



Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

h t t p s : / / z i s t i . i a u v a r a m i n . a c . i r



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

Zahra Ghasemzadeh¹, Maryam Khoshokhn-Mozaffar^{2*}

¹Ms of Biology, Qo.C. Islamic Azad University, Qom, Iran

²Associate Prof. Department of Biology, Qo.C. Islamic Azad University, Qom, Iran

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

Article Info

Abstract

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

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, Khoshokhn-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 10.71631/zisti.2024.1204588

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/licenses/by-nc/4.0/>

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

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۴/۰۱/۰۳

بازنگری ۱۴۰۴/۰۱/۲۳

پذیرش ۱۴۰۴/۰۲/۱۳

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

یافته ها: نتایج نشان داد در روش CTAB بدون تغییرات تنها در گونه *M. stricta* (جمع آوری ۲۰۰۷) باند مشاهده شد. در روش CTAB تغییر یافته گونه های *M. stricta* (جمع آوری ۲۰۰۷)، *M. stricta* (جمع آوری ۲۰۱۲)، *M. asiatica* (جمع آوری ۲۰۰۴) باندهای قوی و گونه های *M. sparsiflora* (جمع آوری ۱۹۸۰) و *M. sylvatica* (جمع آوری ۱۹۸۸) باند ضعیف-تر ایجاد کرد و در روش دلاپورتا در گونه *M. asiatica* (جمع آوری ۲۰۰۴) باند مشاهده گردید.

نتیجه گیری: در روش CTAB با تغییرات به دلیل افزایش حجم ۶۰ مرکابتواتانول (جلوگیری از اکسید شدن پلی فنلها) و استفاده از استات آمونیوم (جدا کردن بهتر هیستونها از اسیدنوکلئیک) + 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.

کلمات کلیدی

استخراج DNA

CTAB

میوزوتیس

دلاپورتا

ترکیبات ثانویه

* مسئول مکاتبات:

ma.km1357@iaub.ac.ir

شیوه آدرس دهی این مقاله: ز قاسم زاده، م خوش سخن مظفر. ارزیابی روش های مختلف استخراج DNA ژنومی از نمونه های هرباریومی گیاه *Myosotis*.

مجله دانش زیستی ایران. ۱۹:۱۴۰۳ (۳): ۱۸-۱۱

doi 10.71631/zisti.2024.1204588

نویسندگان: حق مؤلف ©

شاپا الکترونیکی: X ۴۵۹ - ۲۷۱۷

شاپا چاپی: ۴۲۲۶-۱۷۳۵

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا

مقدمه

امروزه با پیشرفت های علم بیوتکنولوژی، نشانگرهای مولکولی متعددی برای بررسی روابط فیلوژنتیکی، تهیه نقشه های ژنتیکی گیاهان و همچنین حذف نمونه های تکراری در بانک های ژن بکار گرفته می شوند. این روش ها 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. روش های متنوعی برای استخراج DNA از گیاهان وجود دارند، که در اغلب موارد روش های مرسوم مانند روش دوویل و دوویل (۱) به عنوان روش استاندارد مورد استفاده قرار می گیرد. در این روش، مراحل ساده و کارآمدی برای استخراج DNA ارائه شده است، اما در گیاهان حاوی ترکیبات فنلی فراوان یا کلروفیل و ناخالصی های زیاد، ممکن است نیاز به اصلاحات یا روش های دیگر باشد. از جمله روش های دیگر می توان به روش دلاپورتا (۲)، یانگ و کانگ (۳) و خانوجا (۴) اشاره کرد. هر یک از این روش ها مزایا و محدودیت های خاص خود را دارند و در نمونه های خشک، قدیمی یا حاوی ترکیبات ثانویه زیاد، ممکن است کارایی کمتری داشته باشند. بنابراین، بهینه سازی روش های 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، یک ساله یا چندساله، دارای متابولیت های ثانویه فراوان است که نقش مهمی در داروشناسی، طب سنتی و تحقیقات زیستی دارد، ضمن اینکه به دلیل فصلی بودن رویش و محدود بودن نمونه های تازه، نیاز به روش های بهینه استخراج DNA از نمونه های خشک یا قدیمی بیشتر احساس می شود (۵).

