تقويم كفاءة أربع طرائق مختلفة لاستخلاص الحمض النووي الريبي المنزوع الأوكسيجين (DNA) من سوسة القمح *Sitophilus granarius*

زهرة رمضان[1]، أحمد اللاحم[1] وفاضل كعده[2]

(1) قسم علوم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة حلب، سورية، البريد الإلكتروني: Zahraramadan671@gmail.com؛

(2) قسم هندسة التقانات الحيوية، كلية الهندسة التقنية، جامعة حلب، سورية.

الملخص

رمضان، زهرة، أحمد اللاحم وفاضل كعدة. 2019. تقويم كفاءة أربع طرائق مختلفة لاستخلاص الحمض النووي الريبي المنزوع الأوكسيجين (DNA) من سوسة القمح *Sitophilus granarius*. مجلة وقاية النبات العربية، 37(4): 359–364.

تعد الدراسات الجزيئية للحمض النووي من الوسائل المهمة في تصنيف الحشرات، وتعد خطوة استخلاص الحمض النووي الريبي المنزوع الأوكسيجين (DNA) من الحشرات المرحلة الأولى في تلك الدراسات، لذلك هدف البحث الحالي إلى تقويم كفاءة أربع طرائق مختلفة لاستخلاص الحمض النووي DNA من سوسة القمح *Sitophilus granarius* ومقارنة تركيز ونقاوة الحمض النووي DNA المستخلص من كل طريقة. أظهرت النتائج أن طريقة SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ذات مردود مرتفع من حيث تركيز الحمض النووي DNA مع نقاوة منخفضة، وكانت طريقتا CTAB (ctyltrimethylammonium bromide) و CTAB-PVP (ctyltrimethylammonium bromide -polyvinyl-pyrrolidone) من الطرائق الفعالة في استخلاص الحمض النووي DNA ومتماثلة من حيث التركيز والنقاوة، إلا أن تركيز الحمض النووي DNA أقل مما كان عليه في طريقة DTT (Dithiotreiotol). أثبتت طريقة DTT فعالية مناسبة لاستخلاص الحمض النووي DNA مع المحافظة على شكل وقوام الحشرة.

كلمات مفتاحية: استخلاص، الحمض النووي الريبي المنزوع الأوكسيجين، سوسة القمح، *Sitophilus granarius*.

المقدمة

تعد الطرائق الجزيئية أدوات دقيقة لاستدلال العلاقات التطورية للكائنات الحية عبر شجرة الحياة (Moreau, 2008). ويعد استخلاص الحمض النووي DNA الخطوة الأولى في الدراسات البيولوجية التي تتضمن التعريف الجزيئي للأنواع، وتتطلب الدراسات الجزيئية للكائنات الحية استخلاص الحمض النووي DNA من تلك الكائنات كل على انفراد، لذلك تنوعت طرائق استخلاص الحمض النووي DNA من الكائنات الحية (Milligan, 1998) باستخدام مواد مختلفة، وكان لتلك الطرائق تأثيرات متنوعة في الحمض النووي DNA المستخلص. وقد ركز الباحثون اهتمامهم على الطرائق التي تنتج كمية عالية من الحمض النووي DNA مع نقاوة جيدة، مع إمكانية أن تكون هذه الطرائق مناسبة لأجل استخلاص الحمض النووي DNA من كائنات مختلفة (Waldschmidt, 1997؛ Chen *et al*., 2008).

تسهم الحشرات بدورٍ مهم في النظام البيئي، وتعد بعض الحشرات هامة اقتصادياً كونها آفات ضارة بالمحاصيل الزراعية، ومن هذه الحشرات الضارة سوسة القمح إذ تسبب هذه السوسة أضراراً كبيرة على المحاصيل الزراعية مثل القمح والرز والذرة وغيرها، لذلك كان من الضروري تعريفها بشكلٍ دقيقٍ (Obrepalska-Steplowska *et al*., 2008). قديماً استخدمت بيئة الحشرات لتصنيف ودراسة تطور الحشرات وتنوعها وفهم العلاقات الغذائية بينها، واعتمدت الصفات الظاهرية مثل بقع الجسم والخطوط والأشعار والأشواك ولون العيون للتمييز بين الأنواع. في الوقت الحالي تعد دراسة الحمض النووي DNA خطوة أساسية لمعرفة الأبوة والنسب (Behura, 2006).

