مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۵ شماره ۱ صفحه‌های ۶۵ تا ۷۶ (۱۴۰۳)
مقاله پژوهشی

مقایسه و بهینه سازی روش‌های مختلف استخراج RNA کل از بافت گل خرما جهت انجام مطالعات مولکولی

Comparison and Optimization of Different Methods for Isolating of Total RNA From Date Palm Flower Tissue to Perform Molecular Studies

ایوب مزارعی[۱]، صالحه گنجعلی*[۲]، لیلا فهمیده[۳]، حامد حسن‌زاده خانکهدانی[۴]، حدیث کرد[۵]

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، ایران

۲. گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، ایران

۳. گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

۴. تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.

۵. موسسه IPK آلمان.

نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (saleheganjali@uoz.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۹/۵، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱

چکیده

جداسازی RNA از بافت‌های گیاهان چوبی، بهویژه گل‌های درخت خرما، به‌دلیل داشتن غلظت‌های بالایی از ترکیبات فنولیک، پلی‌ساکاریدها، الیاف فیبری، پروتئین‌ها، متابولیت‌های ثانویه (تانن‌ها، لیگنین‌ها و ترکیبات چرب) بسیار مشکل است؛ زیرا در برخی از روش‌های استخراج RNA، کلاف‌های تولیدی به‌دلیل وجود آلاینده‌های ناشناخته حلالیت کمی دارند و در بعضی موارد کلاف‌های تولیدی ژلاتینی هستند که نشان دهنده وجود آلودگی‌های پلی ساکاریدها است و کمپلکس این ترکیبات با RNA می‌تواند RNA را برای کاربردهایی مانند فن RNA-Seq غیرقابل استفاده کند. بنابراین دستیابی به یک روش استخراج مناسب که بتواند RNAی با کمیت و کیفیت مناسب را تولید کند، از اهمیت بالایی برخوردار است. از این رو در مطالعه حاضر به‌منظور دستیابی به RNAی با کیفیت جهت انجام مطالعات RNA-Seq، هفت روش استخراج RNA (شامل سه کیت (Column RNA Isolation Kit، Total RNA extraction mini kit و Neasy Mini Kit) و چهار بافر استخراج (ترایزول، فنول-کلروفرم، لیتیم کلراید و RNX-Plus™)) با یکدیگر مقایسه و روش استخراج اسید نوکلئیک از گل‌های این گیاه بهینه‌سازی شد. تغییرات صورت گرفته در جهت بهینه‌سازی استخراج RNA شامل استفاده از تیمار پیش‌گرما روی بافر استخراج، کاهش دور سانتریفیوژ حذف آلودگی DNA و حذف DEPC می‌باشد و به‌منظور از بین بردن DNA ژنومی و پروتئین‌ها از DNase و پروتئیناز K استفاده شد و پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن با استفاده از اسپکتروفتومتری و ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. از این رو براساس نتایج این مطالعه مشخص شد که از بین کیت‌ها و روش‌های استفاده شده تنها روش لیتیم کلراید بعد از تیمارهای از DNase و پروتئیناز K و تغییرات صورت گرفته در جهت بهینه‌سازی، از کمیت و کیفیت بالایی از لحاظ غلظت RNA استخراجی (۲۴۷/۵ ng/µl) و وضوح باندهای 28SrRNA و 18SrRNA روی ژل آگارز و همچنین بالا بودن نسبت‌های جذبی A260/A280 و A260/A230 برخوردار بود. بنابراین بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان بیان کرد روش بهینه سازی شده انتخابی بر مشکلات استخراج RNA از بافت‌های سرشار از ترکیبات پلی‌فنولیک، پلی‌ساکاریدی، ترکیبات فیبری، لیگنین‌ها و اسیدهای چرب چون گل خرما فائق آمده و نمونه RNAهای استخراجی توسط این روش برای انجام مطالعات RNA-Seq، توسط این پژوهشگران جهت توالی‌یابی ارسال شد.

واژه‌های کلیدی: اسپکتروفتومتری، استخراج RNA، الکتروفورز ژل آگارز، بافت چوبی، روش‌های مولکولی.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

مقدمه

استخراج RNA فرآیندی است که طی آن RNA کل موجود در یک نمونه همگن شده سلولی جدا و تصفیه می‌شود. این روش آزمایشگاهی در بیوتکنولوژی، مهندسی ژنتیک و موارد متعدد دیگری کاربرد ویژه‌ای دارد و یکی از پیشنیازهای ضروری در فرآیندهایی همچون PCR و RT-PCR، هیبریداسیون ریزآرایه، آنالیز RT-PCR، ساخت کتابخانه cDNA، نوردرن بلاتینگ و دیگر روش‌ها است (Karra *et al*., 2019). اما سه نکته اساسی از قبیل کیفیت RNA، سرعت استخراج و میزان آن باید در فرآیند استخراج مدنظر باشد (Rouholamin *et al*., 2015). یکی از چالش‌های مهم در فرایند استخراج RNA کیفیت و یکپارچگی RNA استخراجی می‌باشد که برای بسیاری از مطالعات زیست‌شناسی مولکولی حیاتی است (Karra *et al*., 2019).

استخراج RNA ژنومی با کیفیت بالا از گیاهان و محصول‌های کشاورزی بخصوص از بافت‌های گیاهان چوبی و چند ساله که حاوی مقادیر بالای ترکیبات پلی‌فنولی و تانن، پلی‌ساکاریدی، اسیدهای چرب، آلکالوئیدها و بافت‌هایی مانند لیگنین (چوب) می‌باشند همیشه یک چالش بزرگ برای پژوهشگران بوده است (Haeerizadeh *et al*., 2016). این ترکیبات با اتصال به پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک سبب تشکیل کمپلکس‌هایی با وزن مولکولی بالا می‌شوند. تشکیل چنین کمپلکس‌هایی سبب غیر قابل حل شدن رسوب‌های RNA می‌شود به طوری که رسوب‌های مایل به رنگ قرمز نشاندهنده آلودگی‌های پلی فنولی و رسوب‌های ژلاتینی بیانگر آلودگی‌های پلی‌ساکاریدی هستند (Sabir, 2012). مثلا ترکیبات پلی‌ساکاریدی تمایل دارند در حضور الکل‌ها با RNA رسوب کنند و به عنوان آلاینده در یک چهارم عصاره باقی بمانند و در مراحل بعدی تداخل ایجاد کنند (Bahador *et al*., 2014) همچنین ترکیبات فنولی با قرار دادن مولکول RNA در معرض هضم آنزیم‌های RNase، RNA را برای Real-Time PCR، RT-PCR، سنتز اولین رشته cDNA و غیره نامناسب سازند (Sabir, 2012). با اینکه ساختار RNA تقریبا در تمام گونه‌ها مشابه است ولی ناخالصی‌ها و یا مقدار نسبی آن‌ها بسته به میزان حلالیتشان متفاوت بوده و در عمل، عوامل بسیار زیادی بر استخراج RNA اثر می‌گذارند. بعضی از این عوامل باعث افزایش درجه خلوص RNAی استخراجی می‌شوند ولی در مقابل برخی ترکیبات از خلوص آن می‌کاهند. از اینرو، آگاهی از نقش این مواد و اثرات آنتاگونیستی احتمالی آن‌ها در مراحل مختلف استخراج، می‌تواند باعث صرفه جویی در وقت و هزینه شده و کیفیت استخراج را بالا ببرد (Haeerizadeh *et al*., 2016).

