

2014

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA

ZAKLJUČNA NALOGA
PREIZKUŠANJE RAZLIČNIH METOD ZA IZOLACIJO
DEDNEGA MATERIALA IZ VINSKE TRTE (*Vitis*
vinifera L.)

NOVAK

TJAŠA NOVAK

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Preizkušanje različnih metod za izolacijo dednega materiala iz vinske
trte (*Vitis vinifera* L.)**

(Testing different methods for the isolation of genetic material from grapevine (*Vitis
vinifera* L.))

Ime in priimek: Tjaša Novak
Študijski program: Biodiverziteta
Mentor: doc. dr. Dunja Bandelj
Somentor: dr. Matjaž Hladnik

Koper, september 2014

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Tjaša NOVAK

Naslov zaključne naloge: Preizkušanje različnih metod za izolacijo dednega materiala iz vinske trte (*Vitis vinifera* L.)

Kraj: Koper

Leto: 2014

Število listov: 36 Število slik: 5 Število preglednic: 4

Število referenc: 31

Mentor: doc. dr. Dunja Bandelj

Somentor: dr. Matjaž Hladnik

Ključne besede: vinska trta, biofenoli, izolacija DNA, mikrosateliti, *Vitis vinifera* L.

Izveček:

V raziskavi smo ugotavljali učinkovitost dveh protokolov za izolacijo DNA iz različnega rastlinskega materiala vinske trte v dveh terminih (junij, oktober). Vinska trta sodi med rastlinske vrste z večjo vsebnostjo sekundarnih metabolitov, predvsem biofenolov, zaradi česar je izolacija DNA iz vinske trte v primerjavi z rastlinami z manjšo vsebnostjo sekundarnih metabolitov bolj problematična. Protokoli, ki so objavljeni v znanstvenih člankih in ki po izsledkih testiranj zagotavljajo učinkovito izolacijo DNA, pogosto vsebujejo adsorbente sekundarnih metabolitov (npr. PVP) ter spojine z antioksidativnim delovanjem, ki preprečujejo oksidacijo sekundarnih metabolitov (npr. β -merkaptotanol). Učinkovitost protokolov smo ugotavljali z določanjem količine izolirane DNA s fluorometrom, čistost DNA pa s spektrofotometrom ter z ugotavljanjem uspešnosti namnoževanja 4 mikrosatelitov v reakciji PCR in intenzitete fluorescentnega signala pri kapilarni elektroforezi.

Key words documentation

Name and SURNAME: Tjaša NOVAK

Title of the final project paper: Testing different methods for the isolation of genetic material from grapevine (*Vitis vinifera* L.)

Place: Koper

Year: 2014

Number of pages: 36 Number of figures: 5 Number of tables: 4

Number of references: 31

Mentor: Assist. Prof. Dunja Bandelj, PhD

Co-Mentor: Assist. Matjaž Hladnik, PhD

Keywords: grapevine, biophenols, DNA isolation, microsatellites, *Vitis vinifera* L.

Abstract:

The aim of the work was to determine the effectiveness of two protocols for the isolation of DNA from different plant material in two periods (June, October). Grapevine is one of the plant species with higher content of secondary metabolites, mainly biophenols, what makes DNA isolation more problematic than plants with a lower content of secondary metabolites. Protocols which are published in scientific papers and according to tested results ensure the effective isolation of DNA, often containing the adsorbents for secondary metabolites, such as PVP, and compounds with antioxidant activity which prevent the oxidation of secondary metabolites, for example β -mercaptoethanol. The effectiveness of the protocols were assessed by determining the quantity of isolated DNA with a fluorometer, the purity of DNA with a spectrophotometer, and by identifying the amplification success of four microsatellites with PCR and by identifying the fluorescence signal intensity after capillary electrophoresis.

ZAHVALA

Za nasvete in strokovno pomoč pri zaključni nalogi se zahvaljujem somentorju dr. Matjažu Hladniku in mentorici doc. dr. Dunji Bandelj.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in prijateljem, ki so me skozi vsa študijska leta spremljali in mi vlivali pozitivno energijo za delo.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Namen zaključne naloge	1
1.2	Pregled literature	2
1.2.1	Klasifikacija vinske trte (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	2
1.2.1.1	Anatomija lista, mladike in rozge.....	2
1.2.1.1.1	Mladika in rozga.....	2
1.2.1.1.2	List.....	4
1.2.2	Sekundarni metaboliti	4
1.2.2.1	Sekundarni metaboliti pri vinski trti.....	5
1.2.2.2	Vpliv sekundarnih metabolitov na uspeh izolacije nukleinskih kislin	5
1.2.3	Izolacija DNA.....	6
1.2.3.1	Homogenizacija tkiva	6
1.2.3.2	Liza membran in organelov	6
1.2.3.3	Odstranitev beljakovin in RNA	7
1.2.3.4	Odstranitev biofenolov in ostalih sekundarnih metabolitov	7
1.2.4	PCR – verižna reakcija s polimerazo	8
1.2.4.1	Reakcijska mešanica PCR.....	9
1.2.4.2	Mikrosateliti	9
2	METODE DELA	10
2.1	Pridobivanje rastlinskega materiala in terminski potek.....	10
2.2	Sestava pufrov za izolacijo DNA	10
2.3	Izolacija DNA po dveh različnih protokolih.....	11
2.3.1	Protokol 1	11
2.3.2	Protokol 2.....	12
2.4	Merjenje koncentracije DNA	12
2.5	Določanje čistosti DNA	13
2.6	Določitev uspešnosti namnoževanja z analizo 4 mikrosatelitskih lokusov	13
2.7	Statistična obdelava podatkov.....	15

3	REZULTATI Z DISKUSIJO.....	16
3.1	Količina DNA v izoliranih vzorcih	16
3.2	Razmerje A_{260}/A_{280} in A_{260}/A_{230}	17
3.3	Uspešnost namnoževanja mikrosatelitov in intenziteta signala pri kapilarni elektroforezi.....	20
4	ZAKLJUČEK	23
5	LITERATURA	24

KAZALO SLIK

Slika 1: Mladika vinske trte (vir: Vršič in Lešnik 2010)	3
Slika 2: Prečni prerez rozge (vir: Vršič in Lešnik 2010)	4
Slika 3: Okvir z ročaji za količino DNA po obravnavanjih	17
Slika 4: Graf v obliki okvirja z ročaji za prikaz razmerij absorbanca A_{260}/A_{280}	18
Slika 5: Graf v obliki okvirja z ročaji za prikaz razmerij absorbanca A_{260}/A_{230}	19

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razlaga oznak posameznih obravnavanj	10
Preglednica 2: Seznam mikrosatelitov in začetnih oligonukletidov; podčrtano nukleotidno zaporedje predstavlja zaporedje M13 (-21) oligonukleotida v dolžini 18 bp	14
Preglednica 3: Količina DNA in razmerje absorbanca glede na posamezno obravnavanje ..	16
Preglednica 4: Rezultati genotipizacije, povprečje intenzitete fluorescentnega signala pri kapilarni elektroforezi, minimalne in maksimalne vrednosti, ter število uspešno namnoženih vzorcev glede na obravnavanje.....	21

SEZNAM KRATIC

ang.	angleško
bp	bazni par, mera za dolžino nukleotidnega zaporedja
°C	stopinja Celzija, enota za merjenje temperature
CTAB	cetil trimetil amonijev bromid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotidtrifosfat
EDTA	etilen-diamintetraocetna kislina – dinatrijeva sol
HCl	klorovodikova kislina
K ⁺	kalijev ion
KCl	kalijev klorid
Mg ²⁺	magnezijev ion
MgCl ₂	magnezijev klorid
NaCl	natrijev klorid
NaOAc	natrijev acetat
ng/μl	nanogram na mikroliter
NH ⁴⁺	amonijev ion
(NH ₄) ₂ SO ₄	amonijev sulfat
nm	nanometer
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PVP	polivinilpirolidon
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
RNA	ribonukleinska kislina
<i>Taq</i> polimeraza	termostabilni encim DNA polimeraza
TE	tris–EDTA puffer
Tris	tris (hidroksimetil) aminometan
μl	mikroliter

1 UVOD

Izolacija DNA je eden od ključnih korakov genetske analize. Pri izolaciji z napačnim ali slabo optimiziranim postopkom se lahko pojavijo različne težave, kot je na primer delna do popolna degradacija DNA z endogenimi nukleazami. Izolirana DNA lahko vsebuje tudi večje količine primesi polisaharidov, biofenolov in ostalih sekundarnih metabolitov, ki inhibirajo delovanje encimov pri nadaljnjih postopkih analize. Izolacija DNA iz rastlin in rastlinskih tkiv z večjo vsebnostjo sekundarnih metabolitov in polisaharidov je zato pogosto težavna.

