Iranian Journal Of Biological Science. 2024; 19(3):11-18

Original Article
Iranian Journal of Biological Sciences
https://zisti.iauvaramin.ac.ir

Assessment of Various Techniques for Extracting Genomic DNA from Herbarium Specimens of *Myosotis*

Zahra Ghasemzadeh[1], Maryam Khoshsokhn-Mozaffar[2*]

[1]Ms of Biology, Qo.C. Islamic Azad University, Qom, Iran
[2]Associate Prof. Department of Biology, Qo.C. Islamic Azad University, Qom, Iran

Place of Research: Laboratory of Qom Branch of Islamic Azad University

Article Info

Article History:

Recived 2025.03.23
Revised 2025.04.12
Accepted 2025.05.03

KeyWords:

DNA Extraction
CTAB
Myosotis
Dellaporta
Secondary Metabolites

*Corresponding author:
E-mail address:

b.behboodian@mshdiau.ac.ir

Abstract

Introduction: DNA extraction is a crucial technique in molecular biology. However, extracting DNA from various plants can be challenging due to the presence of secondary metabolites. This study aims to discover an effective method for extracting DNA from *Myosotis* species, part of the borage family.

Materials and Methods: Three extraction methods were employed on five *Myosotis* species: unmodified CTAB, modified CTAB, and Dellaporta.

Results: The findings revealed that using unmodified CTAB resulted in a weak band only for *M. stricta* (collection 2007). In contrast, the modified CTAB method produced strong bands for *M. stricta* (collections 2007 and 2012) and *M. asiatica* (collection 2004), while *M. sparsiflora* (collection 1980) and *M. sylvatica* (collection 1988) yielded weaker bands. The Dellaporta method showed a band for *M. asiatica* (collection 2004).

Conclusion: The modifications in the CTAB method, which included increasing the concentration of 60% mercaptoethanol (to prevent polyphenol oxidation) and adding ammonium acetate (for improved separation of histones from nucleic acids), resulted in better DNA concentration. Given the potential for DNA degradation in older samples, the modified CTAB method provided superior quality and quantity of extracted DNA.

Cite this article: Ghasemzadeh Z, Khoshsokhn-Mozaffar M, Assessment of Various Techniques for Extracting Genomic DNA from Herbarium Specimens of *Myosotis*. Iranian Journal of Biological Sciences. 2024; 19 (3): 11-18

doi .....

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch Print ISSN: 1735-4226 Online ISSN: 1727-459X
This is an open access article under the: https://creativecommons.org/license/by-nc/4.0/

مقاله تحقیقی
دانش زیستی ایران
https://zisti.iaubaramin.ac.ir

ارزیابی روش‌های مختلف استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های هرباریومی گیاه *Myosotis*

زهرا قاسم زاده[۱]، مریم خوش سخن مظفر[۲*]

[۱] دانش آموخته زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
[۲] دانشیار زیست شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

محل انجام تحقیق:آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۴/۰۱/۰۳
بازنگری ۱۴۰۴/۰۱/۲۳
پذیرش ۱۴۰۴/۰۲/۱۳

کلمات کلیدی

استخراج DNA
CTAB
میوزوتیس
دلاپورتا
ترکیبات ثانویه

* مسئول مکاتبات:

ma.km1357@iau.ac.ir

چکیده

مقدمه: استخراج DNA بعنوان ابزاری در روش های مولکولی بسیار دارای اهمیت است. این استخراج از بسیاری گیاهان به دلیل دارا بودن متابولیت های ثانویه آسان نیست. هدف در این مطالعه، یافتن راهی برای استخراج بهینه DNA از گیاه *Myosotis* از خانواده گاوزبان می باشد.

مواد و روش: در این مطالعه جهت استخراج DNA از ۵ گونه گیاه *Myosotis* از سه روش CTAB بدون تغییرات، CTAB با تغییرات و دلاپورتا استفاده شد

نتایج: نتایج نشان داد در روش CTAB بدون تغییرات تنها در گونه *M. stricta* (جمع آوری۲۰۰۷) باند مشاهده شد. در روش CTAB تغییر یافته گونه های *M. stricta* (جمع آوری۲۰۰۷)، *M. stricta* (جمع آوری۲۰۱۲)، *M. asiatica* (جمع آوری۲۰۰٤) باندهای قوی و گونه های *M. sparsiflora*(جمع آوری۱۹۸۰) و *M. sylvatica* (جمع آوری ۱۹۸۸) باند ضعیف-تر ایجاد کرد و در روش دلاپورتا در گونه *M. asiatica* (جمع آوری۲۰۰٤) باند مشاهده گردید.