تاکنون روش‌های زیادی برای استخراج RNA از بافت‌های چوبی ارائه شده است، اما این روش‌ها غالبا با توجه به شرایط و نوع بافت تغییر می‌کنند (Haeerizadeh *et al*., 2016). در همه‌ی روش‌های مرسوم، برای جداسازی RNA معمولاً از مواد شوینده مانند سدیم دودسیل سولفات (SDS)[1] یا استیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB)[2]، دناتوره کننده حلال‌های آلی (فنول و کلروفرم)، عوامل کاهنده (β- مرکاپتواتانول[3] و دی تیوتریتول[4])، یا نمک‌های ایزوتیوسیانات گوانیدینیوم[5] استفاده می‌کنند (Montazeri & Sadat, 2017). بیشتر این روش‌ها در مقیاس زیاد، انرژی بر و زمانبر هستند و در هر روز کاری تنها از تعداد محدودی نمونه می‌توان RNA استخراج نمود (Le Provost *et al*., 2007). از طرفی با وجود تنوع بیولوژیکی و شیمیایی زیاد در گیاهان، تاکنون هیچ روش عمومی استخراج RNA برای همه در دسترس نیست (Javdan Asl *et al*., 2016)؛ زیرا این روش‌ها با مشکلاتی مانند وجود مقادیر زیاد پلی‌ساکاریدها، سطوح زیادی از آنزیم RNase، انواع مختلف ترکیبات فنولی مانند تانن‌ها و الئورسین ترپنوئیدها[6] و غلظت کم اسید نوکلئیک (مقدار زیاد آب) و بافت‌هایی مانند لیگنین (چوب) و الیاف فیبری، که تجزیه آن مشکل است مواجه می‌باشند (Montazeri & Sadat, 2017) و از طرفی، گونه‌های مختلف و بافت‌های متفاوت گیاهان، رفتار متفاوتی در طول استخراج RNA و یا DNA برای برای استفاده در مطالعات مولکولی دارند و بسیاری از پژوهشگران مجبورند زمان زیادی را صرف یافتن روشی مناسب برای استخراج RNA از گیاه مدنظرشان نمایند (Haeerizadeh *et al*., 2016).

۱- Sodium Dodecyl Sulfate
۲- Cation-active cetyltrimethylammonium bromide
۳- B-Mercaptoethanol
۴- Dithiothritol
۵- Guanidinium thiocyanate
۶- Oleoresin terpenoids

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

روش‌های متفاوتی برای استخراج RNA ژنومی کل در گونه‌های مختلف گیاهان پیشنهاد شده است، به عنوان مثال از روش فنول-کلروفرم برای استخراج RNA از گیاهانی مثل انبه، ذرت و سویا (Lopez-Gomez & Gomez-Lim., 1992 & Wang & Ghabrial, 2002) و آرابیدوپسیس (Wang & Ghabrial, 2002)، روش فنول- سدیم دودسیل سولفات برای جداسازی RNA از سه گونه آویشن (Bahador *et al*., 2014)، تریس کلراید لیتیم جهت جداسازی RNA از برگ انگور (Tattersall *et al*., 2005) و روش IHBT برای استخراج RNA از گیاهان دارویی *Arnebia euchroma* و *Rheum australe* (Ghawana *et al*., 2011) استفاده شده است؛ اما تا به حال گزارشی مبنی بر استفاده از چند روش استخراج RNA ژنومی از گل‌های نخل خرما و مقایسه و معرفی بهترین روش استخراج جهت انجام مطالعات RNA-Seq که هدف بعدی مطالعه این پژوهشگران است ارائه نشده است. از این رو در این مطالعه هفت دستورالعمل مختلف استخراج RNA از گل‌های نخل خرما مورد مطالعه قرار گرفت تا با مقایسه آن‌ها بتوان به مناسب‌ترین روشی که بتواند ضمن استخراج RNA با کیفیت مطلوب و کمیت بیشتر، ترکیبات فنولی و متابولیت‌های ثانویه کمتری داشته و در زمان و هزینه‌ها نیز صرفه‌جویی نمایید، دست یافت.

مواد و روش

در این پژوهش اثر هفت روش استخراج RNA بر روی گل‌های نخل خرما، به صورت طرح کاملا تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. نمونه گل‌های نخل خرما در سال ۱۳۹۹ از ایستگاه تحقیقاتی خرما و میوه‌های گرمسیری میناب (استان هرمزگان) جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از برداشت در فویل آلومینیوم بسته‌بندی و فوراً در فلاسک حاوی نیتروزن مایع (با دمای ۱۹۶- درجه سلسیوس) قرار گرفته و به پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل و پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان منتقل شدند و جهت نگهداری طولانی مدت در دمای ۸۰- درجه سلسیوس قرار داده شدند. هفت روش استخراج RNA در این پژوهش شامل: کیت RNeasy Mini Kit (ساخت شرکت Qiagen)، کیت Column RNA Isolation Kit (ساخت شرکت دنازیست آسیا)، کیت Total RNA extraction mini kit (شرکت یکتا تجهیز)، بافر RNX-Plus™ (شرکت سیناژن)، فنول-کلروفرم، بافر لیتیم کلراید و TRIzol® بود.

