استخراج DNA از گونه‌های ماکرو جلبکی حاوی میزان بالای ترکیبات پلی‌ساکاریدی و فنولی جهت مطالعات ژنتیکی

کیانا پیریان[۱]
خسرو پیری[۲*]
سعید تمدنی جهرمی[۳]
جلوه سهرابی پور[٤]
امیر اقبال خواجه رحیمی[٥]

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۲. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۳. استادیار بخش ژنتیک، پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، بندرعباس، ایران
۴. استادیار بخش جلبک‌شناسی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان، بندرعباس، ایران
۵. استادیار واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

***مسئول مکاتبات:**
khpiri@gmail.com

کد مقاله: ۱۳۹۴۰۴۰۳۸۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۱
این مقاله برگرفته از رساله دکتری است.

چکیده

استخراج DNA خالص و کافی از ماکرو جلبک‌ها به علت دارا بودن رنج وسیعی از متابولیت‌های ثانویه، نحوه اشتباه نمونه‌برداری و خصوصیات مرفولوژی کی آن‌ها، معمولاً مشکل است. ازآنجاکه استخراج DNA خالص جهت مطالعات مولکولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است این مطالعه باهدف استخراج آسان و ارزان DNA ژنومی باکیفیت و کمیت بالا از نمونه‌های ماکرو جلبکی انجام شد. استخراج DNA توسط روش‌های فنول-کلروفرم، CTAB و CTAB تغییریافته انجام شد و همچنین نیتروژن مایع جهت خرد کردن نمونه‌ها حذف گردید. درروش CTAB تغییریافته، تغییراتی در نسبت حجم بافر استخراج به نمونه، ترکیبات بافر استخراج (افزایش غلظت EDTA، بتامرکاپتواتانول و افزودن PVP و سارکوسیل) ایجاد شد. واکنش PCR بر اساس ژن tufA جهت اطمینان از خلوص DNA انجام شد. در ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراجی، نسبت ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر بین ۱/۸۴-۱/۷ و نسبت ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر بیشتر از ۲ نشان داده‌شده و همچنین غلظت DNA بین ۸-۶/۵ میکروگرم بر میکرو لیتر اندازه‌گیری شد. محصولات PCR باندهایی را در محدوده ۷۰۰-۸۰۰ جفت باز در ژل آگارز نشان دادند. ارزیابی کمی و کیفی داده‌ها، خلوص و میزان بالای DNA استخراج‌شده به روش CTAB تغییریافته نسبت به دو روش دیگر را نشان دادند، به‌طوری‌که نسبت‌ها نشان‌دهنده عاری بودن DNA از ترکیبات پروتئینی و پلی‌فنولی/ پلی‌ساکاریدی است. ازآنجاکه آلودگی‌های پلی‌ساکاریدی و فنولی بازدارنده آنزیم‌های واکنش PCR هستند بنابراین نتایج موفقیت‌آمیز واکنش PCR نشان‌دهنده خلوص DNA استخراج‌شده و کاربرد آن در مطالعات مولکولی است.DNA استخراج‌شده به روش بهینه‌شده در این مطالعه مناسب جهت مطالعات مولکولی و نگهداری است.

واژگان کلیدی: استخراج DNA، روش CTAB، ترکیبات پلی‌ساکارید و فنولی، ژن tufA، گونه‌های ماکروجلبک.

مقدمه

ماکرو جلبک‌ها یا علف‌های دریایی به علت تنوع زیستی بالایی که دارند، منبع غنی از ترکیبات فعال بیولوژیکی محسوب می‌شوند. بسیاری از گونه‌های ماکرو جلبکی به علت رشد در زیستگاه‌های پیچیده و دشوار محیطی و جهت تطبیق با محیط، ترکیبات اولیه و ثانویه‌ای را تولید می‌کنند که جانداران دیگر نمی‌توان آن‌ها را یافت (Lordan *et al*., 2011). ماکرو جلبک‌ها ترکیبات مختلفی ازجمله کارتنوئیدها، اسیدهای چرب، ترکیبات فنولی، ترپنوئیدها وپلی‌ساکاریدی و... را تولید می‌کنند که در صنایع مختلف ازجمله داروسازی، آرایشی و بهداشتی، مواد نگه‌دارنده مواد غذایی، ضد رسوب‌گذاری و... کاربرد

