

Comparison of three different genomic RNA extraction methods from peel and pulp of Thomson navel orange fruit (*Citrus sinensis* L.)

Fatemeh Ahmadi¹, Mohamad Mehdi Sharifani^{1*}, Amir Mousavi³, Negin Akhlaghi Amiri⁴,
Mostafa Khoshhal Sarmast⁵, Khalil Zaynali Nezhad⁶

1. PhD Student, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran.
2. Associate Professor, Department of Horticultural Science and Landscape Engineering, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran.
3. Associate Professor, Department of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Horticulture Crops Research, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Sari, Iran.
5. Associate Professor, Department of Horticultural Science and Landscape Engineering, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran.
6. Assistant Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran.

Citation: Ahmadi, F, Mehdi Sharifani, M., Mousavi, A., Akhlaghi Amiri, N., Khoshhal Sarmast, M., & Zaynali Nezhad, Kh. (2023). Comparison of three different genomic RNA extraction methods from peel and pulp of Thomson navel orange fruit (*Citrus sinensis* L.). *Plant Productions*, 46(1), 1-10.

Abstract

Introduction

Efficient genomic RNA extraction is a basic requirement of molecular biology and the primary step in the study of gene expression. Woody plants are problematic due to the presence of polyphenolics, polysaccharides and other compounds that bind or co-precipitate with the RNA. The present study is to compare different methods of extracting high-quality total RNA in Thomson navel orange. Citrus is one of the most strategic fruits of Iran, finding an efficient and low-cost method is important for executive and molecular works.

Materials and Methods

Plant materials used to extract total RNA were collected from two different parts of Thomson navel orange peel (consisting of both flavedo and albedo) and pulp from Ghaemshahr Horticultural Research Station, Mazandaran in 2020. Fruits were frozen in liquid nitrogen after sampling and were stored at -80°C until used.

* **Corresponding Author:** Mohamad Mehdi Sharifani
E-mail: msharifani2019@gmail.com

These samples were transferred to the laboratory department of horticultural science and engineering, Gorgan where the samples were applied to analyze the molecular experiment. For this study three methods including of: Trizol, Non-column Denazist and RNX-Plus™ were evaluated for total RNA extraction. In order to show the quality and quantity of RNA, were assessed on 1% agarose gel and using a nanodrop spectrophotometer with 230, 260 and 280 wavelength. Results were analyzed using a completely randomized design with three replicates, Duncan test with a significance level of 0.05 using SAS 9.0 software.

Results and Discussion

The result showed a distinct 28S and 18S rRNA bands visible on an agarose gel. The RNA integrity was assessed by the sharpness of ribosomal RNA bands. Also by using this protocols, the absorbance ratio at 260/280 was ranged between 1.80 – 1.93 which indicated there were no protein in the extracted RNA. A ratio A_{260}/A_{280} ratio from 2.0 to 2.14 indicated a lack of polysaccharides and phenol contamination. Trizol method, which was significantly different than compared to other methods. This protocol was successfully applied to isolate total RNA from the organ of two section fruit. Generally, the samples with a ratio in the range of ~ 1.9 to 2 revealed high purity of the extracted RNA using Trizol and the average concentration of RNA ranged from 379.90 (ng/μl) of orange peel and 352.15 (ng/μl) of orange pulp, respectively. And concentration was observed in Non-column Denazist method which treated with the lowest concentration (263.10 ng/μl) of orange pulp.

Conclusion

The Trizol method was the best choice for extraction of high-quality total RNA. In this respect method represented the highest RNA yield and purity from various samples (peel and pulp) of citrus. However, generally peel samples (flavedo and albedo) produced high concentration total RNA.

Keywords: *Citrus sinensis*, extraction, peel, pulp, ribonucleic acid

مقایسه سه روش مختلف استخراج RNA ژنومی از پوست و گوشت میوه پرتقال تامسون ناول (*Citrus sinensis* L.)

فاطمه احمدی^۱، محمد مهدی شریفانی^{۲*}، امیر موسوی^۳، نگین اخلاقی امیری^۴،
مصطفی خوشحال سرمست^۵، خلیل زینلی نژاد^۶

۱. دانشجوی دکتری علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲. دانشیار گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۳. دانشیار گروه پژوهشی زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.
۴. استادیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، ساری، ایران.
۵. دانشیار گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۶. استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