روش‌های استخراج RNA

استفاده از کیت‌های استخراج RNA

در این روش از کیت Column RNA Isolation Kit شرکت دنازیست آسیا، Total RNA extraction mini kit شرکت یکتا تجهیز و کیت RNeasy Mini Kit کیاژن مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

استفاده از TRIzol®

بر اساس دستور شرکت سازنده به میکروتیوب حاوی بافت (۱۰۰ میلی‌گرم) همگن شده ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر ترایزول اضافه و میکروتیوب‌ها به مدت ۵-۱۰ ثانیه مخلوط شدند تا بافت گیاهی کاملا همگن شود. بعد از قرار دادن تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط، ۲۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه و سپس تیوپ‌ها را به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده تا محتویات داخل آن مخلوط شوند. بعد از قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۳-۲ دقیقه در دمای محیط، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه) شدند. پس از آن فاز رویی جداسازی و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد و پس از آن نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. سپس مایع شناور رویی دور ریخته و به رسوب حاصله آن ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه و به آرامی پیپت شد تا رسوب از ته میکروتیوب جدا شود و سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع روشناور دور ریخته و به منظور خشک شدن رسوب به مدت کم در دمای اتاق گذاشته شد. سپس رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب فاقد RNase حل و مخلوط حاصله را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۷ درجه قرار گرفت.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

استفاده از لیتیم کلراید

در این روش RNA کل طبق روش Channuntapipat و همکاران (2001) استخراج شد. بدین منظور ابتدا ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر لیتیم‌کلراید (شامل Mercaptoethanol، Ethylene Diamine Tetraacetic Acid.، Safety Data Sheet، Polyvinylpyrrolidon و Tris-Hydrochloride) به اضافه ۸۰۰ میکرولیتر از مخلوط فنول اشباع با بافر تریس (Tris-HCl، pH=8) به همراه کلروفرم-ایزوآمیل الکل (نسبت ۱:۲۴) و مرکاپتواتانول (۱۰ میکرولیتر) به هر نمونه پودر شده (۱۰۰ میلی‌گرم) در تیوب ۱۵ میلی‌لیتری به ترتیب اضافه شد. سپس مخلوط حاصل به مدت یک دقیقه تکان داده شد. در مرحله بعد محتویات داخل تیوپ ۱۵ میلی‌لیتری را به داخل چند تیوپ دو میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جداسازی و به حجم آن لیتیم‌کلراید ۴ مولار اضافه شد. پس از قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در فریز ۲۰- درجه سلسیوس، نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور) شدند. به رسوب حاصله ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، اتانول سرد (۷۰ درصد) به مقدار ۸۰۰ میکرولیتر و ۴۰۰ میکرولیتر استات‌سدیم سه مولار با pH = ۵/۴ حل شد. پس از سانتریفیوژ کردن تیوپ‌ها، مایع رویی دور ریخته شده و رسوب حاصله با اتانول ۷۰ درصد سرد شستشو داده شد. در مرحله بعد پس از خارج کردن مایع شناور رویی و خشک شدن تیوپ‌ها، رسوب حاوی RNA در ۴۰ میکرولیتر آب فاقد RNase حل و برای استفاده طولانی مدت به فریزر ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شد.

جدول ۱- مواد مورد استفاده در تهیه ۲۵میلی‌لیتر بافر لیتیم کلراید.

Table 1. Reagents for preparation of 25 ml of lithium chloride buffer.

مواد لازم Reagents	غلظت مورد استفاده Concentraction	میزان مورد نیاز Quantity
Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA)	0.1 M – pH: 8	0.093 g
Licl	0.1 M	0.105 g
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	%1 v/v	0.25 ml
Polyvinyl Pyrrolidine (PVP)	%5 v/v	1.25 ml
Tris-HCl	0.1 M – pH: 8	0.394 g
Mercaptoethanol	0.1 v/v	0.5 ml

استفاده از فنول-کلروفرم

در این روش استخراج RNA کل طبق روش Ghabrial و Wang (2002) صورت گرفت. بدین منظور ابتدا به ۱۰۰ میلی‌گرم گل پودر شده ۳۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (NaCl، EDTA، SDS و Mercaptoethanol) و ۳۰۰ میکرولیتر فنول کالیبره شده با بافر TE (۷-۸ =pH) اضافه شد. پس از چندین تکان آرام به تیوپ ها ۱۴۴ میکرولیتر کلروفرم و ۶ میکرولیتر ایزو آمیل الکل اضافه نموده (نسبت ۱:۲۴) و تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در فریزر (منفی ۲۰ درجه) نگهداری و بعد از آن به مدت ۴ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه) شدند. بعد از تشکیل سه فاز، مایع رویی شفاف به یک میکروتیوب جدید منتقل و ۲-۱/۵ برابر حجم مایع رویی اتانول مطلق سرد و ۱ برابر حجم آن استات سدیم ۳ مولار با pH=۵ اضافه و به مدت یک ساعت داخل فریزر قرار گرفتند. پس از بیرون آوردن آن‌ها، نمونه‌ها سانتریفیوژ (به مدت ۱۶ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس) شدند. در مرحله بعد حذف مایع رویی و اضافه کردن ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد به رسوب حاصله میکروتیوب‌ها و در ادامه سانتریفیوژ به مدت ۴ دقیقه یا ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد. در آخرین مرحله با ریختن مایع شناور رویی و قرار دادن میکروتیوب‌ها در زیر هود، اتانول کاملا تبخیر گردید و در نهایت رسوب حاوی RNA را در۴۰-۲۰ میکرولیتر آب فاقد RNAse حل شد.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

جدول ۲- مواد مورد استفاده در تهیه ۵۰ میلی‌لیتر بافر استخراج به روش فنول-کلروفرم.

Table 2. Reagents for preparation of 50 ml of extraction buffer by phenol-chloroform method.

مواد لازم Reagents	غلظت مورد استفاده Concentraction	میزان مورد نیاز Quantity
Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA)	0.1 M – pH: 8	0.186 g
NaCl	0.1 M	0.292 g
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	%1 v/v	0.5 ml
Mercaptoethanol	0.1 v/v	0.5 ml

استفاده از RNX-Plus™

بر اساس دستور شرکت سازنده به میکروتیوب حاوی بافت هموژنیزه شده ۱۰۰۰میکرولیتر بافر RNX-Plus™ سرد و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و میکروتیوب‌ها به مدت۱۰- ۵ ثانیه ورتکس شدند تا بافت گیاهی کاملا هموژنیزه شود. بعد از قرار دادن تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط، تیوپ‌ها به مدت ۱۵ ثانیه سر و ته شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ هزار دور در دقیقه) شدند. پس از آن فاز رویی جداسازی و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد به آن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. سپس مایع شناور رویی دور ریخته و به آن ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه و به آرامی پیپت شد تا رسوب از ته میکروتیوب جدا شود و سپس به مدت ۸ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع روشناور دور ریخته و به منظور خشک شدن رسوب به مدت کم در دمای اتاق گذاشته شد. سپس رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب فاقد RNase حل شد.

تیمار DNAse و پروتئیناز K برای حذف آلودگی در RNA

RNAی کل استخراج شده ممکن است دارای آلودگی پروتئینی و DNA باشد. از این رو به منظور حذف DNA و پروتئین از RNA استخراج شده، از آنزیم DNase و پروتئیناز K (طبق دستورالعمل شرکت‌های سازنده) برای روش‌های RNX-Plus™، فنول-کلروفرم، بافر لیتیم کلراید و TRIzol®استفاده شد.

بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراجی

برای تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراجی از دو روش الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتر استفاده شد. به‌منظور بررسی کیفیت RNA استخراج شده از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. بدین منظور مقدار پنج میکرولیتر از RNA با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط شد و در داخل چاهک تزریق شد و الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. سپس توسط دستگاه ژل داکیومنتیشن[1] به وسیله پرتو فرابنفش باند RNA مشاهده و تصویر برداری انجام شد. همچنین برای بررسی غلظت RNA از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. ابتدا دستگاه با استفاده از ۱۰۰ میکرولیت آب فاقد RNase کالیبره شد. پس از کالیبره‌کردن دستگاه، داخل کووت به نسبت۹۸ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۲ میکرولیتر از RNA ژنومی ریخته و با سمپلر به آرامی مخلوط شد و در طول موج A260/A280 و A260/A230 مورد آزمایش قرار گرفت و چگالی نوری تعیین شد (Montazeri & Sadat, 2017).

واکاوی آماری داده‌ها

داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تجزیه شدند و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد انجام شد. از نرم افزار SAS نسخه ۹ و نرم افزار Excel به‌ترتیب برای تجزیه‌های آماری و رسم شکل‌ها استفاده شد.

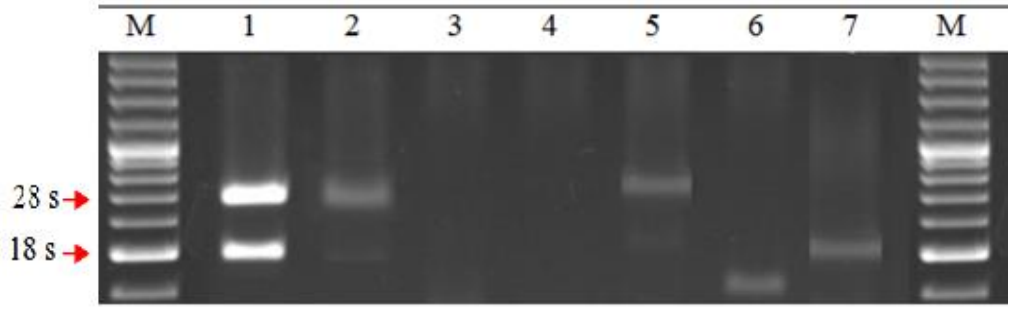
۱- Gel Documentation

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

نتایج

نتایج کیفیت RNA استخراجی

به منظور بررسی کیفیت RNA استخراج شده از بافت گل خرما با روش‌های مورد استفاده، از ژل آگارز یک درصد استفاده شد و با مقایسه وضوح باندهای به دست آمده از هر روش با شاخص مارکر کیفیت باندهای RNA استخراج شده بررسی شد. شکستگی قطعه‌های RNA در طی مراحل استخراج که به صورت دنباله در روی ژل دیده می‌شود به عنوان معیاری برای کیفیت پایین‌تر برای نمونه‌های RNA تلقی می‌گردد زیرا وجود RNA های خرد شده مانع از مشاهده واضح باندها می‌شود و به‌دلیل متفاوت بودن اندازه mRNA ها، این نوعRNA ها به‌وضوح بر روی ژل قابل مشاهده نبوده و به‌صورت اسمیر در بین باندهای مربوط به RNAهای ریبوزومی دیده می‌شوند. ریبوزوم‌های یوکاریوتی حاوی ۴ مولکول rRNA از قبیل 5S، 5.8S، 28S و 18S هستند که سه نوع اول متعلق به زیر واحد بزرگ (60s) و نوع 18S مربوط به زیر واحد کوچک (40s) می‌باشد، از بین روش‌های مورداستفاده، فقط در نتایج روش لیتیم کلراید، وجود باندهای مجزای مربوط ۲۸ s و ۱۸ s به وضوح و بدون تخریب و شکستگی و به‌صورت سالم و یکپارچه مشاهده شد. همچنین دو برابر بودن ضخامت باند ۲۸ s نسبت به باند ۱۸ s و وجود اسمیر بین دو باند نیز حاکی از بالا بودن کیفیت RNA استخراج شده در این روش بود (شکل ۱).



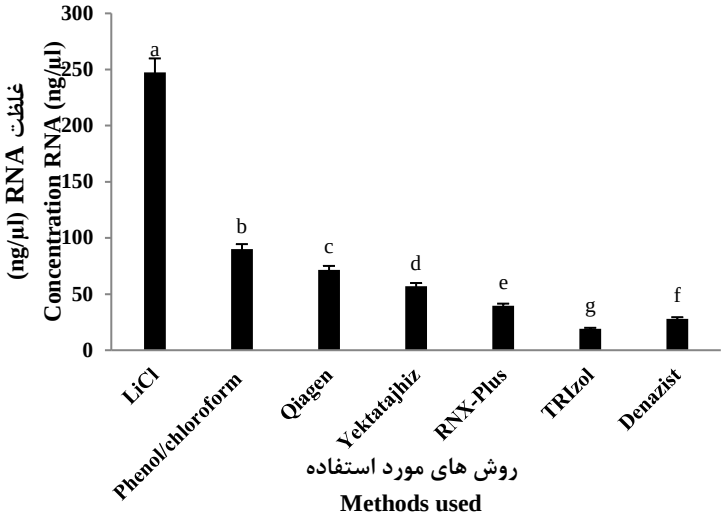
شکل ۱- نمونه‌هایی از کیفیت RNA استخراج شده از بافت گل نخل خرما روی ژل آگارز. چاهک M (مارکر)، چاهک ۱ (روش لیتیم کلراید)، چاهک ۲ (روش فنول-کلروفرم)، چاهک ۳ (روش ترایزول)، چاهک ۴ (روش RNX-Plus)، چاهک ۵ (کیت کیاژن)،چاهک ۶ (کیت یکتاژن)، چاهک۷ (کیت دنازیست)، چاهک M (مارکر).

Fig. 1. Quality of RNA extracted from flower of date palm on agarose gel. Well: M (Marker), 2 (LiCl), 3 (Phenol/chloroform), 4 (Qiagen), 5(Yektatajhiz), 6 (RNX-Plus), 7 (TRIzol), 8 (Denazist), M (Marker).

نتایج کمیت RNA استخراجی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد بین روش‌های مورد استفاده، از لحاظ غلظت RNA استخراجی و نسبت‌های جذبی آن‌ها اختلاف آماری معنی داری در سطح یک درصد وجود دارد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین (شکل ۲) مشخص شد که بین روش‌های مورد استفاده، از لحاظ غلظت RNA استخراجی اختلاف معنی‌داری وجود داشت و میزان اسید نوکلئیک استخراج شده بسته به روش استخراج بکار برده شده از ۱۹ تا۲۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر متغیر بود، به طوری که بیشترین غلظت استخراجی مربوط به روش لیتیم‌کلراید و کمترین هم مربوط به روش ترایزول بود.

