DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.1.6 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۳۱-۲۱۶

مقایسه پنج روش استخراج DNA ژنومی در گیاه دارویی گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum*)

زهرا علیدوستی شهرکی[۱]، پریسا فرخ[۲،۱*]، عاطفه امیراحمدی[۲،۱]، آرزو رضایی[۲،۱] و جواد قاسمیان[۳]

[۱] ایران، دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی

[۲] ایران، دامغان، دانشگاه دامغان، پژوهشکده علوم زیستی

[۳] ایران، دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده ریاضی و علوم کامپیوتر

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۷

چکیده

در مطالعه تاکسونومی گیاهان دارویی روش‌های مبتنی بر DNA، جذاب‌تر از روش‌های کلاسیک هستند. استخراج DNA از گیاهان دارویی به دلیل متابولیت‌های ثانویه بیشتر با مشکلاتی مواجه است. در این مطالعه جهت انتخاب یک روش مناسب برای استخراج DNA از برگ‌های تازه و هرباریومی گیاه گاوزبان ایرانی، پنج دستورکار شامل روش دویل و دویل اصلی، دو روش دویل و دویل تغییریافته (که بدون ۲-مرکاپتواتانول یا استات آمونیوم است)، روش تغییریافته موری و تامسون و کیت Gene All ارزیابی شدند. کیفیت و کمیت DNA با روش‌های الکتروفورز روی ژل و اسپکتروفتومتری بررسی گردید. قابلیت استفاده DNA خالص سازی شده از طریق PCR توالی فاصله‌انداز رونویسی شونده داخلی (ITS) در DNA ریبوزومی هسته‌ای آزمایش شد. در مقایسه با روش دویل و دویل اصلی، حذف ۲-مرکاپتواتانول یا استات آمونیوم از این روش، تاثیر معناداری (p-value > ۰/۰۵) روی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از گیاه گاوزبان تازه و هرباریومی نداشتند. اگرچه بیشترین غلظت DNA از برگ‌های هرباریومی با روش موری و تامسون تغییریافته به دست آمد، ناحیه ITS در این نمونه تکثیر نشد. محصولات PCR مورد انتظار از ناحیه ITS در سایر نمونه‌های DNA تکثیر شدند. درنتیجه، روش دویل و دویل تغییریافته ساده‌تر با حذف ۲-مرکپتواتانول یا استات آمونیوم برای استخراج DNA از برگ‌های تازه و خشک گیاه گاوزبان مفید است. این تغییر اثر منفی روی مرحله PCR در ادامه کار ندارد.

واژه‌های کلیدی: CTAB، استخراج DNA، گیاه دارویی، گاوزبان ایرانی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳۳۵۲۲۰۲۲۳، پست الکترونیکی: farrokh@du.ac.ir

مقدمه

گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum* Fisch. & C.A. Mey) به خانواده Boraginaceae تعلق دارد و یکی از گیاهانی است که دارای ارزش غذایی و دارویی زیادی می‌باشد (۵). رویشگاه طبیعی آن منطقه محدودی در شمال ایران و قفقاز است و در طب سنتی ایران جایگاه ویژه‌ای دارد (۲۳). گل و برگ گاوزبان نشاط آور است و از سه قرن قبل از میلاد این خصوصیات گیاه گاوزبان شناسایی شده بود (۳،۵). گل، برگ و سرشاخه گلدار گیاه گاوزبان کاربردهای دارویی دارند (۳). گل گاوزبان با ویژگی‌های ضدالتهابی، تسکین دهنده و آرام بخش، برای درمان سرما خوردگی و گلودرد به کار می‌رود (۲۳)، همچنین از آن برای درمان ورم کلیه استفاده می‌شود (۳).

اگرچه ویژگی‌های ریخت شناسی در تاکسونومی سنتی همچنان در شناسایی گونه‌های گیاهی با ارزش و کاربردی

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.1.6 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۳۱-۲۱۶

است، اما استفاده از مارکرهای مولکولی در سال‌های اخیر گسترش یافته و موجب رفع محدودیت‌های تاکسونومی سنتی در شناسایی برخی از گونه‌ها شده است (۲۰، ۲۵). نخستین مرحله برای استفاده از این روش‌های مولکولی، خالص سازی DNA می‌باشد (۹، ۱۵، ۳۲). فراوانی متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند آلکالوئیدها، پلی ساکاریدها و پلی فنل‌ها در گیاهان مشکلاتی را در تهیه DNA باکیفیت ایجاد می‌کند (۱۵، ۱۷، ۱۹) و فراوانی این متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی قابل توجه‌تر از سایر گیاهان است (۱۵، ۳۲).

در مطالعات گیاهی مناسب‌ترین بخش برای استخراج DNA برگ‌های گیاهان هستند که البته میزان متابولیت‌های ثانویه در آن‌ها بالا است (۹، ۱۵). متابولیت‌های برخی گیاهان دارویی در مرحله لیز سلول تداخل ایجاد می‌کنند (۳۲) و برخی موجب اکسیداسیون و تخریب DNA (۹، ۳۲) یا مهار فعالیت آنزیم‌های اندونوکلئاز در هضم آنزیمی یا مهار فعالیت DNA پلیمراز در واکنش PCR می‌گردند (۹، ۱۴، ۳۲). همین مسئله موجب شده که پژوهشگران روش‌های استخراج DNA را برای گیاهان مختلف بهینه سازی کنند. در سال‌های گذشته روش‌هایی برای استخراج DNA از گیاهان دارویی مختلف معرفی شده است (۸، ۱۰، ۳۴، ۳۷). از سوی دیگر توجه برخی از مطالعات هم رسیدن به یک روش موثر ساده و سریع یا کم هزینه برای استخراج DNA از گیاهان بوده که از کیفیت نسبی برخوردار باشد (۱۸، ۲۱، ۲۶، ۲۸). استخراج DNA از نمونه‌های هرباریومی هم در مطالعات گیاهی اهمیت خاصی دارد. به ویژه زمانی که گیاهی نادر باشد و یا رویشگاه آن به راحتی در دسترس نباشد. معمولا جداسازی DNA از نمونه‌های خشک شده نسبت به گیاهان تازه دشوارتر است و با توجه به تفاوت-های ترکیبات شیمیایی گیاهان مختلف و روش خشک کردن گیاه و زمان نگهداری آن‌ها در هرباریوم، نیاز است تا تغییراتی را در روش استخراج برای داشتن DNA با کیفیت و کمیت مناسب ایجاد کرد (۱۳، ۳۱).

