

Uloga kloroplastne DNA u genetskim istraživanjima

Cigula, Patricija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:151885>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-07**



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 OSIJEK

Patricija Cigula

Preddiplomski sveučilišni studij

Smjer Hortikultura

Uloga kloroplastne DNA u genetskim istraživanjima

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Patricija Cigula

Preddiplomski sveučilišni studij

Smjer Hortikultura

Uloga kloroplastne DNA u genetskim istraživanjima

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. izv.prof.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
2. prof.dr.sc. Sonja Vila, član
3. dr.sc. Sunčica Guberac, član

Osijek, 2020

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij; smjer hortikultura
Patricija Cigula

Završni rad

Uloga kloroplastne DNA u genetskim istraživanjima

Sažetak: Kloroplasti se nalaze u citoplazmi eukariotske biljne stanice te pripadaju skupini organela koje nazivamo plastidi. Kloroplasti sadrže vlastitu DNA molekulu i se mogu dijeliti neovisno o diobi stanice. Kloroplast je mjesto fotosinteze, a fotosinteza je iznimno važna za život na Zemlji. Cilj ovog rada je bio istražiti ulogu kloroplastne DNA (cpDNA) u genetskim istraživanjima s osvrtom na poljoprivredne kulture. Bitno je naglasiti da je uzimanje uzoraka za izolaciju cpDNA potrebno obaviti dok je biljka još mlada zbog čistoće i kvalitete genetskog materijala.

Ključne riječi : DNA, kloroplast, izolacija DNA, cpDNA, genomska različitost

23 stranice, 13 slika, 42 literaturna navoda

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

BASIC DOCUMENT CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical sciences Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Horticulture
Patricija Cigula

BSc Thesis

The role of chloroplast DNA in genetic research

Summary: Chloroplasts are located in the cytoplasm of a eukaryotic plant cell and belong to a group of organelles called plastids. Chloroplast have their own DNA and have the ability to divide independently of a cell division. Chloroplasts is the place of photosynthesis which is extremely important for life on Earth. The aim of this study was to investigate the importance and role of chloroplast DNA (cpDNA) in genetic research with a focus on agricultural crops. It is important to emphasize that sampling fresh young leaves is crucial for cpDNA isolation regarding its purity and quality of genetic material.

Keywords: DNA, chloroplast, the role of chloroplast, isolation of DNA, methods of isolation, genetic research

23 pages, 13 figures, 42 references

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

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Nukleinska kiselina	1
1.2. DNA	1
1.3. Kloroplast	3
1.4. Mitochondriji	3
1.5. Stanična jezgra	4
1.6. Razvoj izolacije DNA	5
2. IZOLACIJA GENOMSKE DNA	6
2.1. Metode izolacije DNA i njihova primjena	6
3. IZOLACIJA KLOROPLASTNE DNA	8
3.1. Prikupljanje biljnog materijala	9
3.2. Izolacija kloroplasta	9
3.3. Soja.....	10
3.4. Pšenica.....	11
3.5. Suncokret.....	12
3.6. Kukuruz.....	13
3.7. Uljana repica.....	13
3.8. Ječam.....	14
3.9. Zob	15
3.10. Lucerna.....	17
4. ZAKLJUČAK	19
5. POPIS LITERATURE	20

1. UVOD

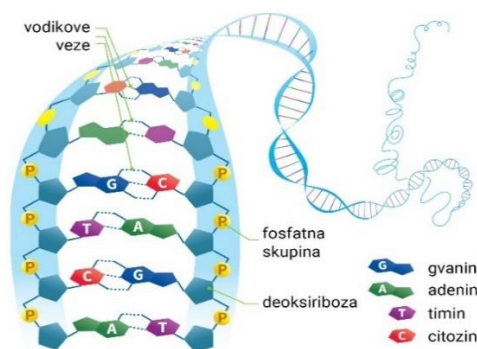
1.1. Nukleinska kiselina

Nukleinska kiselina je skupina bioloških makromolekula. Njihova funkcija je pohrana genetičke informacije te njezino prevođenje u strukturu bjelančevina. Sastavljena je od šećerne komponente (riboza i deoksiriboza), purinske i pirimidinske heterociklične baze te fosforne kiseline (www.enciklopedija.hr)

1.2. DNA

Deoksiribonukleinska kiselina je molekula na kojoj se nalaze upute za sintezu karakterističnih proteina odnosno za raspored aminokiselina u njihovim polipeptidnim lancima (slika 1.). Sastoji se od dušičnih baza purina i pirimidina te od šećera s pet ugljikovih atoma i fosfata. Ima četiri vrste dušičnih baza: od kojih su adenin (A), gvanin (G) (purinske) te timin (T) i citozin (C) (pirimidinske baze). Preko tih baza vodikovim su vezama povezana dva lanca, pri čemu se uvijek vežu adenin i timin odnosno citozin i gvanin. Redoslijed baza u jednom lancu u potpunosti ovisi od redoslijeda baza u drugom, komplementarnom lancu. Ovo svojstvo je od velikog značaja prilikom diobe stanice i prenošenja nasljednog materijala. Promjer uzvojnice je 2 nm, razmak između susjednih baza je 0.34 nm, a međusobno su zakrenute za 36° te se tako spiralna struktura ponavlja nakon svakih deset nukleotida. Sveukupna DNA neke stanice ili virusa naziva se genom, a dio DNA koji određuje strukturu neke bjelančevine ili RNA naziva se gen. Molekule DNA najveći su biopolimeri. Duljina im iznosi od nekoliko mikrometara, kod virusa i staničnih organela (mitohondrij, kloroplasti) te nekoliko milimetara kod bakterija, do više od 1 dm u pojedinim kromosomima sisavaca. Tehnikom sekvenciranja moguće je utvrditi točan redoslijed nukleotida u DNA (W. Gilbert; F. Sanger). Godine 2001. utvrđen je potpuni redoslijed nukleotida u svim kromosomima. Danas se analiza DNA koristi u različite znanstvene svrhe, a budući da je molekula kemijski otporna, moguće je analizirati čak i fosilne uzorke (<http://enciklopedija.hr>).

