکولی غیر قابل استفاده شود. در این پژوهش، یک روش ساده، سریع و موثر برای استخراج DNA با کیفیت زیاد گزارش شده است.

مواد و روش ها: در این پژوهش ۷ گونه ورد مورد بررسی قرار گرفتند. ٤ گرم از برگ های بالغ از وردهای مورد پژوهش جمع آوری شدند و در هاون چینی به همراه ازت مایع پودر شدند و 20 میلی لیتر بافر شستشو (Tris-HCl، glucose، EDTA، PVP و mercaptoethanol) به آنها اضافه شد و در یخ قرار گرفتند و سانتریفیوژ شدند و مایع بالایی دور ریخته شد، سپس ۲۰ میلی لیتر بافر استخراج (Tris-HCl، NaCl، EDTA، CTAB و mercaptoethanol) اضافه شد و ٤٠ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفتند، بعد از آن ۲۰ میلی لیتر کلروفرم: ایزوآمیل الکل و ۲ میلی لیتر پتاسیم استات ۵M اضافه شد و سانتریفیوژ شدند و مایع بالایی به لوله اپندرف جدید منتقل شد و دوباره کلروفرم: ایزوآمیل الکل اضافه شد، بعد از سانتریفیوژ کردن و انتقال مایع بالایی به لوله اپندرف جدید، ایزوپروپانول و سدیم استات ۳M اضافه شد، بعد از قرار گرفتن در دمای $-۲۰^{\circ}C$ و سانتریفیوژ کردن رسوب سفید DNA حاصل شد، بعد از سه بار شستشو با اتانل، رسوب حاصل در TE بافر و RNAase حل شد و سپس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج و بحث: بر اساس روش گفته شده، DNA ۱۰۰۰-۷۰۰ µg به ازاء هر گرم وزن تر برگ ها به دست آمد که این مقدار بیش از مقدار به دست آمده توسط سایر روش های استخراج DNA بود(۱ و۲). نسبت جذب A_{260}/A_{230} (آلودگی پلی ساکارید و پلی فنل) ۲/۲۲- ۱/۹ و A_{260}/A_{280} (آلودگی پروتئین) ۱/۹۶-۱/۷۸ بود، که نشان دهنده آلودگی بسیار کم DNA با پلی فنل ها، پلی ساکاریدها و یا پروتئین ها است.

منابع

1. Dehestani, A., S. K. Kazemi Tabar. 2007. A rapid efficient method for DNA isolation from plants with high levels of secondary metabolites. Asian J. Plant Sci. 6: 977-981.
2. Khan, I. A., F. S. Awan, A. Ahmad and A. A. Khan. 2004. A modified mini-prep method for economical and rapid extraction of genomic DNA in plants. Plant Mol. Bio. Rep. 22: 89a-89e.

An Efficient Method for Extraction Genomic DNA from 7 Important Species of *Rosa*

Zohreh Jabbarzadeh[1], Hassan Salehi[2] and Morteza Khosh-Khui[3]
[1, 2, 3] Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

Abstract: Rose is one of the most commonly cultivated ornamental plants in the world. DNA isolation from rose species is particularly difficult because of their large amounts of polysaccharides and polyphenols and other compounds. These substances not only decrease the yield but the quality of DNA is almost unusable. To overcome this problem, we designed a simple but efficient method for DNA isolation. In this method a wash buffer is primarily used to remove cell debris, polysaccharides and excessive water before extraction. An extraction buffer is used to reduce the secondary metabolite levels. CTAB/NaCl precipitation of polysaccharides and elimination of proteins by chloroform: isoamyl alcohol resulted a more pure DNA. DNA isolated using this method was checked spectrophotometrically: A_{260}/A_{230} (polyphenol and polysaccharide residuals) and A_{260}/A_{280} (protein contamination). We routinely obtained 700-1000µg DNA per gram fresh leaf tissue which is enough for most of genetic assays.

Key words: rose, DNA isolation, polyphenols, polysaccharides

شناسایی ارقام مختلف سیب توسط نشانگر SSR

رومینا جهرمی شیرازی (۱)، منصوره کشاورزی (۲)، محمدرضا نقوی (۳)، سیما دامیار (۲)، مهدی زهراوی (۴) و حسینی زواره ای محمد (۱)

۱- کارشناس ارشد بیو تکنولوژی، دانشگاه آراد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، ۲- کرج، جاده ماهدشت، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر شهرک اصلاح بذر، بخش باغبانی، ۳- گروه بیو تکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران و ۴- کرج، جاده ماهدشت، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، بانک ژن