مطالعات انجام شده در زمینه استخراج DNA از گیاه گاوزبان محدود است. در یک مطالعه، حسین پور آزاد و همکاران روش STE (ساکارز- تریس- EDTA) را برای استخراج DNA از برگ‌های تازه گیاه گاوزبان بهینه سازی کردند. ولی این روش بسیار پرهزینه است چون به موادی همچون لیتیم کلرید، ساکارز، SDS و PVP نیاز دارد (۱). به دلیل کاربردهای دارویی گیاه گاوزبان، این مطالعه با هدف رسیدن به یک روش کم هزینه‌تر و استفاده از مواد شیمیایی کمتر به مقایسه کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از برگ‌های تازه و هرباریومی این گیاه با روش‌های دویل و دویل، دو روش تغییر یافته دویل و دویل، روش تغییر یافته موری و تامسون و کیت Gene All می‌پردازد. در دو روش تغییر یافته دویل و دویل، اثر حذف ۲-مرکاپتواتانول یا استات آمونیوم بررسی شدند.

مواد و روشها

جمع‌آوری و نگهداری گیاهان: گیاه گاوزبان (*E. amoenum*) در بهار سال ۱۳۹۷ و در مرحله گلدهی از طبیعت استان مازندران (N: 36.3751172, E: 53.2519149) جمع آوری شد. گیاهان تازه جمع آوری شده در کوتاه‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل شدند و با استفاده از کلیدهای شناسایی بر اساس خصوصیات ریخت شناسی، شناسایی آن‌ها انجام شد. برگ‌های جوان و سالم انتخاب شدند و پس از شستشو با آب مقطر، بخشی از آن‌ها به صورت تازه در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد قرار داده شدند و بخش دیگر در دمای اتاق خشک شدند که در هرباریوم دانشگاه دامغان (Amirahmadi 2664; DU 001120) نگهداری می‌شود. در زمان انجام این مطالعه تقریبا یک سال از زمان خشک کردن نمونه‌ها گذشته بود.

استخراج DNA با روش دویل و دویل: روش دویل و دویل یکی از روش‌های قدیمی استخراج DNA است (۱۲). به طور خلاصه، ۰/۲۵ گرم برگ گیاه تازه یا ۰/۱۲۵ گرم برگ گیاه هرباریومی بهمراه ۳ میلی لیتر بافر CTAB (۲٪

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.1.6 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۳۱-۲۱۶

CTAB، ۱/۴ مولار NaCl، ۲۰ میلی مولار EDTA، ۱۰۰ میلی مولار Tris-HCl با pH: ۸) در هاون سابیده شد و ۰/۲ درصد (v/v) ۲-مرکاپتواتانول به آن اضافه گردید. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از این مخلوط همگن به میکروتیوب منتقل شد و ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در حمام خشک قرار داده شد. دو برابر حجم به هر نمونه کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه شد و سپس در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی با دو برابر حجم ایزوپروپانول سرد مخلوط شد و ۳۰ دقیقه در فریزر قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. رسوب DNA حاصل با اتانول ۷۰٪ و استات آمونیم ۱۰ میلی مولار شسته شد و پس از دور ریختن مایع رویی در دمای محیط خشک گردید و در آب مقطر دیونیزه حل شد.

استخراج DNA با روش دویل و دویل بدون ۲-مرکاپتواتانول: این روش استخراج DNA تغییریافته مشابه با روش دویل و دویل بود و تنها ۲-مرکاپتواتانول از آن حذف شد.

استخراج DNA با روش دویل و دویل بدون استات آمونیوم: یک بار هم استات آمونیوم از بافر شستشوی DNA در روش دویل و دویل حذف گردید و استخراج DNA از برگ‌های تازه و هرباریومی گاوزبان انجام شد.

استخراج DNA با روش تغییر یافته موری و تامسون: روش استخراج DNA تغییر یافته موری و تامسون بر اساس روش ریاحی و همکاران انجام گرفت (۲۸). مراحل کار به صورت خلاصه عبارتند از: ۰/۲۵ گرم برگ گیاه تازه یا ۰/۱۲۵ گرم برگ گیاه هرباریومی بهمراه ۱۸۷۵ میکرولیتر بافر CTAB (۲٪ CTAB، ۱/۴ مولار NaCl، ۵۰ میلی مولار EDTA، ۱۰۰ میلی مولار Tris-HCl با pH: ۸) در هاون سابیده شد و ۰/۴ ٪ (v/v) ۲-مرکاپتواتانول به آن اضافه گردید. سپس ۷۵۰ میکرولیتر از مخلوط همگن به میکروتیوب منتقل شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در حمام خشک قرار گرفت. در ادامه، ۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) به هر نمونه اضافه شد و ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و ۰/۳۳ حجم مایع رویی ایزوپروپانول سرد به هر نمونه اضافه گردید و ۶۰ دقیقه در فریزر قرار گرفت. برای رسوب DNA، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و پس از دور ریختن مایع رویی، ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE (Tris-HCl ۱۰ میلی مولار و EDTA ۱ میلی مولار)، ۰/۱ حجم مایع رویی سدیم اگزالواستات ۲/۵ مولار و ۲ برابر حجم آن اتانول ٪۹۵ سرد به هر میکروتیوب اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و رسوب حاصل با اتانول ۷۰٪ شسته شد و با تکرار سانتریفیوژ در شرایط قبلی، رسوب DNA به دست آمده خشک شد و در آب مقطر دیونیزه حل گردید.