دارند (Sastry and Rao, 1994). ماکرو جلبک‌ها بر اساس رنگ‌دانه به سه دسته ماکرو جلبک‌های قرمز، قهوه‌ای و سبز تقسیم می‌شوند. گونه‌های ماکرو جلبکی علاوه بر کاربردهای بیوتکنولوژی، ازنظر صنعتی نیز بسیار مهم می‌باشند و به علت تولید ترکیبات باارزشی همچون آگار، آگارز، کاراژینان و... یکی از منابع مهم اقتصادی محسوب می‌شوند. با توجه به فراوانی پراکنش و کاربرد وسیع ماکرو جلبک‌ها در صنایع مختلف، استفاده از تکنیک‌های مولکولی جهت مطالعه آن‌ها توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است. در بیشتر مطالعات مولکولی و تنوع ژنتیکی بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) جهت به دست آوردن اطلاعات دقیق و کامل، به نمونه DNA باکیفیت بالا و با کمترین آلودگی پلی‌ساکاریدی، فنولی، پروتئینی و ... نیاز است (Tan and Yiap, 2009). ماکرو جلبک‌ها به علت سازگاری با شرایط مختلف محیطی قادر به سنتز رنج وسیعی از متابولیت‌های ثانویه ازجمله پلی-ساکاریدها، پلی‌فنول‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و ... هستند که وجود این ترکیبات و دیواره سلولی ازجمله عوامل بازدارنده استخراج DNA از این گیاهان می‌باشند که روند استخراج DNA و کاربرد آن در مطالعات مولکولی را مختل می‌کنند. گزارش‌ها متعددی مبنی بر وجود مشکلات فراوانی بر جداسازی DNA باکیفیت بالا از گیاهان بال خصوص ماکرو جلبک‌های جنس *Ulva* گزارش‌شده است (Huang *et al*., 2000). متابولیت‌های ثانویه در هنگام استخراج DNA به‌صورت محکم به اسیدهای نوکلئیک متصل می‌شوند و درروند واکنش‌های بعدی اختلال ایجاد می‌کنند. حضور ترکیبات پلی‌ساکاریدی در نمونه DNA سبب ممانعت از فعالیت آنزیم Taq پلی‌مراز و آنزیم‌های برشی می‌شوند (Pandey *et al*., 1996) و نیز سبب ویسکوزیته بالا محلول می‌شوند (Do and Adams, 1991). فرم‌های اکسیدشده ترکیبات پلی‌فنولی به DNA به‌صورت کوالانسی متصل و سبب قهوه‌ای شدن و کاهش مدت‌زمان نگهداری نمونه DNA می‌شوند (Katterman and Shattuck, 1983). علاوه بر روش‌های دستی مختلف، کیت‌های تجاری جهت استخراج DNA ژنومی از گیاهان وجود دارد. مطالعات بسیاری جهت حذف مواد شیمیایی خطرناک، مراحل طولانی و وقت‌گیر، کیت‌های تجاری گران‌قیمت و... در استخراج DNA از گیاهان انجام‌شده است، برای مثال، Doyle و Doyle (۱۹۹۰) از روش CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) جهت استخراج DNA استفاده کردند با این تفاوت که میزان بتامرکاپتو را کاهش و از پروتئین از K جهت حذف پروتئین‌ها استفاده کردند. Richard و Rogers (۱۹۹۳) از غلظت بالای CTAB جهت غیرفعال سازی آنزیم‌های نوکلئازی و پلی‌ساکاریدها استفاده کردند. Edward و همکاران (۱۹۹۱) از SDS و فنول به‌جای CTAB به‌عنوان دترژنت جهت استخراج DNA خالص استفاده کردند. باوجود روش‌های مختلف استخراج DNA از نمونه‌های گیاهی اما جهت استخراج DNA خالص از هرگونه گیاهی با توجه به ترکیبات متابولیت‌های ثانویه، بافت مورداستفاده و میزان DNA موردنیاز جهت مطالعات موردنظر، به روش استخراج DNA مناسبی نیاز است. جهت استخراج DNA ابتدا باید نمونه گیاهی موردنظر کاملاً خرد شود که در برخی مطالعات جهت ممانعت از دژ نره شدن DNA این عمل توسط نیتروژن مایع انجام می‌گیرد. بافت‌های بالغ دارای میزان بیشتری از تانن‌ها، پلی‌فنول‌ها و پلی‌ساکاریدها می‌باشند (Porebski *et al*., 1997)، بنابراین استفاده از بافت‌های تازه و جوان جهت استخراج DNA باکیفیت بالا، بسیار مناسب است (Moreira and Oliveira, 2011) و بسیاری از روش‌های استخراج DNA جهت استخراج DNA نمونه تازه و جوان را پیشنهاد می‌کنند، اما بااین‌حال همیشه این امکان وجود ندارد که از بافت‌های تازه و جوان در استخراج DNA استفاده شود (Michiels *et al*., 2003). بسیاری از ماکرو جلبک‌ها دور از دسترس و در مکان‌های نادری یافت می‌شوند که امکان استفاده از بافت تازه آن‌ها وجود ندارد و حتی برخی موارد تنها بافت‌های خشک و فریز شده در دسترس هستند، بنابراین باید روشی را بهینه کرد که برای نمونه‌های گیاهی خشک‌شده نیز کارآمد باشد. همچنین ازآنجاکه نمونه‌برداری ماکرو جلبک‌ها در مناطق جزرومدی صورت می‌گیرد، در فاصله انتقال نمونه‌ها از محل نمونه‌برداری تا آزمایشگاه در صورت عدم رعایت شرایط درست و به علت ساختار مرفولوژی برخی نمونه‌های ماکرو جلبکی احتمال آسیب میزان بیشتری از DNA نمونه‌ها وجود دارد، بنابراین به روشی نیاز است که بیشترین میزان DNA با بهترین کیفیت را حاصل نماید.

هدف این مطالعه ایجاد روشی مناسب، آسان و کم‌هزینه جهت استخراج DNA باکیفیت بالا از نمونه‌های ماکرو جلبکی تازه، خشک و فریز شده، جهت مطالعات مولکولی است که بدین منظور ابتدا استخراج DNA از نمونه‌های ماکرو جلبکی بر اساس دو روش متداول استخراج DNA از گیاهان، CTAB (Doyle and Doyle, 1990) و فنول-کلروفرم (Blomster *et al*., 1999)، انجام گرفت، باوجودی که نتایج حاصل از روش CTAB در مقایسه با

روش فنول-کلروفرم قابل‌توجه‌تر بودند اما DNA استخراجی حاصله از این روش نیز از کیفیت و کمیت مطلوبی برخوردار نبود؛ بنابراین در این مطالعه با ایجاد تغییرات قابل‌توجهی درروش CTAB از قبیل تغییر نسبت حجم بافر استخراج به نمونه، افزایش غلظتEDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid)، بتا-مرکاپتواتانول و افزودن دو ماده PVP(Poly vinyl pyrrolidone) و سارکوسیل به بافر استخراج و تغییر در مراحل شستشو DNA جهت حذف بیشتر ناخالصی‌ها و همچنین حذف ماده پرهزینه نیتروژن مایع جهت خرد کردن نمونه‌ها، قادر به جداسازی ایمن، ارزان DNA باکیفیت و کمیت مطلوب از گونه‌های مختلف ماکرو جلبکی جهت مطالعات مولکولی از قبیل شناسایی مولکولی از طریق تکثیر و بارکدینگ ژن tufA شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌های ماکرو جلبکی سبز، قهوه‌ای و قرمز شامل گونه‌های *Ulva lactuca*، *Ulva clathrata*، *Iyengaria stellate*، *Acanthophora specifera*، *Padina gymospora*، *Hypnea Valentia* جهت استخراج DNA از مناطق جزرومدی سواحل بندرعباس، جزایر قشم و هرمز در دی و بهمن‌ماه سال ۱۳۹۳ در زمان حداکثر جزر جمع‌آوری شدند (جدول ۱). جلبک‌های جمع‌آوری‌شده جهت حذف ذرات شن و ماسه با آب دریا شستشو شده و در کیسه‌های پلاستیکی نام‌گذاری شده حاوی آب دریا جهت جلوگیری از تبخیر قرار داده شدند و درون یونولیت حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه نمونه‌ها مجدد جهت حذف اپی‌فیت‌ها با آب دریا به‌دقت شسته شدند. مقداری از هر نمونه جهت تهیه شیت هر باریومی و شناسایی مرفولوژیکی جدا گردید و باقی‌مانده نمونه جهت آنالیزهای مولکولی در کیسه‌های زیپ کیپ نام‌گذاری شده حاوی سیلیکاژل جهت رطوبت‌گیری قرار گرفتند و در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. شناسایی نمونه‌ها بر اساس خصوصیات مرفولوژی کی و سلولی توسط کلید شناسایی معتبر (Lawson and John, 1987) انجام شد و شیت‌های هرباریومی تهیه‌شده پس از نام‌گذاری و کدگذاری در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان نگهداری شدند.

