

Usporedba izolacije genomske DNA iz listova soje i suncokreta

Lovrić, Monika

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:920059>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-18**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Monika Lovrić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Usporedba izolacije genomske DNA iz listova soje i suncokreta

Završni rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Monika Lovrić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Usporedba izolacije genomske DNA iz listova soje i suncokreta

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. izv.prof.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
2. izv.prof.dr.sc. Andrijana Rebekić
3. prof.dr.sc. Sonja Vila

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku
Preddiplomski sveučilišni studij smjera Bilinogojstvo
Monika Lovrić

Usporedba izolacije genomske DNA iz listova soje i suncokreta

Sažetak:U ovom radu provedena je izolacija genomske DNA iz listova soje i suncokreta, a u istraživanju korištene su CTAB i SDS metode izolacije. Cilj rada bio je izolirati DNA te utvrditi čistoću i količinu izolirane DNA. Iz obje ispitivane biljne vrste uspješno je izolirana DNA optimalnih vrijednosti omjera absorbanci ($A_{260}/280$ 1,7 – 2,00; $A_{260}/230 >2,0$). Najveća količina DNA izolirana je CTAB (1225,6 ng/ μ l), dok je najmanja količina izolirana SDS metodom (258,51 ng/ μ l).

Ključne riječi:DNA, izolacija DNA, CTAB metoda, SDS metoda, biofotometrijska analiza, čistoća DNA.

22 stranica, 4 tablice, 21 slika, 18 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Science Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Plant production
Comparison of genomic DNA isolation from soybean and sunflower leaves

Summary:In this work, genomic DNA isolation from soybean and sunflower leaves was performed, and using CTAB and SDS isolation methods. The aim of the study was to isolate DNA and determine its purity quantity. DNA was successfully isolated from both plant species with optimal absorbance ratio ($A_{260}/280$ 1,7 – 2,00; $A_{260}/230 >2,0$). The highest DNA yield was recorded with CTAB (1225.6 ng/ μ l) , while the lowest yield was recorded with SDS method (258.51 ng/ μ l).

Key words:DNA, DNA isolation, CTAB method, SDS method, biophotometric analysis, DNA purity

22 pages, 4 table, 21 figures, 18 references

BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. MATERIJALI I METODE.....	2
2.1. Biljni materijal	2
2.1.1. Soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.).....	2
2.1.2. Suncokret (<i>Helianthus annuus</i> L.).....	2
2.2. Priprema biljnog materijala	3
2.3. Izolacija DNA	5
2.3.3. Mjerenje čistoće i količine izolirane DNA	14
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	16
4. ZAKLJUČAK.....	20
5. POPIS LITERATURE.....	21

1. UVOD

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) je nasljedni ili genetski materijal prisutan u svim stanicama, nosi informacije o strukturi i funkciji živih bića. Ljude je uvijek zanimalo nasljeđivanje, bilo ono u njihovoj obitelji, vrtu ili animalnom svijetu. Prva osoba koja je otkrila zakone nasljeđivanja na biljkama bio je austrijski redovnik Gregor Mendel 1800. godine koristeći za svoje istraživanje slatki grašak (*Lathyrus sativus* L.) koji je samooplodan što je u velikoj mjeri pojednostavnilo praćenje svojstava od interesa. Geni su osnova nasljeđivanja koja se prenose s generacije na generaciju. Istraživač Avery 1944. godine je dokazao da je kemijska osnova gena tj. nasljeđivanja molekula DNA. DNA je središnja molekula života te osnovni nositelj nasljedne informacije, kontrolira rast i razvoj svakog živog bića. Sastavljena je od dva lanca molekula koji su međusobno uvijeni jedan oko drugog u obliku dvostruke uzvojnice. Model dvostruke uzvojnice opisali su 1953. god. Watson i Crick (Pavlica, 2012.).

Smatra se da je izolacija DNA molekule iz biljnog tkiva teška i komplicirana zbog velikog broja sekundarnih metabolita kao što su polisaharidi i polifenoli. Kako bi se riješio ovaj problem razvijene su brojne metode izolacije. U ovom radu korištene su dvije izolacijske metode; CTAB (Cetil trimetilamonijev bromid) metoda Doyle i Doyle, (1987.) modificirana prema Grljušić (2003.) i SDS (natrijev dodecil-sulfat) metoda prema Schweizer i sur. (1995.) modificirana prema Bolarić i sur. (2005.). CTAB metoda je najpopularnija metoda u izolaciji DNA iz biljnog tkiva, a za njezinu izvedbu potrebna je velika količina biljnog materijala, liofilizator ili tekući dušik. Znanstvenici preporučuju korištenje svježeg i mladog biljnog tkiva jer se starenjem otežava izolacijski postupak zbog veće koncentracije sekundarnih metabolita i silikata.

Druga korištena metoda u ovom radu je SDS metoda koja se koristi u izolaciji bakterijske DNA i denaturaciji membrana čime dolazi do oslobađanja proteina, povezana je s fenol/kloroform tretmanom. Osnovni princip izolacije DNA u svim metodama temelji se na primjeni nekog izolacijskog pufera koji je na bazi detergenata i lužina, a čija je uloga liza (grčki: *lysis* rastavljanje, razlaganje) odnosno razlaganje stanica. Nakon toga slijedi deproteinizacija uz pomoć enzima i organskih otapala, taloženje u otopini alkohola i soli, te na kraju pročišćavanje i otapanje izolirane DNA u puferu. Cilj ovog istraživanja je utvrditi količinu i kvalitetu izolirane DNA iz listova soje i suncokreta.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Biljni materijal

S obzirom da su biljke sastavni dio ljudske i životinjske prehrane, potrebno je voditi računa o kvaliteti hrane i samom prinosu sirovine. Stoga se na biljkama rade razni oplemenjivački procesi kojima prethodi izolacija DNA. Izolirana DNA može se koristiti u stvaranju novih kultivara koji će biti otporni na bolesti i štetnike, a ujedno će davati i visoke prinose. U radu je provedeno istraživanje na dvije vrlo važne uljne i proteinske kulture koje se po svom sastavu znatno razlikuju, a sve u svrhu izolacije i procjene kvalitete DNA koristeći dvije metode.