استخراج DNA با روش کیت Gene All: استخراج DNA از برگ تازه و هرباریومی گاوزبان با کیت Gene All (کره جنوبی) طبق دستورالعمل کیت انجام شد. به طور خلاصه، در این روش ابتدا از ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز (PL) برای سابیدن برگ‌های تازه (۰/۱ گرم) یا هرباریومی (۰/۰۲۵ گرم) استفاده شد و سپس مخلوط به دست آمده در حدود ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد (حمام خشک) قرار گرفت. در مرحله بعد، به هر نمونه ۱۴۰ میکرولیتر بافر PD (بافر دناتوره کننده) اضافه شد و ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت و محلول رویی به ستون‌های موجود در کیت منتقل شد و ۲ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. به اندازه ۱/۵ برابر حجم محلول زیر ستون، بافر BD (بافر متصل شونده) اضافه شد و مخلوط حاصل به ستون‌های دیگر موجود در کیت انتقال داده شد و ۳۰ ثانیه در ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. DNA متصل شده به ستون، دو مرتبه با محلول شستشو دهنده (CW) شسته شد و در

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.1.6 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۳۱-۲۱۶

نهایت با ۱۰۰ میکرولیتر بافر AE و ۱ دقیقه سانتریفیوژ در ۸۰۰۰ rpm، DNA از ستون جدا و جمع آوری گردید.

بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده: تمام DNAهای استخراج شده تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده نسبت جذب نمونه‌ها در ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و بر اساس جذب نمونه‌های استخراج شده در ۲۶۰ نانومتر، غلظت آن‌ها بر حسب µg/ml محاسبه شد. همچنین، کیفیت DNA استخراج شده با الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی گردید. از همه نمونه‌ها به میزان تقریبا ثابت (۱۵۰ نانوگرم) در چاهک‌های ژل قرار گرفت.

واکنش PCR: بمنظور بررسی کیفیت DNAهای استخراج شده و امکان تکثیر ژن‌ها با PCR، بخشی از ناحیه ITS (ناحیه فاصله انداز رونویسی شونده داخلی) در nrDNA (DNA ریبوزومی هسته‌ای) با پرایمرهای عمومی (جدول ۱) تکثیر گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر قطعه ITS هسته‌ای.

نام پرایمر	توالی ´۳ ⟵ ´۵	منبع
ITS5m (F)	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG	۲۹
ITS4 (R)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	۳۸

ناحیه ITS در برگ‌های گاوزبان تازه که با روش‌های دویل و دویل بدون ۲-مرکاپتواتانول، دویل و دویل بدون استات آمونیوم، روش تغییر یافته موری تامسون و کیت Gene All استخراج شده بودند، با PCR استاندارد تکثیر شدند. به‌علاوه، DNA استخراج شده از برگ گیاه خشک گاوزبان هم در روش کیت Gene All با PCR استاندارد تکثیر شد.

مخلوط واکنش PCR شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس آمپلیکون، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومولار، ۵۰۰ تا ۷۰۰ نانوگرم DNA استخراج شده و آب مقطر استریل تا حجم ۲۰ میکرولیتر بود. دمای اتصال پرایمرها در واکنش PCR استاندارد طبق جدول ۲ بود.

جدول ۲- دمای اتصال پرایمرها در واکنش استاندارد PCR برای ژن ITS.

دمای اتصال پرایمر براساس درجه سانتی گراد	روش استخراج DNA
۵۵	DNA استخراج شده به روش دویل و دویل بدون ۲-مرکاپتواتانول و CTAB بدون استات آمونیوم در گیاه تازه
۵۶	DNA استخراج شده با کیت Gene All در گیاه تازه و هرباریومی
۵۸	DNA استخراج شده به روش تغییریافته موری و تامسون در گیاه تازه

ناحیه ITS در نمونه‌های گاوزبان هرباریومی که DNA آن‌ها با روش‌های دویل و دویل، دویل و دویل بدون ۲-مرکاپتواتانول، دویل و دویل بدون استات آمونیوم استخراج شده بودند و گاوزبان تازه که با روش دویل و دویل استخراج DNA آن انجام شده بود با Touch-down PCR تکثیر شدند. مخلوط مواد واکنش Touch-down PCR مشابه با PCR استاندارد تهیه شد و شرایط دمایی به کار رفته مطابق جدول ۳ بود. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند و باندهای مورد انتظار بررسی شدند.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.1.6 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۳۱-۲۱۶

جدول ۳- شرایط دمایی واکنش Touch-down PCR.

مرحله		دما (درجه سانتی گراد)	زمان
واسرشت شدن اولیه		۹۴	۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه
۱۰ چرخه	واسرشت شدن	۹۴	۵۰ ثانیه
	اتصال پرایمرها	۶۰-۶۹	هر ۳۰ ثانیه، دما یک درجه کاهش می‌یابد
	تکثیر	۷۲	۵۰ ثانیه
۲۵ چرخه	واسرشت شدن	۹۴	۵۰ ثانیه
	اتصال پرایمرها	۵۸	۳۰ ثانیه
	تکثیر	۷۲	۵۰ ثانیه
تکثیر نهایی		۷۲	۷ دقیقه

تحلیل آماری: استخراج DNA و بررسی مربوط به کیفیت و کمیت آن‌ها در همه روش‌ها با سه بار تکرار انجام شد. تحلیل آماری در این مطالعه با نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. با توجه به تعداد کم داده‌ها، برای مقایسه داده‌های پنج روش استخراج DNA در گیاه گاوزبان تازه و هرباریومی از آزمون ناپارامتری کراسکال- والیس استفاده شد و برای مقایسه داده‌های دو نمونه تازه و هرباریومی در هر روش استخراج DNA از آزمون ناپارامتری من-ویتنی استفاده گردید.