Osnovu teorije o nasljeđivanju postavio je Gregor Mendel krajem prošlog stoljeća. Proučavajući nasljeđivanja kod biljaka on je otkrio osnovne zakonitosti, a njegovi faktori nasljeđivanja su ono što danas nazivamo genima. Geni su osnova nasljeđivanja koja se prenose s generacije na generaciju. Više gena zajedno s nekim proteinima čini kromosome, koji su sastavni dijelovi stanične jezgre. Kromosome je moguće vidjeti svjetlosnim mikroskopom, ali tek nakon bojanja u stanicama koje se intenzivno miotski dijele (npr. stanica korijena luka). Istraživač Avery 1944. godine je dokazao da je kemijska osnova gena tj. nasljeđivanja DNA. Deoksiribonukleinska kiselina (Deoxyribonucleic Acid, DNA) je središnja molekula života te osnovni nositelj nasljedne informacije, kontrolira rast i razvoj svakog živog bića. DNA je sastavljena od dva lanca molekula koji su međusobno uvijeni jedan oko drugog u obliku dvostruke uzvojnice (slika 1). Model dvostruke uzvojnice opisali su 1953. godine Watson i Crick. DNA lanac sastoji se od niza nukleotida, a svaki nukleotid od šećera deoksiriboze, fosfata i nukleotidnih baza : adenina (A), citozina (C), gvanina (G) i timina (T). Baze se sparuju vodikovim vezama na način da je adenin vezan sa timinom (A-T), a citozin s gvaninom (C-G). Svaki pojedinačni kontakt je par baza (engl. base pair, bp) a cijeli ljudski genom ih ima oko 3 milijarde (Pavlica, 2012.).



Slika 1. DNA

(izvor: <https://edutorij.e-skole.hr/>)

1.3. Kloroplast

Kloroplasti pripadaju skupini organela koje nazivamo plastidi. Nalaze se u citoplazmi eukariotske stanice i imaju sposobnost diobe neovisno o diobi stanice (slika 2). Obavijeni su dvjema membranama. Na unutarnjim membranama se nalazi pigment klorofil, koji je neophodan za proces fotosinteze. Kloroplasti imaju vlastiti DNA, RNA i ribosome. Unutrašnji prostor kloroplasta nazivamo stroma. Kloroplasti sadrže vlastitu DNA molekulu i vlastite ribosome te se mogu dijeliti neovisno o diobi stanice (<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl18.html>)



Slika 2. Kloroplast

(izvor: <https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/074ffbb3-a1b7-4fe1-9f4a-1ea3539d642d/biologija-1/m03/j06/index.html>)

1.4. Mitochondrij

Mitochondriji su organeli eukariotskih stanica u kojima se odvija aerobna respiracija i sinteza adenozin – trifosfat (ATP). Mitochondriji izgledaju poput izduženih tjelešca promjera 0,5 μm (slika3.). Mitochondriji su omeđeni dvjema membranama, koje čine ovojnica. Vanjska membrana je propusnija od unutarnje, površina joj je znatno povećana naborima što ulaze u unutrašnjost mitohondrijima (matriks ili matičnica). Unutarnja membrana i matriks obiluju enzimima koji su odgovorni za metaboličke procese koji se zbivaju u mitohondrijima (<https://www.bib.irb.hr/209028>).



Slika 3. Mitohondrij

(izvor: <http://instrukcije-kemija.blogspot.com/2011/05/instrukcije-iz-biologije.html>)

1.5. Stanična jezgra

Stanična jezgra (lat. *nucleus*) je organel promjera oko 5 μm . Ovojnicom je odvojena od citoplazme, a u njoj je pohranjena nasljedna tvar stanice. Jezgrina se ovojnica sastoji od vanjske i unutarnje membrane. Vanjska membrana izravan je nastavak membrana endoplazmatskoga retikuluma u na njoj se nalaze ribosomi. Prostor između membrana ovojnice, tzv. perinuklearni prostor, povezan je s lumenom endoplazmatskog retikuluma. Na jezgrinoj ovojnici nalaze pore koje omogućuju slabu komunikaciju između jezgre i citoplazme. Pore su okružene proteinskim prstenom, a on je odgovoran za kontrolirani promet molekula. Tijekom jezgrine diobe njezina se ovojnica razgradi, a potom se oko dviju jezgra kćeri izgradi nova ovojnica. Jezgra je najčešće okrugla, ovalna, ali može biti i ameboidna, osim u nekim metabolički vrlo aktivnim stanicama, primjerice žljezdanim ili tumorskim. Tvar koja se nalazi unutar jezgrine ovojnice intenzivno se boji karminom i nekim bazičnim bojama te se naziva kromatin. Njega tvore molekule DNA, RNA i proteini. Po biokemijskom sastavu kromatin je sličan kromosomima vrlo tanki pa se mogu jasno uočiti svjetlosnim mikroskopom (<https://edutorij.e-skole.hr>).

1.6. Razvoj izolacije DNA

U eukariotskih stanicama organizacija molekula DNA je složenija nego u prokariota. Genom eukariota sastavljen je od više linearnih molekula DNA koje su organizirane u strukture koje nazivamo kromosomi. U interfaznoj jezgri kromosomi su vidljivi u obliku guste zrnate strukture koju nazivamo kromatin. Kromatin je kompleks protein i molekula DNA. Proteinski dio čine histoni, mali proteini koji proporcionalno imaju više bazičnih aminokiselina i na taj način olakšavaju vezanje na negativno nabijenu molekulu DNA. Histonsku jezgru oko koje se namata četiri vrata histona u obliku proteinskih dimera. Tu strukturu nazivamo nukleosom i predstavlja osnovnu strukturu kromatina (<http://akademija.inovagen.hr/izolacija-dna-povijest-i-primjena/>).

