بررسی کارآیی چهار روش استخراج DNA از زنبورعسل کوچک *Apis florea* (Hymenoptera: Apidae) جهت انجام آزمایشات ژنتیکی

داود نجف زاده[1*] و سمانه لله گانی[2]

۱- *نویسنده مسوول: دانشجوی سابق کارشناسی ارشد حشره شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران (mokandes@yahoo.com)

۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد حشره شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۸/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

استخراج DNA اولین مرحله در انجام آزمایشات ژنتیکی است، لذا کیفیت و کمیت مناسب DNA استخراج شده در مطالعات مولکولی امری بسیار ضروری می باشد. از این رو دستیابی به روش یا روش‌هایی که به سهولت استخراج DNA از زنبورعسل کوچک *Apis florea* Fabricius که یکی از دو گونه زنبورعسل موجود در ایران است کمک کند، می‌تواند حائز اهمیت باشد. این گونه زنبورعسل به دلیل پراکندگی گسترده و همچنین ایفای نقش مستقیم در گرده افشانی گونه‌های زراعی، باغی و جنگلی از اهمیت مطالعاتی زیادی برخوردار است. به همین دلیل در این مطالعه چهار روش استخراج DNA شامل بهینه نمکی، فنل-کلروفرم، CTAB و CTAB+SDS به منظور گزینش مناسب‌ترین روش استخراج DNA زنبورعسل کوچک مورد ارزیابی و آزمایش قرار گرفت. سپس کیفیت و کمیت DNA استخراجی با استفاده از روش‌های اسپکتوفتومتری و ژل آگارز مورد مقایسه قرار گرفت. با توجه به کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، روش CTAB+SDS برای استخراج DNA از زنبورعسل کوچک قابل توصیه است.

کلید واژه‌ها: استخراج ، ژنتیک، *Apis florea*، PCR

مقدمه

امروزه اهمیت زنبورعسل در گرده‌افشانی گیاهان زراعی، باغی، احیای مراتع و بهبود محیط زیست به حدی شناخته شده و آشکار می باشد که تولید عسل و موم را تحت شعاع قرار می‌دهد. به طورکلی در میوه‌ها و بذرها در مجموع ۱٪ گرده‌افشانی به وسیله باد، ۶٪ گرده‌افشانی به وسیله سایر حشرات و ۹۳٪ گرده‌افشانی تنها توسط زنبورعسل انجام می‌گیرد(Naraghi, 2011). دو گونه زنبور عسل معمولی (نژاد ایرانی) *Apis mellifera meda* Shorikov و زنبورعسل کوچک *Apis florea* F. در ایران وجود دارد (Ruttner et al., 1985). زنبورعسل کوچک برای اولین بار در سال ۱۷۸۷ توسط فابریسیوس[1] بررسی و معرفی گردید. این زنبور با ساختن یک شان در فضای باز زندگی می‌کند. بر خلاف زنبورعسل معمولی، این زنبور در تاریکی فضای کندو، تنه خالی درختان، شکاف سنگ‌ها و ... قادر به زیستن نمی‌باشد (Mossadegh, 2014). زنبورعسل کوچک *A. florea*، از سلسله جانوران، شاخه بندپایان، رده حشرات، راسته بال‌غشائیان ، بالاخانواده Apoidea، خانواده Apidae، زیرخانواده Apinae، قبیله Apini و جنس *Apis* می‌باشد. منطقه انتشار این زنبورعسل در

1 - Fabricius

منطقه غرب آسیا در کشورهایی همانند ایران، عمان، پاکستان، هندوستان، اندونزی وجزیره پاوالان در فیلیپین است. همچنین این زنبور در سال ۱۹۸۶ در خارطوم پایتخت سودان در شمال آفریقا برای اولین بار مشاهده و گزارش گردید. این گونه در قاره آمریکا وجود ندارد (Ruttner, 1988 ; Mossadegh, 2014). این گونه در ایران در مناطق غربی، جنوبی غربی، جنوبی و گاهی اوقات در جنوب شرق کشور نیز پراکندگی دارد (Mossadegh, 2014).