نتایج

کیفیت و کمیت DNAهای استخراج شده: نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر و همچنین غلظت DNAهای استخراج شده از گیاه گاوزبان در جدول ۴ دیده می‌شود. تفاوت‌هایی بین غلظت DNA جداسازی شده در میان گیاه تازه و خشک گاوزبان در هر روش دیده شد که در روش-های دویل و دویل بدون استات آمونیوم و موری تامسون تغییر یافته، غلظت DNA استخراج شده از برگ خشک به طور معناداری بیشتر از برگ تازه بود (p-value < ۰/۰۵). با اینکه بیشترین غلظت DNA در میان ۵ روش به کار برده شد برای گیاه تازه، در روش موری و تامسون دیده شد (۱۰۵/۰۰±۳۱/۰۰ µg/ml)، نتایج غلظت DNA در میان ۵ روش در گیاه تازه اختلاف معناداری نداشتند (p-value > ۰/۰۵). تحلیل آماری غلظت DNA در میان ۵ روش در گیاه هرباریومی اختلاف معنا داری را نشان داد (p-value < ۰/۰۵) و DNA استخراج شده با روش‌های موری و تامسون و کیت تجاری Gene All بترتیب با µg/ml ۳۱۸/۰۰±۵۷/۶۶ و ۳۹/۵۰±۱/۵۰ بیشترین و کمترین مقادیر بودند.

نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر، نشان دهنده کیفیت DNA استخراج شده می‌باشند. نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر اگر ۱/۸ تا ۲ باشد یعنی DNA خلوص خوبی دارد و فاقد پروتئین و فنل‌ها است. نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر هم نشان دهنده باقیمانده نمک‌ها و آلودگی پلی ساکاریدی در DNA است و بهتر است از ۱/۵ بیشتر و به ۱/۸ نزدیکتر باشد (۷، ۸).

نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر به دست آمده در این مطالعه بین ۱/۷۱ -۰/۶۳ بود که اختلاف معناداری بین روش‌های مختلف استخراج DNA در گیاهان تازه و هرباریومی و همچنین بین گیاه تازه و خشک در هر روش استخراج وجود نداشت (p-value > ۰/۰۵). نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر هم بین ۱/۵۰- ۰/۲۵ بود که اختلاف معناداری میان ۵ روش به کار رفته در میان گیاهان خشک و همچنین میان ۵ روش به کار رفته در میان گیاهان تازه

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۳۱-۲۱۶ DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.1.6

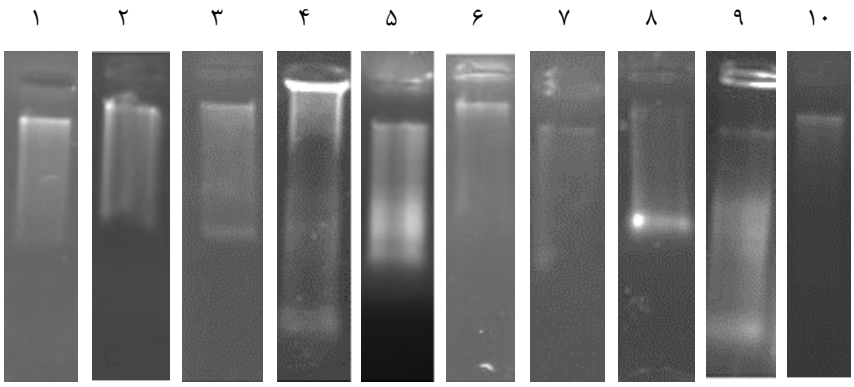
دیده شد (p-value < ۰/۰۵). DNA استخراج شده با روش دویل و دویل بدون استات آمونیوم هم در گیاه گاوزبان تازه و هم هرباریومی از نظر نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر قابل قبول‌تر بود و آلودگی کمتری را نشان داد (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه کیفیت و کمیت DNAهای استخراج شده از گیاه گاوزبان با ۵ روش مختلف.

روش‌های استخراج DNA در گیاه گاوزبان	نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰	نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰	غلظت DNA (µg/ml)
برگ تازه با روش دویل و دویل	۱/۷۱±۱/۱۰	۰/۹۲±۰/۱۴	۲۹/۵۰±۷/۵۰
برگ هرباریومی با روش دویل و دویل	۱/۲۸±۰/۰۷	۰/۸۸±۰/۰۲	۱۰۰/۰۰±۱۵/۵۵
برگ تازه با روش دویل و دویل بدون ۲-مرکاپتواتانول	۱/۶۴±۰/۱۰	۱/۱۰±۰/۰۰	۸۱/۵۰±۰/۷۰
برگ هرباریومی با روش دویل و دویل بدون ۲-مرکاپتواتانول	۱/۴۵±۰/۰۹	۱/۰۲±۰/۱۰	۷۷/۶۶±۲۲/۵۰
برگ تازه با روش دویل و دویل بدون استات آمونیوم	۱/۵۶±۰/۰۹	۱/۵۰±۰/۲۲	۵۹/۳۳±۲۸/۹۱
برگ هرباریومی با روش دویل و دویل بدون استات آمونیوم	۱/۳۹±۰/۰۴	۱/۰۴±۰/۰۱	۱۳۶/۰۰±۲۳/۰۶
برگ تازه با روش تغیریافته موری و تامسون	۰/۶۳±۰/۱۴	۰/۲۵±۰/۰۴	۱۰۵/۰۰±۳۱/۰۰
برگ هرباریومی با روش تغییر یافته موری و تامسون	۱/۳۲±۰/۰۶	۰/۸۴±۰/۰۷	۳۱۸/۰۰±۵۷/۶۶
برگ تازه با روش کیت Gene All	۱/۴۵±۰/۰۹	۰/۸۷±۰/۳۳	۸۴/۰۰±۲۴/۰۴
برگ هرباریومی با روش کیت Gene All	۱/۳۷±۰/۴۴	۰/۹۱±۰/۳۷	۳۹/۵۰±۱/۵۰

نتایج از تکرار سه بار آزمایش به دست آمده و به صورت انحراف معیار ± میانگین گزارش شده است.