Prvu izolaciju DNA proveo je švicarski liječnik Friedrich Miescher 1869. godine. Mieschera su zanimali osnovni principi života: odrediti kemijski sastav stanice. U početku je njegov rad bio usredotočen na različite vrste proteina koje se nalaze u leukocitima, te je dokazao da su proteini glavna poveznica stanične citoplazme. Tijekom pokusa primijetio je određenu supstancu koja se taložila u slučaju dodataka kiseline, te bila ponovno otopljena nakon pH na alkalni (<http://akademija.inovagen.hr/izolacija-dna-povijest-i-primjena/>).

Proučavanjem DNA na određenim biljnim skupinama otkrivamo jedinstvenu metodu izolacije koja nije identična ni na jednoj drugoj biljnoj skupini. Razvijeno je nekoliko metoda izolacije DNA koje će biti objašnjene, te će biti prikazan primjer jednog kultivara na određenoj metodi.

2. IZOLACIJA GENOMSKE DNA

Izoliranje DNA, RNA i proteina osnovne su metode istraživanja korištene u molekularnoj biologiji. Molekule DNA, RNA i proteina izoliraju se iz biljnih materijala za korištenje u industrijske svrhe, preparativne ili analitičke.

Svrha prve izolacije DNA je bila naći odgovore na pitanja vezana uz principe života, ekstrakcija DNA je za danas našla primjena u različitim poljima, od medicinske dijagnostike, genetičkog inženjerstva životinja i biljaka do kriminalističke forenzike (<http://akademija.inovagen.hr/izolacija-dna-povijest-i-primjena/>)

2.1. Metode izolacije DNA i njihova primjena

Miescher je razvio novi protokol, pomoću kojeg je uspješno dobio veće količine pročišćenog nukleina, kasnije nazvanog kao „nukleinska kiselina“. Od tada do danas je razvijeno mnogo različitih metoda, od kojih su najčešće: Alkalna metoda ekstrakcije, etidijum bromid-cezijum klorid (CsCl) gradijentno centrifugiranje, celulozna kromatografija, izolacija nukleinskih kiselina na čvrstoj fazi, automatizirano pomoću magnetskih kuglica i dr. (<http://akademija.inovagen.hr/izolacija-dna-povijest-i-primjena/>)

Jedne od najšire korištenih metoda izolacije genomske DNA iz biljaka su CTAB (Cetiltrimetilamonijum bromid) prema Doyle i Doyle (1990.) s manjim izmjenama te natrij – bisulfit metoda (Lovrić, 2010.).

Protokoli za izolaciju temelje se na sljedećim postupcima: liziranje stanica, uklanjanje staničnih proteina, RNA i drugih makromolekula (ugljikohidrati, lipidi, fosfolipidi), kemijskom ekstrakcijom (fenol – kloroform) ili enzimskim reakcijama (proteinaza K, RNA), izdvajanje DNA taloženjem, pomoću alkohola (96% etanol) i na kraju otapanje DNA u TE (Tris-EDTA) puferu, pH 8,0. Ovo su klasični laboratorijski postupci, koji su temelji cijelog niza komercijalnih metoda, koje se mogu uspješno automatizirati. (<https://www.medri.uniri.hr>)

Kako bi se izolirana DNA mogla koristiti u genetskim istraživanjima ona mora biti čista i kvalitetna, a njezinu kvalitetu smanjuje prisutnost polisaharida, proteina i inhibitora DNA polimeraze (tinin, alkaloidi i polifenoli). Zbog prisutnosti navedenih sekundarnih metabolita

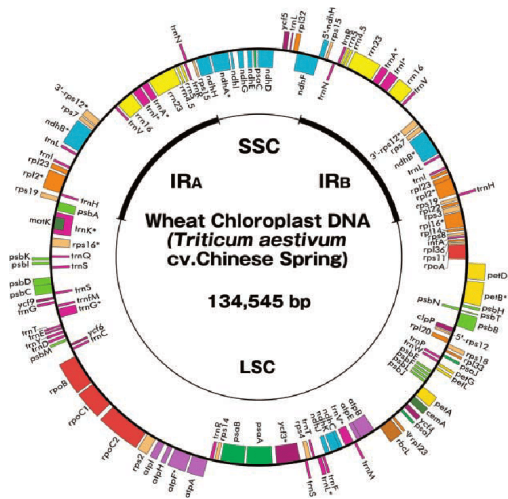
je uzorak DNA uveličan i nečist. DNA se može izolirati iz lista ili zrna biljaka. Najčešće je izolacija DNA iz listova pomoću tekućeg dušika koji smrzava tkivo i zbog čega se tkivo može usitniti do praha (<http://akademija.inovagen.hr/izolacija-dna-povijest-i-primjena/>).

Tijekom godina provodile su se različite metode izolacije DNA. Pervaniz i sur. (2011.) izolirali su DNA iz lista i zrna žitarica pomoću modificirane CTAB metode, a njihov omjer je apsorbanci A260/ A280 između 1,93 i 2,27 što ukazuje da je DNA kontaminirana proteinima i polisaharidima. Datukishvili i sur. (2010.) proveli su izolaciju DNA iz soje, pšenice, ječma, zobi i kukuruznog brašna prema DNaseasy Kit, Wizard Kit i CTAB metodi i dobili omjer apsorbanci A260/ A280 između 1,4 i 1,6 što ukazuje na kontaminiranost uzoraka proteinima. Xia i sur. (2019.) su koristeći modificiranu SDS (Natrij dodecil sulfat) metodu na soji izmjerili visoku čistoću DNA pomoću omjera apsorbanci A260/ A280 koja je iznosila 1,86 i 1,94. Omjer apsorbanci A260/ A280 kao i omjer apsorbanci A260/ A230 varira od sorte do sorte i ovisi o čistoći izolirane DNA.