پیشرفت در هر رشته علمی به در دسترس بودن تکنیک‌ها و روش‌های جدید و پیشرفته آن رشته، بستگی دارد. در سال‌های اخیر با پیشرفت رشته ژنتیک در اکثر آزمایشگاه‌های معتبر دنیا آزمایش‌هایی برای جدا کردن بخش ویژه ای از DNA از ژنوم ارگانیسم[1] جهت پی بردن به سکانس[2] و عملکرد آن، انجام می شود (Kreuzer and Adrianne, 2003). ژن‌ها واحدهای اساسی اطلاعات ژنتیکی می‌باشند که اختلال در ساختمان آن‌ها باعث بروز بیماری‌های مختلف ژنتیکی می‌شود. در ضمن در موارد وجود چند شکلی یا پلی مورفیسم[3] اثرات ژن‌ها در تفاوت فنوتیپ در افراد مشاهده شده و جهت بررسی تفاوت‌ها در افراد، ساختمان ژن‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد (Trevor and Julian, 2006).

مباحث مولکولی از اهمیت روزافزونی در علوم زیستی برخوردار هستند و استخراج اسیدهای نوکلئیک اولین و مهمترین نیاز در اجرای تحلیل‌های ژنتیکی مانند تشخیص جهش و پی بردن به توالی و عملکرد بخش ویژه‌ای از ژنوم می‌باشد (Berthomieu and Meyer, 1991) همچنین مهندسی ژنتیک بر اساس اطلاعات ژنتیکی قرار دارد که توسط DNA کد گذاری می‌شود و به شکل ژن‌ها منظم می‌شود. پس لزوم دستیابی به ساختمان DNA در مهندسی ژنتیک موجب شده است که چندین روش مختلف آزمایشگاهی برای استخراج DNA از ژنوم بوجود آید (Watson, 2004).

اولین قدم در مهندسی ژنتیک جداسازی و خالص سازی DNA است. استخراج DNA برای انجام تحقیقات ژنتیک و همین‌طور آزمایشات تشخیصی مختلف حائز اهمیت است (Nicholl, 1996).

DNA را می توان از هر نوع بافتی استخراج کرد ولی در زنبورعسل این مسأله می تواند از قسمت قفسه سینه انجام پذیرد، زیرا در این ناحیه ماهیچه‌های پروازی وجود دارند و همچنین دسترسی به DNA ساده تر صورت می گیرد (Hepburn and Radolf, 2011).

با توجه به محدودیت روش های استخراج که عموماً شامل روش‌های بکار برده شده در آزمایش انجام داده شده است و با در نظر گرفتن این مسئله که امکان آزمون و خطا و تکرار آزمایش جهت هر نمونه برای یافتن جواب مطلوب امکان پذیر نمی‌باشد، یافتن بهترین روش استخراج از نمونه‌ها بسیار مهم می‌باشد (Gari et al, 2006).

اصول کلی استخراج DNA شامل چهار مرحله است (Poljak et al, 1995).

۱- شکستن سلول: از بین بردن دیواره هسته معمولا با استفاده از شوک اسمزی[4] و دترجنت‌های یونی[5]، مانند تریتون[6] یا تریس[7]، صورت می گیرد.

۲- هضم پروتئین‌ها با استفاده از دترجنت‌های یونی، مانند سدیم دودسیل سولفات[8] (SDS) سبب تخریب غشاء سلولی و پروتئین متصل به DNA می‌شود. تیمار آنزیمی (پروتئیناز K) نقش پروتئین‌زدایی دارد. فعالیت بهینه این آنزیم در حضور SDS، در دمای ۵۵ تا ۶۵

1- Organism genome
2 - Sequencing
3 - Polymorphism

4 - Osmotic shock
5- Ionic detergents
6 - Triton
7 - Tris
8 - Sodium dodecyl sulfate

درجه سانتی‌گراد است. در مقابل، آنزیم‌های دیگری مانند DNAse، در همین شرایط دناتوره می‌شوند و ترکیبات متصل‌کننده یونی، مانند اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید[1] (EDTA) با آنزیم نوکلئاز[2]، برای جلوگیری از تجزیه DNA، متصل می‌شوند.

۳- رسوب پروتئین‌ها: در DNA حاصله ناخالصی‌هایی وجود دارد. جهت رسوب پروتئین‌ها از فنل وکلرفرم و یا محلول نمک اشباع استفاده می‌شود.

۴- رسوب دادن DNA: معمولا با استفاده از اتانول مطلق سرد انجام می‌شود.

بسیاری از فرآیندهایی که بر پایه اصول بالا طراحی شده‌اند، زمان‌بر، هزینه‌بر و سمی هستند. بنابراین، استفاده از روشی که سریع، بی‌خطر و مقرون به صرفه بوده و کمیت و کیفیت DNA بدست آمده با آن نیز مطلوب باشد، مورد نیاز است (Kury et al., 1990).