2.1.1. Soja (*Glycine max(L.) Merr.*)

Soja potječe iz Azije i jedna je od vodećih uljnih i bjelančevinastih kultura, a njezino se zrno koristi kao izvor jestivih ulja (18 – 24 %) i bjelančevina (35 – 50 %) kako u ishrani stoke tako i u ljudskoj ishrani. U Republici Hrvatskoj soja se uzgaja na površinama od 85 tisuća hektara s prosječnim prinosom od 2,4 t/ha. Kako bi udvostručili proizvodnju i prinose potrebno je stvarati nove sorte s poboljšanim svojstvima i visokom rodnošću (Vratarić, Sudarić, 2008.).

2.1.2. Suncokret (*Helianthus annuusL.*)

Suncokret potječe iz Amerike (Meksiko, Peru). Najprije je uzgajan kao ukrasno bilje, a njegovo sjeme se koristilo kao hrana za ptice. Važna je uljna kultura i u sastavu sjemena ima 50 % ulja, 20 % bjelančevina i ugljikohidrata. Danas suncokret ima široku uporabu, pa se koristi u ljudskoj ishrani, ishrani stoke, farmaceutskoj industriji i dr. Suncokret se u Republici Hrvatskoj uzgaja na oko 37 tisuća hektara s prosječnim prinosom od 3,1 t/ha. S obzirom na njegovu namjenu, razvijene su brojne sorte i hibridi pa je područje oplemenjivanja suncokreta široko (Vratarić i sur., 2004.).

2.2. Priprema biljnog materijala

U ovom istraživanju korištene su dvije biljne vrste; soja i suncokret. Obje kulture prethodno su stavljene na naklijavanje (slika 1) u dva ponavljanja, u različite medije. Prvo ponavljanje naklijavano je u BRILL bio eko logical Start supstrat čiji sastav čine 50 % bijeli treset, 30 % crni treset, 10 % kompost supstrat i 10 % „cocSol“ pH vrijednost korištenog supstrata iznosila je 5,9. U drugom ponavljanju korištene su tresetne pločice koje su sastavljene od kokosovih vlakana. Biljkama omogućavaju prirodan rast i bolju otpornost. Prije uporabe tresetne pločice prethodno su bile namočene u 100 ml vode kako bi nabubrile. Ispitivane kulture stavljene su na naklijavanje 9.5.2019. u komoru u kontrolirane uvjete.



Slika 1. Posijano sjeme soje i suncokreta (foto original: M. Lovrić)

Komora je programirana na temperaturu od 20 °C, 12h dan i 12h noć. Obzirom da se radilo o dva ponavljanja, jedno ponavljanje bilo je u komori, dok je drugo bilo na uvjetima vanjske sredine i umjerenog osvjetljenja. Oba ponavljanja su bila 14 dana na naklijavanju. Nakon 14 dana, biljke su bile u fazi 3-4 lista (slika 2 i 3). Za izolaciju genomske DNA bilo je potrebno odrezati i odvagati 0,15 g svježeg biljnog materijala (slika 4).



Slika 2. Klijanac biljke soje nakon

15 dana

(foto original: M. Lovrić)



Slika 3. Klijanac biljke sunockreta

nakon 15 dana

(foto original: M. Lovrić)



Slika 4. Vaganje uzoraka (foto original: M. Lovrić)

2.3. Izolacija DNA

U provedenom istraživanju korištene su dvije metode izolacije DNA iz listova soje i suncokreta:

- Metoda 1: CTAB metoda prema Doyle i Doyle (1987.) modificirana prema Grljušić (2003.)
- Metoda 2: SDS metoda prema Schweizer i sur. (1995.) modificiran prema Bolarić i sur. (2005.)