Osim izolacije genomske DNA iz dijela biljke (lista ili sjemena ili cijele biljke), također se primjenjuju izolacije DNA iz kloroplasta i mitohondrija te jezgrina DNA.

3. IZOLACIJA KLOROPLASTNE DNA

Istraživanja genoma kloroplasta započela su 1950.-ih godina kada su znanstvenici otkrili da kloroplasti imaju vlastitu DNA (Sugiura, 2003.). Godine 1986. objavljen je prvi rad o sekvenciranom genomu plastida duhana (Shinozaki i sur., 1986.) i močvarne vrste Marhancije (Ohyama i sur., 1986.). Kloroplastna DNA (cpDNA) evolucijski je neovisna o jezgri DNA i kružnog je oblika (slika 4.) te vrlo slična bakterijskom kromosomu. Kloroplastni genom (plastom) je veličine od 110 do 200 kb (kilobaza). Nasljeđuje se citoplazmom (majčinsko nasljeđivanje), nije podložna rekombinaciji te učincima dominacije ili fenotipskim interakcijama (Borojević, 1981.). Prilikom oplodnje majčinska komponenta potomku daje ne samo sastav jezgre već i sastav citoplazme s organelima, dok očinska komponenta daje samo jezgru. Stoga su podaci dobiveni istraživanjem cp DNA vrlo važni u području filogenije i filogeografije (Slatkin 1994.). Kloroplastna DNA kodira oko 120 proteina kao što su RNA polimeraza, ribosomalni proteini i naravno enzimi koji su važni u procesu fotosinteze. U istraživanjima, koja se temelje na prethodnoj izolaciji cpDNA, prvi je korak prikupljanje biljnog materijala te izolacija kloroplasta.



Slika 4. Kružna struktura genoma kloroplasta *Triticum aestivum*

(izvor: Ogihara i sur., 2002.)

3.1. Prikupljanje biljnog materijala

Kod prikupljanja biljnog materijala potrebno je voditi računa o:

- a. odgovarajućoj fenološkoj fazi biljke (vrsta i količina kloroplasta će direktno ovisiti od stupnja razvoja biljke)
- b. zdravstvenom stanju biljke (neoštećena, bez prisutnosti bolesti)

3.2. Izolacija kloroplasta

Za izolaciju cpDNA visoke čistoće potrebno je izdvojiti cjelovite kloroplaste koji se najčešće dodatno pročišćavaju u gradijentu Percolla (Bartlett i sur., 1982.; Lung i sur., 2015.). Potrebna je relativno mala količina svježeg biljnog materijala (od 10 do 50g ovisno o protokolu), a kao izolacijski pufer najčešće se koriste pufer sljedećeg sastava: 300 mM sorbitol, 20 mM Tris/HCl, 5mM EDTA, 10mM Na₂CO₃ i 0,1% BSA (Napier i Barnes, 1995.; Dumančić, 2019.).

Biljni se materijal usitnjava u mikseru nakon čega se dodaje organski pufer. Suspenzija se zatim profiltrira preko dva sloja Miraclotha u plastične graduirane kivete. Nakon centrifugiranja supernatant se uklanja i dodaje se izolacijski pufer, a talog se resuspendira mikropipetom (Dumančić, 2019.). Slijedi drugi ciklus centrifugiranja i priprema epruveta s diskontinuiranim gradijentima Percolla. Supernatant se odlijeva a talog se uz pomoć kista suspendira puferom za homogenizaciju. Nakon trećeg ciklusa centrifugiranja kloroplasti će biti raspoređeni u dvije faze, a u donjoj se nalaze netaknuti kloroplasti. Izdvojeni kloroplaste je važno čuvati u mraku i na ledu nekoliko sati do samo izolacije cpDNA (Fulgosi, 2007.).

Nakon uspješno izolirane cpDNA koja je tada pogodna za umnažanje određenih dijelova lančanom reakcijom polimeraze (PCR) ujedno je pogodna i za direktne analize polimorfizama nakon prethodne razgradnje restrikcijskim endonukleazama.

Važnost i uloga metoda u izolaciji cpDNA je prikazana kroz istraživanja na osam najvažnijih kulturnih vrsta u poljoprivrednoj proizvodnji.

3.3. Soja

Kulturna Soja (*Glycine max* (L.) Merr) porijeklom je iz Azije (slika 5). Njen uzgoj traje već nekih 4000 godina, a zbog kemijskog sastava zrna jedna je od vodećih uljnih i bjelančevinastih kultura kao hrana u ishrani ljudi i životinja. U Republici Hrvatskoj u 2017. soje se uzgaja na površinama na oko 85 tisuća hektara s prosječnim prinosom od 2,4 t/ha (www.dzs.hr/). Kako bi se udvostručila proizvodnja i prinos potrebno je stvarati nove sorte s poboljšanim svojstvima i visokom rodnošću (Vratarić, Sudarić, 2008.).



Slika 5. *Glycine max* (L) Merr

(izvor: <https://www.plantea.com.hr/soja/>)

Jedan od prvih protokola je bio onaj Ohyama i sur. (1977.) u kojem je dan detaljan opis metode izolacije DNA iz kloroplasta, mitohondrija i jezgre mladih listova soje koristeći centrifugiranje u gradijentu CsCl. Hatfield i sur. (1985.) su ispitivali majčinsko nasljeđivanje kloroplastne DNA unutar roda *Glycine*. Izolacija cpDNA odrađena je prema Shoemaker i sur. (1984.) te je kasnije razgrađena restrikcijskim endonuklezama, a potom je određena struktura kloroplastnog genoma te je utvrđeno da su fragmenti potomstva identični majčinskoj komponenti.