تُعد طرائق استخلاص الحمض النووي DNA المحضرة في المختبر أرخص ثمناً من شراء الأدوات التجارية الجاهزة (commercial kits) والتي لها مردود جيد، إلا أنها تستغرق زمناً طويلاً بالإضافة إلى احتمال وجود ملوثات في الحمض النووي DNA المستخلص، أما استخدام الأدوات التجارية الجاهزة فتمتاز بنقاوة جيدة للحمض النووي DNA المستخلص وبوقت قصير إلا أنها عالية التكلفة (Chen *et al*., 2010).

https://dx.doi.org/10.22268/AJPP-037.4.359364
© 2019 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

تعتمد معظم طرائق عزل الحمض النووي DNA من الحشرات على استخدام مواد كيميائية مثل SDS (sodium dodecyl sulfate)، CTAB (Ctyltrimethylammonium bromide)، بروتيناز K وPVP (Polyvinyl-pyrrolidone)، وتستخدم في هذه الطرائق لاستخلاص DNA من الحشرات إما حشرة بالغة كاملة أو أجزاء منها كالصدر، الرأس أو الأجنحة (Calderón-Cortés *et al.*, 2010) .

وصفت طريقة CTAB من قبل Dolye & Dolye (1987) وأُعتبرت من الطرائق التقليدية شائعة الاستخدام لعزل الحمض النووي من الكائنات الحية. وقد تم تعديل طريقة CTAB للحصول على تركيز أعلى للحمض النووي DNA ونقاوة أفضل وذلك بإضافة مضادات الأكسدة مثل PVP و β–مركبتو ايثانول إلى محلول وقاء الاستخلاص (buffer) إذ تساعد هذه المواد في ترسيب المركبات الفينولية من الحمض النووي المستخلص (Calderón-Cortés *et al.*, 2010).

نظراً لقلة الأبحاث الجزئيئة المتعلقة بالآفات الحشرية على الحبوب المخزونة من جهة، ولقلة الدراسات المتعلقة باستخلاص الحمض النووي .DNA من الآفات الحشرية على الحبوب المخزونة بالطرائق التقليدية وتقويم هذه الطرائق، لذلك هدف هذا البحث إلى مقارنة كفاءة الطرائق الأربعة المستخدمة في استخلاص الحمض النووي من سوسة القمح *S. granarius*. وذلك بقياس تركيز ونوعية الحمض النووي DNA المستخلص بالطرائق المختلفة.

مواد البحث وطرائقه

تحضير سوسة القمح *S. granarius* لاستخلاص الحمض النووي DNA

تم جمع حشرات سوسة القمح من مستودعات الإغاثة الغذائية المدخلة إلى سورية. وزنت حشرة بالغة واحدة من سوسة القمح ووضعت في أنبوب ابندورف، وُضعت الحشرات الموزونة في المجمدة عند حرارة 80 °س مدة 24 ساعة، بعد ذلك طُحنت الحشرات باستخدام القضيب الزجاجي وأُضيف بعض حبات الرمل الصغيرة لضمان طحن الحشرة بشكل جيد (Suzana *et al*., 2015)، أما عند استخدام طريقة DTT، فتمت تم المحافظة على قوام الحشرة كاملة دون طحن.

استخلاص الحمض النووي DNA من فرد واحد من الحشرة البالغة لسوسة القمح بطريقة CTAB

اتبعت طريقة Doyle & Doyle (1987) مع بعض التعديلات، إذ تم طحن الحشرة مع بعض حبات الرمل المعقم وذلك لعدم توافر الآزوت السائل في طحن العينات، وحُضنت العينات في محلول وقاء الاستخلاص (buffer) مدة 24 ساعة عند حرارة 56 °س. حُفظ الحمض النووي DNA المستخلص في 50 ميكروليتر محلول TE عند حرارة −20 °س.