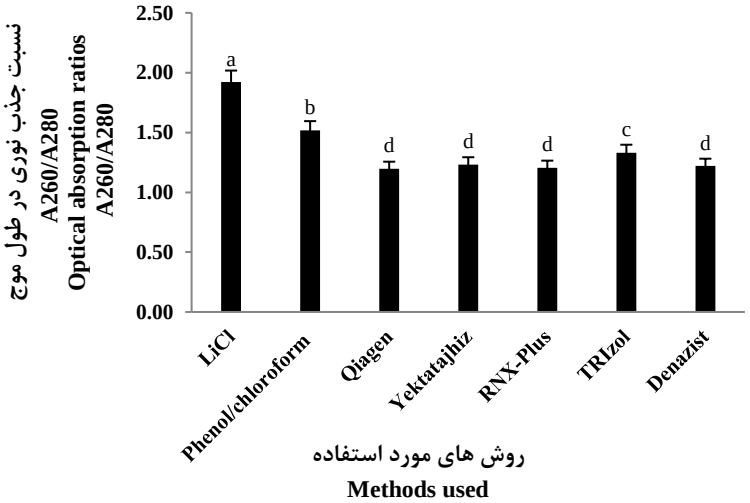
[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]



شکل ۲- مقایسه میانگین میزان غلظت RNA استخراجی توسط روش‌های مورد استفاده. ستون‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، در سطح احتمال یک درصد، اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

Fig. 2. Comparison of the average of concentration extracted RNA by the methods used. In each column, the averages that have the same letters are not significantly different at the *1%* probability level.

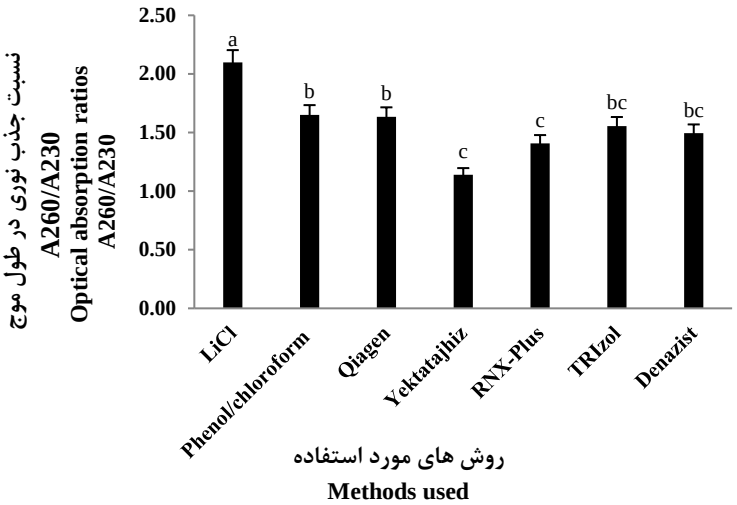
بر اساس نتایج مقایسه میانگین (شکل‌های ۳ و ۴)، بین روش‌های مورد استفاده از لحاظ نسبت‌های جذب محاسبه شده اختلاف معنی داری مشاهده شد و این میزان جذب بسته به روش استخراج بکار برده شده در طول موج A260/A280 بین ۱/۲ تا ۱/۹۲ و در طول موج A260/A230 هم بین ۱/۴۹-۲/۱ متغیر بود. نسبت مقدار جذب RNA در طول موج A260 نانومتر به مقدار جذب در طول موج A280 در محدوده ۲-۱/۸ و نسبت جذب در طول موج A260 نانومتر به طول موج A230 نانومتر هم در ۲/۲-۲ نشان دهنده این مطلب است که جذب بیشتر توسط اسیدهای نوکلئیک صورت گرفته و کیفیت RNA به دست آمده مناسب است. بر این اساس از بین روش‌های استفاده شده، بهترین نسبت جذب شده در هر دو طول موج A260/A280 و A260/A230 در روش استخراج RNA با لیتیم‌کلراید مشاهده شد و در سایر روش‌ها نسبت جذب طول موج A260/A230 و A260/A280کمتر از حد قابل قبول بود.



شکل ۳- مقایسه میانگین نسبت جذب نوری در طول موج A260/A280 توسط روش‌های مورد استفاده. ستون‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، در سطح احتمال یک درصد، اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

Fig. 3. Comparison of the average of optical absorption ratio A260/A280 calculated by the methods used. In each column, the averages that have the same letters are not significantly different at the *1%* probability level.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]



شکل ۴- مقایسه میانگین نسبت جذب نوری در طول موج A260/A230 توسط روش‌های مورد استفاده. ستون‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، در سطح احتمال یک درصد، اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

Fig. 4. Comparison of the average of optical absorption ratio A260/A230 calculated by the methods used. In each column, the averages that have the same letters are not significantly different at the *1%* probability level.

بحث

کیفیت RNA استخراجی با چند روش از جمله: محاسبه نسبت‌های جذب نور در طول‌های موج A260/A280 و A260/A230 (جهت بررسی وجود آلودگی‌های پلی‌فنولی، پلی‌ساکاریدی، پروتئینی و متابولیت‌های ثانویه) و وضوح باندهای مجزای 28SrRNA و 18SrRNA روی ژل آگارز ارزیابی می‌شود (Chang *et al*., 1993; Javdan Asl *et al*., 2016). از این رو قرار گرفتن نسبت A260/A280 در محدوده ۲-۱/۸ و نسبت A260/A230 در محدوده ۲/۲-۲ نشان دهنده کیفیت مطلوب و خلوص لازم RNA به دست آمده است (Montazeri & Sadat, 2017). اما اگر نسبت جذب A260/A230 کمتر از مقدار فوق باشد نشان‌دهنده آلودگی به پلی‌ساکاریدی و پلی‌فنولی است و پایین‌تر بودن نسبت جذب A260/A280 کمتر از ۱/۸ به طور کلی نشان دهنده آلودگی پروتئین در طی مراحل استخراج می‌باشد (Javdan Asl *et al*., 2016).