V literaturi se pojavljajo različni protokoli, ki so pogosto tehnično zahtevni. Vključujejo uporabo številnih kemikalij, so časovno potratni ali pa so prilagojeni za točno določeno vrsto in preizkušeni le na eni vrsti tkiva. Na uspeh izolacije vpliva tudi čas vzorčenja rastlinskega materiala. Najprimernejši čas vzorčenja je v spomladanskih mesecih, ker je v na novo zraslih tkivih v primerjavi s starejšimi manj sekundarnih metabolitov. Po navajanju Hanania in sod. (2004) starejši, polno razprti listi vinske trte, navadno vsebujejo več škroba in biofenolov. Do razlik pri izolaciji prihaja tudi zaradi uporabe različnih tkiv, na primer lista, listnega peclja, kambija, ploda, itd.

Genetske analize vključujejo uporabo različnih encimov. V metodi verižne reakcije s polimerazo (PCR) polimeraza namnožuje regije DNA, restrikcijski encimi režejo DNA, ligaza katalizira vezavo dveh molekul DNA s tvorjenjem fosfodiesterne vezi, itd. Delovanje encimov lahko motijo številne spojine ali inhibitorji, zato je pomembno, da je izolirana DNA prosta vseh primesi.

1.1 Namen zaključne naloge

Namen zaključne naloge je bil:

- s pregledom literature proučiti problematiko izolacije DNA iz rastlin z večjo vsebnostjo sekundarnih metabolitov in polisaharidov ter ugotoviti, zakaj le-ti povzročajo težave in kako jih učinkovito odstranimo.
- S preizkusom dveh protokolov za izolacijo DNA iz različnega rastlinskega materiala in v dveh terminih ugotoviti razlike v količini izolirane DNA, čistosti DNA ter uspešnost namnoževanja mikrosatelitov v reakciji PCR in v intenziteti fluorescentnega signala pri kapilarni elektroforezi.
- Na osnovi rezultatov preizkusa določiti primernejši protokol, čas vzorčenja in tkivo za izolacijo DNA iz vinske trte.

1.2 Pregled literature

Pri izolaciji je sprva potrebo poznati klasifikacijo in anatomijo rastline iz katere izoliramo dedni material. Pomembno pa je tudi vedeti kakšna je osnovna metoda za izolacijo in kaj vpliva na samo izolacijo. Glede na različne vplive je potrebno omogočiti optimalno metodo za izolacijo dednega materiala iz rastline.

1.2.1 Klasifikacija vinske trte (*Vitis vinifera* L.)

Vinska trta je uvrščena v družino Vitaceae, ki zajema okoli 600 vrst. Evropska žlahtna vinska trta se uvršča v rod *Vitis* in nadalje v vrsto *Vitis vinifera* L. (Hrček in Korošec-Koruza 1996). *Vitis vinifera* L. je avtohtona v zahodni Aziji in Evropi med 30 in 50 stopinjami geografske širine. Med ledeno dobo je bila omejena na vlažna ter gozdnata do sušna območja vulkanskih gorskih verig južnega Kavkaza med Črnim morjem in Kaspijskim jezerom ter na območje Sredozemlja. Predstavlja najbolj znano vrsto Evrazijske skupine, saj iz nje izhaja večina sort vinske trte. Gojena vinska trta je zaradi dvospolnih cvetov (redkeje tudi funkcionalno ženskih), uvrščena v podvrsto *V. vinifera* subsp. *sativa* (ali *V. vinifera* subsp. *vinifera*) in velja za domesticirano obliko podvrste *V. vinifera* subsp. *sylvestris*, ki je dvodomna (Keller 2010).

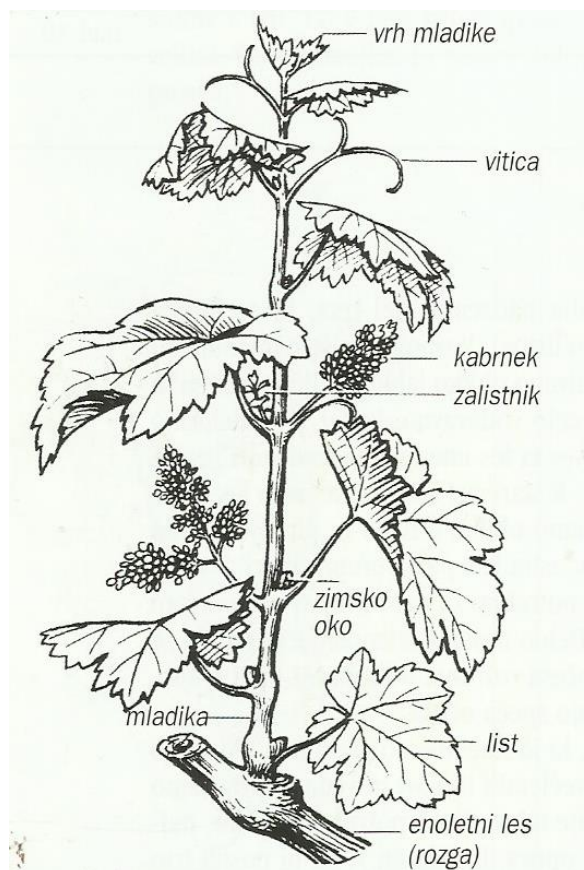
1.2.1.1 Anatomija lista, mladike in rozge

Najbolj primerni rastlinski organi za izolacijo DNA iz vinske trte so mladika oziroma rozga in listi.

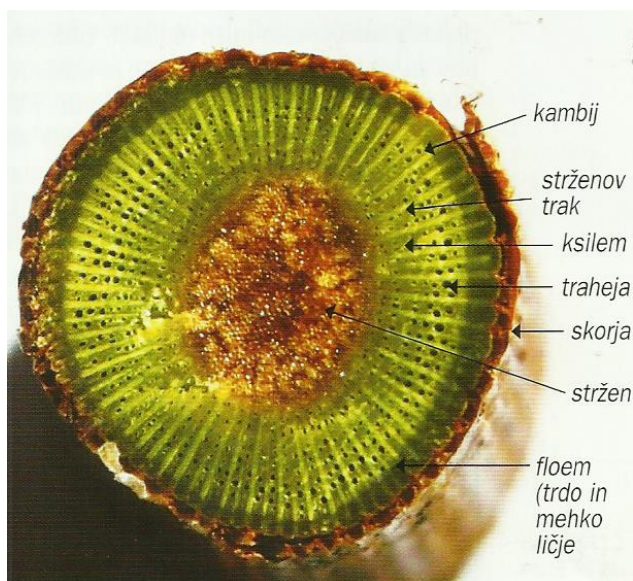
1.2.1.1.1 Mladika in rozga

Poganjek, ki zraste iz katerega koli očesa na trsu, imenujemo mladika. Ta zraste iz brsta v zimskem očesu ali iz brstov v spečih očesih. Če je mladika zrasla iz zimskega očesa na rozgi, ki raste iz dveletnega lesa, ji pravimo rodna mladika. Mladike, ki rastejo iz spečih očes in očes na rozgi, so praviloma nerodne mladike, imenovane jalovke. Na mladiki so listi, vitice in socvetja ali kabrniki (slika 1). V pazduhi listnih pecljev so zalistniki in zimska očesa. Mladika ima členke (nodije), ki jo delijo na medčlenke (internodije). Na nodijih so listi, očesa in kabrniki (po oploditvi grozdi), vitice in zalistniki. Pri evropski trti ima mladika navadno v členku prepono, imenovano diafragma, ki na vsakem nodiju prekinja stržen. Listi so na nodijih menjaje razporejeni in v eni ravnini. Nasproti listov so na spodnjih nodijih grozdi, na zgornjih pa vitice. Vitice so oprijemalni organi, saj trta spada med ovijalke. Del mladike, s katerim je priraščena na dve- ali večleten les, je nekoliko razširjen in na tem mestu so nodiji tako skupaj, da internodije le težka opazimo. Na teh strnjenih nodijih so speča očesa. Ko mladika dozori in oleseni, jo imenujemo rozga. Ta je enoletna, olesenela in dozorela mladika, ki so ji odpadli listi. Internodiji rozge so bolj ali manj valjaste oblike in

imajo izraženo asimetričnost, kar pomeni, da so na nekaterih delih rozge posamezna tkiva različno razvita. Na prečnem prerezu rozge (slika 2) je viden stržen, ki je na vsakem nodiju prekinjen z diafragma. Diafragma je slabše razvita v nodijih, ki nimajo vitic oziroma grozdov (Vršič in Lešnik 2010).