چکیده

پژوهش حاضر به منظور مقایسه روش‌های مختلف استخراج RNA کل با کیفیت بالا در پرتقال تامسون ناول می‌باشد. مرکبات جز یکی از میوه‌های استراتژیک در ایران محسوب می‌گردد و یافتن روش مناسب و کم‌هزینه برای کارهای اجرایی و مولکولی حائز اهمیت است. مواد گیاهی مورد استفاده برای استخراج RNA کل از دو قسمت مختلف پوست (شامل فلاودو و آلبدو) و گوشت پرتقال تامسون ناول از ایستگاه تحقیقات باغبانی قائم‌شهر، مازندران در سال ۱۳۹۸ جمع‌آوری شدند. میوه‌ها بعد از نمونه‌گیری، در نیتروژن مایع به حالت فریز شده قرار گرفتند و تا زمان استفاده در منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور تجزیه و تحلیل مولکولی، نمونه‌ها به آزمایشگاه گروه باغبانی گرگان منتقل شدند. برای مطالعه از سه روش شامل: تریازول، دنازیست غیرستونی و RNX-PlusTM استخراج RNA کل ارزیابی گردید. به منظور نشان دادن کیفیت و کمیت RNA، بر روی ژل آگارز ۱٪ و با استفاده از اسپکتوفتومتر نانودرآپ در طول موج ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ تعیین گردید. نتایج با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و آزمون دانکن در سطح معنی‌دار ۵ درصد و با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج وجود باندهای ریبوزومی ۲۸S و ۱۸S مجزا و واضح روی ژل الکتروفورز نمایش می‌دهد و یکپارچگی RNA با باندهای ریبوزومی شارپ بدست آمد. همچنین با استفاده از این روش‌ها نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰، بین ۱/۹۴-۱/۸۰ بیانگر این است که، نمونه‌ها بدون آلودگی پروتئین در RNA استخراج شده بودند. و در نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰، بین ۲/۱۴-۲/۰ نمونه‌ها بدون آلودگی پلی‌ساکارید و فنل نشان داده شد. در مقایسه با سایر روش‌ها، در روش تریازول اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. این روش به طور موفقیت آمیزی باعث جداسازی RNA از دو بخش میوه پرتقال شد. به‌طور کلی نمونه‌های جذب ۱/۹ تا ۲ بیشترین خلوص RNA استخراجی دارند و متوسط غلظت RNA در روش تریازول به ترتیب در پوست پرتقال ۳۷۹/۹۰ (نانو گرم بر میکرو لیتر) و گوشت پرتقال ۳۵۲/۱۵ (نانو گرم بر میکرو لیتر) داشتند. و کمترین غلظت در روش دنازیست غیرستونی به میزان ۲۶۳/۱۰ (نانو گرم بر میکرو لیتر) در گوشت میوه محاسبه گردید. روش تریازول یکی از بهترین‌ها برای استخراج RNA کل با کیفیت می‌باشد. در ارتباط با این روش بیشترین غلظت و خلوص RNA در نمونه‌های مختلف (پوست و گوشت) پرتقال نشان داد. به طور کلی در نمونه‌های پوست (فلاودو و آلبدو) غلظت RNA بیشتری بدست آمد.

کلیدواژه‌ها: استخراج، اسید نوکلئیک، پرتقال، پوست، گوشت

* نویسنده مسئول: محمد مهدی شریفانی
رایانامه: msharifani2019@gmail.com

در مطالعه‌ای (Liu et al., 2006) از روش SDS-LiCl بر روی برگ، میوه، دانه‌ها و کالوس پرتقال رقم اوسبک با داشتن A_{260}/A_{280} بین ۱/۶۵ - ۱/۹۲ به استخراج RNA مطلوب دست یافتند (Zheng et al., 2014; Tao et al., 2004). در تحقیقی دیگر از روش تریازول با اندکی تغییرات به همراه رسوب‌دهی با LiCl، به طور موفقیت آمیزی برای جداسازی RNA از اندام‌های ریشه، ساقه، برگ، گل و میوه در پونسیروس به کار رفت و از آن برای ساخت cDNA و ریل تایم استفاده شد (Song et al., 2010). همچنین گزارشی بر روی میوه نارنگی با استفاده از روش تریازول به منظور بیان ژن ارائه گردید (Cong et al., 2022). در آزمایشی بر روی پوست و رگبرگ لیموترش، با سه روش مختلف استخراج RNA، روش پتاسیم استات- SDS با داشتن کارایی، کم‌هزینه بودن و عدم دخالت ترکیبات پر خطر فنلی پیشنهاد شد (Bahri et al., 2013; Bernad and Duran-Vila 2005).