بحث: در روش CTAB با تغییرات به دلیل افزایش حجم ٦۰ مرکاپتواتانول (جلوگیری از اکسید شدن پلی فنلها) و استفاده از استات آمونیوم (جدا کردن بهتر هیستونها از اسیدنوکلییک)+ استراحت (فرصت بیشتر برای انجام واکنش ها)، میزان غلظت DNA بهتری حاصل می شود. با توجه به احتمال تخریب DNA در نمونه های قدیمی، DNA استخراجی با کیفیت و کمیت بهتر فقط با روش CTAB با تغییرات حاصل گردید.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله : ز قاسم زاده، م خوش سخن مظفر. ارزیابی روش‌های مختلف استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های هرباریومی گیاه *Myosotis*. مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۳؛۱۹ (۳): ۱۱-۱۸

doi .....

ناشر: دانشگاه آزاد اسامی واحد ورامین - پیشوا شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲٦ شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷ - ٤٥۹ X

نویسندگان: حق مؤلف©

مقدمه

امروزه با پیشرفت‌های علم بیوتکنولوژی، نشانگرهای مولکولی متعددی برای بررسی روابط فیلوژنتیکی، تهیه نقشه‌های ژنتیکی گیاهان و همچنین حذف نمونه‌های تکراری در بانک‌های ژن بکار گرفته می‌شوند. این روش‌ها نیازمند استخراج DNA با کیفیت و خلوص بالا هستند تا نتایج قابل اعتماد حاصل شود. در فرآیند استخراج DNA، سه عامل اصلی باید در نظر گرفته شود: کیفیت DNA، سرعت عملیات و مقدار استخراج شده. روش‌های متنوعی برای استخراج DNA از گیاهان وجود دارند، که در اغلب موارد روش‌های مرسوم مانند روش دویل و دویل (۱) به عنوان روش استاندارد مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش، مراحل ساده و کارآمدی برای استخراج DNA ارائه شده است، اما در گیاهان حاوی ترکیبات فنلی فراوان یا کلروفیل و ناخالصی‌های زیاد، ممکن است نیاز به اصلاحات یا روش‌های دیگر باشد از جمله روش‌های دیگر می‌توان به روش دلاپورتا (۲)، یانگ و کانگ (۳) و خانوجا (٤) اشاره کرد. هر یک از این روش‌ها مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند و در نمونه‌های خشک، قدیمی یا حاوی ترکیبات ثانویه زیاد، ممکن است کارایی کمتری داشته باشند. بنابراین، بهینه‌سازی روش‌های استخراج برای هر نوع گیاه اهمیت فراوانی دارد.

در این راستا، گیاه *Myosotis*، که به خانواده Boraginaceae تعلق دارد، موضوع تحقیق حاضر است. این گیاه علفی، یک‌ساله یا چندساله، دارای متابولیت‌های ثانویه فراوان است که نقش مهمی در داروشناسی، طب سنتی و تحقیقات زیستی دارد، ضمن اینکه به دلیل فصلی بودن رویش و محدود بودن نمونه‌های تازه، نیاز به روش‌های بهینه استخراج DNA از نمونه‌های خشک یا قدیمی بیشتر احساس می‌شود (۵)