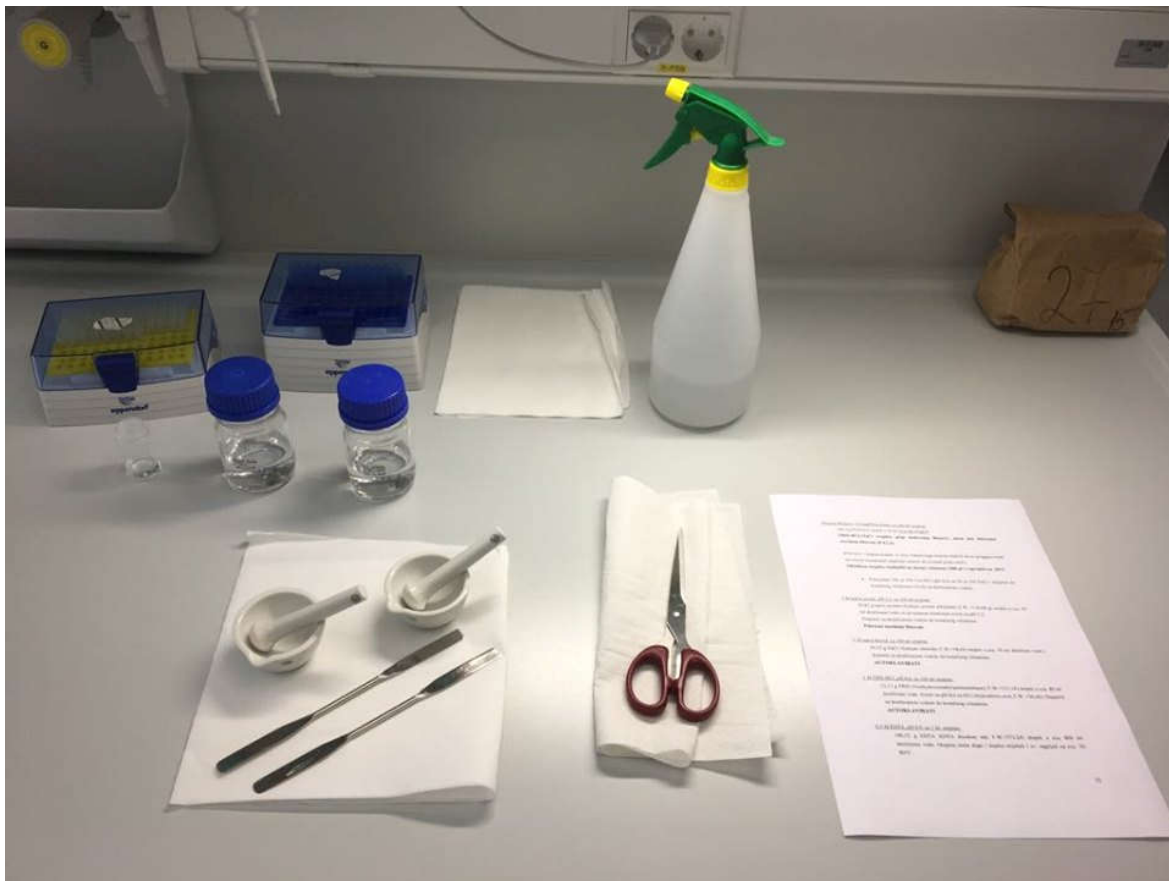
Tablica 1. Otopine i reagensi potrebni za izolaciju DNA CTAB metodom

OTOPINA I REAGENS	SASTAV
Izolacijski CTAB pufer	2% CTAB –Cetrimonijev bromid
	100 mM TRIS - hidroksimetil-aminometan, pH8
	1,4 M NaCl
	20 mM EDTA (EDTA disodium salt), pH8
	0,2 % β-merkaptoetanol
Kloroform-izoamilni alkohol	24:1
70% izopropanol (-20°C)	
70% etanol	
TE pufer za otapanje i čuvanje DNA pH 8	TRIS –hidroksimetil-aminometan EDTA – EDTA dinatrijeva sol

Tablica 2. Otopine i reagensi potrebni za izolaciju DNA prema SDS protokolu

OTOPINA I REAGENS	SASTAV
Izolacijski SDS pufer	1,25% SDS
	100 Mm Tris- HCl
	50 mM EDTA
	500 mM NaCl
	2% PVP (Mr 300.000, Sigma)
	5 mg/ml Natrij-bisulfit
Kloroform-izoamil alkohol	24:1
RNAza A	konc. 10 mg/ml
Izopropanol	vol. 0,7
TE pufer za otapanje i dugotrajno čuvanje DNA	TRIS –hidroksimetil-aminometan EDTA – EDTA dinatrijeva sol

U provedbi izolacije genomske DNA iz listova soje i suncokreta korištena je sljedeća laboratorijska oprema (slika 5): izolacijski puferi, spatule, porculanski tarionici i tučci, škare, nastavci za pipete, 70 % etanol za dezinfekciju, te staničevina.



Slika 5. Potrebna oprema za pripremu biljnog tkiva za izolaciju DNA(foto original: M.Lovrić)

Postupak izolacije DNA prema protokolu CTAB i SDS metode sastojao se iz sljedećih koraka:

1. Korak

U obje metode u vodenoj kupelji zagrijan je izolacijski pufer na temperaturu 65 °C. U isto vrijeme odvagana je količina od 0,15 g biljnog tkiva koje je potom izrezano na manje komadiće zbog lakše manipulacije. U tarionik s tučkom dodano je biljno tkivo i tekući dušik čija je uloga dodatno učiniti biljno tkivo lomljivim (slika 6) uz očuvanje tj. prezervaciju stanica. Kružnim pokretima tučka uz stijenke tarionika biljno tkivo je usitnjeno (homogenizirano) sve do forme praha (slika 7).



Slika 6. Dodavanje tekućeg dušika (foto original: M. Lovrić)



Slika 7. Usitnjeno biljno tkivo (foto original: M. Lovrić)

2. Korak

Nakon što je biljno tkivo usitnjeno u svaki uzorak pipetom je dodano 1000 μ l zagrijanog (65 °C) izolacijskog pufera (slika 8). Svaki uzorak pomiješan je štapićem i prenesen u tubice od 2 ml. Uzorci se potom pomiješani na vrtložnj mješalici (vorteksu) (slika 9) zbog bolje homogenizacije biljnog tkiva i pufera.