استخلاص الحمض النووي DNA من فرد واحد من الحشرة البالغة لسوسة القمح بطريقة CTAB-PVP

اتبعت طريقة Calderón-Cortés *et al.* (2010) مع بعض التعديلات، حيث تم طحن الحشرة المجمدة مع بعض حبات الرمل المعقم وذلك من أجل زيادة الاحتكاك أثناء طحن الحشرة، وتم تعديل فترة الحضن لمدة 24 ساعة عند حرارة 55 °س عوضاً عن25 دقيقة المتبعة في الطريقة المذكورة أعلاه. وتم حفظ الحمض النووي DNA المستخلص بـ 50 ميكروليتر من محلول TEعند حرارة -20 °س.

استخلاص الحمض النووي DNA من فرد واحد من الحشرة البالغة لسوسة القمح بطريقة SDS وطريقة DTT

اتبعت طريقة Moreau (2014) مع بعض التعديلات، حيث تم طحن الحشرة المجمدة مع بعض حبات الرمل المعقم وذلك من أجل زيادة الاحتكاك أثناء طحن الحشرة، وأيضاً تم زيادة فترة الحضن لمدة 24 ساعة عند حرارة 55 °س بدلاً من 2 ساعة. وتم حفظ الحمض النووي DNA المستخلص بـ 50 ميكروليتر من محلول TEعند حرارة −20 °س. أما بالنسبة لطريقة DTT فقد اتبعت طريقة نشرت سابقاً (Maniatis *et al.*, 1989؛ Pfeifer *et al.*, 2004) ولم يتم إجراء أي تعديل عليها.

قياس تركيز الحمض النووي DNA

تم قياس تركيز الحمض النووي المستخلص من سوسة القمح باستخدام جهاز المطياف الضوئي. تم تحضير العينة المراد قياس تركيز DNA المستخلص وذلك بتخفيف تركيز العينة بوضع 10 ميكروليترات من عينات DNA المستخلص في أنابيب أبندورف وأضيف إليها 190 ميكروليتر من TE، بعدها رجت العينة حتى تتجانس، وأُخذت قراءة إمتصاص الأشعة عند طول موجة 260 نانومتر لقياس DNA وعلى طول موجة 280 نانومتر للبروتين، إذ يكون الامتصاص أعظمياً لكل منهما، وحددت قيمة النقاوة بحساب نسبة قيمة القراءة عند طول الموجة 260 إلى قيمة القراءة عند طول الموجة 280.

التحليل الإحصائي

أجري التحليل الاحصائي لنتائج تراكيز ونقاوة الحمض النووي DNA المستخلص باتباع الطرائق الأربعة باستخدام برنامج SPSS.

النتائج

استخلاص الحمض النووي DNA من سوسة القمح باستخدام طريقة CTAB

كانت قيمة تركيز الحمض النووي المستخلص باتباع طريقة CTAB في حدود 1–27.2 نانو غرام/ميكروليتر بمتوسط 12.33 نانو غرام/ميكروليتر، بينما تراوح وزن الحشرات التي أُستخلص الحمض النوويDNA منها بين 11 و65 مغ بمتوسط 18.8 مغ وتراوحت قيمة النقاوة في حدود 0.5–2.0 بمتوسط 1.35 (جدول 1).

جدول 1. تركيز الحمض النووي المستخلص باتباع طريقة CTAB.
Table 1. DNA concentration extracted by the CTAB method.

نقاوة DNA DNA purity	تركيز DNA (نانوغرام/ميكروليتر) DNA Concentration (ng/µl)	وزن الحشرة (مغ) Insect weight (mg)	العينة Sample
0.50	27.2	26.00	1
2.00	13.4	15.00	2
1.80	9.0	24.00	3
1.10	8.5	16.00	4
1.57	1.4	18.00	5
1.67	1.4	21.00	6
1.40	14.2	18.00	7
1.23	26.2	25.00	8
1.40	65.0	26.00	9
1.30	18.5	18.00	10
0.90	9.0	25.00	11
1.00	8.9	15.00	12
1.33	1.1	10.00	13
1.50	2.3	17.00	14
1.50	1.0	12.00	15
1.50	1.0	19.00	16
1.35	13.0	19.06	المتوسط mean

بينت النتائج أن أعلى قيمة لتركيز الحمض النووي DNA هي 27.2 نانوغرام/ميكروليتر من الحشرة ذات الوزن 26 مغ وبنقاوة 1.4، بينما أعطى أقل وزن للحشرة 10 مغ تركيز للحمض النووي DNA 1.1 نانوغرام/ ميكروليتر وبنقاوة 1.3.