Myosotis در اکثر مناطق جهانی شناخته شده و از لحاظ زیستی اهمیت زیادی دارد؛ زیرا در مطالعه روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌های مختلف، نقش مهمی ایفا می‌کند. کاربردهای علمی و زیستی این گیاه، از جمله مطالعه تنوع ژنتیکی، توسعه داروهای گیاهی، و بررسی حفاظت از تنوع زیستی، اهمیت این پژوهش را دو چندان می‌کند. گیاه *Myosotis* دارای متابولیت‌های ثانویه، پروتئین، کربوهیدرات، فنول و ترکیبات مزاحم دیگری است که مانع استخراج موثر DNA و همچنین کاهش کیفیت و کمیت آن در مراحل بعدی مانند واکنش PCR می‌شوند. وجود این مواد اغلب مشکلاتی در فرآیند استخراج و DNA purification ایجاد می‌کند و نیازمند روش‌های خاص برای حذف یا کاهش اثر آنها است مطالعات متعددی در داخل و خارج کشور بر روی بهبود فرآیند استخراج DNA گیاهی انجام شده است. برای نمونه، Alidoosti-Shahraki و همکاران (۲۰۲۳) روش دویل و دویل تغییریافته، با حذف مواد مزاحم مانند مرکپتواتانول و استات آمونیوم، را برای گیاه گاوزبان ایرانی مقایسه و پیشنهاد کردند (٦). FatemiFard و همکاران (۲۰۱۹) روشی سریع، ایمن و بدون نیاز به نیتروژن مایع ارائه دادند که توانست DNA با کیفیت و کمیت بالا تولید کند (۷).همچنین، Sabora و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که استفاده از کیت‌های تجاری، خصوصاً برای نمونه‌های تازه، نتایج بهتری در کاهش آلودگی‌ها و افزایش میزان DNA دارد. در نمونه‌های خشک و هرباریومی، به دلیل کاهش سطح DNA یا تحلیل رفتن آن، استخراج سخت‌تر است، ولی با اصلاحات در روش‌های کلاسیک، می‌توان نتایج قابل قبولی بدست آورد (۸). برخی پژوهش‌ها، مانند مطالعه Zabeti و همکاران (۲۰۱٤)، بر روی گیاه آویشن نشان دادند که روش‌های متفاوتی مانند Kang، Dellaporta، Doyle و Yang و Khanuja، جواب‌های متفاوتی در استخراج DNA داده‌اند و نتیجه‌گیری کرده‌اند که روش‌های اصلاح شده، در برخی موارد، بهتر عمل می‌کنند (۹). همچنین، تحقیقات دیگر نشان داده است که نمونه‌های گیاهی خشک یا قدیمی نسبت به نمونه‌های تازه، به دلیل تخریب مولکول‌های DNA، فرآیند استخراج دشوارتری دارند ولی با تکنیک‌های بهینه می‌توان DNA قابل استفاده و با کیفیت برای آزمایش‌های مولکولی تولید کرد. به طور کلی، هدف این مطالعه، بررسی و بهینه‌سازی روش‌های استخراج DNA از نمونه‌های گیاهی خشک و هرباریومی *Myosotis* است تا بتوان تنوع گونه‌ها را با بهترین کیفیت و کمیت ممکن استخراج کرد و در نتیجه، امکان انجام آزمایش‌های مولکولی دقیق‌تر فراهم شود

استخراج DNA از گونه‌های مختلف گیاه فراموشم مکن با استفاده از نمونه‌های هرباریومی انجام شد. نام و مستندات نمونه های استفاده شده در جدول ۱ مشخص شده است

جدول ۱. نام، کد هرباریومی نمونه، زمان و محل جمع آوری گیاهان مورد بررسی.

شماره نمونه	نام نمونه	زمان جمع آوری	محل جمع آوری	کد سند
1	*M. asiatica*	2004	غرب بجنورد، کوه‌های آلاداغ برفندیل هاور	35512
2	*M. strictalink*	2007	جاده قوچان درگز - دوراهی جدید	37281
3	*M. stricta*	2012	جاده قوچان درگز - دوراهی جدید	20523
4	*M.sparsiflora*	1980	آذربایجان کیلومتر 18، از سردشت تا پیرانشهر	19881
5	*M. sylvatica*	1988	همدانی کوه	64964

روش های استخراج استفاده شده

در همه روش ها از نیم گرم نمونه خشک برگی استفاده شد. در مرحله اول ۵ نمونه ذکر شده به روش CTAB (۱) استخراج شدند. در مرحله دوم ، CTAB تغییر یافته و مرحله سوم روش دلاپورتا استفاده شد

روش CTAB

خردکردن نمونه برگی در هاون چینی به کمک نیتروژن مایع و سپس افزودن بافر CTAB و بتا مرکاپتواتانول انجام شد. سپس از محلول کلروفرم ایزو امیل الکل به نسبت ۲۴ به ۱ استفاده شد. پس از سانتریفیوژ محلول شناور جهت مراحل بعدی استفاده شد. در نهایت با الکل سرد شستشو و رسوب داده شد و در بافر TE حل شده و در فریزر نگهداری گردید(۱).