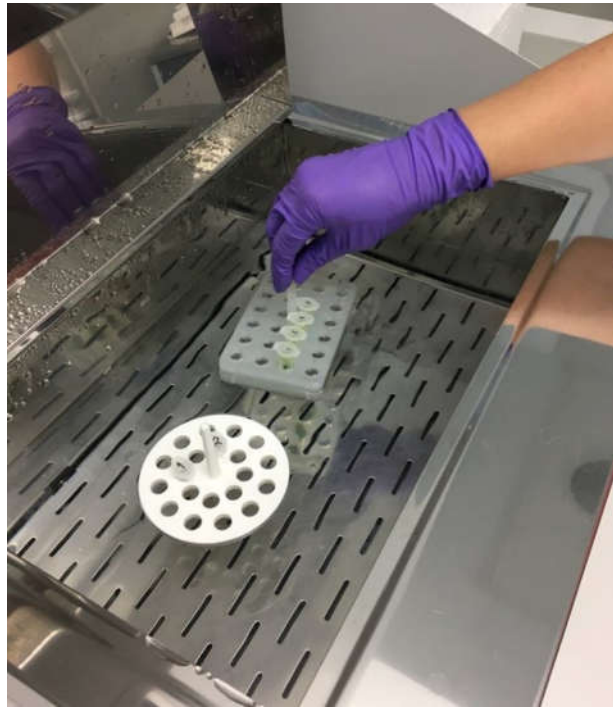


Slika 8. Dodavanje izolacijskog pufera (foto original: M. Lovrić)



Slika 9. Vrtložna miješalica (vorteks)(foto original: M. Lovrić)

Uzorci se potom stavljani u vodenu kupelj (slika 10) na temperaturu od 65 °C te su tubice povremeno okretane svakih 10 minuta. Tubice su nakon toga stavljene u led (slika 11) i pipetom je dodano 670 µl kloroform izoamilnog alkohola (slika 12), nakon čega su uzorci stavljani na stalak za mućkanje na vrijeme od 30 minuta.



Slika 10. Uzorci u vodenoj kupelji (foto original: M. Lovrić)

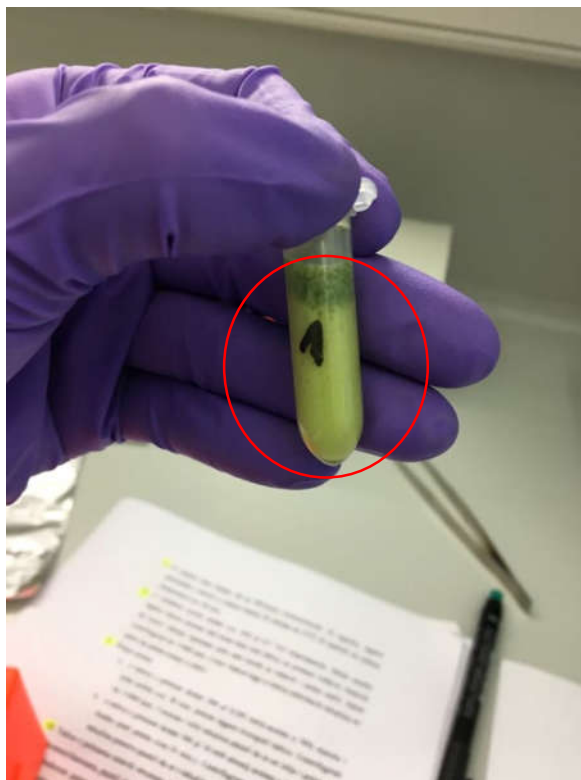


Slika 11. Uzorci u ledu (foto original: M. Lovrić)



Slika 12. Dodavanje kloroform-izoamil alkohola (foto original: M. Lovrić)

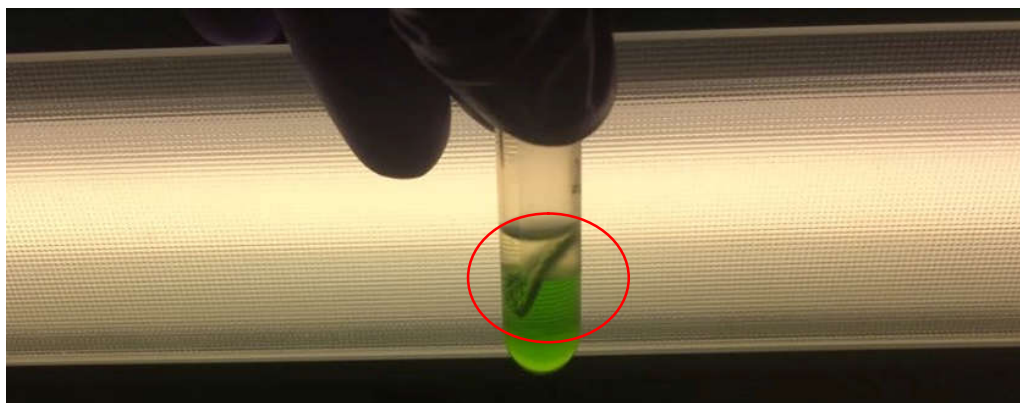
U SDS metodi nakon što je kloroform dodan uzorcima suncokreta u drugom koraku izolacijskog postupka zabilježeno je blago pjenjenje vidljivo na slici 13.