جدول ۱: گونه‌های مختلف ماکرو جلبکی جمع‌آوری‌شده از مناطق ساحلی تنگه هرمز با ذکر نام و مختصات دقیق جغرافیایی محل جمع‌آوری.

گونه	منطقه	مختصات مکانی
Ulva clathrata	بندرعباس	56°26'E/27°17'N
Ulva lactuca	جزیره قشم	26°55'N56°05'E
Acanthophora specifera	جزیره قشم	26°55'N56°05'E
Hypnea valentia	بندرعباس	54°22'E/27°11N
a-Padina gymospor	جزیره هرمز	56°28'E/27°04'N
Iyengaria stellate	جزیره قشم	/26°55'N56°05'E

جهت استخراج DNA به روش فنول-کلروفرم از هر نمونه خشک و فریز شده ۵۰ میلی‌گرم جدا و در میکرو تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی ۸۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج (تریس ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA۵۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی‌مولار، SDS ۶ درصد) ریخته شد. نمونه‌ها با قیچی نوک باریک تا حد پودر شدن خرد و پس از اضافه کردن ۲ میکرولیتر پروتئین از K به هر میکروتیوب، نمونه‌ها در ترمومیکسر با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل ۲ ساعت با چرخش‌های مقطعی انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون ۶۰۰ میکرو لیتر فنول: کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل به نسبت ۱:۲۴:۲۵ به هر میکرو تیوب اضافه و پس از ۳۰ ثانیه ورتکس، به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ شدند. پس از سانترفیوژ سه فاز ایجاد که فاز رویی جدا و در میکرو

تیوب جدید ریخته شد و مجدد به هر میکروتیوب دومرتبه ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه، ورتکس و سانترفیوژ مانند مرحله بالا انجام شد. جهت رسوب DNA، ۲/۵ حجم اتانول ۱۰۰ درصد سرد و ۱/۱۰ حجم سدیم استات ۳ مولار (PH:۵/۲) به هر نمونه اضافه و به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. نمونه‌ها جهت جمع‌آوری DNA بعد از انکوبه شدن، به مدت ۱۵ دقیقه و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ شدند. پلیت‌های DNA ایجادشده با اتانول ۷۰ درصد شستشو و پس از خشک شدن در دمای اتاق، در ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شدند (Blomster *et al.*, 1999).

جهت استخراج DNA به روش CTAB نمونه‌های خشک و فریز شده توسط نیتروژن مایع در هاون به‌خوبی پودر شدند، سپس از هر نمونه ۵۰ میلی‌گرم جدا کرده و در میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری حاوی ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (CTAB ۲ درصد، کلرید سدیم ۱/۴ مولار، تریس ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۲۰ میلی‌مولار) ریخته و در ترمومیکسر ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از انکوباسیون به نمونه‌ها ۶۰۰ میکرو لیتر کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) افزوده و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه جهت جداسازی فازها از یکدیگر سانترفیوژ شدند. پس از جداسازی فاز رویی حاوی DNA به میکرو تیوب‌های جدید حدود ۰/۷ حجم نمونه، ایزوپروپانول سرد به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۳ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ شدند. فاز رویی دور ریخته شد و پلیت‌های ایجاد شده دومرتبه با ۵۰۰ میکرو لیتر اتانول ۷۰ درصد شسته شدند. پس از شستشو نمونه‌ها جهت حذف کامل اتانول در دمای اتاق قرار گرفتند و سپس پلیت‌ها در ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شدند (Doyle and Doyle, 1990).