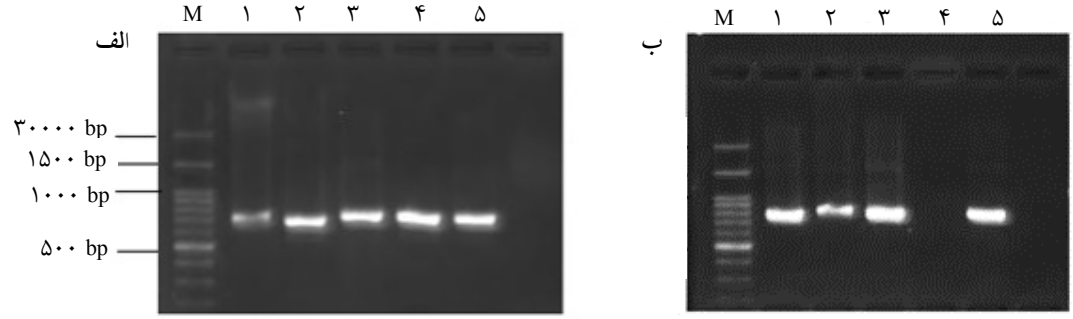
وضعیت DNA استخراج شده گیاه تازه گاوزبان پس از الکتروفورز در ژل آگارز با سه روش دویل و دویل تقریبا مشابه بود و بهتر از روش‌های دیگر به نظر می‌رسید. در گیاه خشک گاوزبان هم DNA استخراج شده با روش‌های دویل و دویل، دویل و دویل بدون ۲-مرکاپتو اتانول و کیت Gene All، ظاهر مشابهی داشتند و مناسب‌تر از سایر روش‌ها بودند. در بیشتر DNAهای استخراج شده اسمیر دیده شد که نشانه تخریب شدن DNA است (شکل ۱).



شکل ۱- الکتروفورز DNA استخراج شده از گیاه تازه و هرباریومی گاوزبان. شماره‌های ۱ تا ۵ و ۶ تا ۱۰ نشان دهنده DNAهای استخراج شده از گیاه تازه و هرباریومی هستند که بترتیب با روش‌های دویل و دویل، دویل و دویل بدون ۲-مرکاپتواتانول، دویل و دویل بدون استات آمونیوم، تغیریافته موری و تامسون و کیت Gene All جداسازی شده‌اند.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.1.6 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۳۱-۲۱۶

نتایج واکنش PCR: باندی با اندازه مورد انتظار ۷۰۰ bp روی ژل آگارز در تمام DNAهای استخراج شده از گیاه تازه گاوزبان، دیده شد (شکل ۲). از میان DNAهای استخراج شده از گیاه گاوزبان هرباریومی، تنها در نمونه به دست آمده از روش تغییر یافته موری و تامسون محصول PCR حتی با تغییر شرایط به دست نیامد (شکل ۲).



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR قطعه ITS در DNA در الف) گیاه تازه و ب) گیاه هرباریومی گاوزبان. شماره‌های ۱ تا ۵ در هر ژل بترتیب مربوط به استخراج DNA با روش‌های دویل و دویل، دویل و دویل بدون ۲- مرکاپتواتانول، دویل و دویل بدون استات آمونیوم، موری و تامسون تغییر یافته و کیت Gene All است. نشانگر وزن مولکولی DNA (SMOBIO, DM2300) است.

بحث

استخراج DNA مرحله‌ای اساسی در مطالعات ژنتیک گیاهی است، ولی همیشه جداسازی DNA با کیفیت و کمیت مناسب از گیاهان با دشواری‌هایی همراه بوده است (۷، ۱۷). گیاهان دارویی سال‌ها است که در جوامع مختلف جهان برای درمان برخی بیماری‌ها استفاده می‌شوند (۲۴) و استخراج DNA از آن‌ها به واسطه وجود متابولیت‌های ثانویه بیشتر، سخت‌تر است (۳۲). با توجه به کاربردهای گیاه گاوزبان، در این مطالعه پنج روش استخراج DNA ژنومی برای رسیدن به یک شیوه مناسب و کم هزینه‌تر از برگ این گیاه با یکدیگر مقایسه شدند.

روش موری و تامسون و روش دویل و دویل از قدیمی‌ترین روش‌های استخراج DNA در گیاهان هستند (۱۲، ۲۲) که پژوهشگران بسیاری بسته به نوع گیاه، تغییراتی در آن‌ها ایجاد کرده‌اند. برای نمونه، Sumitha و همکاران از روش تغییر یافته موری و تامسون با ۵٪ CTAB، ۵ مولار NaCl و ۱٪ پلی وینیل پیرولیدون (PVP) برای استخراج DNA از برگ‌های گیاه *Geophila repens* L. استفاده کردند (۳۵). همچنین ریاحی و همکاران، روش دویل و دویل را بهمراه ۲٪ PVP در بافر استخراج برای چند گونه گیاهی زیرخانواده Papilionideae به کار بردند (۲۸). در مطالعه دیگری، Sari و همکاران چند روش تغییریافته دویل و دویل را که شامل تغییر میزان CTAB، NaCl و ۲- مرکاپتواتانول بود برای استخراج DNA از برگ گیاه *Sapodilla* استفاده کردند (۳۰). از روش دویل و دویل برای استخراج DNA در توتون (*Nicotiana rustica* L.) و کهور پاکستانی (*Prosopis juliflora*) هم استفاده شده است (۲، ۴).