Myosotis در اکثر مناطق جهانی شناخته شده و از لحاظ زیستی اهمیت زیادی دارد؛ زیرا در مطالعه روابط فیلوژنتیکی بین گونه های مختلف، نقش مهمی ایفا می کند. 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 می کند. گیاه *Myosotis* دارای متابولیت های

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 می شوند. وجود این مواد اغلب مشکلاتی در فرآیند استخراج و DNA purification ایجاد می کند و نیازمند روش های 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 دوویل و دوویل تغییر یافته، با حذف مواد مزاحم مانند مرکپتواتانول و استات آمونیوم، را برای گیاه گاوزبان ایرانی مقایسه و پیشنهاد کردند (۶). 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 کیت های تجاری، خصوصاً برای نمونه های تازه، نتایج بهتری در کاهش آلودگی ها و افزایش میزان DNA دارد. در نمونه های خشک و هرباریومی، به دلیل کاهش سطح DNA یا تحلیل رفتن آن، استخراج سخت تر است، ولی با اصلاحات در روش های کلاسیک، می توان نتایج قابل قبولی بدست آورد (۸). برخی پژوهش ها، مانند مطالعه Zabeti و همکاران (۲۰۱۴)، بر روی گیاه آویشن نشان دادند که روش های متفاوتی مانند Yang و Doyle، Dellaporta، Kang و Khanuja، جواب های متفاوتی در استخراج DNA داده اند و نتیجه گیری کرده اند که روش های اصلاح شده، در برخی موارد، بهتر عمل می کنند (۹). همچنین، تحقیقات دیگر نشان داده است که نمونه های گیاهی خشک یا قدیمی نسبت به نمونه های تازه، به دلیل تخریب مولکول های DNA، فرآیند استخراج دشوارتری دارند ولی با تکنیک های بهینه می توان DNA قابل استفاده و با کیفیت برای آزمایش های مولکولی تولید کرد. به طور کلی، هدف این مطالعه، بررسی و بهینه سازی روش های استخراج DNA از نمونه های گیاهی خشک و هرباریومی *Myosotis* است تا بتوان تنوع گونه ها را با بهترین کیفیت و کمیت ممکن استخراج کرد و در نتیجه، امکان انجام آزمایش های مولکولی دقیق تر فراهم شود.

استخراج DNA از گونه های مختلف گیاه فراموشم مکن
با استفاده از نمونه های 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	<i>M. asiatica</i>	2004	غرب بجنورد، کوه های آلاداغ برفندیل هاور	35512
2	<i>M. stricta</i>	2007	جاده قوچان درگز - دوراهی جدید	37281
3	<i>M. stricta</i>	2012	جاده قوچان درگز - دوراهی جدید	20523
4	<i>M. sparsiflora</i>	1980	آذربایجان کیلومتر ۱۸، از سردشت تا پیرانشهر	19881
5	<i>M. sylvatica</i>	1988	همدان کوه	64964

است، در جلوگیری از اکسیداسیون فنول ها و ترکیبات
فنی موجود در نمونه گیاهی موثر است، که به افزایش
خلوص DNA و جلوگیری از تخریب آن کمک می کند. پس
از هر مرحله، نمونه ها 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)

اندازه گیری کیفیت و کمیت DNA

در این مطالعه، میزان کیفیت DNA با استفاده از دستگاه
اسپکتروفتومتر و بر اساس اندازه گیری جذب نور در طول
موج های 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

روش های استخراج استفاده شده

در همه روش ها از نیم گرم نمونه خشک برگ 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

خرد کردن نمونه برگ در هاون چینی به کمک نیتروژن
مایع و سپس افزودن بافر CTAB و بتا مرکاپتوانول
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 مرکاپتوانول 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 ژله ای، کمک می کند
تا کاتیون های دوار مانند کلسیم (Mg^{2+}) که ممکن
است در تجزیه DNA نقش داشته باشند، حذف شوند و
در نتیجه میزان این ناخالصی ها کاهش یابد. همچنین،
مرکاپتوانول، که یک عامل ردوکتور و آنتی اکسیدان قوی

خوبی از خلوص و صحت آزمایش است و کمک می کند تا کیفیت DNA مناسب برای پروژه های بعدی تضمین گردد

جهت ارزیابی خلوص نمونه های DNA، نسبت جذب در طول موج های ۲۸۰/۲۶۰ جهت تخمین میزان آلودگی پروتئینی و ۲۳۰/۲۶۰ برای ارزیابی حضور مواد آلی و ناخالصی ها مورد نظر قرار گرفت. این شاخص ها، نشانگر

نتایج

۳۷۲۸۱ (*M. stricta*) با غلظت ۱۱۷/۱ نانوگرم بر ماکرولیتر و مشاهده باند نه چندان قوی در الکتروفورز، استخراج گردید (جدول ۲).