Slika 1: Mladika vinske trte (vir: Vršič in Lešnik 2010)



Slika 2: Prečni prerez rozge (vir: Vršič in Lešnik 2010)

1.2.1.1.2 List

Zasnove listov obstajajo že v zimskem očesu. List presnavlja snovi ob pomoči sončne energije, vode in ogljikovega dioksida v organske spojine. Listi so razvrščeni izmenično na vsakem nodiju. Na listu razlikujemo listni pecelj in listno ploskev, na njenem začetku se pecelj razčleni na pet glavnih listnih žil. Listne žile se potem iz glavnih razvijejo naprej in dovajajo v list vodo in rudninske snovi, iz lista pa odvajajo asimilate. List vinske trte je eno-, tri- ali petdelen, kar je odvisno od globine zarez med glavnimi listnimi žilami. Na spodnji strani je list lahko poraščen z dlačicami. List je glavni organ vinske trte, po katerem se razporeja večino sort (Vršič in Lešnik 2010).

1.2.2 Sekundarni metaboliti

Sekundarni metaboliti nastanejo s pomočjo specifičnih biosintetskih encimov in v organizmu opravljajo posebne naloge. Nekateri sekundarni metaboliti so iz skupine prednikov primarnih metabolitov ali pa so v rastlinske celice uvoženi iz prokariotskih genov preko mitohondrija ali kloroplastov (Wink 2010). Sekundarni metaboliti so organske snovi, ki niso neposredno vpletene v normalno rast, razvoj in razmnoževanje organizma. Pogosto imajo izjemne fiziološke aktivnosti. V rastlinah največkrat nastopajo kot obrambne molekule, npr. pred rastlinojedi, mikrobi ali virusi, ali kot signalne molekule, ki so pomembne za privabljanje opraševalcev in raznašalcev semen. Sekundarni metaboliti so pomembni za preživetje in razmnoževanje rastlin. V primerjavi s primarnimi metaboliti izostanek sekundarnih metabolitov ne pomeni takojšnje smrti, ampak zgolj dolgoročno

oslabitev preživetja in plodnosti. Sekundarne metabolite rastlin delimo v tri večje skupine, in sicer terpenoide, fenolne spojine ali polifenole (v uporabi novejši izraz biofenoli, ki nakazuje na biološko aktivnost teh molekul) in sekundarne spojine, ki vsebujejo dušik (Thaler in Bajc 2013).

1.2.2.1 Sekundarni metaboliti pri vinski trti

Vinska trta vsebuje visoke koncentracije polisaharidov, biofenolov, taninov in ostalih sekundarnih metabolitov (Lodhi in sod. 1994). Biofenoli delujejo kot antioksidanti in konzervansi, dokazan pa je tudi pozitiven učinek delovanja biofenolov na zdravje ljudi. Splošno so fenoli ciklične benzenove spojine z eno ali več hidroksilnimi skupinami. Delimo jih na dve osnovni skupini, flavonoide in neflavonoide. Najbolj pogosti flavonoidi so antociani, flavonoli in flavan-3-oli oziroma flavanoli, med slednje uvrščamo tudi proantocianidine (imenovane tudi kondenzirani tanini). Tanini so vsi polimerni biofenoli, ki so sposobni vezave beljakovin. Delimo jih na kondenzirane, ki se težko hidrolizirajo, in na hidrolizabilne, ki so iz neflavonoidnih biofenolov in se enostavno hidrolizirajo. Najbolj zastopani in poznani neflavonoidi so derivati hidroksicimetnih kislin, ki so vezani na sladkorje, alkohole ali kisline (Bavčar 2009).

1.2.2.2 Vpliv sekundarnih metabolitov na uspeh izolacije nukleinskih kislin

Sekundarni metaboliti lahko inhibirajo oziroma ovirajo celično lizo, ki je potrebna za sprostitvev nukleinskih kislin, povzročajo razpad nukleinskih kislin, ali ovirajo delovanje polimeraze pri pomnoževanju tarčnih nukleinskih kislin (Thaler in Bajc 2013).

V kolikor se za lizo celic uporabljajo encimi, lahko le-te proteolitični encimi in denaturanti razgradijo ali denaturirajo. Kot denaturanti delujejo tudi fenolne spojine (Wilson 1997). Inhibitorji lahko vplivajo na kinetiko pomnoževanja DNA, tako da vežejo katione Mg^{2+} , ki so pomemben kofaktor vseh DNA-polimeraz, lahko se vežejo na tarčna mesta nukleinskih kislin in tako preprečijo vezavo polimeraze na DNA ali na DNA polimerazo (Thaler in Bajc 2013).

Biofenoli (predvsem tanini) zlahka oksidirajo v kinone, ti pa lahko z ireverzibilno vezavo z beljakovinami in nukleinskimi kislinami tvorijo komplekse z visoko molekularno maso (Japelaghi in sod. 2011). Kinoni dajejo značilno rjavo barvo in zmanjšujejo čas vzdrževanja uporabnosti izoliranega materiala za molekulske študije (Sahu in sod. 2012).

Zato je pomembno, da se med izolacijo odstranijo biofenoli in drugi sekundarni metaboliti ter polisaharidi, ki se oborijo z DNA in s tem povzročajo viskoznost DNA raztopine (Iandolino in sod. 2004).

1.2.3 Izolacija DNA

Na kakovost in količino izolirane rastlinske DNA ima velik pomen izbira rastlinskega materiala, pri čemer sveža in mlada tkiva, vzorčena tik pred izolacijo veljajo za primernejša (Weising in sod. 2005).

Metode za izolacijo rastlinske DNA se razlikujejo, glede na sestavo ekstrakcijskih in liznih pufrov, na način razgradnje tkiv in celic ter na način odstranitve drugih celičnih sestavin, kot so beljakovine, RNA, membrane, polisaharidi in biofenoli (Weising in sod. 2005).

Doyle in Doyle (1990) ter Murray in Thompson (1980) so predstavili metodo za izolacijo nukleinskih kislin, ki predvideva uporabo detergenta CTAB. Protokola temeljita na inkubaciji rastlinskega materiala v segretem izolacijskem pufru CTAB, sledi ekstrakcija s kloroform/izoamilalkoholom (24:1) oziroma kloroformom in oktanolom ter obarjanje DNA iz vodne raztopine. Protokoli, ki temeljijo na uporabi detergenta CTAB so bili z različnimi modifikacijami uporabljeni pri številnih študijah rastlinskih vrst (Kump in Javornik 1996; This in sod. 2004; Jing in sod. 2013; Vršič in sod. 2011; Bandelj in sod. 2004)

1.2.3.1 Homogenizacija tkiva

Pri rastlinah se zaradi celične stene za homogenizacijo tkiva pogosto uporablja tekoči dušik. Rastlinski material zamrzne v tekočem dušiku in se ga s terilnico stre v prah. Pomembno je, da se rastlinski material pred dodatkom izolacijskega puфра ne odtali, ker lahko celični encimi hitro razgradijo DNA (Weising in sod. 2005).

1.2.3.2 Liza membran in organelov

Takoj po homogenizaciji tkiva se v izolacijskem postopku izvede liza membran in sprostitve DNA iz jedra. Ekstrakcijski pufer sestavljajo naslednje sestavine v različnih kombinacijah (Weising in sod. 2005):

- detergenti sodelujejo pri razgradnji bioloških membran, denaturaciji beljakovin in ločitvi beljakovin od DNA. Najbolj pogosto uporabljen kationski detergent je CTAB (ang. Cetyltrimethylammonium bromide). Standardni masno volumski delež CTAB detergenta v ekstrakcijskem pufru je 2 %;

- puferski sistem, navadno na osnovi Tris–HCl, ohranja pH v območju, kjer je onemogočeno delovanje degradacijskih encimov (pri rastlinah običajno med pH 8 in pH 9);
- visoka koncentracija soli (< 1M NaCl) loči jedrne beljakovine (predvsem histone) od DNA in obdrži polisaharide med obarjanjem z etanolom v raztopini. Omogoča pa tudi odstranitev ostalih inhibitorjev PCR;
- reducenti, kot so β -merkaptoetanol, ditioneitol ali askorbinska kislina, inhibirajo oksidacijske procese, ki posredno ali neposredno poškodujejo DNA;
- kelirna sredstva oziroma kelatorji, kot npr. EDTA ali EGTA, vežejo dvovalentne kovinske ione, ki jih za delovanje potrebujejo deoksiribonukleaze.