روش‌های متفاوتی برای استخراج RNA کل وجود دارد اما فقط برخی از آنها می‌توانند RNA های کوچک مولکول را حفظ کرده و استخراج نمایند و اکثراً وقت زیاد، تکنیک پیچیده و مقدار غلظت کمی دارند. هدف از این تحقیق مقایسه روش‌های مختلف استخراج RNA کل با یکدیگر و انتخاب بهترین گزینه برای استخراج RNA ژنومی با در نظر گرفتن کمیت بیشتر و کیفیت مطلوب در پرتقال تامسون ناول می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

به منظور استخراج اسید نوکلئیک، اندام میوه از گیاهان پرتقال تامسون ناول از ایستگاه تحقیقات باغبانی قائم‌شهر، مازندران در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۸ جمع‌آوری گردید. پس از برداشت و جدا کردن پوست و گوشت، آن‌ها را در فویل آلومینیومی بسته‌بندی و بلافاصله در نیتروژن مایع (196°C) قرار گرفته و به آزمایشگاه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند و برای نگهداری طولانی مدت در دمای 80°C - درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

استخراج RNA کل از نمونه‌های پوست و گوشت پرتقال

تامسون ناول

وسایل مربوط به آزمایش از قبیل میکروتیوب و هاون را دو مرتبه، به مدت ۲۰ دقیقه با دمای 121°C درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند، سپس سه ساعت در دمای 200°C درجه سانتی‌گراد آن قرار گرفتند. در ابتدای کار ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های پوست

مقدمه

میوه مرکبات در میان محصولات باغی با ارزش غذایی بالا، چه از نظر ترکیبات مغذی و نیز تجارت بین الملل دارا می‌باشد (Fattahi Moghadam et al., 2017; Lyu et al., 2021) از آنجاییکه مرکبات جز درختان چند ساله چوبی است، آلودگی و مقدار پلی‌ساکارید یکی از مشکلات معمول در استخراج می‌باشد (Nath et al., 2022; Cheng et al., 2003). استخراج RNA با کیفیت برای تحقیقات مولکولی مختلف از قبیل ساخت کتابخانه cDNA، بیان ژن، توالی‌یابی، نورترن بلات و هیبریداسیون میکروآرای با اهمیت می‌باشد. از طرفی استخراج RNA با کیفیت از پرتقال سخت است زیرا غنی از پلی‌ساکارید، ترکیبات فنلی و سایر متابولیت ثانویه است (Majidi and Bahmani, 2017; Gambino et al., 2008; Ghawana et al., 2011). لذا زمانیکه رسوب RNA همراه با پلی‌ساکارید و اکسیداسیون ترکیبات فنلی باشد سبب قهوه‌ای شدن و دیر حل شدن RNA می‌گردد. همچنین پلی‌فنل‌ها در فرایند استخراج مولکولی باعث کاهش عملکرد و بازدارنده تکثیر PCR می‌باشند (Shu et al., 2014). اگرچه گزارش‌ها نشان می‌دهد استخراج RNA نسبت به DNA سخت‌تر است زیرا مولکول RNA تک رشته‌ای، حساس به گرما و فعالیت آنزیم RNase باعث تخریب آن می‌گردد (Montazeri and Sadat, 2018). در روش‌های مختلف استخراج RNA مراحل و عوامل شیمیایی متعددی دخیل می‌باشند، که ممکن است در زمان استخراج باعث کاهش یا از دست دادن مقدار زیادی RNA با وزن مولکولی پائین شوند (ASIF et al., 2000; Song et al., 2010).

شواهد نشان می‌دهد miRNAs کارکرد مهمی در فرایند بیولوژیکی و متابولیسی شامل شناسایی بافت، زمان توسعه و پاسخ به استرس محیطی دارد (Jones-Rhoades et al., 2006). در نتیجه شناخت بهتر بیولوژی مولکولی، بررسی سینگال‌ها و مکانسیم‌های مسیر متابولیسی با اهمیت است (Liu et al., 2007). به‌طوریکه با بررسی استخراج RNA توانستند روش‌های نوینی در کاهش بیماری مرکبات (Nehela and Killiny, 2020)، بیان ژن‌های کلیدی تنش، مسیرهای بیوسنتزی (Ghaderi and Jahanbakhsh Godehkahri, 2020) ایجاد تغییرات در تولید متابولیت ثانویه (Naderi et al., 2015) و تولید ارقام مقاوم به شانکر مرکبات دست یابند (Mansouri et al., 2010).

گردید و بعد از تکان شدید میکروتیوب، مجدداً ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm سانترفیوژ شد. در این مرحله سه فاز تشکیل شد (شکل ۱. ب) که فاز بالایی به میکروتیوب جدید انتقال داده و به میزان نیمی از حجم عصاره از بافر G2 و ایزوپروپانول سرد استفاده شد و ادامه مراحل مشابه روش تریازول انجام گردید.