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

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
<i>M. asiatica</i>	35512	2004	13/5	0/22	0/33
<i>M. stricta</i>	37281	2007	117/1	0/27	0/13
<i>M. stricta</i>	20523	2012	74/1	2/1	0/88
<i>M. sparsiflora</i>	19881	1980	26	0/69	1/5
<i>M. sylvatica</i>	64964	1988	59/4	1/8	0/51

۵ گیاه انجام شد، ۴ گیاه با کد ۳۵۵۱۲، ۳۷۲۸۱، ۲۰۵۲۳ و ۱۹۸۸۱، کیفیت و کمیت مناسبی از DNA استخراجی داشتند و گیاه با کد ۶۴۹۶۴ کیفیت و کمیت کمتری از DNA استخراجی داشت (جدول ۳).

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

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
<i>M. asiatica</i>	35512	2004	235	1/9	1/88
<i>M. stricta</i>	37281	2007	443	0/77	2/02
<i>M. stricta</i>	20523	2012	263/6	0/88	1/81
<i>M. sparsiflora</i>	19881	1980	200/3	1/1	1/7
<i>M. sylvatica</i>	64964	1988	90	1/6	1/7

۳۵۵۱۲، بسیار قابل توجه بود و در بقیه نمونه ها باندی مشاهده نشد و غلظت DNA نیز پایین بود (جدول ۴).

نتایج حاصل از استخراج DNA با روش دلاپورتا

در این روش، تنها میزان DNA استخراج شده از گیاه با کد

جدول ۴. نتایج نانودراپ DNA استخراج شده با روش دلاپورتا

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

بحث

نتایج به دست آمده در این مطالعه حاکی از آن است که استخراج DNA ژنومی با روش CTAB 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 آوری ۲۰۰۷) مشاهده گردید.

در روش CTAB با تغییرات، با استات آمونیوم (مرکاپتوانول ۶۰ میکرولیتر و استراحت)، تقریباً برای هر ۵ نمونه DNA حاصل شد

در روش Dellaporta تنها میزان DNA استخراج شده برای گیاه *M. asiatica* (جمع آوری ۲۰۰۴) قابل توجه بود. در واقع این مطالعه نشان دهنده برتری روش استخراج DNA با روش CTAB با تغییرات با استات آمونیوم بود. وجود ترکیبات فنلی و ترکیبات ثانویه دیگر، استخراج DNA از بافت برگ 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 دوپل و دوپل تغییر یافته (CTAB) نسبت به سایر روش ها بهتر است. این روش در مقایسه با روش های دیگر، نتایج مطلوب تری ارائه می دهد. در واقع، در روش استات آمونیوم، پروتئین های هیستونی که به DNA متصل هستند، می توانند توسط پروتئاز یا با افزودن استات آمونیوم یا استات سدیم ته نشین شوند. این فرآیند موجب جدا شدن پروتئین های مرتبط با DNA می گردد و منجر به استخراج DNA خالص تر می شود (۶). Sabora و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیقی با عنوان «تعیین روش مناسب جهت استخراج DNA ژنومی از برگ گیاه بومادران»، بیان کردند که روش های متعددی

برای استخراج DNA در گیاهان وجود دارد. آن ها همچنین تاکید کردند که برای هر گیاه باید روش مناسب انتخاب شود و گاهی اوقات نیاز به تغییرات در روش ها است. نتایج این مطالعه نشان داد که روش استخراج CTAB با اندکی تغییرات، نسبت به دو روش دیگر، DNA ژنومی مطلوب تری تولید می کند (۸). مطالعه FatemiFard و همکاران (۲۰۱۹) نیز نشان داد که استفاده از روش CTAB با تغییرات جزئی برای استخراج DNA از نمونه های خشک شده گیاه و قارچ، باعث کیفیت و کمیت بالای DNA می شود. 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 پلی ساکاریدها در دیواره سلولی درخت بلوط ایرانی (*Quercus brantii*)، روش معمول CTAB با آلودگی هایی همراه است. این آلودگی ها می توانند مراحل بعدی کارهای مولکولی، مانند واکنش PCR، را مختل کنند. در واقع، نتایج آن ها نشان داد که روش دست کاری 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 پلی ساکاریدها در دیواره سلولی درخت بلوط ایرانی (*Quercus brantii*)، روش معمول CTAB با آلودگی هایی همراه است. این آلودگی ها می توانند مراحل بعدی کارهای مولکولی، مانند واکنش PCR، را مختل کنند. در واقع، نتایج آن ها نشان داد که روش دست کاری شده CTAB، منجر به استخراج DNA با کیفیت و کمیت بالا می شود (۱۱)