1.2.3.3 Odstranitev beljakovin in RNA

Ločitev beljakovin od DNA omogočajo detergenti in visoka koncentracija soli v ekstrakcijskem pufu. Raztopljene beljakovine pa se pogosto odstranijo z eno ali več ponovitvami ekstrakcije s fenolom, raztopino fenol–kloroforma ali kloroform–izoamilalkohola, katerim sledi centrifugiranje za ločitev organske in vodne faze. RNA se pogosto očisti skupaj z DNA, kar lahko povzroča probleme pri reakciji PCR (Weising in sod. 2005). Zvitje in stabilnost terciarnih struktur RNA je odvisno od koncentracije kationov. Zaradi tega, lahko RNA v reakciji PCR deluje kot kelator in nase veže Mg^{2+} katione (Draper 2004). Na RNA se lahko vežejo začetni oligonuleotidi. Ugotovljeno je bilo, da je odstranitev RNA izboljšala namnoževanje markerjev RAPD (Weising in sod. 2005).

1.2.3.4 Odstranitev biofenolov in ostalih sekundarnih metabolitov

Škodljivim vplivom biofenolov in njihovih produktov oksidacije pri izolaciji DNA se najpogosteje izognemo z enim od naslednjih štirih načinov (Weising in sod. 2005):

- vključitev adsorbentov biofenolov kot je goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin ali BSA) ali topen polivinilpirolidon (ang. polyvinylpyrrolidone ali PVP), v izolacijski pufer;
- vključitev inhibitorjev fenol oksidaz;
- preprečitev oksidacije biofenolov s povečanjem koncentracije antioksidantov, kot je β -merkaptoetanol, v izolacijskem pufu. Optimalna koncentracija antioksidantov je med rastlinskimi vrstami zelo različna;
- visoko razmerje med ekstrakcijskim pufrom in rastlinskim materialom povzroči, da se biofenoli bolj razredčijo, zaradi česar je njihov vpliv manjši.

Biofenoli se vežejo na PVP in po obarjanju z dodatkom izopropanola ostanejo v vodni fazi, medtem ko se nukleinske kisline oborijo. Topnost polisaharidov pa je boljša v pufru z večjo koncentracijo NaCl (Japelaghi in sod. 2011).

1.2.4 PCR – verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo je *in vitro* metoda za namnoževanje DNA. Z odkritjem termo stabilne DNA polimeraze v bakteriji *Thermus aquaticus* v letu 1988 se je uporaba reakcije PCR skokovito povečala, tako na področju raziskav kot tudi v diagnostične namene. Reakcija PCR temelji na treh temperaturnih korakih, ki se večkrat ciklično ponovijo (Weising in sod. 2005).

Prvi korak poteka pri 94 °C ali višji temperaturi. Posledica visoke temperature je denaturacija oziroma razklop dvojne vijačnice DNA v dve enojni verigi. Pred prvim ciklom se izvede nekaj minutno denaturacijo (običajno do 5 min), da se genomska DNA popolnoma denaturira. Denaturacija je pri nadaljnjih ciklih krajša in običajno traja od 20 sekund do 1 minute (Brown 2010).

V drugem koraku se reakcijska mešanica ohladi na 50-60 °C. Pri tej temperaturi bi se lahko DNA molekule ponovno združile skupaj, vendar se jih večina ne, ker mešanica vsebuje velik prebitek kratkih molekul, imenovanih začetni oligonukletidi (ang. primers), ki se vežejo na enoverižno molekulo DNA na komplementarnem delu DNA, zato postane molekula ponovno dvoverižna. Drugi korak, imenovan prileganje, traja približno 1 minuto (Brown 2010).

V tretjem koraku se temperatura dvigne na 74 °C, ki je optimalna temperatura za delovanje termo stabilne *Taq* DNA polimeraze. Polimeraza DNA sintetizira komplementarno verigo DNA od začetnega oligonukleotida v smeri 5' proti 3'. Po končanem tretjem koraku, ki traja med 30 sekund in več minut, odvisno od dolžine fragmenta DNA in ga imenujemo podaljševanje nastajajoče verige DNA, je število molekul DNA podvojeno oz. število molekul DNA z vsakim ciklom narašča eksponentno. Po vseh opravljenih ciklih se reakcija še približno 5-10 minut inkubira pri 72 °C, da se fragmenti DNA, ki se med cikli reakcije niso podaljšali za celotno dolžino fragmenta, podaljšajo do konca. (Brown 2010).

1.2.4.1 Reakcijska mešanica PCR

Reakcijska mešanica PCR vsebuje matrično DNA, začetne oligonukleotide, pufer, termostabilno DNA polimerazo, mešanico vseh dNTP-jev (deoksiribonukleotidov ali deoksiribonukleotid trifosfatov) in vodo (Brown 2010).

Pufer zagotavlja optimalne pogoje delovanja *Taq* DNA polimeraze. Običajno sta k polimerazi s strani proizvajalca priložena dva pufera: eden s KCl in drugi z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. K^+ ioni stabilizirajo prileganje začetnih oligonukleotidov, medtem ko imajo NH_4^+ destabilizirajoč vpliv predvsem na šibkejšje vodikove vezi med nekomplementarnimi baznimi pari začetnih oligonukleotidi in matrične DNA. Pri uporabi pufera z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ je potrebna večja koncentracija MgCl_2 in obratno. Zaradi antagonizma med Mg^{2+} in NH_4^+ , *Taq* pufer z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ omogoča večjo specifičnost prileganja začetnih oligonukleotidov. Mg^{2+} ioni stabilizirajo kompleks med polimerazo, začetnimi oligonukleotidi, dNTP in matrično DNA. Vsi štiri dNTP-ji (dATP, dGTP, dCTP in dTTP), zastopani v enaki koncentraciji, predstavljajo zalogo gradbenih elementov potrebnih za sintezo nove verige. (Components... 2012).

1.2.4.2 Mikrosateliti

Mikrosateliti ali ponovitve enostavnih zaporedij (ang. Simple Sequence Repeats, SSR) so sestavljeni iz tandemske ponovljenih nukleotidnih zaporedij. Mikrosateliti so značilni za evkariontske genome, našli so jih tudi pri prokariontih (Weising in sod. 2005). V literaturi se pojavljajo različna poimenovanja mikrosatelitov, kot so kratke tandemske ponovitve (angl. Short Tandem Repeats, STR), polimorfizem dolžin enostavnih zaporedij (ang. Simple Sequence Length Polymorphism, SSLP) in spremenljivo število tandemskih ponovitev (ang. Variable Number of Tandem Repeats, VNTR) (Weising in sod. 2005).

Mikrosateliti se pri trti pogosto uporabljajo za identifikacijo sort in ugotavljanje sorodstvenih povezav med sortami. Identifikacija sort omogoča vzpostavitev kolekcijskih vinogradov in ugotavljanje genetsko različnega materiala (Sefc in sod. 1999).

2 METODE DELA

2.1 Pridobivanje rastlinskega materiala in terminski potek

Izolacijo dednega materiala smo izvedli v dveh terminih iz različnih tkiv vinske trte sorte *Vitis vinifera* 'Refošk' po dveh izolacijskih protokolih. V juniju (14.6.2013) smo DNA izolirali iz listov in mladik vinske trte, oktobra (24.10.2012) pa iz listov in kambija olesenele mladike oz. rozge. Rastlinski material smo vzorčili zjutraj pred samo izolacijo.