در ارتباط با گیاه گاوزبان، حسین پور آزاد و همکاران با روش استخراج STE به طور میانگین ۸۴۵ µg/ml DNA به ازای ۰/۵ گرم برگ تازه و جوان به دست آوردند (۱). اگرچه این عدد از میانگین غلظت‌های DNA به دست آمده در این مطالعه بیشتر است، اما این پژوهشگران روش استخراج STE را برای برگ خشک گاوزبان استفاده نکردند و همچنین نیاز به مواد شیمیایی بیشتر در این روش (مانند

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.1.6 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۳۱-۲۱۶

لیتیم کلرید، SDS، PVP و ساکارز) امکان استفاده از آن را محدودتر می‌سازد.

در مطالعه حاضر، با هدف رسیدن به یک روش استخراج DNA از گیاه تازه و هرباریومی گاوزبان با هزینه و مواد کمتر، یک بار ۲-مرکاپتواتانول و یک بار استات آمونیوم از روش دویل و دویل حذف شدند. استات آمونیوم بهمراه اتانول در شستشوی رسوب DNA برای حذف بهتر نمک‌ها عمل می‌کنند (۶). ۲-مرکاپتواتانول یک ترکیب احیا کننده باندهای دی سولفیدی است و موجب دناتوره شدن پروتئین‌ها می‌شود و علاوه بر این در حذف تانن‌ها و پلی فنل‌ها هم موثر است (۱۶). نتایج به دست آمده و تحلیل آماری نشان داد که حذف ۲-مرکاپتواتانول یا استات آمونیوم از روش استخراج دویل و دویل در برابر روش اصلی، تاثیر معناداری در غلظت و یا کیفیت (بر اساس نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر) DNAهای حاصل از گیاه تازه و هرباریومی ایجاد نکرد (p-value ۰/۰۵ <). با وجود اینکه نسبت‌های جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ در بیشتر روش‌های استخراج به کار برده شده برای گیاه گاوزبان، بترتیب نشان دهنده آلودگی‌های پروتئینی/پلی فنلی و پلی ساکاریدی/نمکی بودند، اما تکثیر ناحیه ITS از DNAهای استخراج شده با روش‌های دویل و دویل در گیاه تازه و خشک گاوزبان با موفقیت انجام شد که مشخص می‌کند، ترکیبات مهارکننده PCR در حدی نبودند که مانع از تکثیر این ناحیه ژنومی شوند. بنابراین می‌توان در مورد گیاه گاوزبان تازه و هرباریومی بر اساس دسترسی به مواد آزمایشگاهی از استات آمونیوم یا ۲-مرکاپتواتانول در روش دویل و دویل استفاده نکرد.

اگرچه غلظت DNA استخراج شده از گیاه خشک گاوزبان با روش تغییر یافته موری و تامسون، به صورت معناداری (p-value < ۰/۰۵) از دیگر DNAهای استخراج شده از گیاه هرباریومی بیشتر بود، اما این DNA کیفیت مناسبی برای PCR نداشت و حتی با تغییر شرایط واکنش PCR هم از این DNA محصول ناحیه ITS تکثیر نشد. نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر در DNA به دست آمده از گیاه خشک گاوزبان با روش تغییر یافته موری و تامسون از دیگر DNAهای استخراج شده از گیاه خشک کمتر بود و آلودگی پلی ساکاریدی/نمکی بیشتری را نشان داد، ولی در عین حال این کاهش در حدی نبود که تفاوت معناداری (۰/۰۵ > p-value) بین آن با DNA به دست آمده از گیاه خشک با روش دویل و دویل وجود داشته باشد. نکته‌ای که باید به آن توجه شود این است که عوامل مختلفی در میزان جذب در ۲۶۰ نانومتر و در نهایت در غلظت و کیفیت DNA تاثیر می‌گذارند. برای نمونه، نسبت DNA تک رشته و دو رشته موجود در محلول و حضور ترکیباتی مانند RNA و نوکلئوتیدهای آزاد بر جذب ۲۶۰ نانومتر اثرگذار هستند (۱۱). بنابراین، نسبت‌های ۲۶۰/۲۳۰ و ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر که با روش اسپکتروفتومتری به دست می‌آیند و همچنین غلظت DNA محاسبه شده بر این اساس نمی‌توانند بیان کننده دقیق کیفیت و کمیت DNA باشند. از آنجایی که متابولیت‌های ثانویه گیاه در روند استخراج DNA آزاد می‌شوند و روی واکنش PCR تاثیر می‌گذارند، تکثیر یک ژن با PCR می‌تواند نشان دهنده کیفیت DNA باشد (۳۶). علت عدم تکثیر ناحیه ITS در یک شرایط دمایی ثابت در واکنش PCR در این مطالعه می‌تواند به تفاوت در کیفیت DNAهای به دست آمده با روش‌های استخراج مختلف مربوط باشد. زیرا مهارکننده‌های موجود در DNA می‌توانند بر اتصال پرایمرها به الگوی DNA در واکنش PCR تاثیر بگذارند (۲۷، ۳۳).