روش‌های مختلفی برای استخراج DNA از زنبورعسل توسط محققین استفاده شده است. روش Chelex با کمی تغییر توسط Delarua et al., (2001) جهت استخراج DNA از قفسه‌سینه زنبورعسل به کار رفته است. این روش همچنین جهت استخراج DNA از پای سوم زنبورعسل مورد استفاده سایر محققین قرار گرفته است (Garnery et al., 1998., Estoup et al. 1995., Strange et al., 2007 ., Frank et al., 2001). روش CTAB توسط Irfan et al. (2006) جهت استخراج DNA از کل بدن زنبورعسل مورد بررسی قرار گرفته است.

با توجه به آنکه نتایج مطالعات قبلی با هم هماهنگ نیست و به نظر می‌رسد که با توجه به مواد مختلف و تفاوت نمونه‌ها نتایج متفاوتی بدست آمده باشد (Poljak et al.,1995) لذا در این تحقیق روش‌های مختلف استخراج DNA بر روی نمونه‌های زنبورعسل کوچک انجام و کارایی آن‌ها با همدیگر مقایسه گردید.

1 - Ethylenediaminetetraacetic acid
2 - Nuclease

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از کلنی‌های زنبورعسل کوچک *A. florea* در استان خوزستان به صورت تصادفی انجام گرفت . ابتدا مناطقی که این گونه در آن استقرار داشت مورد شناسایی قرار گرفت، سپس برای جمع‌آوری از شیشه‌های درب گشاد که حاوی پنبه آغشته به کلرفرم بودند استفاده شد. سپس نمونه ها بلافاصله پس از جمع‌آوری در الکل مطلق و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از قفسه سینه زنبورهای کارگر، پس از جداسازی بال، سر و شکم به صورت زیر انجام شد.

روش بهینه نمکی[3]

این مرحله از آزمایش براساس روش Shouhani et al. (2012) انجام گرفت. ابتدا قفسه سینه زنبور توسط ازت مایع پودر شد و به میکرو تیوب‌های ۵/ ۱میکرولیتری منتقل شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده[4] (۱۰Mm تریس بیس[5]، ۱۰ mM[6] EDTA، ۰/۴۴ M کلرید سدیم) اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۲ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد درون حمام آب گرم قرار گرفته و پس از افزودن ۳۰۰ میکرولیتر NaCl ۵ مولار و سانتریفیوژ نمونه‌ها، فاز رویی جدا و به میکروتیوب جدید منتقل شده و به نمونه‌ها ۱۵۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده شد. پس از سانتریفیوژ و جداسازی فاز رویی ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق سرد و استات سدیم ۳ مولار به نمونه‌ها افزوده شد. سپس نمونه‌های سانتریفیوژ شده با الکل ۷۰ درصد شسته شد به صورتی که رشته‌های رسوب شده DNA در کف میکروتیوب باقی بماند و در نهایت به هر نمونه ۵۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده شد.

روش فنل -کلروفرم[7]

براساس روش Arias and Sheppard, (2005) ابتدا نمونه‌ها توسط ازت مایع در میکروتیوب ۱/۵

3 - Salting out
4 - Lysis buffer
5 - Tris base
6 - mili Molar
7 - Phenol- Chloroform

میکرولیتری پودر شده و ۵۰۰ میکرولیتر بافر جدا کننده (۱۰Mm باز تریس، ۰/۴۳ m ساکارز، ۵ mM $Mgcl_2$، ۱درصد تریتون ۱۰۰X) به هر میکروتیوب اضافه و خوب آن را مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی هر میکروتیوب دور ریخته شد و مراحل آن قدر ادامه یافت تا رسوب سفید رنگ شود. سپس ۱۸۰میکرولیتر بافر TE 1X و ۱۸میکرولیتر SDS۱۰درصد و ۴ میکرولیتر پروتئیناز K[1] اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه در حمام آب گرم قرار گرفت. بعد از این مرحله، هم حجم محلول موجود در میکروتیوب، فنل- کلروفرم به نسبت ۲۴ : ۲۵ اضافه و بعد از سانترفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه محلول رویی را در میکروتیوب جدید منتقل شده و به هر میکروتیوب ۲۰میکرولیتر استات سدیم ۳ مولار و ۵۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق سرد اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در فریزر ۲۰- نگهداری شد. سپس به DNA حاصله در هر میکروتیوب ۵۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده گردید.