استخراج RNA کل با استفاده از RNX-Plus™

مطابق دستورالعمل مقدار یک میلی‌لیتر از محلول RNX-Plus™ سرد با نمونه‌های پودر شده، پوست و گوشت پرتقال ترکیب گردیدند و به مدت پنج دقیقه در دمای محیط قرار داده شدند، سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده و با سرعت ۱۲۰۰۰rpm، ۱۵ دقیقه سانترفیوژ گردیدند. پس از سانترفیوژ فاز بالایی خارج (شکل ۱. ج) و به تیوب جدید منتقل شدند و در نهایت ادامه کار مشابه روش تریازول ذکر شده در بالا صورت گرفت.

بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراجی

برای تعیین کیفیت RNA استخراج شده در اندام‌های پوست و گوشت پرتقال تامسون ناول از دستگاه الکتروفورز افقی، بر روی ژل آگارز ۱ درصد و بافر TAE استفاده شد، مقدار پنج میکرولیتر از RNA به همراه دو میکرو لیتر بافر لودینگ مخلوط شدند و در چاهک تزریق گردیدند و الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ به مدت ۴۰ دقیقه انجام شد. سپس در دستگاه ژل داک توسط اشعه UV باندهای ریبوزومی (rRNAs) ۲۸S و ۱۸S مشاهده و تصویر برداری انجام شد. همچنین برای بررسی خلوص RNA (نسبت‌های OD) و غلظت RNA (نانوگرم در میکرولیتر) با استفاده از یکی از روش‌های ساده و سریع، دستگاه اسپکتوفتومتر نانودرآپ انجام گردید. سه میکرولیتر RNA با سمپلر به آرامی روی پلیت ریخته و بعد در طول موج ۲۶۰، ۲۸۰، ۲۳۰ نانومتر اعداد جذب قرائت گردید. با قرارگیری OD₂₆₀ در رابطه زیر غلظت RNA محاسبه شد.

فلاودو و آلبدو) و گوشت پرتقال تامسون ناول به وسیله نیتروژن مایع درون هاون چینی دارای دمای پائین پودر نموده و به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتر سرد انتقال داده شدند.

استخراج RNA کل به روش تریازول

مقدار یک میلی‌لیتر محلول تریازول (شرکت ریراژن) به نمونه‌های مورد مطالعه اضافه گردید، سپس بعد از پنج دقیقه نگهداری در دمای محیط، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده و ورتکس ۱۵ ثانیه انجام گردید تا نمونه‌های گیاهی کاملاً هموژنیزه شدند. در ادامه نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰g سانترفیوژ شدند. پس از سانترفیوژ سه فاز تشکیل شد (شکل ۱. الف)، فاز بالایی شفاف و حاوی RNA است و با دقت به میکروتیوب جدید منتقل گردید. به منظور رسوب RNA ایزوپروپانول سرد اضافه و بعد از ۱۰ دقیقه در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه در سانترفیوژ ۱۲۰۰۰g قرار داده و پس از آن پلیت سفید رنگ در انتهای تیوب مشاهده شد. سپس مایع روشن‌رنگ دور ریخته و به میزان یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه گردید. پس از ورتکس مختصر نمونه‌ها برای پنج دقیقه در ۷۵۰۰g سانترفیوژ شدند. پس از سانترفیوژ مایع روشن‌رنگ دور ریخته و به منظور حذف الکل و خشک شدن رسوب در دمای اتاق قرار داده و در ادامه ۵۰ میکرو لیتر آب دبس به نمونه‌ها اضافه گردیدند. جهت حل شدن بهتر RNA، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵- تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در نهایت جهت آنالیز بعدی RNA به ۸۰°C- منتقل گردید.

استخراج RNA کل با استفاده از کیت غیر ستونی دنازیست

در این روش مقدار یک میلی‌لیتر بافر G1 به نمونه پودر شده اضافه گردید و مخلوط حاصل به مدت یک دقیقه ورتکس و پنج دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد، سپس میکروتیوب را پنج دقیقه در سانترفیوژ ۱۲۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی-گراد قرار داده شد و در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه



Figure 1. Formation stage of three phases in RNA extraction.

رابطه (۱)

$$X_{ng/\mu l} = OD_{260} \times 40$$

تجزیه واریانس و آزمون مقایسه میانگین صفات با روش دانکن در سه تکرار با سطح احتمال ۰/۰۵ و با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 انجام شد.