جهن استخراج DNA به روش CTAB تغییریافته ۵۰ میلی‌گرم از هر نمونه خشک و فریز شده در میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی ۷۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج (CTAB ۲ درصد، کلرید سدیم ۱/۴ مولار، تریس ۱۰۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میلی‌مولار EDTA، سارکوسیل ۱ درصد و PVP ۱ درصد) قرار داده شد و با قیچی کاملاً خرد گردیدند. به هر نمونه ۱۲ میکرو لیتر بتامرکاپتواتانول و ۵ میکرو لیتر پروتئین از K اضافه و جهت انکوباسیون به مدت ۳ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با چرخش‌های مقطعی در ترمومیکسر قرار گرفتند. پس از انکوباسیون و پایین آمدن دما، به هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل (۲۴:۱) اضافه و پس از ورتکس کردن جهت جداسازی فازها، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ شدند که فاز رویی جدا و به میکروتیوب‌های جدید منتقل شد و مراحل بالا جهت جداسازی بهتر DNA دو مرتبه تکرار می‌گردد. به نمونه‌ها ۵۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانول سرد جهت رسوب DNA افزوده و به مدت ۱۸-۱۵ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از انکوباسیون نمونه‌ها ۱۲ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ شدند. برای شستشو DNA ابتدا به هر نمونه ۲۵۰ میکرولیتر بافر شست‌وشو ۱ (استات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار و الکل ۷۶ درصد) اضافه و بعد از ۲۰ دقیقه ۲۵۰ میکرو لیتر بافر شستشو ۲ (استات آمونیوم ۱۷ میلی‌مولار و الکل ۷۶ درصد) به نمونه‌ها افزوده و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانترفیوژ شدند. نمونه‌ها جهت شستشو بهتر مجدداً با الکل ۷۰ درصد شستشو و سانترفیوژ شدند و سپس در دمای اتاق جهت حذف کامل اتانول قرار گرفتند. پلیت‌های ایجادشده در ۱۰۰-۷۰ میکرو لیتر آب مقطر استریل حل گردیدند و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده: میزان DNA استخراج‌شده توسط نور UV در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorf 91300) اندازه‌گیری شد. میزان خلوص و میزان آلودگی به ترکیبات پلی‌ساکاریدی DNA به ترتیب توسط بررسی نسبت میزان جذب در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر به طول‌موج‌های ۲۸۰ نانومتر (۲۶۰/۲۸۰) و ۲۳۰ نانومتر (۲۶۰/۲۳۰) تعیین شد. همچنین برای تعین کیفیت و کمیت DNA، ۳ میکرو لیتر از هریک از نمونه‌های DNA استخراج‌شده به همراه DNA فلورسنت (Smobio DL5000) به چاهک‌های ژل ۱ درصد آگارز منتقل و سپس در دستگاه الکتروفورزافقی (Applex 61300) با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۹۰ دقیقه ران شدند. پس از اتمام الکتروفورز، باندهای ایجادشده در دستگاه ژل داکیومنت (Vilber lourmat 7830) مشاهده شدند.

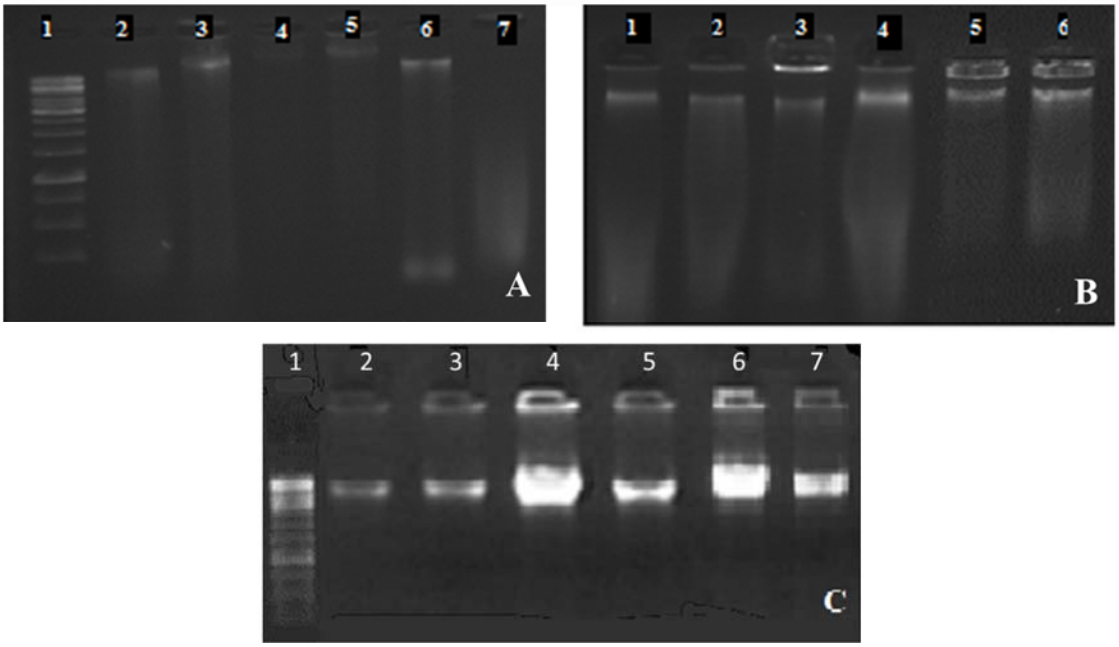
جهت انجام PCR ژن DNA tufA ژنومی استخراج‌شده به روش CTAB تغییریافته این مقاله، به‌عنوان الگو جهت تکثیر ژن کلروپلاستی tufA توسط پرایمرهای tufGF (5'-GGNGCNGCNCAAATGGAYGG-3') و tufAR (5'-CCTTNCGAATMGCRAAWCGC-3') استفاده

شد. واکنش‌دهنده‌های PCR شامل ۲ میکرو لیتر DNA الگو (۲۵ نانوگرم)، ۵ میکرو لیتر بافر ۵,PCR۱۰x میکرو لیتر ۴dNTPs میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرهای رفت‌وبرگشت میلی‌مول ۱۰، ۰/۲ میکرولیترآنزیم DNA پلی‌مراز Taq می‌باشند که توسط آب مقطر به حجم کلی ۵۰ میکرو لیتر رسانیده شد. واکنش PCR به‌صورت واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد چهار دقیقه، ۳۸ سیکل: ۱ دقیقه واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و درنهایت ۶ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت گسترش نهایی، در دستگاه ترموسیکر (Eppendorf 5341) انجام شد. جهت بررسی کمی و کیفی محصولات PCR از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد و رنگ آمیزی با DNA فلورسنت استفاده شد.

داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SPSS (۱۹,۰ ویرایش) بر اساس واریانس ANOVA (یک‌طرفه) مورد تجزیه قرار گرفتند و نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری $p\leq ۰/۰۵$ با یکدیگر مقایسه شدند. قابل‌ذکر است کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و نتایج به‌صورت میانگین سه تکرار در نظر گرفته شدند.