روش تغییر یافته CTAB

در روش تغییر یافته CTAB، کلیه مراحل مشابه با روش استاندارد CTAB است. تغییرات شامل افزودن ۶۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول و استات آمونیوم در مراحل مختلف عملیات بوده است. این تغییرات به جهت بهبود کیفیت و خلوص DNA صورت گرفته است. استات آمونیوم به عنوان یک عامل ژله‌ای، کمک می‌کند تا کاتیون‌های دوار مانند کلسیم ($^{+}Mg^{2}$) که ممکن است در تجزیه DNA نقش داشته باشند، حذف شوند و در نتیجه میزان این ناخالصی‌ها کاهش یابد. همچنین، مرکاپتواتانول، که یک عامل ردوکتور و آنتی‌اکسیدان قوی است، در جلوگیری از اکسیداسیون فنول‌ها و ترکیبات فنلی موجود در نمونه گیاهی موثر است، که به افزایش خلوص DNA و جلوگیری از تخریب آن کمک می‌کند. پس از هر مرحله، نمونه‌ها برای حصول اطمینان از بهترین وضعیت، استراحت داده شد که این اقدام بر کیفیت و مقدار نهایی DNA تاثیر مثبت دارد

روش دلاپورتا

در این روش، بافر استخراج با روش قبلی متفاوت بوده و همچنین بافر با دمای ۶۵ درجه استفاده می شود. همچنین در این روش از استات سدیم ۵ مولار استفاده شده و در دمای صفر درجه قرار می گیرند. سپس از محلول کلروفرم ایزوامیل الکل استفاده می گردد. پس از سانتریفیوژ محلول شناور جهت مراحل بعدی استفاده گردید. در نهایت با الکل سرد شستشو و رسوب داده شد و نظیر روش های فوق در بافر TE حل شده و در فریزر نگهداری گردید (۲)

اندازه‌گیری کیفیت و کمیت DNA

در این مطالعه، میزان کیفیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و بر اساس اندازه‌گیری جذب نور در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. غلظت DNA بر اساس شدت جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر محاسبه گردید. همچنین، غلظت ژل آگاروز مورد استفاده در الکتروفورز به یک درصد تنظیم گردید

جهت ارزیابی خلوص نمونه‌های DNA، نسبت جذب در طول موج‌های ۲۸۰/۲۶۰ جهت تخمین میزان آلودگی پروتئینی و ۲۳۰/۲۶۰ برای ارزیابی حضور مواد آلی و ناخالصی‌ها مورد نظر قرار گرفت. این شاخص‌ها، نشانگر خوبی از خلوص و صحت آزمایش است و کمک می‌کند تا کیفیت DNA مناسب برای پروژه‌های بعدی تضمین گردد

نتایج

نتایج حاصل از استخراج DNA با روش CTAB

جهت استخراج DNA از این ۵ گیاه از روش CTAB بدون تغییرات استفاده شد اما DNA استخراجی در این روش برای بیشتر نمونه ها بسیار کم بود و فقط DNA (*M. stricta*) ۳۷۲۸۱ با غلظت ۱۱۷/۱ نانوگرم بر ماکرولیتر و مشاهده باند نه چندان قوی در الکتروفورز، استخراج گردید (جدول ۲).

جدول ۲. نتایج نانودراپ DNA استخراج شده با روش CTAB بدون تغییرات

نام علمی	کد نمونه	تاریخ جمع آوری	غلظت DNA (ng/µl)	260/230	260/280
M. asiatica	35512	2004	13/5	0/22	0/33
M. stricta	37281	2007	117/1	0/27	0/13
M. stricta	20523	2012	74/1	2/1	0/88
M. sparsiflora	19881	1980	26	0/69	1/5
M. sylvatica	64964	1988	59/4	1/8	0/51

نتایج حاصل از استخراج DNA با روش CTAB با تغییرات(۶۰ مرکاپتو اتانول+ آمونیوم استات+ استراحت)

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB با تغییرات برای ۵ گیاه انجام شد، ٤ گیاه با کد ۳۵۵۱۲، ۳۷۲۸۱، ۲۰۵۲۳ و ۱۹۸۸۱، کیفیت و کمیت مناسبی از DNA استخراجی داشتند و گیاه با کد ٦٤٩٦٤ کیفیت و کمیت کمتری از DNA استخراجی داشت (جدول ۳).