روش CTAB[2]

این کار بر اساس روش استخراج Evans et al., (2013) انجام گرفت. در این روش نمونه‌ها درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری توسط ازت مایع پودرشده و ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده (Mm Tris-HCL ۱۰۰، ۱/۴ Mm NaCl، ۲۰ Mm EDTA[3]، ۲٪CTAB) ، ۵۰µg پروتئینازK و ۲ میکرولیتر مرکاپتواتانول ۲٪ به نمونه‌ها اضافه شد. پس از ۱ دقیقه ورتکس[4] کردن، نمونه ها به مدت یک شبانه روز در دمای ۶۵ درجه حمام آب گرم قرار داده شدند. سپس به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد و به نسبت ۲۵:۲۴:۱ از محلول فنل- کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل[5] اضافه گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه نمونه‌ها به آرامی تکان داده شدند و ۲دقیقه برروی یخ قرار گرفتند. پس از سانتریفیوژ نمونه ها در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، محلول رویی به میکروتیوب جدید منتقل گردید و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول[6] سرد و ۵۰میکرولیتر از استات سدیم ۳ مولار به هر کدام از نمونه‌ها اضافه گردید. نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ انجام گردید. رسوب DNA موجود در انتهای هر میکروتیوب با الکل۷۵٪ شستشو داده شد و در نهایت به هرکدام از نمونه‌ها ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد.

روش CTAB+SDS[7]

این کار براساس روش Doyle and Doyle (1987) با تغییراتی انجام گرفت. در این روش پس از خورد کردن نمونه‌ها در میکروتیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری توسط ازت مایع، ۲۰ میکرولیتر از بافر CTAB و ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده SDS به هرکدام از نمونه‌ها اضافه گردید. سپس ۵ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شدند. سپس۵۰۰ میکرولیتر فنل به هر میکروتیوب اضافه گردید و نمونه‌ها ۱۰دقیقه به آرامی تکان داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و فاز بالایی به دورن میکروتیوب جدید منتقل شد و دوباره ۵ ساعت درون دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم قرار داده شدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر فنل به آنها اضافه شد و به آرامی تکان داده شده و دوباره سانتریفیوژ برروی آنها صورت گرفت. سپس ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هرکدام از نمونه‌ها اضافه گردید و ۵ دقیقه به آهستگی تکان داده شده و با حداکثر سرعت سانتریفیوژ شده و فاز رویی به دورن میکروتیوب جدید منتقل گردید. سپس ۲۰

1 - Proteinase
2 - Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
3 -Millimolar
4 - Vortex
5 - Phenol: Chloroform: Isoamyl Alchol
6 - Isopropanol
7 - Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide + Sodium dodecyl sulfate

میکرولیتر اتانول مطلق به نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها به مدت۲۰ دقیقه در فریزر۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، انجام گرفت. سپس با استفاده از سمپلر فاز الکلی جدا شد و ۱۰۰۰ میکرولیتر الکل۷۰٪ به میکروتیوب‌ها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ صورت گرفت (شستشوی نمونه‌ها در این مرحله دوبار صورت گرفت). نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه برروی دستمال قرار گرفته تا خشک شوند و در آخر ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر به هرکدام از نمونه‌ها اضافه شد.

نتایج و بحث

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش‌های اسپکتوفتومتری[1] و الکتروفورز[2] روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. میانگین خلوص DNA (بر اساس نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰) که با چهار روش استخراج شد، در جدول ۱ نشان داده شده است.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های مربوط به بررسی اثر روش استخراجی بر روی تعیین کیفیت DNA نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارها وجود داشت (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد نشان داد که روش CTAB+SDS بهترین روش برای استخراج DNA بود (شکل ۱).

با تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط آزمون آماری دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مشخص شد که روش CTAB+SDS بهترین روش جهت اساس استخراج DNA بود. در نتایج بدست آمده توسط Shouhani et al., (2012) که بر اساس سه روش استخراج DNA بر روی گونه زنبور عسل معمولی (نژاد ایرانی) انجام گردید، روش بهینه نمکی به عنوان روش مناسب جهت استخراج معرفی شده بود. این در صورتی است که نتایج اسپکتوفتومتری و ژل آگارز در آزمایش‌های انجام شده نشان داد که روش CTAB+SDS، با متوسط خلوص ۱/۸۹ ± ۰/۱ نسبت به سه روش دیگر کارآیی بهتر و بیشتری داشت. همچنین این نکته نیز شایان ذکر است که DNA استخراج شده در هر ۴ روش، برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قابل استفاده بود. ولی با توجه به کمیت و کیفیت بالاتر و همچنین با در نظر داشتن میزان هزینه، روش CTAB+SDS مناسب‌تر به نظر می‌رسد و استخراج با این روش آسان‌تر و سریع بوده و DNA حاصل، فاقد بازدارنده‌های PCR بود. زیرا محدوده مورد جذب در روش اسپکتوفتومتری DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به مقدار جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر باید در محدوده ۲-۱/۸ باشد، که این موضوع نشان دهنده‌ی این است که جذب بیشتر توسط اسیدهای نوکلئیک صورت گرفته و کیفیت DNA بدست آمده مطلوب بوده و از خلوص خوبی برخوردار بوده است (Yoghesh and Khan, 2014). نتایج حاصل از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد ، موید نتایج بدست آمده از دستگاه اسپکتوفتومتر می‌باشد (شکل ۲).

نتایج تحقیق جاری نشان داد که ضخامت باندهای حاصله از DNA در طی مراحل استخراج که به صورت دنباله در روی ژل دیده می‌شود به عنوان معیاری برای کیفیت پایین‌تری برای نمونه‌های DNA تلقی می‌گردد. از طرفی دوبار شستشو در روش CTAB+SDS تاثیر به سزایی در کاهش آلودگی پروتئینی می‌تواند داشته باشد. البته روش فنل- کلروفرم هم بر اساس باندهای نشان داده شده می‌تواند روش خوبی باشد، اما به دلیل اینکه فنل یک ماده سرطان‌زا و خطرناک است، بهتر است کمتر مورد استفاده قرار گیرد. همچنین به نظر می‌رسد که روش CTAB+SDS توانایی استخراج با کیفیت و کمیت لازم را دارد. همچنین ایمنی بالای این روش برای پژوهشگران در طی مراحل استخراج باعث قابل توصیه شدن این روش خواهد بود.

1 - Spectrophotometry
2 - Electrophoresis

جدول ۱- میانگین غلظت و خلوص DNA زنبورعسل کوچک *A.florea* بر اساس چهار روش استخراج مختلف

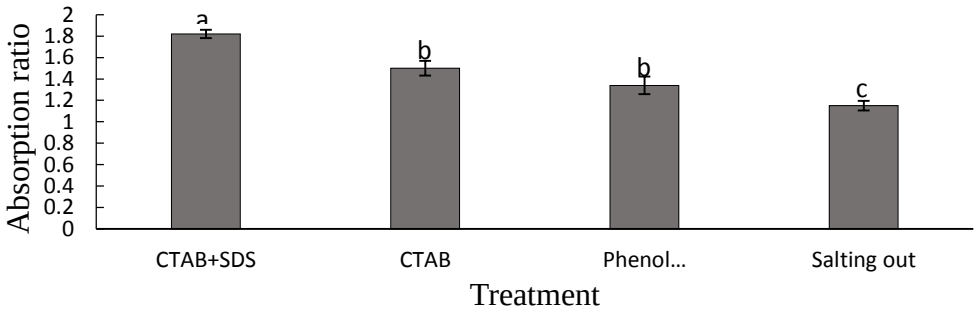
Table 1. Average concentration and purity of DNA of dwarf honeybee *A. florea* based on four different extraction methods

Extraction method	Absorption ratio 260nm/280nm	Concentration DNA(µg/µl)
CTAB+SDS	$1.82 \pm 0.01_a$	210.72 ± 0.03
CTAB	$1.7 \pm 0.02_b$	191.36 ± 0.05
Phenol-choloroform	$1.37 \pm 0.01_b$	158.4 ± 0.04
Salting out	$1.15 \pm 0.01_c$	140.88 ± 0.06