Slika 13. Uzorak suncokreta nakon dodanog kloroforma (foto original: M. Lovrić)

3. Korak

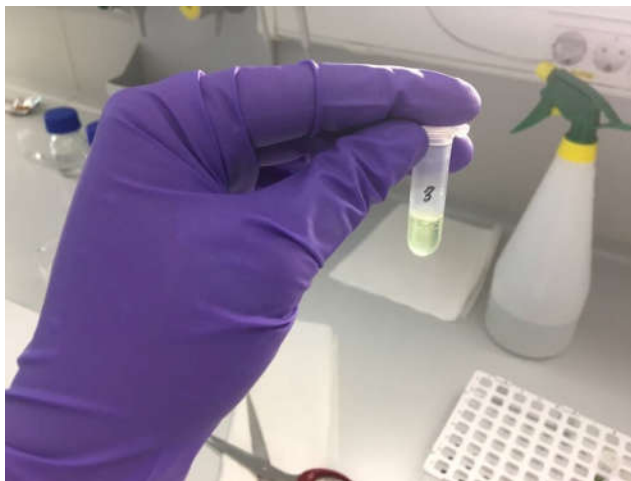
Uzorci su se u ovom koraku izolacije centrifugirali na maksimalnoj brzini 8 minuta pri čemu je došlo do odvajanje tekuće od krute faze biljnog tkiva. U tekućoj fazi nalazi se DNA, dok krutu fazu čine ostatci biljnog tkiva tvoreći tzv. disk (slika 14).



Slika 14. Prikaz nastalog diska (foto original: M. Lovrić)

4. Korak

Nakon što je došlo do odvajanja tekuće od krute faze mikropipetom je u obje metode izvučen supernatant (slika 15) pazeći pritom da se ne dotiče nečistoća s diska ili donja tekuća faza, a uzeti uzorci premješteni su u novo obilježenu tubicu volumena 2 ml. Pipetom je iz nastale forme u uzorcima pripremljenim prema CTAB protokolu izdvojeno 750 μ l dok je iz uzoraka pripremljenih prema SDS protokolu bilo moguće izdvojiti 650 μ l supernatanta.



Slika 15. Izdvojena vodena faza (foto original: M. Lovrić)

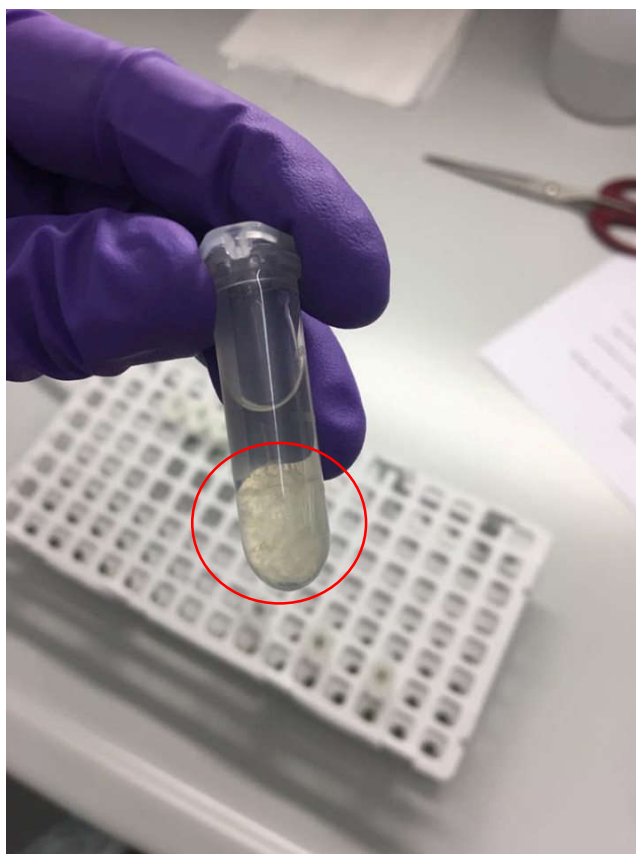
U izdvojenu vodenu fazu uzoraka dodano je 16 μ l enzima RNA-ze (slika 16) u postupku izolacije prema CTAB protokolu, dok je u uzorke prema SDS protokolu dodana količina od 20 μ l enzima RNA-ze.



Slika 16. Dodavanje enzima RNA-ze (foto original: M. Lovrić)

5. Korak

U ovom koraku izolacijskog postupka prema oba protokola u uzorke je dodana količina od 650 μ l hladnog izopropanola i uzorci su laganim okretanjem promiješani dok DNA nije postala vidljiva (slika 17). U izopropanolu DNA je stajala jedan sat uz povremeno okretanje tubice, potom je centrifugirana na maksimalnoj brzini jednu minutu kako bi se zalijepila za dno tubice.



Slika 17. Vidljiva pahuljasta tvorevina DNA (foto original: M. Lovrić)

6. Korak

U sljedećem koraku je vrlo pažljivo odstranjen izopropanol iz tubice tako što se pazilo da peleta ostane i dalje zalijepljena za dno tubice. Pelete svih uzoraka prema CTAB protokolu bile su bijele boje, dok su uzorci drugog ponavljanja soje i suncokreta prema SDS protokolu bili nešto tamnije smeđe do zelene boje (slika 18). Uzrok obojenosti pelete DNA mogu biti zaostali sekundarni metaboliti. Nakon izlijevanja izopropanola u svaku tubicu s peletom dodano je 500 μ l 0,2 mM natrijevog acetata koji služi ispiranju pelete DNA.

Pelete su ispirane 30 minuta, lagano tresući tubice rukom nakon čega su se uzorci ponovno centrifugirani (slika 19). Pelete su se ponovno zalijepile za stijenke tubica i natrijev acetat izliven je u laboratorijsku čašu. U tubice je potom dodano 500 μ l 10 mM amonijevog acetata u 76 % etanolu nakon čega je uslijedilo ponovno pranje peleta 10 minuta, laganim treskanjem rukom.