با در نظر گرفتن این موضوع که کیت‌های تجاری همواره در دسترس نیستند و استفاده از آن‌ها هزینه بالایی دارد و علاوه بر این یک کیت استخراج DNA ممکن است برای همه گونه‌های گیاهی نتیجه قابل قبولی نداشته باشد، پیدا کردن روش‌های استخراج ساده و کم هزینه‌تر برای گیاهان پرکاربرد، ضروری است. به طور کلی، مجموع آزمایش‌های کیفی و کمی این پژوهش نشان می‌دهد که از میان روش-

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.1.6 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۳۱-۲۱۶

های غیرتجاری استخراج DNA به کار رفته در این مطالعه، روش دویل و دویل بدون ۲-مرکاپتواتانول یا بدون استات آمونیوم می‌تواند جایگزین خوبی برای روش استخراج کلاسیک دویل و دویل برای برگ تازه و خشک گیاه گاوزبان باشد. می‌توان امکان استفاده از این روش استخراج DNA را برای نمونه‌های هرباریومی قدیمی گاوزبان هم در مطالعات آینده بررسی کرد.

سپاسگزاری

از حمایت مالی دانشگاه دامغان برای انجام این کار پژوهشی تشکر می‌شود.

منابع

۱- حسین پور آزاد، ن.، نعمت زاده، ق.، ۱۳۹۱، معرفی روش سریع و ساده‌ی استخراج دی ان ای در گل گلوزبان ایرانی (*Echium amoenum* Fisch. & Mey)، فصلنامه علمی-پژوهشی گیاه و زیست بوم، ۳۱، صفحات ۱۱۱-۱۲۰.

۲- طغیانی، م. ا.، احسان پور، ع. ا.، شریعتی، م.، امام زاده، ر.، ۱۳۹۵، مطالعه تغییرات هورمون‌های اکسین و سیتوکینین و تغییرات سوماکلونال در گیاهان باززایی شده و کالوس توتون (*Nicotiana rustica* L.)، مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست شناسی ایران)، ۲۹، صفحات ۳۸۵-۳۹۴.

۳- نادری حاجی باقرکندی، م.، باقر رضایی، م.، ۱۳۸۳، بررسی فیتوشیمیایی گل گاوزبان *Echium amoenum*، فصلنامه پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۰، صفحات ۳۷۷-۳۸۳.

۴- نصیری، س.، یوسفی، م.، حائری نسب، م.، ۱۴۰۰، بررسی تنوع ژنتیکی کهور پاکستانی (*Prosopis juliflora*) در استان خوزستان به روش CDDP، مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست شناسی ایران)، ۳۴، صفحات ۱۸۲-۱۹۴ .

۵- نقدی بادی، ح.، سروش زاده، ع.، رضازاده، ش.، شریفی، م.، قلاوند، ا.، امیدی، ح.، ۱۳۸۶. مروری بر گیاه گاوزبان (گیاه دارویی با ارزش و غنی از گامالینولنیک اسید)، فصلنامه گیاهان دارویی، ۲۴، صفحات ۱-۱۴.

6. Abdullah, F. I., Chua, L. S., Rahmat, Z., Samad, A. A., and Wagiran, A., 2016. Plant Genomic DNA Extraction for Selected Herbs and Sequencing their Internal Transcribed Spacer Regions Amplified by Specific Primers. Natural Product Communications, 11(10), PP: 1491-1496.

7. Aboul-Maaty, N. A. F., and Oraby, H. A. S., 2019. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. Bulletin of the National Research Centre, 43, PP: 25-34.

8. Abu-Romman, S., 2011. Comparison of methods for isolating high quality DNA from saga (*Salvia officinalis*). Journal of Medicinal Plants Research, 5(6), PP: 938-941.

9. Arruda, S. R., Pereira, D. G., Silva-Castro, M. M., Brito, M. G., and Waldschmidt, A. M., 2017. An optimized protocol for DNA extraction in plants with a high content of secondary metabolites, based on leaves of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Leguminosae). Genetics and Molecular Research, 16(3), PP: gmr16039063.

10. Biswas, N., and Verma, S. K., 2020. A novel nucleic acid extraction method from aromatic herbs and dried herbal powders using cow skim milk. Scientific Reports, 10(1), PP: 11513.

11. Demeke, T., and Jenkins, G. R., 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 396, PP: 1977-1990.

12. Doyle, J. J., and Doyle, J. L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin, 19(1), PP: 11-15.

13. Drábková, L. Z., 2014. DNA Extraction from Herbarium Specimens. Methods in Molecular Biology, 1115, PP: 69-84.

14. Friar, E. A., 2005. Isolation of DNA from Plants with Large Amounts of Secondary Metabolites. Methods in Enzymology, 395, PP: 3-14.

15. Ghadia, B., Singh, A. K., Khatnani, T., Hirpara, M., Patel, S., Joshi, P., 2016. An improved method of DNA purification from secondary metabolites rich medicinal plants using certain chaotropic agents. Acta Physiol Plant, 38(8), PP: 207.

16. Heikrujam, J., Kishor, R., and Mazumder, P. B., 2020. The Chemistry Behind Plant DNA

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.1.6 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۳۱-۲۱۶

Isolation Protocols. Biochemical Analysis Tools - Methods for Bio-Molecules Studies, PP: 1-12.

17. Hosseinpour Azad, N., and Nematadeh, G. H., 2013. Introducing a new method of genomic DNA extraction in dicotyledonous plants. Scholarly Journal of Agricultural Science, 2(6), PP: 242-248.

18. Hu, Y., Xie, X., Wang, L., Yang, J., Zhang, H., and Li, Y., 2009. An effective and low-cost method for DNA extraction from herbal drugs of *Rheum tanguticum* (polygonaceae). African Journal of Biotechnology, 8(12), PP: 2691-2694.

19. Li, H., Li, J., Cong, X. H., Duan, Y. B., Li, L., Wei, P. C., Lu, X. Z., and Yang, J. B., 2013. A high-throughput, high-quality plant genomic DNA extraction protocol. Genetics and Molecular Research, 12(4), PP: 4526-4539.