جدول ۲- تجزیه واریانس روش‌های استخراج DNA زنبورعسل کوچک *A.florea*

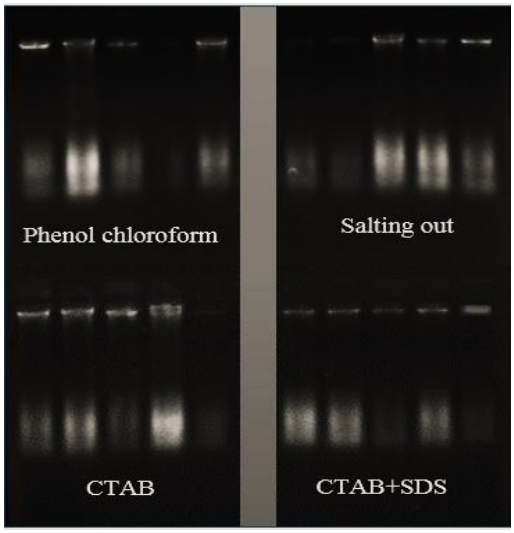
Table 2. Analysis of the DNA extraction methods of dwarf honeybee *A. florea*

Source change	DF	Sum of squares	Mean square	F	Pr>F
Treatment	3	1.234	0.411	22.363	0.000
Error experimental	16	0.295	0.018		
Total	19	1.528			



شکل ۱- مقایسه میزان نسبت جذب DNA زنبورعسل کوچک *A.florea* حاصل از روش اسپکتوفتومتری

Figure 1. The comparsion of DNA absorption ratio of dwarf honeybee *A. florea* by Spectrophotometric method



شکل ۲- ژل آگارز نمونه DNA زنبورعسل کوچک *A.florea* استخراج شده با چهار روش مختلف

Figure 2. DNA sample of dwarf honeybee *A. florea* extracted with 4 different methods on agarose gel

سپاسگزاری

نویسندگان از تمامی اعضای هئیت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان به پاس کمک هایشان تشکر می‌کنند.

REFERENCES

Arias, M.C., and Sheppard, W.S. 2005. Phylogenetic relationships of honeybees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. Molecular Phylogenetic and Evolution, 37 (1): 25-35.

Berthomieu, P., and Meyer, C. 1991. Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR," Plant Molecular Biology, 17 (3): 555-557.

Delarua, P., Galian, J., Serrano, J. and Moritz, R.F.A. 2001. Genetic structure and distinctiveness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. Molecular Ecology, 10: 1733-1742.

Doyle, J.J., and Doyle, L.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.

Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., and Cornuet, J. 1995. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: Hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. Genetics, 140: 679-695.

Evans, D.J., Schwarz, R.S., Chen, Y.P., Budge, G., Cornman, R.S., Delarua, P., Miranda, J., Foret, S., Foster, L., Gauthier, L., Genersch, E., Gisder, S., Jarosch, A., Kucharski, R., Lopez, D., Lun, D.M., Moritz, R., Maleszka, R., Muñoz, I. and Pinto, M.A. 2013. Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. International Bee Research Association. Journal of Apicultural Research, 52 (4):1-53.

Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B. P., Hepburn, H.R., Solignac, M., and Cornuet, J.M. 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. Heredity, 86 (4): 420-430.

Gari, M.A., Abuzenadah, A.M., Chaudhary, A.G., Al-Qahtain, M.H., Al- says, F.M., and Dmanhouri, G. 2006. Pilot study of DNA extraction from archival unstained bone marrow slides: comparison of three rapid methods. African Journal of Biotechnology, 5(6): 532-535.

Garnery, L., Franck, P., Baudry, E., Vautrin, D., Cornuet, J.M., and Solignac, M. 1998. Genetic diversity of the west European honeybee (*Apis mellifera* and *A. M. iberica*). I. Mitochondrial DNA, Genetics Selection Evolution, 30: 531-547.

Hepburn, H.R., and Radloff, S.E. 2011. Honeybees of Asia. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, P. 669.

Irfan, K., Marina, D.M.,Ayca, O., and Walter, S.S. 2006. Genetic characterization of honeybee (*Apis mellifera* Cypria) populations in northern Cyprus. Apidologie, 37: 547-555.

Kreuzer, H., and Adrianne, M. 2003. Recombinant DNA and Biotechnology. Mohamadreza Shakibai Publication, Kerman. P. 200. (In Persian).

Kury, F., Schneeberger, C., Sliutz, G., Kubista, E., Salzer, H., Medl, M. and Spona, J. 1990. Determination of HER-2/neu amplification and expression in tumor tissue and cultured cells using a simple, phenol free method for nucleic acid isolation. Oncogene, 5(9): 1403-1408.