چکیده

با استفاده از نشانگرها در سطح ملکول DNA می توان اطلاعات دقیقی از ژنوم گیاهان بدست آورد. از جمله نشانگرهای معتبر در بررسی ژنوم سیب، نشانگر SSR است که در بررسی تنوع ژنتیکی و شناسه دار کردن ارقام سیب کارایی بالایی دارد. در این تحقیق به منظور تهیه شناسنامه ژنتیکی و تعیین رابطه ژنتیکی بر روی ۲٤ رقم سیب از ۵ جفت نشانگر منتخب SSR استفاده شد. بر اساس نتایج، در مجموع ۵۲ آلل چند شکل در ۵ مکان ژنی ریزماهواره (میانگین ۱۰/٤ در هر لوکوس) شناسایی شدند. در نهایت، ۳ نشانگر SSR توانستند باندها و الگوی نواربندی اختصاصی برای ارقام شناسایی نمایند. کلاستر بندی نسبی بر اساس حضور یا عدم حضور باند، خصوصیات میوه و منشا جغرافیایی ارقام ارائه شد. این نشانگر قادر به شناسایی دقیق ارقام مختلف سیب بوده و می تواند در تهیه شناسه ژنتیکی ارقام مختلف بومی و تجاری سیب بکار رود.

مقدمه

مهمترین درختان میوه کشت شده در مناطق معتدله و سردسیری که بصورت اهلی درآمده اند در خانواده گلسرخیان قرار دارند. ثبت و شناسایی ارقام و تعیین رابطه ژنتیکی بین آنها مستلزم دسترسی به روشهای دقیق و قابل تکراری است که از شرایط محیطی متأثر نباشند. از بین نشانگرهای مختلف، SSR (ریزماهواره) فراوانترین نشانگر مولکولی است که در این زمینه مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از این تحقیق بررسی روابط ژنتیکی و دستیابی به آلل های اختصاصی میکروساتلیت برای تعدادی از ارقام بومی و تجاری سیب کشور است.

مواد و روش‌ها

۲٤ رقم بومی و خارجی سیب شامل گلدن آسیایی، گلدن کانادایی، گلدن دلیشز، شمیرانی تابستانه، شمیرانی، لبنانی تابستانه، دماوند B_1 ، دماوندB_2 ، دماوندB_3 ،گلاب نعمتی، گلاب رسمی، گلاب‌دکتراسماعیلی، گلاب دماوند، گلاب صحنه، گلاب پاییزه، گلاب کهنز، گلاب اصفهان، ملایر ٤، ملایر٦، ملایر۷، ملایر ۸، ملایر ۹، شفیع آبادی چالوس، شفیع‌آبادی یغمرخان مورد شناسایی ملکولی قرار گرفت. بدین منظور از ۵ جفت آغازگر منتخب (Guilford et al,. 1997; Gianfranceschi *et al*,.1998) استفاده و محصول پی سی آر توسط الکتوفورز عمودی توالی یاب بررسی شد. پس از رنگ آمیزی نیترات نقره، تجزیه خوشه ای داده ها توسط نرم افزار NTSYS و بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه Dice ترسیم شد. اندازه باند ها و الگوهای نوار بندی اختصاصی با استفاده از Ladder (۱۰۰pb) تعیین گردید

نتایج و بحث

بر اساس نتایج پی سی آر، در مجموع ۵۲ آلل چند شکل در ۵ مکان ژنی ریزماهواره (میانگین ۱۰/٤ آلل در هر مکان ژنی) شناسایی شدند. میزان چند شکلی با استفاده از این آغازگرها ۱۰۰٪ و میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) در مکان های ژنی بین ۰/۷۵ – ۰/۸٤ محاسبه شد. کلیه آغازگرها، توانستند الگوی نواربندی اختصاصی در ارقام ایجاد کنند. ۳ نشانگر توانستند در ۱۳ رقم نوارهای اختصاصی ایجاد کنند. بر این اساس، ارقام مختلف براحتی از یکدیگر تفکیک شدند. باندها و الگوی نواربندی اختصاصی در جلوگیری از اختلاط یا اشتباه ارقام در احداث باغات و همچنین در ثبت رقم کاربرد دارند. بر اساس نتایج تجزیه کلاستر داده ها، ارقام به ٦ گروه تقسیم شدند. این تقسیم بندی بطور نسبی تابع منشا جغرافیایی یا خصوصیات مورفولوژیک میوه بود.

منابع

1) Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M., Cgessler, C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. Theor Appl yenet. 96:1069-1076.
2) Guilford, P ., Sprakash , J .M. Zhu., Rikkering, E., Gardiner, S., Bassett, H., and R Forster. 1997. Microsatellite in Malus × damestica (apple): abundance, Polymorphism and cultivar identification. Theor Apple Genet 94:249-254.

Abstract
It is possible to employ markers at DNA molecule level in order to get precise information on plants genome. SSR marker is one of the reputable markers for examining apple genome which has an essential function in genetic diversity, cultivar and varieties identification. The present study has applied 5 pair of SSR polymorphic markers on 24 cultivars and varieties of apple tree to develop a genetic ID for them and also determine their genetic relationships. finally 52 polymorphic alleles in 5 micro satellite loci (average of 10/4 for each locus) were identified By using three primers (CH01H01, 02B1, CH02B10) it was possible to observe specific bands in cultivars (24 cultivars). Also the specific pattern of banding for each primer was established for some cultivars. Cluster analysis was conducted individually for each cultivar and variety on the basis of band presence or absence, morphological trait and origin.
Keyword: apple, SSR marker