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك ارتباط معنوي بين تركيز الحمض النووي DNA ووزن الحشرة فكانت قيمة Pearson 0.535* وقيمة Sig 0.015 أصغر من 0.05.

استخلاص الحمض النووي DNA من سوسة القمح بطريقة CTAB-PVP

تراوحت قيمة تركيز الحمض النوويDNA المستخلص وفق طريقة CTAB–PVPP بين (1.1–37.5) نانوغرام/ميكروليتر بمتوسط مقداره 11 نانوغرام/ميكروليتر، بينما تراوحت أوزان الحشرات التي أُستخلص منها الحمض النووي DNA وفق طريقة CTAB–PVPP بين 10–22 مغ بمتوسط 14.9 مغ وفق الجدول 2.

جدول 2. تركيز ونقاوة الحمض النووي DNA المستخلص باتباع طريقة CTAB-PVPP.
Table 2. Concentration and purity of extracted DNA by the CTAB-PVP method.

نقاوة DNA DNA purity	تركيز DNA (نانوغرام/ميكروليتر) DNA Concentration (ng/µl)	وزن الحشرة (مغ) Insect weight (mg)	العينة Sample
1.60	37.5	22.0	1
1.50	29.6	19.0	2
1.80	31.9	16.0	3
1.50	20. 1	20.0	4
1.80	17.4	13.0	5
2.00	9.0	14.0	6
1.50	10.5	12.0	7
1.60	8.1	14.0	8
1.00	6.5	12.0	9
1.30	7.9	20.0	10
1.40	5.4	12.0	11
1.30	10.3	10.0	12
1.30	10.0	12.0	13
0.21	17.2	16.0	14
1.63	2.0	21.0	15
1.58	1.6	14.0	16
1.58	1.1	12.0	17
1.60	1.2	14.0	18
1.56	1.3	13.0	19
1.64	1.1	12.0	20
1.47	11.0	14.9	المتوسط mean

وبينت النتائج أيضاً أن أعلى تركيز للحمض النووي DNA المستخلص وفق طريقة CTAB–PVP هو 37.5 نانوغرام/ميكروليتر من الحشرة ذات وزن 22 مغ، بينما أعطى وزن الحشرة 12 مغ تركيز للحمض النووي 1.1 نانوغرام/ميكروليتر.

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك ارتباط معنوي ايجابي بين تركيز الحمض النووي DNA ووزن الحشرة فكانت قيمة Pearson 0.455* وقيمة Sig 0.044 أصغر من 0.05.

استخلاص الحمض النووي DNA من سوسة القمح باستخدام طريقة SDS

تراوحت قيمة تركيز الحمض النووي DNA المستخلص وفق طريقة SDS بين 4.6 و 42.1 نانوغرام/ميكروليتر، بينما تراوحت أوزان الحشرات التي أُستخلص منها الحمض النووي DNA بين 11 و 23 مغ بمتوسط 14.42 مغ، وتراوحت قيمة نقاوة الحمض النووي DNA بين 1.2 و 2.0 (جدول 3).

جدول 3. تركيز ونقاوة الحمض النووي DNA المستخلص وفق طريقة SDS

Table 3. DNA concentration and purity of extracted DNA by the SDS method.

العينة Sample	وزن الحشرة (مغ) Insect weight (mg)	تركيز DNA (نانوغرام/ميكروليتر) DNA Concentration (ng/µl)	نقاوة DNA DNA purity
1	12.00	10.50	1.20
2	12.00	6.40	2.00
3	17.00	42.10	1.20
4	19.00	11.90	1.20
5	23.00	17.40	1.23
6	17.00	6.40	1.40
7	12.00	16.10	1.23
8	11.00	4.60	2.00
المتوسط Mean	15.37	14.42	1.30

وقد أظهرت النتائج أن أعلى قيمة لتركيز الحمض النووي DNA المستخلص 42.1 نانوغرام/ميكروليتر من الحشرة ذات الوزن 17 مغ ونقاوة 1.2، بينما أعطى أقل وزن للحشرة 11 مغ تركيز 4.6 نانوغرام/ميكروليتر ونقاوة 2.0. كما أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك ارتباط معنوي بين تركيز الحمض النووي ووزن الحشرة فكانت قيمة Pearson **0.630 وقيمة Sig 0.004 أصغر من 0.05.