3.4. Pšenica

Pšenica (*Triticum aestivum* (L.) em. Fiori et Paol.) ubraja se među najstarije poljoprivredne kulture (slika 6).. Uzgajana je u Iraku, Maloj Aziji, Kini i Egiptu. Pšenica je najvažniji ratarski usjev, a uzgaja se na oko 23% svjetskih obradivih površina. Prema statističkom ljetopisu iz 2018. u Republici Hrvatskoj 2017. godine površine pod pšenicom iznosile su 116 150 ha s prosječnim prinosom od 5,9 t/ha (www.dzs.hr).

Bowman i Dyer (1982.) navode učinkovitost dehidriranog izoliranog kloroplasta za izolaciju cpDNA koji olakšava daljnje korištenje drugih metoda. Middleton i sur (2014.) istraživanjem su ispitali povezanost vrsta *Triticeae* pomoću sljedova genoma kloroplasta. U prosjeku je očitano 500 000 genomskih DNA po primki što je rezultiralo s ukupno 8 000 – 30 000 čitanja izvedenih kloroplasta. Dobiveni su visokokvalitetni sklopovi genoma kloroplasta iz svih primki pšenice što je omogućilo izračunavanje vremenske razlike nekoliko bioloških rodova Tritiaceae te dobivanje rezultata o podrijetlu kloroplasta u poloploidnim vrstama.



Slika 6. Pšenica u zriobi

(izvor: <https://www.plantea.com.hr/pšenica/>)

Ogihara i sur. (2001.) utvrđuju da su neke strukturne promjene u genima kloroplasta prepoznate i kod u drugih predstavnika trava. Navode da su te promjene rezultat

replikacijskog proklizivanja ili intramolekularne rekombinacije kroz jednostavna izravna ponavljanja i jednostavni gubitak nukleotida.

3.5. Suncokret

Suncokret (*Helianthus annuus* L.) potječe iz Amerike (Meksiko, Peru). Najprije je uzgajan kao ukrasno bilje, a njegovo sjeme se koristilo kao hrana za ptice (slika 7). Važna je uljana kultura i u sastavu sjemena ima 50% ulja, 20% bjelančevina i ugljikohidrata. 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 (www.dzs.hr). S obzirom na njegovu namjenu, razvijene su brojne sorte i hibridi pa je područje oplemenjivanja suncokreta široko (Vratarić, Sudarić, 2004.).

Triboush i sur. (1998.) koriste metodu izolacije cpDNA iz svježih mladih listova temeljenu na homogenizaciji s organskim otapalima te na izolacijskim puferima sa saharozom te taloženjem s kalijevim acetatom i čišćenjem s amonijevim acetatom i izopropanolom. Kloroplastna DNA je zatim razgrađena s 12 restrikcijskih endonukleza. Također navode da je korišteno vrlo malo biljnog materijala (5g), relativno velikom količinom izolirane cpDNA (s 5–10 µg/g tkiva).



Slika 7. *Helianthus annuus* L.

(izvor: <https://www.plantea.com.hr/suncokret/>)

Wills i Burke (2006.) otkrivaju podrijetlo 51 primke divljeg i udomaćenog suncokreta na temelju varijabilnosti cpDNA sekvenci. Identificirali su 45 haplotipova kloroplasta iz 26 populacija u divljeg suncokreta te 3 haplotipa unutar 15 udomaćenih linija.

3.6. Kukuruz

Kukuruz (*Zea mays* L.) je jednogodišnja biljka jarog tipa razvića, a njegova dužina vegetacija od nicanja do pune zriobe ovisi od osobine sorte, odnosno hibrida, s jedne strane, i uvjeta uzgoja, s druge strane (slika 8). Po dužini vegetacije sve hibride kukuruza možemo razvrstati u rane, srednje rane i kasne vegetacije. Zrno kao osnovna sirovina u pripravljanju koncentrirane stočne hrane ima izuzetnu veliku važnost jer sadrži 70-75% ugljikohidrata, 10% bjelančevina, oko 5% ulja, 15% mineralnih tvari, te 2,5% celuloze (www.agroklub.com).

Oldenburg i Bendich (2004.) su ispitali cpDNA prikupljenih iz različitoga tkiva klijanaca (od 8 do 16 dana) te tkiva odrasle biljke (od 50 do 58 dana). Nisu uspjeli detektirati DNA u većine kloroplasta odraslih listova. Oldenburg i Benedich (2015.) za izolacija plastida, koristili su pufer visoke soli i pufer za izolaciju temeljen na sorbitolu. U istraživanju su prikazali linearne kromosome plastida kukuruza posebno terminalnih regija te potencijalno korištenje rezultata u transformaciji plastida u žitarica.



Slika 8. *Zea mays* L.

(izvor: <https://www.plantea.com.hr/kukuruz/>)

3.7. Uljana repica

Uljana repica (*Brassica napus* L. (*Partim*)) proizvodi se zbog dobivanja ulja. U sjemenu uljane repice ima oko 40% i oko 20 % bjelančevina. Ranije je ulje uljane repice korišteno za osvjetljenje i mazivo, a potom u industrijske svrhe (slika 9). Ulje sadržava veliku količinu

eruka kiseline (do 50%) koja nema hranjive vrijednosti, a štetna je za zdravlje. Selekcijom se uspio dobiti sortiment s neznatnim sadržajem te kiseline, pa se ulje tako može koristiti u prehrani bez da je štetno za zdravlje. Počinje cvjetati rano u proljeće, a cvatnja traje 20-ak i više dana (www.agroklub.com).

Hu i sur. (2012.) tijekom istraživanja su koristili male količine biljnog materijala za izolaciju cpDNA i mtDNA. Uzorak homogenata je korišten za ekstrakciju cpDNA i mtDNA iz identičnog međuspremnik. Navode da je metoda brza i da nije potreban gradijent Percolla nego diferencijalno centrifugiranje. Izolirana cpDNA je bila pogodna za daljnje molekularne analize i može se čuvati najmanje godinu dana na -20°C bez ikakvih promjena u njihovim svojstvima. Predloženi postupak može biti korišten za proučavanje citoplazmatske muške ili druge sterilnosti u sličnim istraživanjima.