Pri listih smo za začetno količino rastlinskega materiala uporabili plastičen tulec (premer približno 13 mm), s katerim smo izrezali enako velikost dela lista s povprečno maso 0,05 g. Pri izolaciji iz kambija smo s skalpelom odstranili skorjo in nastrgali kambij ter razvijajoč ksilem in floem, medtem ko smo pri izolaciji iz mladike s skalpelom nastrgali del mladike vključno s povrhnjico (v obeh primerih približno 0,05 g rastlinskega materiala). Rastlinski material rozge in mladike smo pred dodatkom pufra CTAB strli z dodatkom tekočega dušika. Centrifuga (Ependorf 5430R) je bila ohlajena na 4 °C.

Skupno smo zastavili 8 obravnavanj glede na termin izolacije, rastlinsko tkivo in protokol (preglednica 1).

Preglednica 1: Razlaga oznak posameznih obravnavanj

OBRAVNAVANJA	RAZLAGA OZNAKE
JL1	jesen, list, protokol 1
JL2	jesen, list, protokol 2
JK1	jesen, kambij, protokol 1
JK2	jesen, kambij, protokol 2
PL1	pomlad, list, protokol 1
PL2	pomlad, list, protokol 2
PM1	pomlad, mladika, protokol 1
PM2	pomlad, mladika, protokol 2

2.2 Sestava pufrov za izolacijo DNA

Za izolacijo DNA smo uporabili dva protokola; v protokolu 1 (Kump in Javornik 1996) so bile vključene naslednje kemikalije:

- CTAB pufer: 100 mM Tris-HCl¹ pH 8, 20 mM EDTA², 1,4 M NaCl, 2 % (masno-volumski delež) CTAB, 0,2 % (volumski delež) β-merkaptotanol,
- natrijev acetat (NaAc): 3 M, pH 5,2; pH uravnavan z ledeno očetno kislino.

V protokolu 2 (Japelaghi in sod. 2011) pa:

- CTAB pufer: 300 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 2 M NaCl, 2 % (masno-volumski delež) PVP³, 2 % (masno-volumski delež) CTAB. Pred uporabo smo dodali β-merkaptotanol (2 %, volumski delež),
- natrijev acetat (NaAc): 3 M, pH 5,2; pH uravnavan z ledeno očetno kislino.

Pri protokolu 1 v ekstrakcijskem pufru ni prisotnega PVP-ja. Razlika med izolacijskima pufrima je še v koncentraciji NaCl in volumskem masnem deležu β-merkaptotanola. V drugem protokolu je večja koncentracija NaCl (2,5 M), kar poveča topnost polisaharidov in tako zmanjša obarjanje le-teh z DNA. V drugem protokolu je večji tudi volumski delež β-merkaptotanola.

2.3 Izolacija DNA po dveh različnih protokolih

2.3.1 Protokol 1

Za prvi protokol smo z nekaterimi spremembami uporabili protokol, opisan v Kump in Javornik (1996):

- a) približno 50 mg rastlinskega materiala smo zdrobili v terilnici in dodali 1,5 ml CTAB pufra [2 % (m/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 % (v/v) β-merkaptotanol], predhodno segretega na 68 °C;
- b) sledila je inkubacija na 68 °C za 1 uro in pol z občasnim stresanjem;
- c) dodali smo 500 μl topila, fenol-kloroform-izoamilalkohol v razmerju 25 : 24 : 1 in dobro premešali, da je nastala suspenzija;
- d) po 15 minutnem centrifugiranju pri 11.000 obratih na minuto (centrifuga je bila vseskozi ohlajena na 4 °C) smo supernatant odpipetirali v novo centrifugirko in ponovili koraka c in d;
- e) dodali smo 50 μl 3 M NaAc in 500 μl ledeno hladnega izopropanola ter dobro pretresli;
- f) vzorce smo za 30 minut dali v zamrzovalnik na – 20 °C;

¹ TRIS 1 M, pH 8, s HCl uravnavan pH

² EDTA 0,5 M, pH 8, z NaOH uravnavan pH

³ Sigma, MW 40000

g) vzorce smo nato centrifugirali 15 minut pri 11.000 obratih. Po centrifugiranju smo supernatant odlili, dodali 500 μ l 70 % etanola in rahlo pretresli, da se je DNA odlepila od centrifugirke;

h) po 5-minutnem centrifugiranju pri 11.000 obratih na minuto, smo previdno odlili etanol in DNA posušili na zraku;

i) glede na količine izolirane DNA, smo DNA raztopili v 30 do 50 μ l TE [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA (pH 8,0)] puftru.

2.3.2 Protokol 2

Izolacija po drugem protokolu je potekala kot je opisano v Japelaghi in sod. (2011):

a) približno 50 mg rastlinskega materiala smo zdrobili v terilnici in dodali 1 ml CTAB pufra [2 % (m/v) CTAB, 2 M NaCl, 25 mM EDTA, 300 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 % (w/v) topnega PVP, 2 % (v/v) β -merkaptometanol], predhodno segretega na 68 °C;

b) sledila je inkubacija na 68 °C za 30 minut z občasnim stresanjem;

c) dodali smo 1 ml topila, kloroform-izoamilalkohol v razmerju 24 : 1 in dobro premešali, da je nastala suspenzija;

d) po 5 minutnem centrifugiranju pri 14.000 obratih na minuto (centrifuga je bila vseskozi ohlajena na 4 °C) smo supernatant odpipetirali v novo centrifugirko in ponovili koraka c in d;

e) dodali smo 100 μ l 3 M NaAc (pH 5,2) in 1 ml ledeno hladnega izopropanola ter dobro pretresli;

f) vzorce smo za 30 minut dali v zamrzovalnik na – 80 °C;

g) vzorce smo nato centrifugirali 30 minut pri 14.000 obratih. Po centrifugiranju smo supernatant odlili, dodali 500 μ l 70 % etanola in rahlo pretresli, da se je DNA odlepila od centrifugirke;

h) po 5-minutnem centrifugiranju pri 11.000 obratih na minuto, smo previdno odlili etanol in DNA posušili na zraku;

i) glede na količine izolirane DNA, smo DNA raztopili v 30 do 50 μ l TE [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA (pH 8,0)] puftru.

2.4 Merjenje koncentracije DNA

Meritve s fluorometrom temeljijo na uporabi fluorescentnih barvil, ki se vežejo na nukleinske kisline. Fluorometer oddaja UV-svetlobo pri valovni dolžini, kjer ima uporabljeni fluorokrom absorpcijski maksimum. Fluorokromi zaradi prejete energije in bližine dušikovih spojin fluorescirajo oziroma oddajajo svetlobo pri valovni dolžini v vidnem delu spektra. Fluorometer izmeri jakost fluorescence, ki je sorazmerna s količino

nukleinskih kislin. Metoda merjenja s fluorometrom je primernejša za vzorce, ki poleg DNA vsebujejo tudi RNA.

Koncentracijo DNA smo določili s povprečno vrednostjo treh meritev. Koncentracijo izolirane DNA smo določili s fluorometrom Qubit™ (Life Technologies) in s pripadajočim setom reagentov (Qubit® dsDNA BR Assay Kit, Q32853) po navodilih proizvajalca.

Delovno raztopino smo pripravili tako, da smo 200-krat koncentriran reagent (Qubit® dsDNA BR Reagent) razredčili s pufrom (Qubit® dsDNA BR Buffer) na enkrat delavno koncentracijo. Umeritvene raztopine smo pripravili z mešanjem 190 µl delavne raztopine in 10 µl založnih standardnih raztopin 1 in 2 (Quant-iT™ dsDNA BR standard #1 s koncentracijo 0 ng/µl in #2 s koncentracijo 100 ng/µl). Meritveno raztopino smo pripravili z mešanjem 198 µl delavne raztopine in 2 µl DNA raztopine.

2.5 Določanje čistosti DNA

Nukleinske kisline imajo absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 260 nm. Količina absorbirane svetlobe je sorazmerna s količino nukleinskih kislin v vzorcu. Pri valovni dolžini 280 nm imajo absorpcijski maksimum aminokislina, predvsem stranske verige tirozina, fenilalanina in triptofana. Vsebnost beljakovin v raztopini DNA lahko preverimo z razmerjem A_{260}/A_{280} . Vrednosti med 1,8 in 2 pri DNA pomenijo, da raztopina DNA ne vsebuje večje količine beljakovin. Vsebnost fenolov in ostalih organskih snovi lahko določimo z merjenjem absorbance pri 230 nm. Razmerje A_{260}/A_{230} pri čistih vzorcih je navadno višje od razmerja A_{260}/A_{280} .