در ایـــن مطالعـــه ابتـــدا از برخی کیـــت‌ها و بافرهای تجـــاری همچون کیت RNeasy Mini Kit، Column RNA Isolation Kit، Total RNA extraction mini kit و بافر RNX-Plus™ و TRIzol® استفاده شد ولی با وجـود گـزارش‌هـای فراوان مبنی بر کارا بودن این کیت‌ها برای اسـتخراج RNA در گیاهان مختلف، در مورد بافت مورد مطالعه در این پژوهش، موفقیت آمیز نبوده و طی اجرای آن‌ها مقدار رسـوب بـه دسـت آمده به طور غیرعادی زیاد و به رنگ قهوه‌ای تیره بود که این نشان‌دهنده حضـور پـروتئین، کربوهیدرات و ترکیبات فنولی مخلوط شـده بـا RNA و عدم خالص بودن RNA اسـت (Javdan Asl *et al*., 2016 & Haeerizadeh *et al*, 2016). رسوب قهوه‌ای حاصله معمولا به گونه‌ای بود که حل شدن آن در آب مشـکل بود و حتی اعمال تیمارهای پروتئیناز K جهت حذف پروتئین هم بی‌تاثیر بود. این کیفیت پائین RNA را می‌توان به رسـوب هم‌زمـان پلی‌ساکاریدها و اکسیداسـیون ترکیبـات فنولـی کـه بـه‌طـور برگشـت ناپـذیر بـا RNA واکـنش مـی‌دهنـد، نسـبت داد (Haeerizadeh *et al*, 2016).

بر اساس نتایج این مطالعه مشخص شد که بیشترین نسبت جذبی در بین روش‌های ارایه شده مربوط روش لیتیم کلراید بود به طوری که در این روش نسبت جذب A260/A230 و A260/A280 به ترتیب بالای ۲ و ۱/۸ بود که این امر نشان‌دهنده کارآمد بودن این روش در جداسازی فازها در زمان استخراج می‌باشد (شکل‌های ۳ و ۴). طی کاربرد این روش سه فاز کاملاً مجزا از یکدیگر مشاهده شد که فاز اول، مایع رو شناور محتوی اسید نوکلئیک (فاز شفاف)، فاز دوم رسوب حاصل از تجمع

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

کربوهیدرات، پروتئین‌ها، رنگدانه‌ها و سایر بقایای سلولی و فاز سوم که در انتها قرار دارد شامل فنول-کلروفرم ایزوآمیل‌الکل است. درصورت اختلاط این فازها با فاز رو شناور شفافیت این فاز کمتر شده و آلودگی‌های حاصل مانع از انجام درست بقیه مراحل پژوهش می‌شوند.

در این پژوهش همانند گزارش Haerizadeh و همکاران (2016) ۱۰۰ میلی‌گرم بافت استفاده شد زیرا هر قدر میزان بافت برداشتی بیشر باشد به همان میزان آلودگی‌ها بیشتر و در نتیجه حذف آن‌ها مشکل‌تر خواهد بود. از طرفی در این پژوهش به-منظور افزایش حلالیت بافر استخراج از تیمار پیش‌گرما استفاده و مشخص شد که اعمال تیمار پیش‌گرمای در بافر استخراج سبب برای افزایش حلالیت بافر و تجزیه دیواره سلول‌ها می‌شود که با یافته‌های گزارش پژوهشگرانی چون Chang و همکاران (1993)، Kolosava و همکاران (2004) و Haerizadeh و همکاران (2016) هم‌خوانی دارد. از طرفی در این پژوهش جهت کاهش ترکیبات پلی‌ساکاریدی طبق روش ارایه شده توسط Kolosova و همکاران (2004) و Haeerizadeh و همکاران (2016) از ترکیب سدیم‌استات ۳ مولار و اتانول ۱۰۰ درصد (بجای اتانول ۷۰ درصد) به صورت دوره‌ای و در چند مرحله استفاده شد. همچنین در این پژوهش سرعت دور سانتریفیوژ در مراحل اولیه استخراج تا حدی کاهش یافت این مرحله تا زمانی که فاز رویی شفاف مشاهده شود، تکرار شد. طی کاهش دور سانتریفیوژ ممکن است که پروتئین و DNA به دلیل جرم مولکولی بیشتر نسبت به RNA در فاز پائین‌تر رسوب کنند که در این حالت فاز آبی کاملا شفاف (البته بسته نوع بافت)، در سطح رویی محلول موجود در تیوب مشاهده می‌شود که فقط حاوی RNA می‌باشد (Haerizadeh *et al*., 2008).

در مطالعه ای Javdan Asl و همکاران (2016) کیفیت RNA استخراجی گیاه دارویی بومادران را با استفاده از سه روش لیتیم کلراید، فنول-کلروفرم و RNX-Plus™ بررسی و نتایج آن‌ها نشان داد که بیشترین کیفیت و غلظت RNA استخراجی مربوط به روش فنول-کلروفرم و سپس روش RNX-Plus™ بود و کمترین غلظت و کیفیت RNA جداسازی شده مربوط به روش لیتیم کلراید بود. بر خلاف نتایج این پژوهشگران یافته‌های این مطالعه نشان داد که روش لیتیم کلراید دارای بهترین کیفیت RNA از لحاظ وضوح باندهای مجزای 28SrRNA و 18SrRNA و بیشترین غلظت (۲۴۷/۵ ng/µl) و نسبت‌های جذبی در طول‌های موج A260/A280 و A260/A230 بود. در تایید نتایج این مطالعه Tattersall و همکاران (2005) به منظور استخراج از برگ‌های انگور از پانزده پروتکل مختلف استفاده و بیان کردند که پروتکل لیتیم‌کلراید با وجود زمان‌بر بودن آن، اما به دلیل کمیت و کیفیت RNA استخراجی به عنوان پروتکلی مناسب جهت استخراج RNA برگ و ریشه پیشنهاد می‌شود. در گزارشی دیگر جهت استخراج RNA با کیفیت از گل‌ها گندم از چهار پروتکل از جمله روش لیتیم کلراید استفاده و نتایج آن‌ها نشان داد که پروتکل لیتیم کلراید از لحاظ RNA استخراجی از کیفیت و کمیت قابل قبولی برخودار است (Manickavelu *et al*., 2007). در پژوهشی دیگر Alisa و همکاران (2021) به منظور استخراج RNA با کیفیت از دانه‌های رقم *Golden Delicious* درخت سیب از چهار روش: لیتیم کلراید تغییر یافته، روش CTAB، کیت‌های AurumTM Total RNA Mini Kit و Quick-RNA MiniPrep استفاده و نتایج نشان داد که از بین روش‌های استفاده شده روش لیتیم کلراید دارای بیشترین میزان RNA استخراجی (۴۷۷/۷ ng/µl) و بیشترین میزان جذبی در طول موج‌های A260/A280 (۲/۱۷) و A260/A230 (۲/۲۲) است و روش CTAB با غلظت ۲۲۳/۷۸ ng/µl، RNA استخراجی و دارا بودن نسبت‌های جذبی ۲/۱۵ و ۲/۱ به ترتیب در طول موج‌های A260/A280 و A260/A230 در مرتبه بعدی قرار داشت.