Slika 9. *Brassica napus* L.

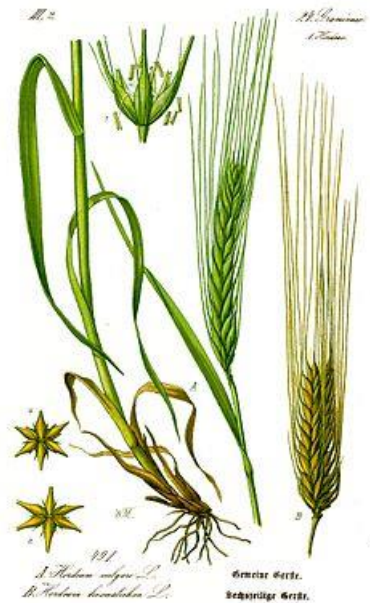
(izvor: <https://www.plantea.com.hr/uljana-repica/>)

3.8. Ječam

Ječam (*Hordeum vulgare* L.) se uglavnom koristi kao stočna hrana jer posjeduje visoku hranidbenu vrijednost. U hranidbi stoke ječam se koristi kao prekrupa (izmrvljeno zrno koje se koristi za dodavanje u brašno za kruh i u druge proizvode), pa ga je dobro miješati s ostalim zrnatim kulturama, a količina ječma u smjesi ovisi o vrsti i načinu hranidbe životinje

(slika 10). U industriji se rabi prvenstveno u proizvodnji piva i alkohola jer daje kvalitetan slad. Slad ječma rabi se u pekarskoj, konditorskoj, tekstilnoj industriji, u proizvodnji kvasca, škroba i dr. (www.agroklub.com)

Saski i sur. (2007.) izolirali su kloroplast iz mladog lišća postupkom gradijenta saharoze izvornom metodom Plamer (1986.) modificirana i izmijenjena od strane Saski i sur. (2007.). Oko 10 g lisnatog tkiva homogenizirali su u izolacijskom puferu Sandbrink koristeći se prethodno ohlađenim tkivom. Homogenat je filtriran pomoću četiri sloja gaze i jednog sloja Miracloth-a. Zaključeno je da je potrebno mnogo sekvenci kloroplasta iz trava, kako bi se osiguralo dovoljno uzorkovanja taksona za generiranje filogenije, za cijelu porodicu koja se temelji na genomima.



Slika 10. *Hordeum vulgare* L.

(izvor: https://hr.wikipedia.org/wiki/Je%C4%8Dam_ozimac)

3.9. Zob

Zob (*Avena sativa* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice trava (Poaceae) (slika 11). U planinskom području uzgaja se jara sorta, dok se u nizinskom području obično sije na jesen – ozima zob. U RH se sijala na više od 60 000ha, no danas na skoro četiri manje površina odnosno 15 885 ha (<https://www.dzs.hr/>, 2019.). U usporedbi s ostalim žitaricama

potrebno joj je najveća količina vode tijekom rasta i razvoja. Prosječni prinosi zobi iznose oko 4 t/ha. Nakon žetve od pljeve se odvoji zrno te se dalje procesira ili samo tako suši (www.agroklub.com).



Slika 11. *Avena sativa L*

(izvor: http://pinova.hr/hr_HR/baza-znanja/ratarstvo/zob/sjetva-zobi)

Yu i Woo (1990.) opisali su jednostavnu mehaničku metodu za izolaciju kloroplasta s visokim stopama fotosinteze iz listova zobi (*Avena sativa L.*). Fotosintetska aktivnost kloroplasta u tom istraživanju bila je stabilna najmanje 2 sata sa stopama od CO₂ ovisno o 30- 40 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ChI s}^{-1}$. Fotosintetska svojstva ovih kloroplasta bila su slična kloroplastima špinata i graška koji su izolirani mehaničkim cijepanjem. Optimalni pH za fotosintezu O₂ bio je 7.6. Indukcijsko vrijeme u tom istraživanju je bilo 0.5-2 min. U ovim pripravcima kloroplasta dobivene su maksimalne stope razvoja fotosintetskog O₂ u odsutstvu dvovalentnih kationa i EDTA. Kada ti kationi nisu prisutni u testnom mediju, dodavanjem EDTA veće od 1 mol/m³ smanjuje se fotosintetska aktivnost kloroplasta. U njihovim pripravcima kloroplasta je bilo 0,2-0,3 mol/m³.