2.6 Določitev uspešnosti namnoževanja z analizo 4 mikrosatelitskih lokusov

Mikrosatelite smo uporabili za preverjanje uspešnosti namnoževanja DNA, izolirane z dvema različnima protokoloma, v dveh terminih in iz različnih tkiv vinske trte.

Analizirali smo sledeče lokuse: VVMD7 (Bowers in sod. 1996), VVMD27 in VVMD32 (Bowers in sod. 1999) ter VrZAG62 (Sefc in sod. 1999).

Preglednica 2: Seznam mikrosatelitov in začetnih oligonukletidov; podčrtano nukleotidno zaporedje predstavlja zaporedje M13 (-21) oligonukleotida v dolžini 18 bp

Mikrosatelitski lokus		Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov
VrZAG62	F	GGT GAA ATG GGC ACC GAA CAC ACG C
	R	<u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> CCA TGT CTC TCC TCA GCT TCT CAG C
VVMD7	F	AGA GTT GCG GAG AAC AGG AT
	R	<u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> CGA ACC TTC ACA CGC TTG AT
VVMD27	F	GTA CCA GAT CTG AAT ACA TCC GTA AGT
	R	<u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> ACG GGT ATA GAG CAA ACG GTG T
VVMD32	F	TAT GAT TTT TTA GGG GGG TGA GG
	R	<u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> GGA AAG ATG GGA TGA CTC GC

Mikrosatelitske lokuse smo namnoževali z ekonomično metodo, pri kateri je v reakciji PCR poleg lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov, od katerih je eden na 5' koncu podaljšan za nukleotidno zaporedje M13(-21) oligonukleotida v dolžini 18 bp (v preglednici 1 podčrtano nukleotidno zaporedje), vključen še tretji začetni oligonukleotid, imenovan M13(-21) z nukleotidnim zaporedjem 5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3' in je na 5' koncu označen s fluorescentnim barvilom (Schuelke 2000). Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov je predstavljen v preglednici 1.

Reakcijo PCR smo izvedli po postopku, kot je opisan v Hladnik (2014). Reakcija PCR, je v končnem volumnu 15 µl vsebovala 20 ng DNA, 1X *Taq* pufer z (NH₄)₂SO₄, 0,2 mM koncentracijo vsakega deoksiribonukleotid trifosfata, 2 mM koncentracijo MgCl₂, 0,2 µM koncentracijo vsakega lokusno specifičnega začetnega oligonukleotida (Integrated DNA Technologies), 0,25 µM koncentracijo M13 (-21) oligonukleotida (Applied Biosystems) in 0,375 enote *Taq* DNA polimeraze (EP0402). Če ni drugače navedeno, so vse kemikalije za izvedbo reakcije PCR in *Taq* polimeraza proizvajalca Fermentas/Thermo Scientific.

Namnoževanje je potekalo v cikličnem termostatu AB 2720 (Applied Biosystems) po naslednjem dvostopenjskem temperaturnem profilu:

- začetna 5-minutna denaturacija DNA pri 94 °C,
- sledilo je 5 ciklov, kjer se je pri vsakem ciklu temperatura prileganja znižala za 1 °C,
 - a) 30 sekund pri 94 °C,
 - b) 90 sekund pri 60 °C (-1 °C/cikel),
 - c) 90 sekund pri 72 °C,
- sledilo je 30 ciklov s ponavljanjem:
 - a) 30 sekund pri 94 °C,

- b) 90 sekund pri 55 °C,
- c) 90 sekund pri 72 °C,
- končna inkubacija vzorcev 8 minut pri 72 °C.

Namnoženo DNA smo detektirali na kapilarnem sekvenatorju ABI3130 (Applied Biosystems). Po končani reakciji PCR smo vse 4 lokuse združili v skupno mešanico v enakem razmerju. Od nastale mešanice smo 1 µl vsakega vzorca prenesli na 96-mestno PCR ploščo za ABI sekvenator ter vsakemu vzorcu dodali 10,7 µl formamida (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems) in 0,3 µl velikostnega standarda (GeneScan™ 500 LIZ™ Size Standard, Applied Biosystems). Vzorce smo pred nanosom na sekvenator denaturirali tako, da smo jih 5 minut inkubirali pri 95 °C. Elektroforeza je potekala v polimeru 3130 POP-7™ (Applied Biosystems). Rezultate smo dobili v obliki kromatografskih datotek s končnico ».fsa«. To je vrsta datotek, v katere shranjuje podatke o fragmentni analizi program Data Collection (Applied Biosystems). Dolžino namnoženih mikrosatelitov in intenziteto fluorescence v relativnih enotah fluorescence (ang. relative fluorescence units, rfu) smo določili z algoritmom programskega paketa GeneMapper v4.1.

2.7 Statistična obdelava podatkov

Podatke za količino in intenziteto DNA smo statistično obdelali s programom SPSS, v19.0 (IBM, ZDA). Za preverjanje enakosti varianc med obravnavanji smo uporabili Levenov test. Za preverjanje ali so med obravnavanji statistično značilne razlike, smo podatke obdelali z analizo variance (ANOVA). Za izvedbo mnogoternih primerjav smo uporabili HSD ali Tukeyev preizkus ($\alpha = 0,05$). Za zagotovitev enakosti varianc smo podatke o količini DNA logaritmirali z desetiškim logaritmom. Podatki so prikazani tabelarično ter grafično v obliki okvirjev z ročaji (slike 3, 4 in 5).

3 REZULTATI Z DISKUSIJO

3.1 Količina DNA v izoliranih vzorcih

S statistično analizo smo ugotovili, da smo pri obravnavanju PL2 pridobili statistično značilno največ DNA (preglednica 3). Glede na to, da smo pri obravnavanju JL2 ugotovili statistično značilno manjšo količino DNA, rezultati analize potrjujejo predhodne ugotovitve, da je vzorčenje rastlinskega materiala spomladi primernejše (Weising in sod. 2005; Piccolo in sod. 2012). Slednje ugotovitve nismo uspeli potrditi pri protokolu 1, ker med obravnavanji JL1 in PL1 nismo ugotovili statistično značilne razlike v količini DNA.

Preglednica 3: Količina DNA in razmerje absorbanc glede na posamezno obravnavanje

Obravnavanje	Število vzorcev	Transformirane vrednosti ($\log_{10}x$) \pm SD	Netransformirana povprečna količina DNA (ng \pm SD)	$A_{260}/A_{280} \pm$ SD	$A_{260}/A_{230} \pm$ SD
JL1	10	3,2873 \pm 0,15 ^c	2047 \pm 772	1,98 \pm 0,10	1,99 \pm 0,19
JL2	10	3,2945 \pm 0,28 ^c	2249 \pm 909	1,98 \pm 0,04	1,67 \pm 0,11
JK1	6 (10)*	1,8829 \pm 0,33 ^a	97 \pm 74	1,49 \pm 0,17	1,00 \pm 0,29
JK2	10	3,2387 \pm 0,17 ^c	1842 \pm 626	2,01 \pm 0,03	1,79 \pm 0,15
PL1	10	3,4987 \pm 0,29 ^c	3722 \pm 2039	2,09 \pm 0,02	2,43 \pm 0,05
PL2	10	4,0446 \pm 0,13 ^d	11519 \pm 3107	2,09 \pm 0,02	2,16 \pm 0,12
PM1	10	2,9128 \pm 0,19 ^b	881 \pm 300	2,01 \pm 0,07	2,49 \pm 0,13
PM2	10	3,314 \pm 0,07 ^c	2084 \pm 349	2,07 \pm 0,03	2,26 \pm 0,18

* koncentracijo DNA ter količino smo določili 6 vzorcem, pri ostalih 4 je bila pod mejo detekcije. Razmerje absorbanc je bilo določeno pri vseh 10 vzorcih.