جدول ۳. نتایج نانودراپ DNA استخراج شده با روش CTAB با تغییرات (۶۰ مرکاپتو اتانول+ آمونیوم استات+ استراحت)

نام علمی	کد نمونه	تاریخ جمع آوری	غلظت DNA (ng/µl)	260/230	260/280
M. asiatica	35512	2004	235	1/9	1/88
M. stricta	37281	2007	443	0/77	2/02
M. stricta	20523	2012	263/6	0/88	1/81
M. sparsiflora	19881	1980	200/3	1/1	1/7
M. sylvatica	64964	1988	90	1/6	1/7

نتایج حاصل از استخراج DNA با روش دلاپورتا

در این روش، تنها میزان DNA استخراج شده از گیاه با کد ۳۵۵۱۲، بسیار قابل‌توجه بود و در بقیه نمونه ها باندی مشاهده نشد و غلظت DNA نیز پایین بود (جدول ٤).

جدول ٤. نتایج نانودراپ DNA استخراج شده با روش دلاپورتا

نام علمی	کد نمونه	تاریخ جمع آوری	غلظت DNA (ng/µl)	260/230	260/280
M. asiatica	35512	2004	192	0/85	1/47
M. stricta	37281	2007	93/3	1/27	1/88
M. stricta	20523	2012	51/4	0/61	1/87
M. sparsiflora	19881	1980	33/4	0/74	1/6
M. sylvatica	64964	1988	16/8	0/19	1/57

بحث

نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه حاکی از آن است که استخراج DNA ژنومی با روشCTAB با اعمال تغییرات، برای این پنج گیاه از کمیت و کیفیت بهتری نسبت به سایر روش ها برخوردار می باشد. در روش CTAB بدون تغییرات، تنها باند DNA در نمونه *M. stricta* (جمع آوری۲۰۰۷) مشاهده گردید.

در روش CTAB با تغییرات، با استات آمونیوم (مرکاپتواتانول ٦٠ میکرولیتر و استراحت)، تقریبا برای هر ۵ نمونه DNA حاصل شد

در روش Dellaporta تنها میزان DNA استخراج شده برای گیاه *M. asiatica*(جمع آوری۲۰۰٤) قابل‌توجه بود. در واقع این مطالعه نشان‌دهنده برتری روش استخراج DNA با روش CTAB با تغییرات با استات آمونیوم بود. وجود ترکیبات فنلی و ترکیبات ثانویه دیگر، استخراج DNA از بافت برگی گونه های گیاه *Myosotis* را مشکل ساخته است (۱۰).

در گیاه دارویی گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum*)، انجام مطالعه نشان داد که کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با روش دویل و دویل تغییریافته (CTAB) نسبت به سایر روش‌ها بهتر است. این روش در مقایسه با روش‌های دیگر، نتایج مطلوب‌تری ارائه می‌دهد. در واقع، در روش استات آمونیوم، پروتئین‌های هیستونی که به DNA متصل هستند، می‌توانند توسط پروتئاز یا با افزودن استات آمونیوم یا استات سدیم ته‌نشین شوند. این فرآیند موجب جدا شدن پروتئین‌های مرتبط با DNA می‌گردد و منجر به استخراج DNA خالص‌تر می‌شود (۶). Sabora و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیقی با عنوان «تعیین روش مناسب جهت استخراج DNA ژنومی از برگ گیاه بومادران»، بیان کردند که روش‌های متعددی برای استخراج DNA در گیاهان وجود دارد. آن‌ها همچنین تاکید کردند که برای هر گیاه باید روش مناسب انتخاب شود و گاهی اوقات نیاز به تغییرات در روش‌ها است. نتایج این مطالعه نشان داد که روش استخراج CTAB با اندکی تغییرات، نسبت به دو روش دیگر، DNA ژنومی مطلوب‌تری تولید می‌کند (۸). مطالعه FatemiFard و همکاران (۲۰۱۹) نیز نشان داد که استفاده از روش CTAB با تغییرات جزئی برای استخراج DNA از نمونه‌های خشک شده گیاه و قارچ، باعث کیفیت و کمیت بالای DNA می‌شود. این نوع استخراج، توانایی تکثیر بسیار خوبی دارد (۷). از طرف دیگر، Banitalebi-Dehkordi و همکاران (۲۰۱۳) بیان کردند که به دلیل بالا بودن ترکیبات فنلی و پلی‌ساکاریدها در دیواره سلولی درخت بلوط ایرانی (*Quercus brantii*)، روش معمول CTAB با آلودگی‌هایی همراه است. این آلودگی‌ها می‌توانند مراحل بعدی کارهای مولکولی، مانند واکنش PCR، را مختل کنند. در واقع، نتایج آن‌ها نشان داد که روش دست‌کاری شده CTAB، منجر به استخراج DNA با کیفیت و کمیت بالا می شود(۱۱)