3.10. Lucerna

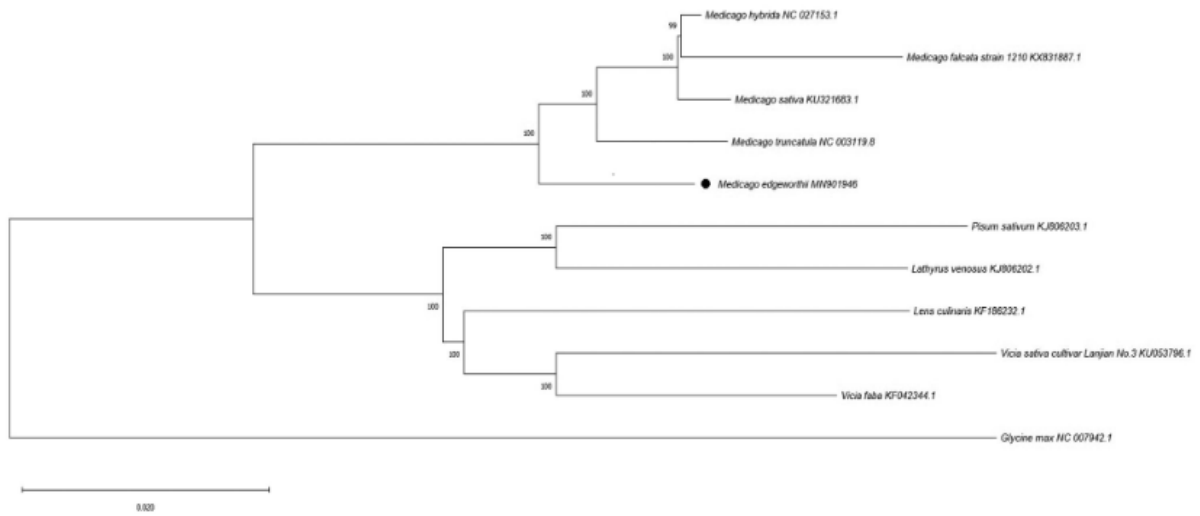
Lucerna (*Medicago sativa* L.) se uzgaja na svim kontinentima, a od europskih zemalja najveći proizvođač je Francuska. Za prehranu domaćih životinja može se koristiti u zelenom stanju ispašom i košnjom, kao sijeno, silažu i brašno. Do početka cvatnje je sočna, mekana, zeljasta i ispunjena vodenasto-staklastom srži (slika 12.). Dalje biljka postaje grublja, srž se suši, stišće i nastaje šupljina, zato se sa košnjom ne smije zakasniti. Lucerna je stranooplodna te jednim dijelom i samooplodna biljka (www.agroklub.com).



Slika 12. *Medicago sativa* L.

(izvor: <https://www.agroklub.com/sortna-lista/krmno-bilje/lucerna-57/>)

Xia i sur. (2020.) su u istraživanju DNA izolacije kroz rad koristili CTAB metodom (Doyle i Doyle 1987.), a podatci su dobiveni tehnologijom sekvenciranja nove generacije. Kompletan slijed je označen pomoću PGA. Genom kloroplasta *M. Edgeworthii* je 122.442 bp i samo jedna kopija IR regije. Postoji 112 funkcionalnih gena, uključujući 76 gena koji kodiraju proteine (PCG), 32 gena za tRNA i 4 za rRNA. Među njima je i 10 proteinskih kodova i 6tRNA . Osnovni sastav genoma je 33,1% A, 16,4% C, 17,6% G, 33,0% T i prosječni sadržaj GC je 34,0%. Da bi se dalje otkrio filogenetski položaj *M. Edgerworthii* Leguminosae, preuzeto je 11 kompletnih kloroplasta sekvence genoma leguminoza (slika 13.).



Slika 13. Filogenetski odnosi 11 vrsta na temelju kompletnog genoma kloroplasta
(izvor: Xia i sur. (2020.))

4. ZAKLJUČAK

Uloga kloroplasta u biljnoj stanici je da se replicira neovisno o jezgrinom genomu. Kloroplasti sadrže informacije o proteinima koji su neophodni za proces fotosinteze. Uloga i važnosti izolacije cpDNA dana je kroz pregled istraživanja na osam poljoprivrednih kultura. Bitno je naglasiti da je uzimanje uzoraka za izolaciju cpDNA potrebno izvršiti dok je biljka još mlada zbog čistoće i kvalitete genetskog materijala biljke. Kukuruz spomenut u ovom radu ima linearnu cpDNA kao i mnoge druge istražene vrste. Istraživanja na pšrnici ukazuju na postojanje kružne molekule cpDNA. Razlog zbog kojeg neke vrste imaju linearnu cpDNA u kloroplastu, a neke kružnu još nije poznat te se i dalje provode istraživanja.

5. POPIS LITERATURE

1. Avery, O.T, MacLeod, C.M., McCarty, M. (1944.). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribosenucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III, J. Exp. Med., 79,137-158
2. Bartlett,S. G., Grossman, A.R., Schmidt,G.W., Mullet, J.E. and Chua, N.H. (1982.). Optimal conditions for post-translational uptake of proteins by isolated chloroplasts. In vitro synthesis and transport of plastocyanin, ferredoxin-NADP+ oxidoreductase, and fructose-1,6-bisphosphatase. J Biol Chem, 257(3), 1558-1563.
3. Borojević K. (1985.). Geni i populacija, Novi Sad, str. 1-545
4. Bowman, C.M., Dyer, T.A. (1982.). Purification and Analysis of DNA from Wheat Chloroplasts Isolated in Nonaqueous Media. Analytical Biochemistry, Vol. 122(1), 108-118.
5. Datukishvili, N., Gabriadze, I., Kutateladze, T., Karseldaze, M., Vishnepolsky, B. (2010.). Comparative evaluation of DNA extraction methods for food crops. International Journal of Food Science and Technology, 45(6), 1316-1320
6. Doyle i Doyle (1987.). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical bulletin, 19(1), 11-15
7. Dumančić, T. (2019.). Usporedba metoda za određivanje ekspresije fotosintetskih proteina. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
8. Fulgosi, H., Vojta, A., Schleiff, E. (2008.). The molecular concept of protein translocation across the outer membrane of chloroplasts. Croatica Chemica Acta, Vol. 81(3), 501-509
9. Saski, C., Lee, S., Fjellheim, S. et al. (2007.). Complete chloroplast genome sequences of *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor* and *Agrostis stolonifera*, and comparative analyses with other grass genomes. Theor Appl Genet 115, 591
10. Gornicki, P., Zhu, H., Wang, J., Challa, G.S., Zhang, Z., Gill, G.S. i Li, W. (2014.). The chloroplast view of the evolution of polyploid wheat. New Phytologist, 204:704-714