نتایج و بحث

تغییرات در کمیت و کیفیت RNA ناشی از حساسیت بالای RNase به فاکتورهای تغییر دهنده، آلودگی پروتئین و DNA ژنومی، حضور ریبونوکلائازها به منظور کاهش RNA و وجود مقادیر بالای پلی ساکراید، پلی فنل و متابولیت ثانویه می باشد (Tele et al., 2019). در گونه های گیاهی متشکل از ماکرو و میکرومولکولها دستیابی به روش مناسب استخراج RNA با کیفیت حائز اهمیت است (Iqbal et al., 2020). همچنین استخراج مولکولی در یوکاریوتها در بافت های مختلف به صورت اختصاصی می باشد (Ahsani et al., 2019). مشاهده RNA استخراج شده در نمونه های مورد مطالعه نشان داد، روش های فوق، وجود باندهای ریبوزومی که در شکل (۲) واضح، بدون تخریب و شکستگی است، در هر دو اندام پوست و گوشت شامل

بودند، درحالیکه روش تریازول وجود باندهای ۲۸S و ۱۸S ریبوزومی با وضوح بیشتر و شارپ تری را نمایش داد (شکل ۲). یکی از مشخصه های مهم آنالیز RNA استخراجی، بررسی یکپارچگی RNA (RNA integrity) می باشد، که به دلیل وجود RNase ها، RNA بسیار مستعد تخریب شدن است. با مقایسه ضخامت و شدت (شارپی) باندهای بدست آمده روی ژل آگارز می توان به کیفیت RNA یوکاریوتی پی برد. وجود باندهای RNA ریبوزومی ۲۸S و ۱۸S به طور مجزا، بدون اسمیر و پیرنگ روی ژل آگارز، نشان دهنده یک استخراج با کیفیت مطلوب است. در حالیکه وجود باندهای تخریب شده برای RNA ریبوزومی، حاکی از تخریب احتمالی سایر RNA سلول و کیفیت پائین تخلیص است (Zarei et al., 2012). نتایج مطالعات نشان می دهد نگهداری نمونه بعد از ۲۴ ساعت و افزایش حجم کیت تریازول مصرفی در برابر حجم نمونه می تواند باعث افزایش غلظت و یکپارچگی RNA کل شود (Heidary and Pahlevan Kakhki, 2014). در مرحله جداسازی فازها، RNA در فاز آبی، پروتئین و پلی ساکراید در فاز میانی و کلروفرم در فاز آلی قرار می گیرد. در هر صورت مخلوط شدن فازها با فاز بالایی، شفافیت نمونه کاهش یافته و آلودگی حاصل مانع استفاده از آن برای مراحل تحقیق بعدی خواهد شد (Zepeda and Verdonk, 2022).

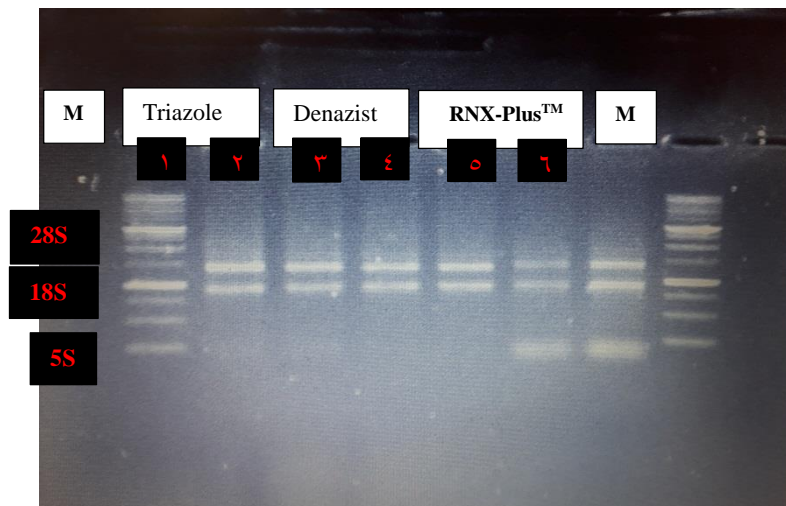


Figure 2. Electrophoretic result of RNA isolated on agarose gel, from peel and pulp samples of *Citrus sinensis* cv. Thomson navel showing intact 28S and 18S rRNA bands. M: 1Kb molecular weight marker. Wells 1,3, 5: peel. Wells 2, 4, 6: Pulp.

در حالیکه نسبت‌های کمتر از ۱/۸ نشان دهنده این است که، نمونه‌ها آلودگی پروتئینی دارد و به منظور حذف آلودگی، استفاده بیشتر از آنزیم پروتئیناز K و انکوبه کردن نمونه‌ها در طول شب موثر می‌باشد و همچنین نسبت بالای بیش‌تر از ۲، نشان‌دهنده آلودگی DNA است و باید از آنزیم DNaseI استفاده شود (Javdan Asl et al., 2016). به‌طوریکه نتایج آزمایش بر روی گیاه ریواس و گل عسلی نشان داد با استفاده از آنزیم DNase، خلوص RNA و در برخی موارد غلظت RNA افزایش یافت (Ghawana et al., 2011). اگرچه کمیت RNA در نمونه‌های تازه سنجد تلخ نسبت به نمونه ۳۰ روز در منفی ۸۰°C فریز شده بیشتر گزارش شد که به‌علت افزایش مدت زمان، باعث اکسید شدن ترکیبات فنلی بافت‌های گیاهی و مانع جداسازی RNA با کیفیت خوب می‌شود (Bahador et al., 2009; Ghangal et al., 2014).