بیشتر روش‌های استخراج عمدتا بر مبنای روش‌های نمک گوانیدینیوم تیوسیانات، CTAB و فنول/SDS هستند؛ در بافرهایی مثل RNX-plus™، TRIzol® و برخی Mini Kits نمک‌های گوانیدینیوم به عنوان دناتوره‌های پروتئین و بازدارنده‌های آنزیم‌های RNase کاربرد دارد، اما این نمک‌ها، عامل مؤثری برای جداسازی RNA از کمپلکس‌های غیرپروتئینی در زمان وجود متابولیت‌های ثانویه نیستند و به علت به سختی حل شدن RNA در محلول ممکن است طی فرایند استخراج، RNA از بین بروند (Liu *et al*., 1998). شاید یکی از دلایل برتری روش لیتیم کلراید وجود مواد موجود در بافر و مراحل استخراج آن باشد هر چند که در یک یا دو مورد با بافر روش‌هایی چون فنول-کلروفرم مشابه بود: مثلا کاربرد ماده PVP در بافر این روش، با تشکیل پیوند هیدروژنی با ترکیبات پلی فنولی و تشکیل کمپلکس، باعث جداسازی ترکیبات پلی فنولی از اسیدهای نوکلئیک شد (Rouholamin *et al*., 2015) این نکته با نتایج مطالعه Haerizadeh و همکاران (2016) و Lewinsohn

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

و همکاران (1994) که بیان کردند کاربرد PVP در ترکیب بافر استخراج در حذف و رسوب دادن ترکیبات فنولی موثر است هم‌راستا می‌باشد. همچنین این پژوهشگران اظهار داشتند که کاربرد تکی این ماده در مرحله جداگانه‌ای به دلیل عدم حلالیت آن و همچنین افزایش احتمال حضور RNaseها توصیه نمی‌شود و افزودن آن به بافر استخراج مناسب‌تر است چرا که در آن زمان وجود اورین تری کربوکسیلیک اسید مانع از فعالیتRNaseها می‌شود.

در پژوهش حاضر، مشابه نتایج Yang و همکاران (2008) جهت جلوگیری از هرگونه واکنش اکسیداسیون نامطلوب از بتا-مرکاپتو اتانول در بافر استخراج استفاده شد زیرا این ماده با ممانعت از اکسیداسیون فنول‌ها و آزادسازی کوئینون‌ها از ترکیبات فنولی و شکستن پیوند دی‌سولفیدی باعث غیرفعالسازی آنزیم‌های RNase می‌شود و ماده SDS به‌عنوان حذف‌کننده‌ی لیپیدهای غشایی، شکستن دیواره سلولی و دیواره هسته، مطرح بوده و همچنین به جدا شدن ترکیبات پروتئینی از RNA کمک می‌کند (Rouholamin *et al*., 2015) و EDTA مورد استفاده در این روش، از فعالیت یون‌های منیزیم که به عنوان کوفاکتور جهت فعالیت آنزیم‌های نوکلئاز هستند، جلوگیری می‌کند (Javdan Asl *et al*., 2016). اما در کنار همه این مواد نمک لیتیم کلراید نقش اساسی در مراحل اولیه و پایانی استخراج دارد زیرا این ماده در مراحل اولیه از طریق ایجاد برهمکنش بین قند ریبوز RNA و کاتیون‌های مثبت (لیتیم) امکان جداسازی، تاخوردن و رسوب RNA را از DNA و پروتئین را در محلول آبی فراهم می‌کند و در مراحل پایانی هم کاربرد مجدد آن سبب جداسازی و خالص‌سازی اسیدهای نوکلئیک از آلاینده‌های مراحل اولیه می‌شود (Gautam, 2022). نتایج این پژوهش با مطالعه‌ای که Fu و همکاران (2004) بر روی گیاه *Aegiceras corniculantum* و Haerizadeh و همکاران (2016) روی نهال‌های چهار ساله *Abies grandis* و نهال‌های شش ساله *Cedrus deodara* داشتند و گزارش کرده بودند که افزودن لیتیم‌کلراید به بافر استخراج موجب حذف پلی‌ساکاریدهای درگیر با RNA می‌شود، مطابقت دارد ولی در پژوهش حاضر بر خلاف نتایج مطالعه Chang و همکاران (1993)، که بیان شد اعمال و افزودن لیتیم‌کلراید به بافر استخراج، سبب کم شدن کمیت و کیفیت RNA و ایجاد ناخالصی در آن می‌شود، هیچ گونه محدودیتی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

از آن‌جایی که هدف اصلی این پژوهش انجام مطالعات RNA-Seq بود دست‌یابی به RNA با کیفیت از ملزومات انجام پژوهش فوق بود اما به دلیل وجود ترکیبات پیچیده پلی‌فنولی مانند فلاون‌ها، فلاونول‌ها و فلاوان‌ها (Latifian *et al*., 2020) ، پلی‌ساکاریدی، پروتئینی، الیاف فیبری و ترکیبات روغنی بالا از یک طرف (Karra *et al*., 2019) و از طرفی دیگر کم بودن میزان کلی RNA در این بافت (Ainsworth, 1994)، دستیابی به RNA به ویژه mRNA در بافت گل مشکل می باشد. از این‌رو انتخاب روش‌های گزارش شده در این پژوهش به طور عمده بر اساس مواد و یا ترکیب‌هایی بوده است که حضور آن‌ها بتواند تا حدودی منجر به حذف ترکیب‌های پیچیده پلی‌فنولی، پلی ساکاریدی و یا متابولیت‌های ثانویه گردد؛ بنابراین بر اساس نتایج این پژوهش پروتکل لیتیم کلراید به دلیل این که دارای بیشترین میزان RNA استخراجی و وضوح باندهای 28SrRNA و 18SrRNA روی ژل آگارز و همچنین بالا بودن نسبت‌های جذبی A260/A280 و A260/A230 نسبت به سایر روش‌ها، به‌عنوان پروتکل انتخابی این پژوهش انتخاب شد و نمونه RNAهای استخراجی توسط این روش برای انجام مطالعات RNA-Seq، جهت توالی‌یابی ارسال شد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه زابل برای حمایت مالی با کد گرنت ۷۰۹۲ و تمامی همکاران محترم پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان و همچنین پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل که صمیمانه در اجرای این پژوهش مساعدت نمودند، قدردانی می‌شود.

منابع References

Ainsworth, C. (1994). Isolation of RNA from floral tissue of Rumex acetosa (Sorrel). *Plant Molecular Biology Reporter*, *12*, 198-203.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

Alisa, M., Maria, S., Ilya, S., Sergey, E., Vladimir, P., & Natalia, N. (2021). Isolation of high-quality RNA from plant seeds. *Biological Communications*, *66*(2), 144-150.

Bahador, S., Rabiei, B., & Hassani Kumleh, S. H. (2014). Comparison of different methods for isolating of total RNA from leaf of three Thyme species rich in secondary metabolites. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, *22*(1), 11-24.