نتایج

سنجش کمی و کیفی DNA حاصل از نمونه‌های خشک‌شده گونه‌های مختلف ماکرو جلبکی بر اساس سه روش به‌کاربرده شده توسط الکتروفورز ژل اگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتر آنالیز و نتایج در جدول ۲ و شکل ۱ آورده شده‌اند. در سنجش کیفیت DNA های استخراجی سه روش مذکور توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد، نمونه‌های DNA حاصل از روش CTAB تغییریافته باندهای واضح و بدون اسمیری را نشان دادند (شکل C1) درحالی‌که نمونه‌های DNA حاصل از دو روش دیگر باندهای واضح و مشخصی را نشان ندادند (شکل ۱)، به‌طوری‌که درروش فنول-کلروفرم (Blomster *et al*.,1999) بیشتر نمونه‌ها به علت عدم استخراج DNA کافی و مطلوب هیچ باندی را نشان ندادند و دیگر نمونه‌ها نیز باندهای بسیار ضعیف و دارای اسمیر زیاد را نشان دادند که ناشی از استخراج DNA بسیار کم و به‌شدت آلوده از نمونه‌ها است (شکل ۱A). درروش CTAB (Doyle و Doyle ۱۹۹۰) باوجودی که همه نمونه‌ها باندهای DNA بر روی ژل آگارز نشان دادند اما باندها کمرنگ و دارای اسمیر بودند که نشان‌دهنده عدم حذف ترکیبات پلی‌ساکاریدی و فنولی از نمونه‌ها است (شکل ۱B).



شکل ۱: الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد DNA های استخراجی از نمونه‌های ماکرو جلبکی،

A) استخراج به روش Blomster و همکاران (۱۹۹۹): (چاهک ۱: مارکر ۱ کیلو جفت باز، ۲: *Iyengaria stellata*، ۳: *Padina pavonia*، ۴: *Ulva lactuca*، ۵: *Ulva clahtrata*، ۶: *Acanthophora specifera*، ۷: *Hypnea valentia*)، B) استخراج DNA به روش Doyle و Doyle (۱۹۹۰): (چاهک ۱: *P. pavonia*، ۲: *I. stellata*، ۳: *U.lactuca*، ۴: *A. specifera*، ۵: *H.valentia*، ۶: *U. clathrate*)C: استخراج به روش CTAB تغییریافته: (چاهک ۱: مارکر ۱ کیلو جفت باز ۲: *U. lactuca*، ۳: *P. pavonia*، ۴: *H. valentia*، ۵: *U. clathrata*، ۶: *I. stellata*، ۷: *A. specifera*)

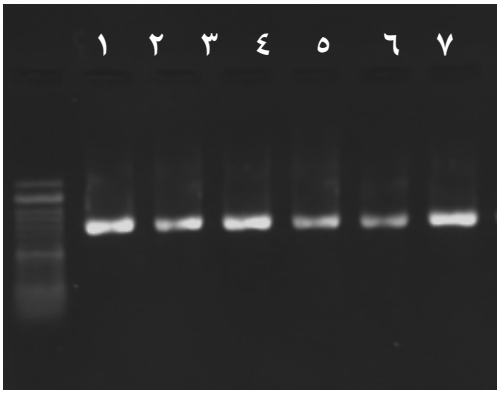
سنجش کمی و کیفی DNA های استخراج‌شده توسط اسپکتروفتومتر نشان دادند، بیشترین میزان DNA به‌دست‌آمده از هرگونه توسط روش CTAB تغییریافته است که بین ۶/۵–۸ میکروگرم بر میلی‌گرم ($ug\ mg^{-1}$) متغیر است که با میزان DNA به‌دست‌آمده توسط دو روش دیگر اختلاف معنی‌داری را نشان داد (جدول ۲). به‌طورکلی در هرگونه بیشترین میزان DNA به‌دست‌آمده مربوط به روش CTAB تغییریافته است و کمترین آن مربوط به روش فنول–کلروفرم است که این میزان DNA برای آنالیزهای مولکولی مانند آنالیزهای برشی که نیاز به میزان بالایی DNA دارند، کافی است (Coyer *et al.*, 1995). نسبت‌های جذب نوری نانومتر ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ مربوط به اسپکتروفتومتری DNAاستخراج‌شده به روش CTAB تغییریافته به ترتیب ۱/۷–۱/۸۴ و بیشتر از ۲ را نشان دادند که نشان‌دهنده عاری بودن DNA از ترکیبات پروتئینی و پلی‌فنولی/ پلی‌ساکاریدی می‌باشند (جدول ۲). با وجودی که نسبت‌های جذب نوری درروش CTAB تغییریافته اختلاف معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۵$) را با دو جذب نوری اندازه‌گیری شده مربوط به دو روش دیگر نشان دادند ولی قابل‌ذکر است که نتایج به‌دست‌آمده درروش CTAB (Doyle and Doyle, 1990) از روش فنول–کلروفرمی بهتر می‌باشند و در برخی گونه‌ها نیز اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده از نمونه‌های خشک‌شده گونه‌های مختلف ماکرو جلبکی بر اساس سه روش استخراج DNA.

گونه ماکرو جلبکی	روش استخراج	میزان DNA (میکروگرم بر میکرو لیتر)	نسبت ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر	نسبت ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر
Ulva lactuca	Blomster	۰/۷^{a}	۱/۱۵^{a}	۰/۹^{a}
	Doyle and Doyle	۱/۶۲^{b}	۱/۳۲^{b}	۱/۱^{a}
	CTAB تغییریافته	۶/۶^{c}	۱/۸۲^{c}	۲/۲^{b}
Ulva clathrata	Blomster	۰/۹^{a}	۱/۲^{a}	۱^{a}
	Doyle and Doyle	۱/۲۵^{a}	۱/۵^{b}	۱/۲^{a}
	CTAB تغییریافته	۷/۱^{b}	۱/۷۵^{c}	۲/۳^{b}
Padina gymosphora	Blomster	۱^{a}	۱/۳^{a}	۰/۹۹^{a}
	Doyle and Doyle	۱/۸۴^{b}	۱/۹^{b}	۱/۶^{b}
	CTAB تغییریافته	۶/۷۵^{c}	۱/۸^{b}	۲/۸^{c}
Iyengaria stellata	Blomster	۱/۱۲^{a}	۱/۴۱^{a}	۰/۵۳^{a}
	Doyle and Doyle	۱/۴^{b}	۱/۵^{a}	۱/۰۸^{b}
	CTAB تغییریافته	۷/۶۵^{c}	۱/۸۴^{b}	۲/۵^{c}
Hypnea valentia	Blomster	۰/۸۷^{a}	۱^{a}	۰/۴۳^{a}
	Doyle and Doyle	۱/۵^{a}	۱/۳^{b}	۱/۱۵^{b}
	CTAB تغییریافته	۸/۵^{b}	۱/۷۱^{c}	۳^{c}
Acanthophora specifera	Blomster	۱/۱^{a}	۱/۳۶^{a}	۰/۷۲^{a}
	Doyle and Doyle	۱/۹^{b}	۱/۱۸^{b}	۱/۲۹^{a}
	CTAB تغییریافته	۷/۲^{c}	۱/۷۶^{c}	۲/۹^{b}