11. Hatfield, P.M., Shoemaker, R.C., Palmer, R.G., Maternal inheritance of chloroplast DNA within the genus *Glycine*, subgenus soja, *Journal of Heredity*, Volume 76, Issue 5, September 1985, Pages 373–374,
12. Hrvatska Enciklopedija, Mrežno izdanje (1950.-2020.). DNA, Leksikografski zavod; Miroslava Krleže.
13. Hu, Zhi-yong, Zhan, Gao-miao, Wang, Han-Zhong, Hua, Wei (2012.). A Simple Method for Isolating Chloroplast DNA and Mitochondria DNA from the Same Rapeseed Green Leaf Tissue. *Journal of Integrative Agriculture* 2012, 11(7) : 1212-1215
14. Lovrić, A. (2010.). Postupci prikupljanja uzoraka biljnog tkiva i metode izolacija molekula DNA. Diplomski rad. Agronomski fakultet u Zagrebu.
15. Middleton CP, Senerchia N, Stein N, Akhunov ED, Keller B, Wicker T, et al. (2014) Sequencing of Chloroplast Genomes from Wheat, Barley, Rye and Their Relatives Provides a Detailed Insight into the Evolution of the Triticeae Tribe. *PLoS ONE* 9(3): e85761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085761>
16. Ogihara, Y., Ishii, T., Mori, N. i. (2001.) : Evaluation of allelic diversity at chloroplast microsatellite loci among common wheat and its ancestral species, *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 896-904
17. Ogihara, .Y., Isono, .K., Kojima, .T. i sur. (2002.). Structural features of a wheat plastome as revealed by complete sequencing of chloroplast DNA. *Mol Gen Genomics* 266, 740–746.
18. Ohyama, K., H. Fukuzawa, T. Kohchi, H. Shirai, T. Sano, S. Sano, K. Umesono, Y. Shiki, M., Takeuchi, Z. Chang, S. Aota, H. Inokuchi and H. Ozeki (1986). Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of Liverwort *Marchantia-Polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322, 572-574
19. Oldenburg, D., Benedich, A. (2004.) Most Chloroplast DNA of Maize Seedlings in Linear Molecules with Defined Ends and Branched Forms, *J Mol Biol.* 335 (4):953-70. doi: 10.1016/j.jmb.2003.11.020.
20. Oldenburg, D., Bendich, A. (2015.). The linear plastid chromosomes of maize: terminal sequences, structures, and implications for DNA replication. *Current Genetics*, 62, 431-442

21. Pervaiz, Z. H., Turi, N. A., Khaliq, I., Rabbani, M.A.,Malik, S.A. (2011). A modified method for high-quality DNA extraction for molecular analysis in cereal plants. *Genetics and Molecular Research*, 10 (3): 1669-1673
22. Pavlica, M. (2012.). Mrežni udžbenik Genetika.
23. Saski, C., Lee, S-B., Fjellheim, S.,Guda, C., Jansen, R.K., Luo, H., Tomkins, J., Rognli, O-D., Daniell, H.,corresponding author and Clarke, JL. (2007.). Complete chloroplast genome sequences of *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor* and *Agrostis stolonifera*, and comparative analyses with other grass genomes. *Theor Appl Genet.*, 115(4), 591
24. Shinozaki, K., M. Ohme, M. Tanaka, T. Wakasugi, N. Hayashida, T. Matsubayashi, N. Zaita, J., Chunwongse, J. Obokata, K. Yamaguchi, Shinozaki, C. Ohto, K. Torazawa, B. Y. Meng, M., Sugita, H. Deno, T. Kamogashira, K. Yamada, J. Kusuda, F. Takaiwa, A. Kato, N. Tohdoh, H., Sugiura M. (1986). The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome - Its gene organization and expression. *Embo Journal* 5, 2043-2049.
25. Shoemaker, R.C., Hatfield, P.M.,Palmer, R.G., Atherly, A.G.(1984.) Chloroplast DNA variation in the genus *Glycine* subgenus *Soja*, *Journal of Heredity*, volume 77, Issue 1, Pages 26-30
26. Slatkin, M. (1994.). *Gene Flow and Population Structure*. In: Real, L., Ed., *Ecological Genetics*, Princeton University Press, Princeton, 3-17
27. Sugiura, M. (2003). History of chloroplast genomics. *Photosynthesis Research* 76, 371-377
28. Triboush, S., Danilenko, N. & Davydenko, O. A. (1998.). Method for Isolation of Chloroplast DNA and Mitochondrial DNA from Sunflower. *Plant Molecular Biology Reporter* 16, 183.
29. Vratarić, A., Sudarić, M. (2004.). Značenje, dostignuća i trendovi u oplemenjivanju soje u Poljoprivrednom institutu Osijek. *Sjemenarstvo* 25, 207-216
30. Watson J.D., Crick, F.H.C. (1953.) Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nucleic Acid,Nature*, volume 171, 737–738
31. Wills DM, Burke JM. (2009.). Chloroplast DNA variation confirms a single origin of domesticated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J Hered.* 97(4):403-408.

32. Xia, K.H., Wang, T.M., Jin, C. (2020.). The complete chloroplast genome sequences of a wild diploid alfalfa *Medicago edgeworthii* (Leguminosae). Mitochondrial DNA part B, 5:2, 1683-1684, DOI:10.1080/23802359.2020.1748531
33. Yu, J., Woo, K.C. (1990.). Photosynthesis in chloroplasts rapidly isolated from primary leaves of oat (*Avena sativa* L.): Effects of orthophosphate, metal ion and chelators, Plant, Cell & Environment, Volume13 (4), 375-382
34. <https://www.plantea.com.hr/?s=je%C4%8Dam>
35. <https://edutorij.e-skole.hr>
36. <http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl18.html>
37. <https://www.bib.irb.hr/209028>
38. <https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.3732/ajb.94.3.302>
39. <http://instrukcije-kemija.blogspot.com/2011/05/instrukcije-iz-biologije.html>
40. https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/ljetopis/2018/sljh2018.pdf
41. http://pinova.hr/hr_HR/baza-znanja
42. <https://www.medri.uniri.hr>