استخلاص الحمض النووي DNA من سوسة القمح باستخدام طريقة DTT

تراوحت قيمة تركيز الحمض النوويDNA المستخلص باستخدام طريقة DTT دون طحن الحشرة بين 0.4 و 3.1 نانوغرام/ميكروليتر بمتوسط 1.56 نانوغرام/ميكروليتر بينما تراوح وزن الحشرات بين 7 و 19 مغ بمتوسط 10.85 مغ ونقاوة تراوحت بين 0.58 و 1.42 بمتوسط 1.097 (جدول 4).

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أنه لا يوجد ارتباط معنوي بين تركيز الـDNA المستخلص وفق طريقة DTT ووزن الحشرة فكانت قيمة Pearson 0.093− وقيمة Sig 0.695 أكبر من 0.05.

المناقشة

كانت نتائج استخلاص الحمض النووي DNA من سوسة القمح ناجحة وجيدة المردود والنقاوة ما عدا طريقة DTT، حيث أظهرت النتائج أنه تم استخلاص الحمض النووي DNA من سوسة القمح وفق هذه الطرق المتبعة وبتراكيز مناسبة. وقد اعتبرت طريقة CTAB من الطرائق الأكثر شيوعاً واستخداماً في استخلاص الحمض النووي DNA من الكائنات النباتية والحيوانية حيث تتطلب مواد كيميائية وكواشف أقل مقارنة مع بقية الطرق التقليدية الأخرى (Borges *et al.*, 2009).

جدول 4. تركيز ونقاوة الـ DNA المستخلص وفق طريقة DTT.

Table 4. DNA concentration and purity of extracted DNA by the DTT method.

العينة Sample	وزن الحشرة (مغ) Insect weight (mg)	تركيز DNA (نانوغرام/ميكروليتر) DNA Concentration (ng/µl)	نقاوة DNA DNA purity
1	12.00	3.10	0.970
2	18.00	1.50	1.010
3	10.00	1.60	0.860
4	9.00	2.10	1.010
5	9.00	1.50	1.020
6	9.00	1.50	1.180
7	9.00	1.70	1.030
8	13.00	2.10	1.030
9	7.00	1.50	1.080
10	7.00	1.20	1.160
11	7.00	1.10	1.190
12	9.00	2.00	0.970
13	11.00	1.40	1.200
14	8.00	1.90	1.190
15	7.00	1.90	1.420
16	12.00	1.50	1.310
17	19.00	2.10	1.410
18	19.00	0.40	1.300
19	9.00	0.70	1.030
20	13.00	0.40	0.580
المتوسط Mean	10.85	1.56	1.098

أكدت طريقة CTAB-PVP المتبعة أنه تم عزل الحمض النووي DNA بتركيز مرتفع أعلى مما هو عليه عند اتباع طريقة CTAB التقليدية. يعزى ذلك إلى أن إضافة PVP وβ–مركبتو ايثانول إلى محلول وقاء الاستخلاص (buffer) تعمل على ترسيب المركبات الفينولية المتعددة أثناء العمل وإعطاء منتج نهائي من الحمض النووي نقي (Rat *et al*., 2014). وقد أشار Pirttilä *et al.* (2001) إلى أن إضافة PVP وβ –مركبتو ايثانول إلى محلول وقاء الاستخلاص يكبح تأكسد المركبات الاستقلابية الثانوية (Pirttilä *et al*., 2001)، وقد اقترح Weising *et al.* (1995) أن التراكيز المختلفة من β–مركبتو ايثانول تكون فعالة في استخلاص الحمض النووي DNA نقي وبتركيز كاف من أنسجة مختلفة (Weising *et al*., 1995)، وأكدت الدراسات السابقة أن مادة PVP ذات فعالية جيدة في عملية استخلاص الحمض النووي DNA من أنسجة العينات بتراكيز ونقاوة جيدة عن طريق ترسيب البروتينات والمحتويات العضوية بدون الحاجة إلى خطوات تنظيفية مستقبلية (Moreau, 2014). ويعد استخدام PVP خطوة أساسية لتحتجز جزء من البقايا الخلوية من الطور المائي الذي يحتوي الحمض النووي DNA وجمعها في السطح الفاصل بين الطورين المتشكلين (Healey *et al*., 2014)، بينما يستخدم كلوريد الصوديوم من أجل ترسيب السكريات المتعددة وتحويل البروتينات المنحلة إلى بروتينات