از طرف دیگر، Banitalebi-Dehkordi و همکاران (۲۰۱۳) بیان کردند که به دلیل بالا بودن ترکیبات فنلی و پلی‌ساکاریدها در دیواره سلولی درخت بلوط ایرانی (Quercus brantii)، روش معمول CTAB با آلودگی‌هایی همراه است. این آلودگی‌ها می‌توانند مراحل بعدی کارهای مولکولی، مانند واکنش PCR، را مختل کنند. در واقع، نتایج آن‌ها نشان داد که روش دست‌کاری شده CTAB، منجر به استخراج DNA با کیفیت و کمیت بالا می‌شود(۱۱)

این سه روش، از نظر کمیت و کیفیت DNA، با استفاده اسپکتروفتومتری، الکتروفورز بر روی ژل ۱٫۵٪ و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مقایسه شدند. نتایج نشان داد که روش CTAB با چند تغییر، DNA ژنومی مطلوب‌تر تولید می‌کند. در این روش، فرآیند استخراج DNA در مدت زمان کوتاه‌تری انجام شد، که در نتیجه درصد خطا کاهش یافت. همچنین، پس از سنجش غلظت نمونه‌ها، میزان DNA به دست آمده بیشتر و آلودگی کمتری داشت (۱۲)

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش دلاپوتا برای استخراج DNA در پنج گونه گیاهی مناسب نیست. این روش تنها برای یک گونه از این گیاه کارآمد بود و برای چهار گونه دیگر نتوانست نتایج رضایت‌بخشی ارائه دهد. در مطالعه Salehi و همکاران (۲۰۱۰)، مشخص شد که روش دلاپوتا به دلیل زمان کم انکوباسیون و اتصال ناقص SDS بافر، نتایج خوبی در استخراج DNA از برگ بعضی گیاهان نمی‌دهد (۱۲). همچنین، مطالعه Zabeti و همکاران (۲۰۱٤) بر روی گیاه آویشن نشان داد که DNA استخراج شده با روش دلاپوتا، از نظر کمیت و کیفیت، پایین‌تر از سایر روش‌ها مانند Doyle و Yang، Doyle و Kang و Khanuja است (۹). این نتایج، تاییدکننده نتایج مطالعه حاضر هستند. در همه روش‌های استفاده شده در این تحقیق، از غلظت بالای مرکاپتواتانول و کلرید سدیم استفاده شد که نقش کلیدی در افزایش کمیت و کیفیت DNA دارند. مواد شیمیایی، مانند CTAB، مولکول DNA را به‌عنوان یک کمپلکس تشکیل می‌دهند و آن را از مواد مزاحم مانند کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها جدا می‌کنند (۱).

پلی‌ساکاریدهای باقی‌مانده، یکی از مشکلات قابل توجه در نمونه‌ها هستند که می‌توانند کیفیت DNA را کاهش دهند. برای حل این مشکل، از NaCl با غلظت ۱ تا ۲٫۵ مولار و رسوب در شرایط نمک بالا استفاده می‌شود. با وجود این، نمونه‌های DNA به‌طور قابل توجهی خالص بودند و امکان تکثیر تکرارپذیر در واکنش‌های PCR فراهم شد. در تحقیقی در گیاه آویشن، نشان داده شد که حذف پلی‌ساکاریدها و مواد مزاحم، برای به‌دست‌آوردن DNA با کیفیت و کمیت مناسب، اهمیت زیادی دارد (۹). همچنین، محققان نشان دادند که تکنیک‌های موثر برای حذف پلی‌ساکاریدهای باقی‌مانده، ارزش بالایی دارند. آن‌ها در مطالعه‌ای بر روی برگ بومادران، پیشنهاد کردند که روش CTAB با اصلاحات، بهترین گزینه برای استخراج DNA است. در گیاهان، مواد متابولیت ثانویه مانند پلی‌ساکاریدها، آلکالوئیدها، تانن‌ها، ترکیبات فنولی و ترپنوییدها موجود است. این مواد، روند استخراج DNA را مشکل می‌سازند. لذا، یافتن روشی مؤثر برای کاهش این ترکیبات، بسیار اهمیت دارد؛ زیرا DNA با کیفیت و خالص، پایه و اساس تمامی تحقیقات مولکولی مانند مهندسی ژنتیک و ژنومیک است (۸). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش CTAB با تغییرات، در افزایش کمیت و کیفیت DNA، کارایی بالایی دارد و می‌تواند یکی از بهترین روش‌های استخراج DNA از برگ‌های گونه‌های مختلف گیاه *Myosotis* باشد. در نمونه‌های قدیمی‌تر، میزان تخریب DNA افزایش می‌یابد. در این مطالعه، نمونه گیاه *M. sparsiflara* (جمع‌آوری ۱۹۸۰) فقط با روش CTAB با تغییرات، DNA با کیفیت و کمیت مناسب داشت. اما، در نمونه گیاه *M. sylvatica* (جمع‌آوری ۱۹۸۸)، به دلیل قدیمی بودن نمونه و تخریب DNA، نتایج قابل قبولی حاصل نشد