اعداد نمایش داده‌شده با حروف متفاوت در بین ردیف‌های هر ستون در هرگونه دارای اختلاف معنی‌دار در سطح P≤۰/۰۵ توسط آزمون توکی هستند.

جهت اطمینان از DNA استخراجی به روش CTAB تغییریافته، PCR ژن tufA انجام شد. محصولات PCR بعد از الکتروفورز ژل آگارز باندهای بسیار واضحی را نشان دادند (شکل ۲). نتایج نشان دادند DNA حاصل از روش CTAB تغییریافته در این مطالعه جهت آنالیز مولکولی نمونه‌های خشک‌شده و تازه گونه‌های مختلف ماکرو جلبکی بسیار مناسب است.



شکل ۲: الکتروفورز ژل آگارز نمونه‌های DNA گونه‌های مختلف ماکرو جلبکی استخراج‌شده به روش CTAB تغییریافته توسط PCR ژن tufa. چاهک ۱: مارکر DNA ۵۰bp، چاهک ۲: Iyengaria stellata، ۳: Padina pavonia، ۴: Ulva lactuca ۵:Ulva clahtrata، ۶: Acanthophora specifera، ۷: Hypnea Valentia.

بحث و نتیجه‌گیری

آنالیز ژنتیک مولکولی مانند انگشت‌نگاری DNA، توالی یابی و ... نیاز به DNA با وزن مولکولی و کیفیت بالا دارد (Lutz *et al*., 2011). اگرچه در نگاه کلی استخراج DNA نسبتاً ساده به نظر می‌رسد اما استخراج DNA باکیفیت و خالص زمانی مشکل می‌گردد که استخراج از بافت‌های خشک و یا بالغ گیاه موردنظر باشد (Michiels *et al*., 2003). در بافت‌های بالغ به علت وجود دیواره سلولی ضخیم و محتوای بالای متابولیت‌های ثانویه و در نمونه‌های خشک‌شده نیز به علت احتمال بالای دژنره شدن قسمتی از DNA، استخراج DNA عموماً چالش‌برانگیز است (Zhang *et al*., 2013). استخراج DNA ژنومی و سپس انجام واکنش PCR جهت آنالیزهای مولکولی در گونه‌های مختلف ماکروجلبکی به علت داشتن متابولیت‌های ثانویه فراوان (پلی‌فنول‌ها، پلی‌ساکاریدها و ...) و همچنین عدم در دسترس بودن نمونه‌های تازه و جوان، معمولاً مشکل است؛ بنابراین روشی جهت استخراج DNA باکیفیت و کمیت بالا نیاز است که میزان اتلاف زمان، هزینه و انرژی در استخراج DNA را به حداقل برساند. در این مطالعه علاوه بر مقایسه دو روش متداول استخراج DNA، CTAB (Doyle and Doyle, 1990) و فنول-کلروفرم (Blomster *et al*., 1999)، روشی تغییریافته بر اساس CTAB جهت استخراج DNA باکیفیت و کمیت بالا از گونه‌های مختلفی ماکروجلبکی تازه و خشک‌شده معرفی‌شده است. همان‌طور که نتایج نشان دادند DNA استخراجی توسط روش پیشنهادی این مقاله که بر پایه روش CTAB است، از کیفیت و کمیت مطلوب‌تری برخوردار بودند. CTAB درواقع دترژنت کاتیونی است که سبب گسیختن سلول‌ها و حذف آلودگی‌های پروتئینی و لیپیدی در محلول می‌شود و همچنین در شرایط غلظت بالای نمک، CTAB به پلی‌ساکاریدها متصل می‌شود و آن‌ها را از محلول جدا می‌کند؛ بنابراین DNA استخراجی حاصل از بافرهای CTAB نسبت به بافر بر پایه SDS، از کیفیت مناسب‌تری برخوردار بودند که با نتایج Li و همکاران (۲۰۰۷) که روش CTAB را به‌عنوان روشی کارآمد در استخراج DNA از برگ‌های بالغ گل آفتابگردان معرفی کردند کاملاً مطابقت دارد. در روش‌های استخراج DNA باکیفیت بالا از گیاهان جهت خرد کردن نم. نه‌ها و تخریب دیواره سلولی و هسته معمولاً یکی از روش‌های نیتروژن مایع، سرد-خشک کردن (freeze-drying) و یا هضم آنزیمی مورداستفاده قرار می‌گیرد (Chakraborti *et al*., 2006; Arbi *et al*., 2009; Biswas and Biswas, 2011) که اخیراً جهت صرفه‌جویی در هزینه سعی بر آن است که با جایگزینی روشی کم‌هزینه کاربرد روش‌های مذکور محدود گردد (Agbagwa *et al*., 2012). در این مطالعه نمونه‌ها در بافر استخراج توسط قیچی خرد شدند که نتایج نشان دادند با تغییرات در برخی از غلظت‌های مواد موجود در بافر می‌توان استفاده از ماده پرهزینه نیتروژن مایع جهت خرد کردن نمونه را حذف و به‌خوبی نمونه‌ها را پودر نمود.