Mossadegh, M. 2014. Know the dwarf honey bee *Apis(micrapis)florea* F. (hymenoptera: apidae). Pakpendar publocation, Karaj. P. 570. (In Persian with English abstract).

Naraqi, A. 2011. Honeybee and Honeybee keeping, Aeej Publication. Tehran. P. 336. (In Persian).

Nicholl D.S.T. 1960. An introduction to genetic engineering. Cambridge University Press. 1996. 1-30.

Poljak, M., Barlic, J., Seme, Avsic-Zupanc, K., and Zore, T. 1995. Solation of DNA from archival Papanicolaou stained cytological smears using a simple salting-out procedure. Clinical and Molecular Pathology, 48(1): 55-56.

Ruttner, F., Pourasghar, D., Kauhausen. D. 1985. Die Honigbienen des Iran. I. *Apis florea* Fabricius. Apidologie 16: 119-12.

Ruttner, F. 1988. Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg GmbH, P. 285.

Shouhani, H., Dousti, A., Radjabi, R., and Zarei, M. 2012. Application of ISSR molecular marker in the genetic diversity of bee (*Apis mellifera* L.) population in some parts of Iran. Journal of Bioscience and Bioengineering, 3(2): 127-131.

Strange, J., Garnery, L., and Sheppard, W. 2007. Morphological and molecular characterization of the Landes honeybee (*Apis mellifera* L.) ecotype for genetic conservation. Insect Conservation, 12: 527-537.

Trevor, B., and Julian, B. 2006. Transcription and structure Gen. (Elahi, E., Emadi, S., Ghorbani Nezami, A.) Sina sharif publication, Tehran. P. 136. (In Persian).

Yogesh , K., and Khan, M. 2014. Genetic variability of European honey bee, *Apis mellifera* in mid hills, plains and tarai region of India. African Journal of Biotechnology, 13(8): 916-925.

Watson, J. 2004. Transcription and structure Gen. (Samadi, A., and Pasalar, P.) University of Tehran publication. Tehran. P. 436. (In Persian).

© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Evaluation of four different DNA extraction methods from dwarf honeybee *Apis florea* (Hymenoptera: Apidae) for genetic experiments

D. Najafzadeh[1*] and S. Lalegani[2]

1. ***Corresponding Author:** Former M.Sc. student of Entomology at University of Kurdistan, Sanandaj, Iran (mokandes@yahoo.com)
2. Former M.Sc. student of Entomology at University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

(DOI): 10.22055/ppr.2019.14154

Received: 13 November 2017 Accepted: 15 January 2019

Abstract

Background and Objectives

DNA extraction is the first step of genetic experiments. In this regard, quality and quantity of extracted DNA plays an important role in molecular studies. This experiment was conducted in order to achieve a novel method that helps us to extract DNA from *Apis florea* F. (one of two important Iranian honeybees). This species is regarded as an important honeybee due to its world-wide distribution and direct role in pollination of field crops, orchards and forests.

Materials and Methods

Samples were collected randomly from the hives of dwarf honeybee in Khuzestan province. In the current research, DNA was extracted from the thorax tissues of worker bees. In total, four DNA extraction methods were evaluated including the optimal salting out, phenol-chloroform, CTAB and CTAB+SDS. To evaluate the quality of extracted DNA, spectrophotometry, electrophoresis and agarose gel methods were applied to compare the quantity and quality of DNA extraction.

Results

Quantity and quality of extracted DNA was evaluated by spectrophotometry based on the absorption ratio 260/280 and electrophoresis on agarose gel. Based on the absorption ratio, for the methods of salting out, phenol-chloroform, CTAB and CTAB + SDS were 1.15 ± 0.01, 1.37 ± 0.01, 1.72 ± 0.02 and 1.82 ± 0.01, respectively. Duncan multiple range test revealed that CTAB+SDS was significantly different from other methods for the evaluation of DNA extraction.

Discussion

Based on the results, the quality of DNA visible bands on the agarose gel can be considered as the option to evaluate the quality of DNA. On the other hand, twice washing in the CTAB + SDS method reduced protein contamination significantly. Furthermore, it could be mentioned that all the DNA extraction methods used in this study seems to be suitable in polymerase chain reaction test, but CTAB+SDS resulted in higher DNA quality and quantity. We referred to this thorax tissue as “thoracic muscle mass”, which could be used as candidate tissue to obtain larger quantities of DNA.

Keywords: Apis, CTAB, DNA, Extract, Genetic