در نسبت جذب A₂₆₀/A₂₃₀، محدوده ۲/۲-۲ نشانگر خلوص RNA (RNA purity) می‌باشد. و مقدار پایین‌تر آن نشان‌دهنده وجود فنول، کربوهیدرات و ترکیبات آروماتیک در RNA استخراج شده است. برای رفع آلودگی این نمونه‌ها می‌توان با استفاده از ستون (Spin-column) یا شستشوی مجدد به از بین بردن ناخالصی کمک کرد، اگرچه منجر به از دست دادن مقداری نمونه اسید نوکلئیک می‌شود (Wang and Stegemann, 2009).

نتایج به دست آمده آنالیز اسپکتوفتومتری با استفاده از دستگاه نانودراپ نشان داد در هر دو اندام میوه پرتقال، کیفیت RNA استخراجی در نسبت طول موج‌های (A₂₆₀/A₂₈₀) بین ۱/۹۳-۱/۸۰ نانومتر است که نشان‌دهنده عدم وجود پروتئین و نسبت‌های (A₂₆₀/A₂₃₀) بین ۲/۱۴-۲/۰ نانومتر، بیانگر عدم وجود پلی‌ساکاریدها در RNA استخراج شده بود (جدول ۱). همچنین داده‌های حاصل از نانودراپ نشان می‌دهد که روش استخراج تریازول بالاترین کیفیت RNA استخراجی را در بین سه روش دارد. و از انجاییکه غلظت RNA استخراج شده حاکی از آن بود که بیشترین آن در نمونه پوست ۳۷۹/۹۰ نانوگرم بر میکرولیتر و کمترین در نمونه گوشت ۳۲۸/۲۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر محاسبه گردید. در نتیجه بین غلظت‌های نمونه‌ها، به دلیل تفاوت متابولیت اولیه و ثانویه، در پوست میوه روش تریازول مقدار بیشتری بدست آمد و روش دنازیست غیرستونی دارای کمترین مقدار RNA کل استخراج شده گزارش شد (جدول ۱). هر چند هر سه روش RNA مناسبی برای ادامه کار و ساخت cDNA دارند ولی روش کیت تریازول با داشتن کیفیت بهتر و کمیت بالا انتخاب و برای مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده قرار گرفته شد و مطابق شکل ۳ محصول پی‌سی‌آر بدست آمده از RNA ژنومی روش تریازول مؤید کیفیت ساخت سی‌دی‌ان‌ای در ژن رفرنس اکتین است.

زمانیکه چگالی نوری A₂₆₀/A₂₈₀ در محدوده ۲-۱/۸ باشد، نشانگر خلوص بالای RNA و نیز RNA ژنومی از کیفیت خوبی برخوردار است و می‌توان در کارهای بعدی استفاده نمود.

Table 1. Comparison of RNA yield and purity analysis

Method	Processing Time	Sample	OD 260/280*	OD 260/230*	Concentration (ng/μl)*
Trizole	2 h	Peel	1.94 ± 0.01 a	2.13 ± 0.01 a	379.90 ± 3.53 a
		Pulp	1.90 ± 0.01 b	2.10 ± 0.02b	352.15 ± 1.62 ab
Non- column Denazist	2 h	Peel	1.82 ± 0.03 d	2.01 ± 0.03 d	287.40 ± 2.89 c
		Pulp	1.80 ± 0.02 d	2.01 ± 0.01 d	263.10 ± 1.45 c
RNX-plus™	1 h, 40 min	Peel	1.85 ± 0.04 c	2.06 ± 0.02 bc	340.28 ± 4.46 b
		Pulp	1.84 ± 0.03 c	2.04 ± 0.03 c	328.19 ± 3.54 b

*- Parameter significance at the level of 0.05

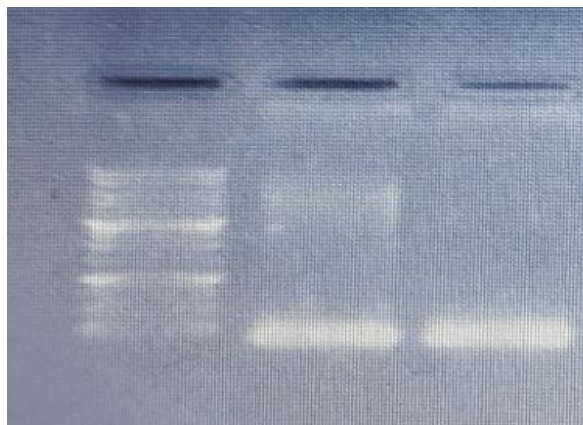


Figure 3. PCR product of Actin reference gene using total RNA isolated by Trizol method, in peel and pulp samples of *Citrus sinensis* cv. Thomson navel