در این مطالعه میزان حجم بافر استخراجی نسبت به روش استاندارد CTAB به ۷۰۰ میکرو لیتر تغییر پیدا کرد که بر روند استخراج DNA اثر مطلوبی را نشان داد. مطالعات نشان دادند افزایش میزان حجم بافر استخراج نسبت به نمونه پودر شده در حذف بهتر ترکیبات پلی‌ساکاریدی از محلول کمک می‌کند (Agbagwa *et al*., 2012)، همچنین Puchooa (۲۰۰۴) گزارش داد جهت استخراج DNA خالص‌تر بهتر است نسبت بافر به نمونه گیاهی دارای ترکیبات فنولی بالا، به نسبت حجمی/وزنی (v/w) ۴:۱ در نظر گرفته شود.

در بافر استخراجی تغییریافته این مطالعه، میزان غلظت EDTA و بتامرکاپتواتانول افزایش و دو ماده PVP و سارکوسیل به بافر افزوده شدند. سارکوسیل دترژنتی است که سبب تخریب بهتر غشا پلاسمایی می‌شود و در بهتر شکستن سلول‌ها و آزاد شدن DNA ژنومی بسیار مؤثر است (Schlager *et al*., 2012)، ازآنجاکه در این مطالعه استفاده از نیتروژن مایع جهت خرد کردن نمونه‌ها حذف‌شده است استفاده از سارکوسیل در بافر استخراج سبب لیز بهتر سلولی می‌شود و همچنین در حذف بهتر ترکیبات پروتئینی بسیار مؤثر است. در مطالعات نیز نشان داده‌شده است که استفاده از ماده دترژنت سارکوسیل سبب استخراج DNA باکیفیت بالاتر از نمونه‌های *Atemisia capillaris* شده است (Hasan *et al*., 2009). پودر کردن نمونه‌ها و سپس غوطه‌ور کردن آن‌ها در بافر استخراج سبب تخریب سلول‌های حاوی ترکیبات پلی‌فنولی و اندامک‌ها می‌شوند به همین علت است که درروند استخراج DNA در برخی گونه‌های گیاهی، محلول استخراج حاوی نمونه به علت اکسید شدن ترکیبات فنولی به ترکیبات کوئینونی، قهوه‌ای‌رنگ می‌شود که این ترکیبات اکسیدکننده قوی سبب تخریب DNA و پروتئین می‌شوند (Katterman and Shattuck, 1983) که با افزایش میزان بازدارنده فنول‌اکسیداز مانند بتامرکاپتواتانول در بافر استخراج به‌طور مؤثری از قهوه‌ای شدن می‌توان جلوگیری می‌کند (Howland *et al*., 1991; Paterson *et al*., 1993). همچنین تحقیقات نشان داده‌اند افزایش غلظت بتا مرکاپتواتانول سبب حذف بهتر ترکیبات فنولی می‌شود (Suman *et al*., 1999)، در این تحقیق نیز با افزایش میزان غلظت بتامرکاپتواتانول مانع از اکسید شدن و قهوه‌ای شدن محلول نمونه شدیم و حذف ترکیبات فنولینیز بهتر صورت گرفت. استفاده از غلظت کلریدسدیم بالای M ۰/۵ همراه با CTAB سبب حذف بهتر ترکیبات پلی‌ساکاریدی هنگام استخراج DNA از نمونه‌ها می‌شود (Moreira and Oliveira،Paterson *et al*., 1993; 2011) که غلظت کلریدسدیم به‌کاررفته در بافر استخراج DNA گونه‌های مختلف گیاهی بین ۶ تا ۰/۷ مول متغیر است (Aljanabi *et al*., 1999). در این روش با استفاده از غلظت بالای کلریدسدیم (۱/۵ مولار) در بافر استخراج سبب بهبود کیفیت DNA استخراجی شد. ازآنجاکه PVP به جدا شدن پلی‌ساکاریدها از اسیدهای نوکلئیک بسیار کمک می‌کند (Zhang and Stewart, 2000)؛ بنابراین افزودن PVP به محلول پایه CTAB در افزایش کیفیت DNA استخراج‌شده بسیار مؤثر است. در کلیه مراحل استخراج و پس از استخراج، DNA باید از تخریب آنزیم‌های نوکلئازها محافظت شود که بدین منظور EDTA موجود در بافر استخراج بااتصال به یون‌های منیزیمی که به‌عنوان کو فاکتور آنزیم‌های نوکلئازی عمل می‌کنند، سبب غیرفعال شدن تمامی نوکلئازها می‌شوند (Richard and Rogers, 1993; Semagn *et al*., 2006). ژن پلاستدی tufA عموماً به‌عنوان مارکری جهت بارکدینگ و شناسایی گونه‌های خانواده مختلف گیاهی ازجمله ماکرو جلبک‌ها به‌کاربرده می‌شود. متابولیت‌های ثانویه موجود در DNA استخراج‌شده علاوه بر تخریب DNA سبب غیرفعال سازی آنزیم‌های برشی و Taq پلی‌مراز می‌شوند، همچنین این ترکیبات هنگام لیز سلولی به DNA متصل می‌شوند (Shivji *et al*., 1992) بنابراین جهت بارکدینگ و آنالیزهای مولکولی، به DNA استخراج‌شده‌ای باکیفیت بالا و بدون آلودگی جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، تکثیر و توالی یابی ژن موردنظر نیاز است که همان‌طور که نتایج نشان دادند تکثیر ژن موردنظر دلیلی بر کیفیت مناسب DNA استخراجی است. در این مطالعه روشی سریع، کم‌هزینه و آسان جهت استخراج DNAمطلوب از ماکرو جلبک‌ها دارای ترکیبات فنولی و پلی‌ساکاریدی بالا، با حذف نیتروژن مایع جهت خرد کردن نمونه‌ها و ایجاد چند تغییر اساسی درروش استاندارد استخراج DNA، Doyle and Doyle (۱۹۹۰) بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده سطح کیفی و کمی مطلوب DNA های استخراجی به روش CTAB تغییریافته نسبت به دو روش دیگر است که این روش جهت استخراج DNA اکثریت گونه‌های ماکرو جلبکی و گیاهی دارای ترکیبات پلی‌ساکاریدی بالا کاربرد دارد.