غير منحلة ويقوم بتجميعها من أجل ترسيبها أثناء عملية التثفيل (Li *et al*., 2007 ؛Horne *et al*., 2004).

نستنتج مما سبق أن ادراج PVP و β–مركبتو ايثانول في طريقة CTAB-PVP لتنظيف الـDNA من الملوثات (المركبات الفينولية والسكريات المتعددة والبروتينات) أعطى نقاوة أعلى لـ DNA المنتج مقارنة مع طريقة CTAB التقليدي بالمقارنة مع أوزان الحشرات المستخدمة في الاستخلاص. أظهرت نتائج طريقة SDS بأن هذا المركب يعمل كمحل جيد لليبيدات، وأن إضافة SDS/بروتيناز K إلى محلول وقاء الاستخلاص يضمن حل الخلايا بشكل جيد (Doosty *et al*., 2012). وأعطت طريقة SDS أعلى تركيز للحمض النووي DNA المستخلص مقارنة مع طريقة CTAB-PVP وطريقة CTAB، إلا أن الحمض النووي DNA المستخلص كان أقل نقاوة. وسجلت طريقة CTAB-PVP وطريقة CTAB نقاوة متقاربة ومناسبة للحمض النووي DNA المستخلص.

قد يعود التركيز المنخفض جداً الذي حصلنا عليه وفق طريقة DTT إلى أنه تم استخلاص الحمض النووي DNA من حشرة واحدة دون اللجوء إلى أي تحطيم أو طحن للحشرة، إذ يتم استخلاص الحمض النووي DNA من الأنسجة الداخلية الرخوة بين القطع المفصلية، ويعزو الباحثون إلى أنه يتم تحرر الـ DNA من الفم والشرج والثغور التنفسية وربما من خلال المناطق الغشائية الرقيقة بين الصفائح الصلبة والغدد الجلدية و الأهداب المتحطمة. إلا أن قلة كمية الحمض النووي المستخرج في هذه الطريقة يستوجب إيجاد طريقة أفضل عندما يراد استخراج الحمض النووي من الحشرات الكاملة بدون هرسها أو طحنها.

Abstract

Ramadan, Z., A. Al-Lahem and F. Kaadeh. 2019. Evaluation of four different methods of DNA extraction from wheat weevil *Sitophilus granarius*. Arab Journal of Plant Protection, 37(4): 359-364.

Molecular studies are important tools in the classification of insects, and the extraction of DNA from insects is the first step in such studies. The aim of the present study was to evaluate four methods of DNA extraction from the insect *Sitophilus granarius*, and comparing the yield and purity of the extracted DNA by the various methods. The results showed that the SDS (sodium dodecyl sulfate) method produced the highest DNA yield but with low purity. CTAB-PVP (ctyltrimethylammonium bromide polyvinyl-pyrrolidone) and CTAB (ctyltrimethylammonium bromide) were appropriate methods of DNA extraction in terms of yield and purity, but the DNA yield was lower than that produced by the DTT (dithiotreiotol) method. In addition, the DTT method produced reasonable purity of the extracted DNA from *S. granariues* and maintained the shape and structure of the insect.

Keywords: DNA extraction, *Sitophilus granariues*, CTAB-PVP, CTAB, DTT, SDS.