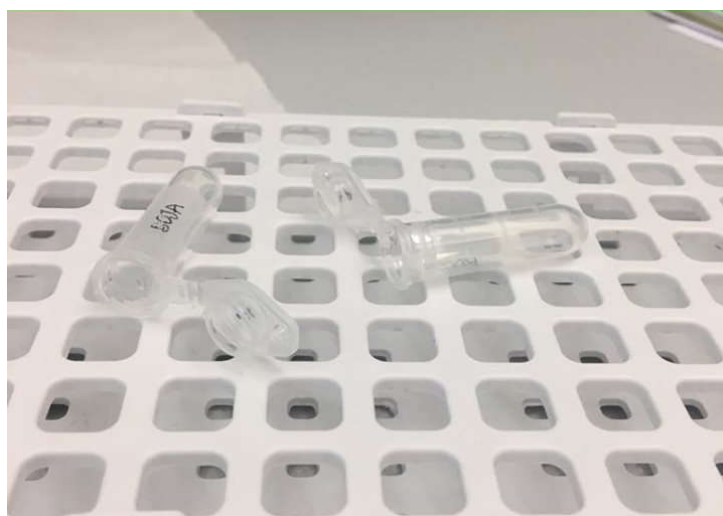
Slika 18. Obojenost peleta (foto original: M. Lovrić)



Slika 19. Centrifugiranje uzoraka (foto original: M. Lovrić)

7. Korak

Nakon ispiranja peleta koje je provedeno kako bi odstranili sve sekundarne metabolite, bjelančevine i eventualne nečistoće izlivena je tekuća faza i pipetom je otklonjen preostali etanol iz tubica. Tubice su potom ostavljene na sušenje 45-60 minuta (slika 20). Nakon sušenja u tubice je dodano 100 μ l TE pufera i DNA je otopljena u istom treskajući prstom tubicu. Tubice su spremljene u hladnjak na +4 °C zbog boljeg otapanja, a onda na -20 °C do daljnjeg testiranja i procjene kvalitete.



Slika 20. Tubice s uzorcima na sušenju (foto original: M. Lovrić)

2.3.3. Mjerenje čistoće i količine izolirane DNA

Čistoća izoliranih DNA uzoraka testirana je biofotometrom (slika 21). Biofotometar je uređaj koji kvantificira biomolekule i radi fotoelektrično mjerenje zračenja koje neka supstanca apsorbira na određenoj valnoj duljini. Prema područjima valnih dužina izvora svjetla, razlikuje se ultraljubičasta (200-400 nm), vidljiva (400-760 nm) i infracrvena (iznad 750 nm) spektrofotometrija.



Slika 21. Biofotometar (foto original: M. Lovrić)

Količina apsorbiranog svjetla određene valne dužine odgovara koncentraciji ispitivane supstance. Što se nukleinskih kiselina tiče, spektrofotometrijom se mjeri absorbanca na 260 i 280 nm. Potpuno čista DNA ima OD (optical density ili optička gustoća) A_{260}/A_{280} koja iznosi 1,8-2,0. Koncentracija DNA se računa po formuli:

$$\text{Koncentracija DNA} = A_{260} \times \text{razrjeđenje} \times 50$$

Razrjeđenje je iznosilo 50.

3. REZULTATI I RASPRAVA

Većina biljnih vrsta sadrži visoku razinu polisaharida, polifenola, pigmenata, soli i drugih sekundarnih metabolita (Antongiovanni i Sargentini, (1991.); Wen i Deng, (2002.); Marshall i sur., (2011.) koji čine DNA neupotrebljivom u biološkim istraživanjima. Izolacija DNA iz biljnog tkiva složen je proces jer biokemija između različitih biljnih vrsta značajno varira. Za razliku od životinjskog tkiva gdje isti tip tkiva kod različite vrste obično ima slične karakteristike, biljke mogu imati promjenjivu razinu metabolita i strukturne biomolekule. Polisaharidi i polifenoli dvije su skupine biljnih biomolekula koje se razlikuju među vrstama i vrlo su problematične pri izolaciji DNA. Kontaminacija polisaharidima i polifenolima može ometati manipulaciju DNA nakon izolacije, posebno u PCR reakcijama. Dostupne su brojne metode koje učinkovito uklanjaju polisaharide i polifenole iz biljnih pripravaka DNA i u ovom istraživanju korištena je CTAB i SDS metoda.

CTAB ili cetil trimetilamonijev bromid kationski je deterdžent koji olakšava odvajanje polisaharida tijekom pročišćavanja i ima široku primjenu u izolaciji biljne DNA. S obzirom da polisaharidi i DNA imaju različitu topivost u CTAB koristi se različita koncentracija natrijevog klorida. U višim koncentracijama soli polisaharidi su netopivi, dok je u nižim koncentracijama DNA netopiva. Stoga se pri izolaciji podešavanjem koncentracije soli u lizatima koji sadrže CTAB, polisaharidi i DNA mogu različito istaložiti.

Druga korištena metoda je tzv. SDS metoda, pri čemu se u izolacijskom puferu koristi natrijev dodecil sulfat, anionski deterdžent koji se koristi se u izolaciji bakterijske, biljne i životinjske DNA. Glavna funkcija i djelovanje SDS-a je poremećaj lipidnih struktura u staničnoj membrani, koristi se za denaturaciji proteina i inaktivira mnoge enzime koji razgrađuju DNA. Prema njihovoj funkciji i namjeni razvile su se brojne modifikacije metoda. U radu je korištena CTAB metoda (Doyle i Doyle (1987.) modificirana prema Grljušić (2003.) i SDS metoda prema Schweizer i sur. (1995.) modificiran prema Bolarić i sur. (2005.). U oba protokola uspješno je postignuta izolacija DNA molekule, a dobiveni rezultati čistoće i koncentracije izolirane DNA prikazani su u Tablici 3 i 4.