نتیجه گیری

روش CTAB با تغییرات (همراه با استات آمونیوم و مرکاپتواتانول ٦۰ میکرولیتر)، در استخراج DNA با کیفیت و کمیت بالا، بسیار مؤثر است. این روش بر نمونه‌های قدیمی و یا دارای مواد مزاحم، بهترین عملکرد را دارد. نمونه‌های قدیمی‌تر در صورت استفاده از این روش، قابلیت بازیابی DNA مناسب دارند. پیشنهاد می شود روش های دیگر جهت توسعه و بهبود فناوری‌های حذف مواد مزاحم مانند پلی‌ساکاریدها و مواد ثانویه در نمونه‌های گیاهی مختلف بکار گرفته شود و همچنین نمونه‌های دیگر گیاهی و قسمت‌های مختلف گیاه نیز بررسی شود

References

1. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus; 1990 12:13-15.

2. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant molecular DNA minipreparation version 2. Plant Mol Biol Rep. 1983;1(1):19-21.

3. Kang TJ, Yang MS. Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wildtype and transgenic. Biotechnology; 2004 6750:4-20.

4. Khanuja SPS, Shasany AK, Darokar MP, Kumar S. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Molecular Biology Reporters. 1999; 17: 1–7.

5. Khatamsaz, M, Flora of Iran, No. 39 – Boraginaceae, Forest and Rangeland Research Institute Publications; 2002.

6. Alidoosty-shahraky Z, Farrokh P, Amirahmadi A, Rezaei A, Ghasemian J. Comparison of five genomic DNA extraction methods in Iranian medicinal plant, Echium amoenum. J Med Plants. 2023;36(3):216-231.

7. FatemiFard SZ, Masoumiasl A. DNA extraction from dried specimens of plant and fungi in a fast, secure, and non-liquid nitrogen method. Iran J Plant Biotech. 2019;14(3):20-27.

8. Saboora A, Amiri Rad M, Asgarani E, Radjabian T. Comparison of three methods for genomic DNA extraction from fresh and herbarium leaf specimens of Achillea wilhelmsii. Nova Biol Res. 2019;5:458-465.

9. Zabiti SM, Ismaeili Maddah Arefi H, Nazarian Firouzabadi F, Mojiri F. Separation of secondary metabolites in DNA extraction process of thyme and analysis using GC-MS. Cell Mol Res. 2014;27(1):66-74.

10. Hoseinpour-Azad N, Nematzadeh GH. Introducing a fast and simple method for DNA extraction from Persian hogweed (Echium amoenum). Plant Ecosyst. 2012;8(31):111-120.

11. Banitalebi-Dehkordi S, Jafari-Sayyadi MH, Alavi-Samani SA. Optimization of CTAB method for DNA extraction from Iranian oak leaf tissue Quercus brantii Lindl. 8th National Biotechnology Congress of I.R. Iran & 4th National Conference on Biosecurity; 2013; Tehran, Iran.

12. Salehi K, Mozaffarian-Firoozabadi F, Esmaeili A, Zabeti SM. Determining the appropriate method for extracting genomic DNA from the leaves of medicinal plant chamomile. Nat Conf Med Plants. 2010.