تامسون ناول تفاوت معنی داری مشاهده شد به طوریکه میزان آن در نمونه‌های پوست بیشتر از گوشت میوه نشان داده شد.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از تمامی اساتید که در انجام این پژوهش همکاری و مساعدت داشتند تشکر و قدردانی می‌گردد.

نتیجه‌گیری

در این آزمایش روش تریازول برای استخراج RNA کل در نمونه‌های پوست و گوشت پرتقال تامسون ناول بهترین کیفیت و کمیت و همچنین کم‌هزینه‌ترین در مقایسه با سایر روش‌ها محسوب گردید و در بین نمونه‌های پوست و گوشت میوه پرتقال

References

- Ahsani, M.R., Mohammadabdi, M.R., Asadi Fozi, M., Esmaelzadeh, A., Kezri, A., & Esmaili, H. 2019. Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real time PCR. *Agricultural Biotechnology Journal*, 11(1), 135-150. [In Persian]
- Asif, M.H., Dhawan, P., & Math, P. 2000. A simple procedure for isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Mol Bio.Rep*, 18, 109-115.
- Bahador, S., Rabiei, B., & Hassani Kumleh, S.H. 2014. Comparison of different methods for isolating of total RNA from leaf of Thyme species rich in secondary metabolites. *Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 22(1), 11-24. [In Persian]
- Bahri, B., Banihashemian, S.M., Kulivand, D., & Radmand, O. 2013. Application of a simple nucleic acid extraction method for detection of Citrus Tristeza virus. 8th National Biotechnology Congress of I.R. Iran. [In Persian]
- Bernad, L., & Duran-Vila, N. 2005. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*, 20(2), 105-113.
- Cheng, Y., Gue, W., Yi, H., Pang, X., & Deng, X. 2003. An efficient protocol for genomic DNA extraction from Citrus species. *Plant Molecular Biology*, 21, 177a-177g.
- Cong, L., De-xiong, L., Xian-bia., H., Fu-qiong, Zh., Zong-zhou, X., Hong-yan, Zh., & Ji-hong, L. 2022. Manual thinning increases fruit size and sugar content of Citrus reticulata Blanco and affects hormone synthesis and sugar transporter activity. *Journal of Integrative Agriculture*, 21(3), 725-735.
- Fattahi Moghadam, J., Seyed Ghasemi, S.E., & Najafi, K. 2017. Evaluation of fruit physico- chemical characteristics of new mandarins- Noushin (*Citrus reticulata* cv. Noushin) and Shahin (*Citrus reticulata* cv. Shahin) during different harvesting time. *Plant Production*, 40(4), 77-90. [In Persian]