Tablica 3. Čistoća i koncentracija izolirane DNA prema protokolu CTAB metode

Biljna vrsta	Ponavljanje	A 260/280	Prosječna vrijednost	A 260/230	Prosječna vrijednost	Koncentracija (ng/ μ l)	Prosječna vrijednost
Soja	1.	2,0	1,9	2,3	2,25	1225,6	1075,93
	2.	1,9		2,2		926,27	
Suncokret	1.	2,0	1,9	2,2	2,15	953,21	726,11
	2.	1,9		2,1		499,01	

Prema podacima iz tablice 3 vidljivo je da je gornja vrijednost izmjerene absorbance prema protokolu CTAB metode iznosila 2,0 dok je najniža zabilježena vrijednost iznosila 1,9 pri čemu je ona ujedno i prosječna vrijednost absorbance oba ponavljanja. Prosječna vrijednost absorbance A260/280 iznosila je 1,9 dok su se prosječne vrijednosti absorbance A260/230 za soju i suncokret kretala između 2,25 i 2,15. Kao relevantni podatci mogu se uzeti srednje vrijednosti ispitivanih uzoraka. Veća vrijednost koncentracije izražena u ng/ μ l izmjerena je u uzorcima soje, a ona je pojedinačno iznosila 1225,6 za prvi uzorak i 926,27 za drugi ispitivani uzorak što je ujedno i najviša izmjerena koncentracija izolirane DNA u ovom istraživanju. Uspoređujući vrijednosti izolirane količine DNA iz soje sa podacima Yimiao Xia i sur., (2019.) zamjećuje se da je CTAB metodom moguće dobiti uzorke visoke kvalitete, ali ne i visoke količine izolirane DNA. Prema njihovom istraživanju kvaliteta izolirane DNA kretala se u omjerima od 1,8 do 2,0 za A260/280, što je ujedno i najbližnja vrijednost dobivenoj u ovom istraživanju. U odnosu na vrijednosti spektrofotometrijskog mjerenja Zeinalzadehtabrizi i sur., (2015.) čije su vrijednosti iznosile 1,8 do 2,0 za mjerenje A260/A280, dok su kod mjerenja A260/A230 vrijednosti iznosile od 1,3 do 1,9 u uzorcima DNA izolirane iz suncokreta. Svako odstupanje od navedenih vrijednosti ukazuje na zaostatke polifenola i polisaharida, što se prema određenim protokolima smatra nečistom DNA. Rezultate najbližnje rezultatima u ovome radu dobio je Li i sur. (2007.) koji je CTAB metodom izolirao DNA iz suncokreta visoke kvalitete i čistoće. Rezultati koncentracije izolirane DNA iz suncokreta nešto su nižih vrijednosti i iznose u prosjeku 726,11 ng/ μ l.

Dobiveni rezultati u ovom istraživanju ukazuju na dobru čistoću i visoku količinu izolirane DNA stoga se CTAB metoda može smatrati uspješnom.

Tablica 4. Čistoća i koncentracija izolirane DNA prema protokolu SDS metode

Biljna vrsta	Ponavljanje	A 260/280	Prosječna vrijednost	A 260/230	Prosječna vrijednost	Koncentracija (ng/ μ l)	Prosječna vrijednost
Soja	1.	2,0	2,0	2,3	2,3	868,99	1011,29
	2.	2,0		2,3		1153,6	
Suncokret	1.	1,8	1,7	1,2	0,87	646,38	452,45
	2.	1,7		0,5		258,51	

Čistoća i koncentracija izolirane DNA prema protokolu SDS metode kod soje u oba ponavljanja imala je izuzetno dobre rezultate čija je absorbanca A260/280 iznosila 2,0 dok je na mjerenjima od 260/230 ona iznosila 2,3. Slične rezultate zabilježio je i Yimiao Xia i sur. (2019.) čije su vrijednosti iznosile od 1,8 do 2,0 za A260/280, a količina izolirane DNA kretala se u omjerima od 1831 do 1906 ng/ μ l. Razlike u vrijednostima izolirane količine DNA vjerojatno su uzrokovane različitim puferima za liziranje na bazi SDS i organskim reagensima koji se koriste za izoliranje ili taloženje DNA. Nešto slabiji rezultati zabilježeni su na uzorcima suncokreta čije su vrijednosti na granici čistoće izolirane DNA i njegovi rezultati u prosjeku iznose 1,7 za A260/280 dok je kod mjerenja A260/230 zabilježen rezultat u prosjeku od 0,87 pri čemu je drugo ponavljanje imalo rezultat 0,54. Koncentracija obje izolirane DNA prema protokolu SDS metode iznosila je od 1011,29 do 452,45 pri čemu je 452,45 ng/ μ l količina izolirane DNA iz suncokreta. U ovom testiranju najlošije rezultate ostvarili su uzorci suncokreta čija je količina i koncentracija izolirane DNA bila izrazito niska, a takvi rezultati ukazuju na zaostatke sekundarnih metabolita pa se ova metode ne smatra pogodnom za izolaciju DNA kod uljnih kultura. Zamijećena su određena odstupanja u vrijednostima absorbanci, pa je tako Andrew F. Page (2010.) utvrdio da je omjer absorbanci A260/280 u rasponu od 1,6 do 1,8, dok omjer absorbance A260/230 iznosio od 1,6 do 1,9 pri čemu je omjeri iznad 1,9 ukazao na vrlo malo kontaminaciju polisaharidima. Obzirom da su se vrijednosti absorbance A260/230 u obje metode izolacije DNA kretale između 2,25 (CTAB) – 2,3 (SDS) za soju i 2,15 (CTAB) – 0,87 (SDS) za uzorke suncokreta, može se zaključiti da je došlo do odstupanja, te da je u ispitivanim uzorcima došlo do zaostajanja polisaharidnih i polifenolnih spojeva.