سپاسگزاری

در پایان از تمامی کارشناسان سه مرکز دانشگاه بوعلی سینا گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان بندرعباس و مرکز تحقیقات کشاورزی بندرعباس به‌خصوص آقای دکتر محمدمهدی فقیهی که ما را در انجام این طرح تحقیق یاری و مساعدت کردند کمال تشکر راداریم.

منابع

Agbagwa, I. O., Datta, S., Patil, P. G., Singh, P. and Nadarajan, N., **2012**. A protocol for highquality genomic DNA extraction from legumes. Genetic Molecular Research, 11 (4): 4632–4639.

Aljanabi, S. M., Forget, L. and Dookun, A., 1999. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol free sugarcane DNA. Plant Molecular Biology Reporter, 17: 1–8.

Arbi, G., Naceur, B., Chokri, M. and Mohamed, B., 2009. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from *Alliumroseum* L. (Alliaceae). African Journal of Biotechnology, 8: 4020–4024.

Biswas, K. and Biswas, R., 2011. A modified method to isolate genomic DNA from plants without liquid nitrogen. Current Science, 100: 1622–1624.

Blomster, J., Maggs, C. A. and Stanhope, M. J., 1999. Extensive intraspecific morphological variation in *Enteromorpha muscoides* (Chlorophyta) revealed by molecular analysis. Journal of Phycology, 35: 575–586.

Chakraborti, D., Sarkar, A., Gupta, S. and Das, S., 2006. Small and large scale genomic DNA isolation protocol for chickpea (Cicer arietinum L.), suitable for molecular marker and transgenic analyses. African Journal of Biotechnology, 5: 585-589.

Coyer, J. A., Steller, D. L. and Alberte, R. S., 1995. A field compatible method for extraction of fingerprint-quality DNA from *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae). Journal of Phycologia, 1:177–80.

Do, N. and Adams, R. P., 1991. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. Bio Techniques, 10 (2): 162–166.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.

Edward, K., Johnstone, C. and Thompson, C., 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acid Research, 19: 1349.

Hasan, Z. S. M., Shafie, B. M. S. and Shah, R. M., 2009. Genomic DNA Extraction Methods from Wormwood Capillary (*Artemisia capillaris*) for PCR-RAPD Studies. New York Science Journal, 2 (1): 13-21.

Howland, D. E., Oliver, R. P. and Davy, A. J., 1991. A method of extraction on DNA from birch. Plant Molecular Biology Report, 9: 340-344.

Huang, J. C., Ge, X. J. and Sun, M., 2000. Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA. Biotechniques, 28: 432–434.

Katterman, F. R. and Shattuck, V. I., 1983. An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins. Preparative Biochemistry, 13 (4): 347–359.

Lawson, G. W. and John, D. M., 1987. The marine algae and coastal environment of tropical West Africa, Second edition, Berlin, Germany.

Li, J. T., Yang, J., Chen, D. C., Zhang, X. L. and Tang, Z. S., 2007. An optimized mini-preparation methods to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower. Genetic Molecular Research, 6: 1064-1071.

Lordan, S., Ross, R. P. and Stanton, C., 2011. Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases. Marine Drugs, 9: 1056–1100.

Lutz, K., Wang, W., Zdepski, A. and Michael T. P., 2011. Isolation and analysis of high quality nuclear DNA with reduced organellar DNA for plant genome sequencing and resequencing. BMC Biotechnology, 11:54.

Michiels, A., Ende, W., Tucker, M., Van Riet L. and Van Laere A., 2003. Extraction of highquality genomic DNA from latex-containing plants. Analytical Biochemestery, 315 (1): 85-89.

Moreira, P. A and Oliveira, D. A., 2011. Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. Genet Molecular Research, 10 (1): 353-358.

Pandey, R. N., Adams, R. P. and Flournoy, L. E., 1996. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. Plant Molecular Biology Reporter, 14(1): 17–22.

Paterson, A. H., Brubaker, C. L. and Wendel, J. F., 1993. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis.Plant Molecular Biology Reporter, 11 (2): 122–127.

Porebski, S., Grant, B. and Boum, B. R., 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter, 15: 8-15.

Puchooa, D., 2004. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). African Journal of Biotechnology, 3: 253–255.

Richard, M. J. and Rogers, S. J., 1993. Plant DNA isolation using CTAB. In Current Protocols in Molecular Biologyeds. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K., USA: John Wiley and Sons, Supplement, pp.22.

Sastry, V. M. V. S. and Rao, G. R. K., 1994. Antibacterial substances from marine algae: successive extraction using benzene, chloroform and methanol. Botanica Marina, 37: 357-360.

Semagn, K., Bjornstad, A. and Ndjiondjop, M. N., 2006. An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology, 5 (25): 2540-2568.

Schlager, B., Straessle, A. and Hafen, E., 2012. Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression. BMC Biotechnology, 12: 95.

Shivji, M. S., Rogers, S. O. and Stanhope, M. J., 1992. Rapid isolation of high molecular weight DNA from marine macroalgae. Marine Ecology Progress, 84: 197-203.

Suman, P. S. K., Ajit, K. S., Darokar, M. P. and Sushil, K., 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Molecular Biology Reporter, 17: 1–7.

Tan, S. C. and Yiap, B. C., 2009. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 1-10.

Xin, Z. and Chen, J., 2006. DNA sequencing II: optimizing preparation and cleanup, in Extraction of Genomic DNA from Plant Tissue ed. Sudbury K. J., Jones and Bartlett, Boston, Mass, pp. 47–59.

Zhang, J. and Stewart, J. M., 2000. Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA. Journal of Cotton Science, 4 (3): 193–201.

Zhang, L., Wang, B., Pan, L. and Peng, J., 2013. Recycling isolation of plant DNA, a novel method. Journal of Genetic and Genomics, 40: 45-54.