این سه روش، از نظر کمیت و کیفیت DNA، با استفاده اسپکتروفتومتری، الکتروفورز بر روی ژل ۱،۵٪ و واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) مقایسه شدند. نتایج نشان داد که روش CTAB با چند تغییر، DNA ژنومی مطلوب تر تولید می کند. در این روش، فرآیند استخراج DNA در مدت زمان کوتاه تری انجام شد، که در نتیجه درصد خطا کاهش یافت. همچنین، پس از سنجش غلظت نمونه ها، 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 رضایت بخشی 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 نمی دهد (۱۲). همچنین، مطالعه Zabeti و همکاران (۲۰۱۴) بر روی گیاه آویشن نشان داد که DNA استخراج شده با روش دلاپوتا، از نظر کمیت و کیفیت، پایین تر از سایر روش ها مانند Doyle, Yang و Doyle, Yang و Khanuja و Kang است (۹). این نتایج، تاییدکننده نتایج مطالعه حاضر هستند. در همه روش های 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 به عنوان یک کمپلکس تشکیل می دهند و آن را از مواد مزاحم مانند کربوهیدرات ها و پروتئین ها جدا می کنند (۱).

پلی ساکاریدهای باقی مانده، یکی از مشکلات قابل توجه

در نمونه ها هستند که می توانند 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 می شود. با وجود این، نمونه های DNA به طور قابل توجهی خالص بودند و امکان تکثیر تکرارپذیر در واکنش های PCR فراهم شد. در تحقیقی در گیاه آویشن، نشان داده شد که حذف پلی ساکاریدها و مواد مزاحم، برای به دست آوردن DNA با کیفیت و کمیت مناسب، اهمیت زیادی دارد (۹). همچنین، محققان نشان دادند که تکنیک های موثر برای حذف پلی ساکاریدهای باقی مانده، ارزش بالایی دارند. آن ها در مطالعه ای بر روی برگ بومادران، پیشنهاد کردند که روش CTAB با اصلاحات، بهترین گزینه برای استخراج DNA است. در گیاهان، مواد متابولیت ثانویه مانند پلی ساکاریدها، آلکالوئیدها، تانن ها، ترکیبات فنولی و ترپنوئیدها موجود است. این مواد، روند استخراج DNA را مشکل می سازند. 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 می تواند یکی از بهترین روش های استخراج DNA از برگ های گونه های مختلف گیاه *Myosotis* باشد. در نمونه های قدیمی تر، میزان تخریب DNA افزایش می یابد. در این مطالعه، نمونه گیاه *M. sparsiflora* (جمع آوری ۱۹۸۰) فقط با روش CTAB با تغییرات، DNA با کیفیت و کمیت مناسب داشت. اما، در نمونه گیاه *M. sylvatica* (جمع آوری ۱۹۸۸)، به دلیل قدیمی بودن نمونه و تخریب DNA، نتایج قابل قبولی حاصل نشد

نتیجه گیری

روش های دیگر جهت توسعه و بهبود فناوری های حذف مواد مزاحم مانند پلی ساکاریدها و مواد ثانویه در نمونه های گیاهی مختلف بکار گرفته شود و همچنین نمونه های دیگر گیاهی و قسمت های مختلف گیاه نیز بررسی شود

روش CTAB با تغییرات (همراه با استات آمونیوم و مرکاپتواتانول ۶۰ میکرولیتر)، در استخراج DNA با کیفیت و کمیت بالا، بسیار مؤثر است. این روش بر نمونه های قدیمی و یا دارای مواد مزاحم، بهترین عملکرد را دارد. نمونه های قدیمی تر در صورت استفاده از این روش، قابلیت بازیابی DNA مناسب دارند. پیشنهاد می 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 miniprep preparation 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. Saboor 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.