Coressponding author: Zahra Ramadan, Faculty of Sciences, Aleppo University, Syria, email: Zahraramadan671@gmail.com

References

المراجع

Behura, S.K. 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. Molecular Ecology, 15: 3087-3113. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03014.x

Borges, A., M.S. Rosa, G.H. Recchia, J.R. de Queiroz-Silva, E. de Andrade Bressan and E.A. Veasey. 2009. CTAB methods for DNA extraction of Sweetpotato for microsatellite analysis. Science and Agriculture (Piracicaba, Brazil), 66: 529-534. https://doi.org/10.1590/S0103-90162009000400015

Calderón-Cortés, N., M. Quesada, H. Cano-Camacho and G. Zavala-Páramo. 2010. A simple and rapid method for DNA isolation from xylophagous insects. International Journal of Molecular Sciences, 11: 5056–5064. https://doi.org/10.3390/ijms11125056

Chen, H., M. Rangasamy, S.Y. Tan, H. Wang and B.D. Siegfried. 2010. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. PLoS One, 5(8): e11963. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011963

Chen, M., Y. Zhu, J. Tao and Y. Luo. 2008. Methodological comparison of DNA extraction from *Holcocerrus hippophaecolus* (Lepidoptera: Cossidae) for AFLP analysis. Forestry Studies in China, 10: 189-192. https://doi.org/10.1007/s11632-008-0035-5

Moreau, C.S. 2014. A practical guide to DNA extraction, PCR, and gene-based DNA sequencing in insects. Halteres, 5: 32-42.

Doosty, B., R. Drikvand, E. Salahvarzi, H. Amiri and J. Hadian. 2012. Comparative analysis and optimization of different DNA extraction protocols in Satureja khuzistanica. International Journal of Biology, 4: 111-116. https://doi.org/10.5539/ijb.v4n4p111

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

Healey, A., A. Furtado, T. Cooper and R.J. Henry. 2014. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. Plant Methods, 10: 21. https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-21

Horne, E.C., S.P. Kumpatla, K.A. Patterson, M. Gupta and S.A. Thompson. 2004. Improved high-throughput sunflower and cotton genomic DNA extraction and PCR fidelity. Plant Molecular Biology Reporter, 22: 83-84. https://doi.org/10.1007/BF02773352

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

Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A.

Milligan, B.G. 1998. Total DNA isolation. Pages 29-64. In: Molecular Genetic Analysis of Population: A Practical Approach. A.R. Hoelzel (ed.) Oxford University Press. 445 pp. https://doi.org/10.1046/j.1469-1809.1999.63302731.x

Moreau, C.S. 2008. Unraveling the evolutionary history of the hyperdiverse ant genus *Pheidole* (Hymenoptera: Formicidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 48: 224-239. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.02.020

Pfeiffer, I., I. Völke, H. Täubert and B. Brenig. 2004. Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. Forensic Science International, 141: 149–151. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.01.016

Pirttilä, A.M., M. Hirsikorpi, T. Kämäräinen, L. Jaakola and A. Hohtola. 2001. DNA isolation method for medicinal and aromatic plants. Plants Molecular Biology Reporter, 19: 273. https://doi.org/10.1007/BF02772901

Rat, M., Ž. Jovanović, , N. Stanisavljević, B. Radak, B. Bokić, S. Rrdović and G. Anačkov. 2014. A simple and efficient DNA isolation method for *Ornithogalum* L. species (Hyacinthaceae, Asparagales). Botanica Serbica, 38: 185-189.

Obrepalska-Steplowska, A.O., K. Nowaczyk, M. Holysz, M. Gawlak and J. Nawrot. 2008. Molecular techniques for detection of granary weevil (*Sitophilus granarius* L.) in wheat and flour. Food Additives and Contaminants: Part A, 25: 1179-1188. https://doi.org/10.1080/02652030802015689

Suzana, M., A.R. Rahimah, I. Maizura and R. Singh. 2015. A simple and rapid protocol for isolation of genomic DNA from oil palm leaf tissue. Journal of oil palm Research, 27: 282-287.

Waldschmidt, A.M, T.M.F. Salomao, E.G. Barros and L.A.O. Campos. 1997. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). Brazilian Journal of Genetics, 20: 421-423. https://doi.org/10.1590/S0100-84551997000300011

Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and W. Meyer. 1995. DNA Fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton, Florida. 444 pp.

Received: February 11, 2019; Accepted: October 25, 2019

تاريخ الاستلام: 2019/2/11؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2019/10/25