Dobiveni rezultati omjera između absorbanci A260nm i A280nm potvrđuju učinkovitost korištenih metoda i čistoću izolirane DNA.

Uz navedene rezultate istraživanju je dodatno otežala vrlo niska klijavost soje, stoga su napravljena dva ponavljanja za svaku pojedinu metodu izolacije. Niska klijavost manifestirala se na duljinu trajanja samog procesa pripreme biljnog tkiva, a uzrok tome je fiziologija sjemena same kulture.

Najbolja čistoća DNA zabilježena je u uzorcima soje i suncokreta izolirane modificiranom CTAB metodom. Najveća količina izolirane DNA zabilježena je na uzorku soje i iznosila je 1225,6 ng/μl. Nešto slabija kvaliteta i čistoća DNA zabilježena je na uzorcima soje i suncokreta izoliranih prema SDS protokolu. Slične rezultate istraživanja dobio je i Li i sur. (2007.) uspoređujući CTAB i SDS metodu izolacije pri čemu se CTAB metoda pokazala učinkovitijom. U obje metode izolacije dobije se veća količina izolirane DNA, a uzorci se razlikuju u kvaliteti. Bolja metoda za izolaciju DNA iz uljnih i bjelančevinastih kultura prema ovom radu je CTAB jer se dobije velika količina izolirane DNA visoke čistoće. Dobivena DNA čuva se -20 °C nakon čega ju je moguće podvrgnuti restrikcijskim endonukleazama koje potvrđuju čistoću izolirane DNA čime je omogućeno njeno korištenje u danjim analizama kao što su PCR analize.

4. ZAKLJUČAK

1. Iz obje kulture (suncokret i soja) izolirana je molekula DNA.
2. Biofotometrijska metoda potvrdila je odgovarajuću čistoću DNA s vrlo malim zaostacima polifenolnih i polisaharidnih spojeva.
3. Najveća količina izolirane DNA utvrđena je u soji (CTAB metodom) i iznosila je 1225,6ng/μl dok je najmanja količina DNA izmjerena kod suncokreta (SDS metoda) i iznosila je 258,51ng/μl.
4. CTAB metoda izolacije DNA pokazala se učinkovitijom u obje testirane kulture u odnosu na SDS metodu.

5. POPIS LITERATURE

1. Antongiovanni, M., Sargentini, C. (1991.): Variability in Chemical Composition of Straws. *Options Mediterraneennes, Serie A: Seminaires Mediterraneens*, 49-53.
2. Bolarić, S., Lovrić, A., Kereša, S. (2014.): Prikupljanje i čuvanje uzoraka biljnog tkiva za izolaciju molekula DNA i metode izolacije. *Zbornik radova (Marić, S. Lončarić, Z. (ur.). Osijek: Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku*, 204-208.
3. Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987.): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
4. Li, J.T., Yang, J., Chen, D.C., Zhang, X.L. (2007): An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower. *Genet. Mol. Res.* 6: 1064-1071.
5. Marshall, C.W., Shepard, L.D., Roskrige, N. (2011.): Determining the identity of New Zealand kamokamo (*Cucurbita pepo*, Cucurbitaceae) using mitochondrial DNA and morphological data. *Agronomy New Zealand* 41, 157-166.
6. Page, A.F. (2010.): Detection and avoidance of polysaccharides in plant nucleic acid extractions Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE.
7. Pavlica, M. (2012.): Mrežni udžbenik Genetika.
8. Pirttilä, A.M., Hirsikorpi, M., Kämäräinen, T., Jaakola L., Hohtola, A. (2001.): DNA Isolation Methods for Medicinal and Aromatic Plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 19(3):273-273.
9. Saghai-Marouf, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., Allard, R.W. (1984.): Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics.
10. Vratarić, M. (2004.): Suncokret (*Helianthus annuus* L.). *Poljoprivredni institut Osijek, Osijek*. 1-8, 407.
11. Vratarić, M., Sudarić, A. (2008): Soja. *Poljoprivredni institut Osijek*.
12. Wen, X.P., Deng, X.X. (2002.): The extraction of genomic DNA from five species of *Rosa* (in Chinese). *Seed*, 126:18-21

13. Zeinalzadehtabrizi, H., Hosseinpour, A., Aydin, M., Haliloglu, K. (2015.): A modified genomic DNA extraction method from leaves of sunflower for PCR based analyzes. Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Hamedan, Iran Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Ataturk University, Turkey.

14. Yimiao, X., Fusheng, C., Yan, D., Liu, C., Guanhao, B., Ying, X., Boye, L. (2019.): A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean. Bioscience Reports

Internetski izvori:

1. <http://lifeofplant.blogspot.com/2011/04/dna-in-plants.html> (pristup 24.06.2019.)

2. <http://www.bioscirep.org/content/39/2/BSR20182271> (pristup 19.06.2019.)

3. https://www.researchgate.net/post/What_is_deference_between_CTAB_and_SDS_for_DNA_extraction_and_what_is_a_best (pristup 29.06.2019.)

4. <https://www.agroklub.com> (pristup 24.6.2019.)