Chang, S. J., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees.

Channuntapipat, C., Sedgley, M., & Collins, G. (2001). Sequences of the cDNAs and genomic DNAs encoding the S1, S7, S8, and Sf alleles from almond, Prunus dulcis. *Theoretical and Applied Genetics*, *103*, 1115-1122.

Fu, X., Deng, S., Su, G., Zeng, Q., & Shi, S. (2004). Isolating high-quality RNA from mangroves without liquid nitrogen. *Plant Molecular Biology Reporter*, *22*(2), 197a.

Gautam, A. (2022). Lithium chloride-based isolation of RNA. In *DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts* (pp. 69-72). Cham: Springer International Publishing.

Ghawana, S., Paul, A., Kumar, H., Kumar, A., Singh, H., Bhardwaj, P. K., ... & Kumar, S. (2011). An RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites. *BMC Research Notes*, *4*, 1-5.

Haeerizadeh, F., Masoomi Asl, A., Azadi, P., Rajabi-memari, H., & Aboofazeli, N. (2016). Optimization of RNA extraction protocol for trees bark tissue of coniferous family. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, *24*(1), 102-113.

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.

Karra, S., Sebii, H., Borchani, C., Danthine, S., Blecker, C., Attia, H., ... & Bouaziz, M. A. (2019). Physico-chemical and functional properties of dried male date palm flowers. *Food Bioscience*, *31*, 100441.

Kolosova, N., Miller, B., Ralph, S., Ellis, B. E., Douglas, C., Ritland, K., & Bohlmann, J. (2004). Isolation of high-quality RNA from gymnosperm and angiosperm trees. *Biotechniques*, *36*(5), 821-824.

Latifian, M., Rah, B., & Ahmadizadeh, S. (2020). Effect of Inoculating of Date Fruit with the Fungus Beauveria Bassiana on Fruit Quality and Shelf Life of Sayer, Zahedi, and Deiri Cultivars. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, *21*(4), 483-498.

Le Provost, G., Herrera, R., Paiva, J. A., Chaumeil, P., Salin, F., & Plomion, C. (2007). A micro method for high throughput RNA extraction in forest trees. *Biological Research*, *40*(3), 291-297.

Lewinsohn, E., Steele, C. L., & Croteau, R. (1994). Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms. *Plant Molecular Biology Reporter*, *12*, 20-25.

Liu, J. J., Goh, C. J., Loh, C. S., Liu, P. E. I., & Pua, E. C. (1998). A method for isolation of total RNA from fruit tissues of banana. *Plant Molecular Biology Reporter*, *16*, 87-87.

Lopez-Gomez, R., & Gomez-Lim, M. A. (1992). A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *HortScience*, *27*(5), 440-442.

Manickavelu, A., Kambara, K., Mishina, K., & Koba, T. (2007). An efficient method for purifying high-quality RNA from wheat pistils. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *54*(2), 254-258.

Montazeri, S., & Sadat, S. (2017). Comparative study of different protocols for isolation of RNA from apple leaves (*Malus domestica*). *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, *7*(27), 55-62

Rouholamin, S., Zahedi, B., Saei, A., & Nazarian Firouzabadi, F. (2015). Comparison of three genomic RNA extraction methods from pomegranate peel. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, *5*(19), 39-46.

Sabir, J. S. (2012). Abundant high-quality RNA from medicinal plants for molecular applications. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(39), 5214-5221.

Tattersall, E. A., Ergul, A., AlKayal, F., DeLuc, L., Cushman, J. C., & Cramer, G. R. (2005). Comparison of methods for isolating high-quality RNA from leaves of grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *56*(4), 400-406.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

Wang, R. Y., & Ghabrial, S. A. (2002). Effect of aphid behavior on efficiency of transmission of Soybean mosaic virus by the soybean-colonizing aphid, Aphis glycines. *Plant Disease*, *86*(11), 1260-1264.

Yang, G., Zhou, R., Tang, T., & Shi, S. (2008). Simple and efficient isolation of high-quality total RNA from Hibiscus tiliaceus, a mangrove associate, and its relatives. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *38*(3), 257-264.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 25 (1): 65-76 (2024)
Research article

Comparison and Optimization of Different Methods for Isolating of Total RNA From Date Palm Flower Tissue to Perform Molecular Studies

Ayoub Mazarei[1], Salehe Ganjali[2]*, Leila Fahmideh[3], Hamed Hassanzadeh Khankahdani[4], Hadis Kord[5]

[1]. Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran
[2]. Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran
3. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran [3]Associate
[4]Horticultural Crops Research Department, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.
[5]. Department IPK Gatersleben Gemany

Corresponding Author's E-mail: saleheganjali@uoz.ac.ir

RNA extraction from hardwood tissues, especially in date palm flowers, is very hard because they have high concentrations of phenolic compounds, polysaccharides, fibers, proteins, and secondary metabolites(tannins, fatty compounds, and lignin); Some RNA extraction methods yield that are poorly soluble, indicating the presence of unknown contaminants, whereas others are gelatinous, indicating the presence of polysaccharides. RNA can make complexes with polysaccharides and phenolic compounds render the RNA unusable for applications such as the RNA-Seq technique. Therefore, it is important to a suitable extraction method to produce a good quality RNA. Therefore, in this study, to obtain quality RNA for RNA-Seq studies, seven RNA extraction methods (including three kits (Column RNA Isolation Kit, Total RNA Extraction Mini Kit, and Neasy Mini Kit) and four extraction buffers (Triazole, Phenol-Chloroform, Lithium Chloride, and RNX-Plus^{TM})) were compared and the nucleic acid extraction method from the flowers of this plant was optimized. Modifications for optimization of RNA extraction were preheating treatment of extraction buffer, and decreasing centrifuge rounds to eliminate DNA contaminations and DEPC. For genomic DNA and protein elimination, extracted RNA was treated with DNase and Proteinase-K enzyme. After RNA extraction, its quantity and quality were assessed by spectrophotometry and gel electrophoresis. Based on the results of this study, it was found that among the kits and methods used, Lithium chloride method after DNase and Proteinase-K treatment and modifications for optimization had high quality and quantity in terms of extracted RNA concentration (247.5 ng/µl) and resolution of 28SrRNA and 18SrRNA bands on agarose gel as well as high absorbance ratios of A260/A280 and A260/A230. Therefore, based on the results of this study, it can be said that the selected optimized method has overcome the problems of extracting RNA from tissues rich in polyphenolic compounds, polysaccharides, and secondary metabolites such as date palm flowers and the samples of RNAs extracted by this method were sent by these researchers for sequencing for RNA-Seq studies.

Keywords: Spectrophotometry, RNA extraction, Agarose gel electrophoresis, Bark tissue, Molecular methods.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]