SD – standardni odklon

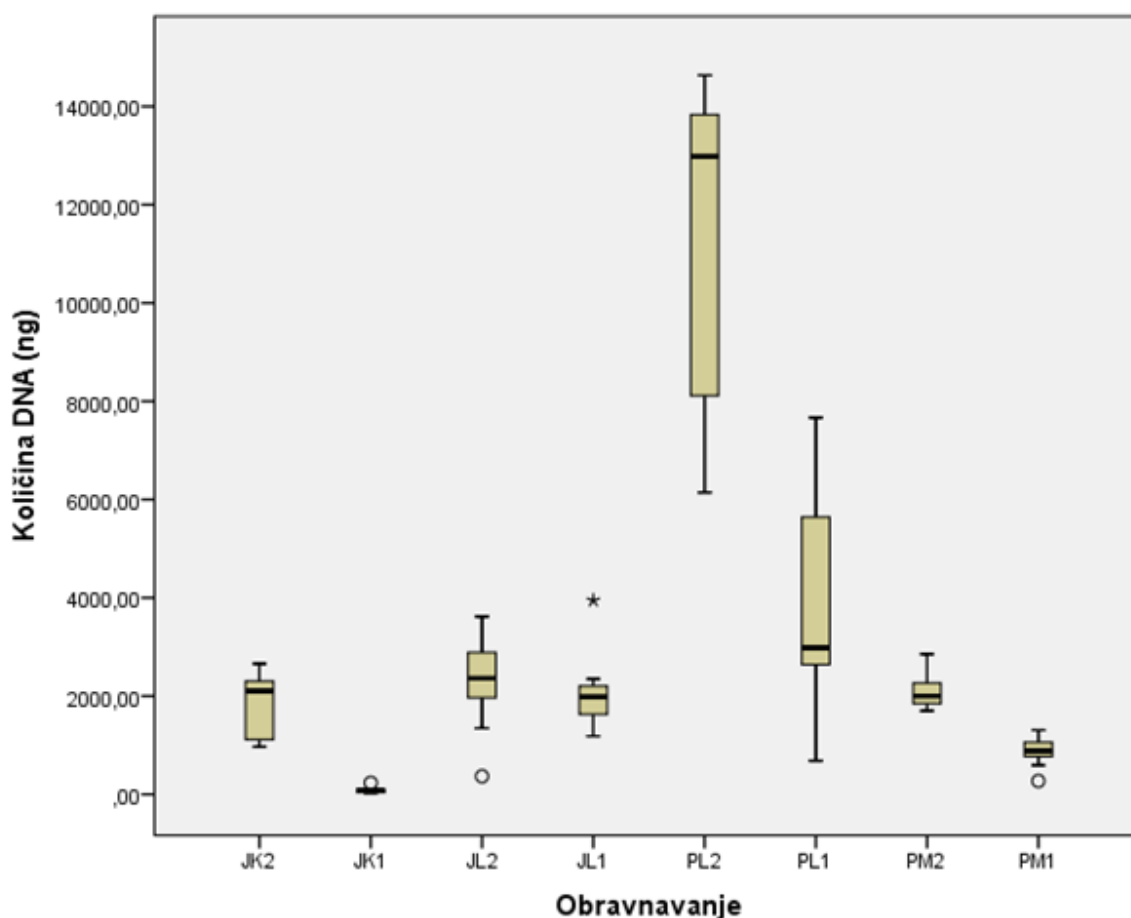
črke a, b, c, d označujejo obravnavanja, med katerimi niso bile ugotovljene statistično značilne razlike

Pri uporabi protokola 2 za izolacijo v oktobru nismo ugotovili razlik v količini DNA med izolacijo iz kambija ter iz lista, medtem ko je bila učinkovitost protokola 1 boljša pri izolaciji iz lista. Pri obravnavanju JK1 (izolacija po protokolu 1 iz kambija v oktobru) je bila namreč ugotovljena statistično značilna najmanjša količina DNA. Razlike pri učinkovitosti protokolov smo ugotovili tudi pri izolaciji iz kambija. S protokolom 1 smo pridobili najmanjšo količino DNA (povprečna vrednost 97 ng DNA), medtem ko smo s protokolom 2 pri izolaciji v povprečju pridobili 1842 ng DNA.

Rezultati kažejo, da je protokol 2, kjer je CTAB pufri dodan še PVP, večja koncentracija NaCl in β -merkaptetanola, učinkovitejši v primerjavi s protokolom 1.

Iz rezultatov je razvidna tudi razlika v izolaciji iz različnih tkiv. Pri protokolu 1 in 2 je bila junija učinkovitejša izolacija iz listov. Oktobra je bila pri protokolu 1 prav tako učinkovitejša izolacija iz listov, medtem ko pri protokolu 2 pri izolaciji v oktobru nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Večjo količino izolirane DNA iz listov sta pridobila tudi Lin in Walker (1997) v primerjavi s kambijem in predpostavila, da je izolacija dednega materiala iz kambija primernejša le takrat, ko listi niso na voljo. Razlik v kakovosti DNA izolirane iz listov in kambija nista ugotovila.

Grafični prikaz podatkov je na sliki 3. S krogi in zvezdicami so označeni osamelci oziroma ekstremni osamelci (vrednosti, ki bistveno odstopajo od večine ostalih vrednosti).



Slika 3: Okvir z ročaji za količino DNA po obravnavanjih

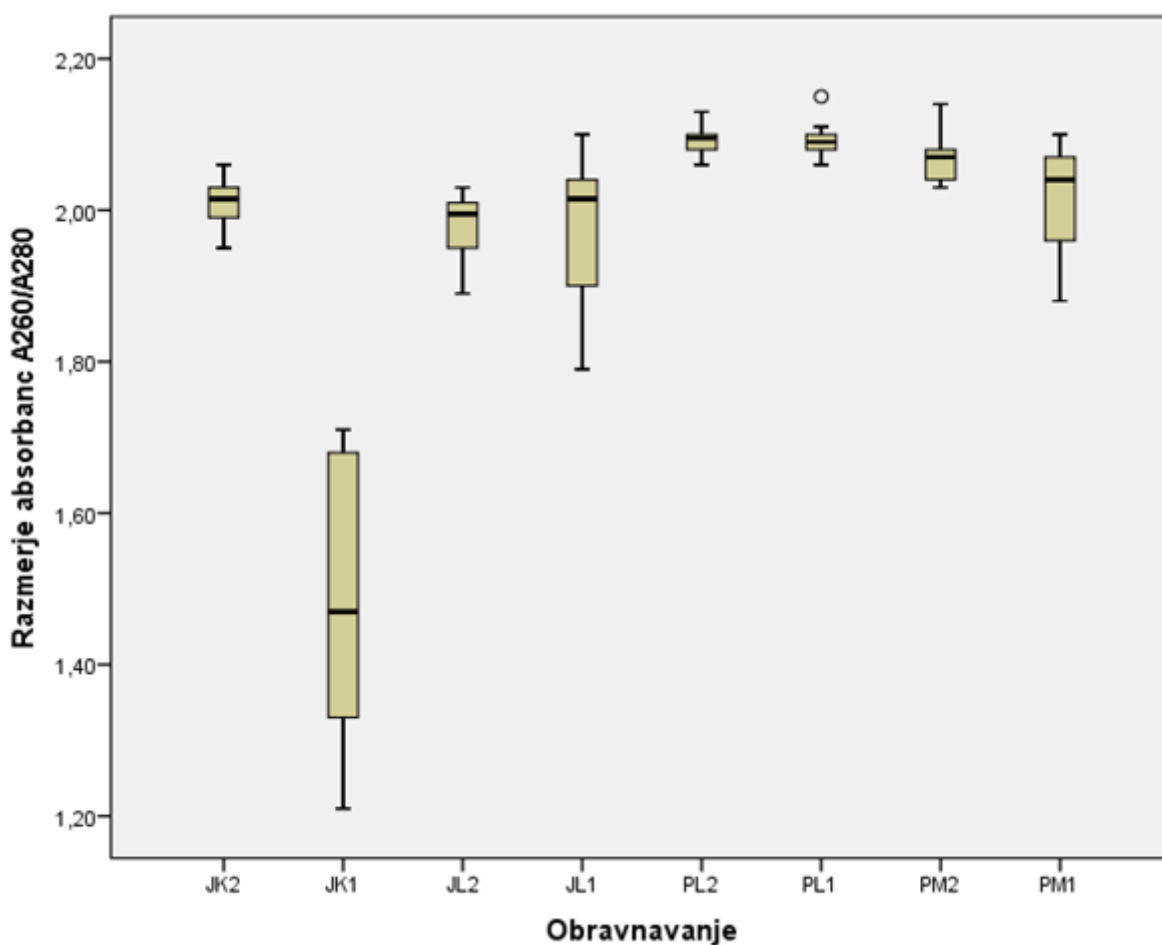
3.2 Razmerje A_{260}/A_{280} in A_{260}/A_{230}