- Gambiono, G., Perrone, I., & Grbaudo, I. 2008. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19, 520-525.
- Ghaderi, A., & Jahanbakhsh Godehkahriz, S. 2020. Study of total protein content, soluble sugar, proline content and P5CS gene expression in leaves of three wheat cultivars under drought stress. *Agricultural Biotechnology Journal*, 12(4), 125-144. [In Persian]
- Ghangel, R., Raghuvanshi, S., & Sharma, P.C. 2009. Isolation of good quality RNA from a medicinal plant seabuckthorn rich in secondary metabolites. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(11-12), 113-115.
- Ghawana, S., Paul, A., Kumar, H., Kumar, A., Singh, A., Bhardwaj, P., Rani, A., Singh, R., Raizada, J., Singh, K., & Kumar, S. 2011. An RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites. *BMC Research Notes*, 4, 85.
- Heidary, M., & Pahlevan Kakhki, M. 2014. TRIZOL-based RNA extraction: a reliable method for gene expression studies. *Journal of sciences, Islamic Republic of IRAN*, 25(1), 13-17.
- Iqbal, A., Yang, Y., Wu, Y., Li, J., Hamayun, M., Hussain, A., & Shah, F. 2020. An easy and robust method for the isolation of high quality RNA from coconut tissues. *Journal of Biotechnology*, 48, 78-85.
- Javdan-Asl, M., Rajabi Memari, H., Nabati Ahmadi, D., & Rahnama, A. 2016. Comparison of different genomic RNA extraction methods from the medicinal plant yarrow (*Achillea millefolium* L.). *Plant Productions*, 39(2), 105-114. [In Persian]
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., & Bartel, B. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 19-53.
- Liu, Q., Xu, J., Liu, Y., Zhao, X., Deng, X., Guo, I., & Gu, J. 2007. A novel bud mutation that confers abnormal patterns of lycopene accumulation in sweet orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Experimental Botany*, 58(15/16), 4161-4171.
- Liu, Y., Liu, Q., & Tao, N. 2006. Efficient isolation of RNA from fruit peel and pulp of ripening navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal Huazhong Agricultural University*, 25(3), 300-304.
- Lyu, sh., Chen, G., Pan, D., Chen, J., & She, W. 2021. Molecular analysis of 14-3-3 genes in *Citrus sinensis* and their responses to different stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 568.
- Rohlah Amin, S., Zahedi, B., Sai, A., & Nazarian Firoz abadi, F. 2015. Comparison of different method for RNA extraction of pomegranate peel. *New Cellular Biotechnology- Molecular Journal*, 5(19), 39-46. [In Persian]
- MacRae, E. 2007. Extraction of plant RNA. *Methods in Molecular Biology*, 353, 15-24.
- Majidi, M., & Bahmani, Y. 2017. Isolation of high-quality RNA from a wild range of woody plants. *Journal of Plant Molecular Breeding*, 5(2), 50-59. [In Persian]
- Mansouri, M., Hosseini pour, A., Sharifi-sirchi, S., & Massumi, H. 2010. Changes in chitinase and β -1,3-glucanase transcript levels in sweet orange (*Citrus sinensis*) in response to treatment with N *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. *Agricultural Biotechnolog Journal*, 1(2), 39- 52. [In Persian]
- Montazeri, Sh., & Sadat, Sh. 2017. Comparison of different RNA extraction methods from the leaf apple (*Malus domestica*). *New Cellular Biotechnology- Molecular Journal*, 7(27), 55-62. [In Persian]
- Naderi, S., Fakheri, B.A., Esmailzadeh Bahabadi, S., & Kamaladini, H. 2015. Increasing of phenyl alanine ammonia lyase (PAL) gene expression and phenylpropanoid compound of basil (*Ocimum basilicum*) by chitosan. *Modern Genetics Journal*, 9(3), 259-266. [In Persian]
- Nath, O., Fletcher, S., Haward, A., Shaw, L., Agarwal, R., Furtado, A., Henry, R., & Mitter, N. 2022. A comprehensive high-quality DNA and RNA extraction protocol for a range of cultivars and tissue types of the woody crop avocado. *Plants*, 11, 242.

- Nehela, Y., & Killiny, N. 2020. Melatonin is involved in citrus response to the pathogen Huanglongbing via Modulation of phytohormonal biosynthesis. *Plant Physiology*, 184(4), 2216- 2239.
- Shu, C., Sun, S., Chen, J., Chen, J., & Zhou, E. 2014. Comparison of different methods for total RNA extraction from sclerotia of *Rhizoctonia solani*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(1), 50-54.
- Song, Ch., Cao, X., Nicholas, K., Wang, Ch., Li, X., & Fang, J. 2010. Extraction of low molecular weight RNA from *Citrus trifolita* tissues for microRNA northern blotting and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *African Journal of Biotechnology*, 9(51), 8726-8730.
- Tao, N., Cheng, Y., Xu, J., Xu, Q., & Deng, X. 2004. An effective protocol for the isolation of RNA from the pulp of ripening citrus fruit. *Plant Molecular Biology*, 22, 305a-305f.
- Tele, A.A., Banda, M.A., Bachake, S.S. Jadhav, V.B, Deshpande, P.P., Adki, V.S., Gopika, M.K., Shinde, N.A., Sharma, J., Parashuram, S., Sangnure, V.R., Mundiwadikar, D.M., & Singh, N.V. 2019. Quality RNA isolation, cDNA synthesis and qPCR validation of differentially expressed gene in *Punica granatum* L. under influence of *Xanthomonas axonopodis* pv.punicae. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 2542-2547.
- Wang, L., & Stegemann, J. 2009. Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetlytrimethylammonium bromide. *Biomaterials*, 31(7), 1612-1618.
- arei, A., Zamani, Z., Mousavi, A. Fatahi, R., Karimi Alavijeh, M., & Dehsara Salami, S.A. 2012. An Effective protocol for isolation of high- quality RNA from pomegranate seeds. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 6, 32-37.
- Zepeda, B., & Verdonk, J. 2022. RNA extraction from plant tissue with homemade acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform (AGPC). *Current Protocols*, 2, e351.
- Zheng, Q.M., Tang, Zh., & Xu, Q. 2014. Isolation, phylogenetic relationship and expression profiling of sugar transporter genes in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 119, 609-62.