20. Manoko, M. L. K., 2018. The power of coefficients and methods of coding in delimiting species using phenetic approach: the case of African *Solanum* section *Solanum sensu* Edmonds. Tanzania Journal of Science, 44(1), PP: 37-51.

21. Mogg, R. J., and Bond, J. M., 2003. A cheap, reliable and rapid method of extracting high-quality DNA from plants. Molecular Ecology Notes, 3, PP: 666-668.

22. Murray, M. G., and Thompson, W. F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8(19), PP: 4321-4325.

23. Nadi, F., 2017. Bioactive compound retention in *Echium amoenum* Fisch. & C. A. Mey. petals: Effect of fluidized bed drying conditions. International Journal of Food Properties, 20(10), PP: 2249-2260.

24. Palhares, R. M. P., Drummond, M. G., Brasil, B. S. A. F., Cosenza, G. P., Brandão, M. G. L., and Oliveira, G., 2015. Medicinal Plants Recommended by the World Health Organization: DNA Barcode Identification Associated with Chemical Analyses Guarantees Their Quality. PLOS ONE, 10(5), PP: e0127866.

25. Pires, A. C., and Marinoni, L., 2010. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through integrative taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. Biota Neotropica, 10(2), PP: 339-346.

26. Pookhamsak, P., Pornbungkerd, P., and tantasawat, P. A., 2019. Simple, rapid and cost-effective DNA extraction method for high quality DNA suitable for PCR based downstream application in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 346, PP: 1-9.

27. Reiss, R. A., and Rutz, B., 1999, Quality control PCR: a method for inhibitors of Taq DNA polymerase. BioTechniques, 27, PP: 920-926.

28. Riahi, M., Zarre, S., Maassoumi, A. A., Attar, F., and Kazempour Osaloo, S., 2010. An inexpensive and rapid method for extracting papilionoid genomic DNA from herbarium specimens. Genetics and Molecular Research, 9(3), PP: 1334-1342.

29. Sang, T., Crawford, D. J., and Stuessy, T., 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92, PP: 6813-6817.

30. Sari, V. K., and Murti, R. H., 2015. An Effective Method for DNA Extraction of Mature Leaf of Sapodilla (*Manikara zapota* (L.) van Royen). Agrivita, 37(1), PP: 18-23.

31. Sarrazola, H. J., and Alzate, F. A., 2019. Obtaining DNA from *Urticaceae*: overcoming the challenges associated with chemical compounds and herbarium specimens. International Journal of Molecular Biology, 4(5), PP: 158-165.

32. Schmiderer, C., Lukas, B., and Novak, J., 2013. Effect of different DNA extraction methods and DNA dilutions on the amplification success in the PCR of different medicinal and aromatic plants. Journal of Medicinal and Spice Plants, 18(2), PP: 65-72.

33. Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., and Johne, R., 2012. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. Journal of Applied Microbiology, 113(5), PP: 1014-1026.

34. Sharma, P., Joshi, N., and Sharma, A., 2010. Isolation of genomic DNA from medicinal plants without liquid nitrogen. Indian Journal of Experimental Biology, 48, PP: 610-614.

35. Sumitha, V. R., Gangaprasad, A., and Nair, G. M., 2015. Molecular characterization and Assessment of Genetic Similarity among the Accessions of *Geophila repens* L. Using RAPD Markers. Journal of Advances in Biological Science, 2(1), PP: 1-6.

36. Susilowati, A., Rachmat, H. H., Rangkuti, A. B., Elfiati, D., and Ambarwati, A., 2019. Optimizing Genomic DNA Isolation and PCR Amplification

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.1.6 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۳۱-۲۱۶

for Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*). KnE Engineering, 1(2), PP: 30-39.

37. Vural, H. C., 2009. Genomic DNA isolation from aromatic and medicinal plants growing in Turkey. Scientific Research and Essay, 4(2), PP: 59-64.

38. White, T. J., Bruns, T., and Taylor, J., 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual, PP: 315- 322.

Comparison of Five Genomic DNA Extraction Methods in Iranian Medicinal Plant, *Echium amoenum*

Alidoosty shahraky Z.[1], Parisa Farrokh[1,2], Atefe Amirahmadi[1,2], Arezou Rezaei[1,2], Javad Ghasemian[3]

[1] School of Biology, Damghan University, Damghan, I.R. of Iran.

[2] Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, I.R. of Iran.

[3] School of mathematics and computer sciences, Damghan University, Damghan, I.R. of Iran.

Abstract

DNA-based techniques are more interesting for the taxonomic study of medicinal plants than the classical methods. DNA isolation from medicinal plants due to the higher secondary metabolites is faced with some difficulties. In this study, five protocols, including the original Doyle and Doyle method, two modified Doyle and Doyle methods in which 2-mercaptoethanol or ammonium acetate were removed, modified Murray and Thompson method, and Gene All kit were assayed to select an appropriate method for the DNA extraction of fresh and herbarium leaves of *Echium amoenum* Fisch. & C.A. Mey. The quality and quantity of the DNA were examined by gel electrophoresis and spectrophotometric analysis. The applicability of the purified DNA was checked by the PCR of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequence. Compared to the original Doyle and Doyle method, the elimination of 2-mercaptoethanol or ammonium acetate had no significant effects (p-value > 0.05) on the quantity and quality of the extracted DNA from fresh and herbarium *E. amoenum*. Although the highest DNA concentration was obtained by the modified Murray and Thompson method from herbarium leaves, the ITS region was not amplified in this sample. The expected PCR products of the ITS region were amplified from the other DNA samples. In conclusion, the easier modified Doyle and Doyle method by eliminating 2-mercaptoethanol or ammonium acetate is beneficial for DNA extraction from both fresh and herbarium leaves of *E. amoenum*. This modification does not negatively effect on the following PCR step.

Keywords: CTAB**,** DNA extraction, Medicinal plant, *Echium amoenum*.