Poleg količine izolirane DNA je pomemben dejavnik za uspešnost nadaljnjih encimskih reakcij tudi čistost DNA. Razmerje absorbance A_{260}/A_{280} je za čisti vzorec 1,8 do 2,0. Manjša

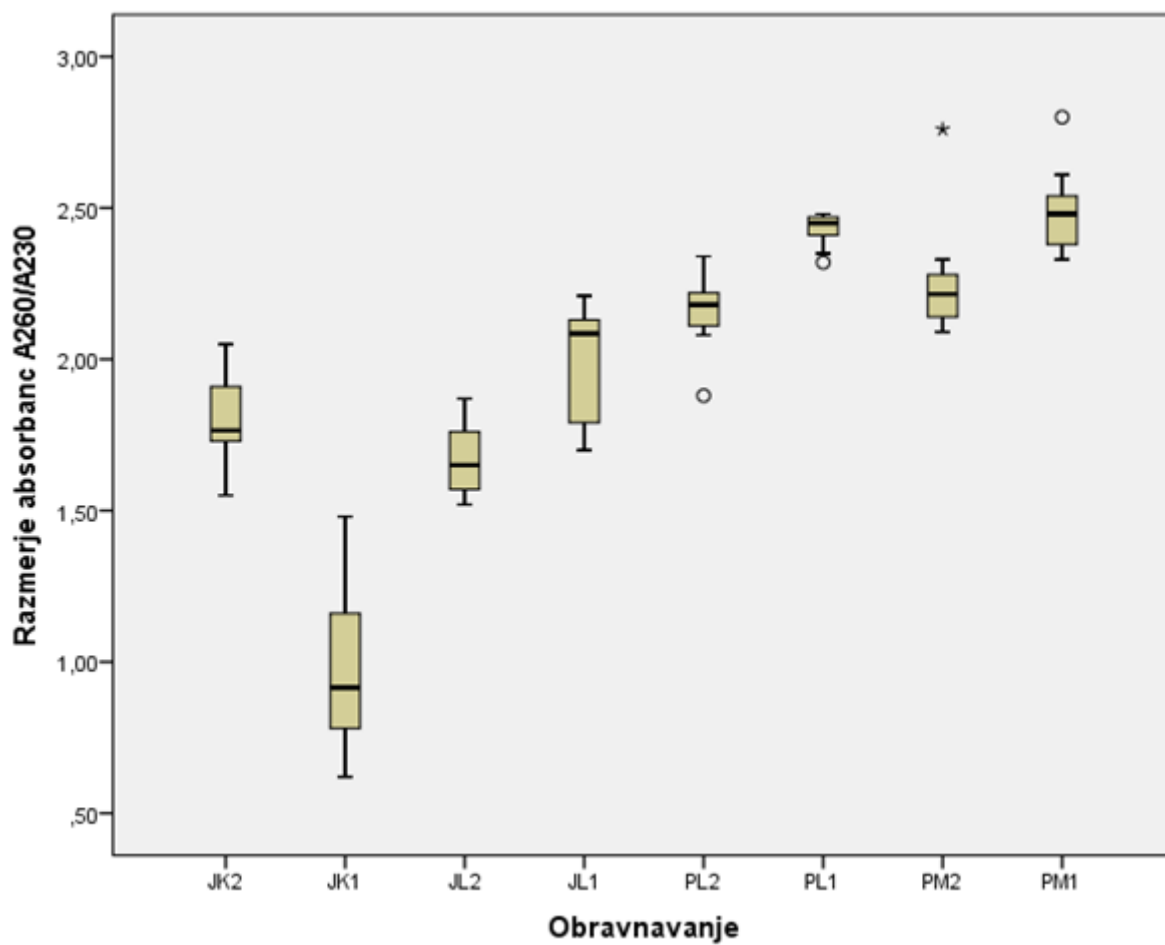
vrednost razmerja kaže na prisotnost beljakovin, medtem ko prisotnost RNA povečuje razmerje absorbcanc. Na splošno razmerje absorbcanc med 1,8 in 2,0 kaže na to, da je DNA dovolj čista. Za razmerje A_{260}/A_{230} pri čisti DNA velja, da je nad 2,0 (Akkurt 2012).

Ker z Levenovim testom nismo potrdili domneve o enakosti varianc, rezultate podajamo le tabelarično in grafično v obliki okvirjev z ročaji (sliki 4 in 5). Pri vseh obravnavanjih, razen pri JK1, smo ugotovili razmerja okoli 2, kar kaže na to, da je bila izolirana DNA dovolj očiščena beljakovin (preglednica 3).

Pri rezultatih razmerja A_{260}/A_{230} smo ugotovili, da je bilo razmerje pri DNA, izolirani v oktobru, pod 2 ter nižje od razmerja A_{260}/A_{280} , razen pri obravnavanju JL1. Nizka razmerja A_{260}/A_{230} so pri rastlinah največkrat posledica večje vsebnosti polisaharidov. Rezultati potrjujejo navedbo Hananie in sod. (2004) in sicer, da starejši, polno razprti listi vinske trte, navadno vsebujejo več škroba in biofenolov.



Slika 4: Graf v obliki okvirja z ročaji za prikaz razmerij absorbcanc A_{260}/A_{280}



Slika 5: Graf v obliki okvirja z ročaji za prikaz razmerij absorbanca A_{260}/A_{230}

3.3 Uspešnost namnoževanja mikrosatelitov in intenziteta signala pri kapilarni elektroforezi

Uspešnost namnoževanja mikrosatelitov smo ugotavljali samo pri 7 obravnavanjih. Vzorcev iz obravnavanja JK1 nismo uporabili zaradi premajhne količine izolirane DNA.

Pri lokusu VVMD27 je bilo ugotovljeno homozigotno stanje, zaradi česar je bil v statistično analizo vključen le po en podatek na uspešno namnožen vzorec, medtem ko sta bila pri heterozigotnih vzorcih za vsak uspešno namnožen vzorec na voljo dva podatka (intenziteta obeh alelov) (preglednica 4).

Pri mikrosatelitskem lokusu VVMD7 je bila najvišja povprečna intenziteta zaznana pri obravnavanju PM2. Najnižja intenziteta pa je bila ugotovljena pri obravnavanju JL1. Med obravnavanji PM2, PL2, JK2 in PL1 ni bilo zaznanih statistično značilnih razlik. Največ vzorcev se je namnožilo pri obravnavanjih PM2 in JK2 in sicer vseh 10 vzorcev na obravnavanje, najmanj pa pri obravnavanju JL1 (7 vzorcev).

Pri mikrosatelitskem lokusu VVMD27 je bila najnižja intenziteta ugotovljena pri obravnavanju JL1, najvišja pa pri obravnavanju PL2. Med obravnavanji PL2, PM2, JK2, JL2, PL1 in PM1 ni bilo ugotovljenih statistično značilnih razlik. Največ vzorcev (vseh deset) se je namnožilo pri obravnavanjih PM2, JK2 in JL2. Najmanjše število vzorcev pa je bilo namnoženo pri obravnavanju JL1.

Pri lokusu VVMD32 je bila najnižja intenziteta ugotovljena pri obravnavanju JL1, najvišja pa pri PM2, prav tako kot pri mikrosatelitskem lokusu VVMD7. Med obravnavanji PM2, JK2, PL2 in PL1 ni bilo zaznanih statistično značilnih razlik. Pri obravnavanju JL1 se je uspešno namnožil le 1 vzorec, največ vzorcev pa pri obravnavanjih PM2 in JK2 (po 9 vzorcev). Pri nobenem obravnavanju ni bilo namnoženih vseh vzorcev.

Pri mikrosatelitskem lokusu VrZAG62 je bila tako kot pri VVMD7 in VVMD32 ponovno najnižja intenziteta ugotovljena pri obravnavanju JL1, največja pa pri PM2. Največ vzorcev se je namnožilo pri obravnavanju JL2 in PM2, najmanj pa pri obravnavanju JL1.

Pri vseh mikrosatelitskih lokusih so bila obravnavanja, med katerimi ni bilo statistično značilnih razlik PM2, PL2, JK2 ugotovljena z najvišjo intenziteto fluorescence. Pri vseh lokusih, razen pri VrZAG62 je bilo poleg teh treh obravnavanj uvrščeno še obravnavanje PL1.

Preglednica 4: Rezultati genotipizacije, povprečje intenzitete fluorescentnega signala pri kapilarni elektroforezi, minimalne in maksimalne vrednosti, ter število uspešno namnoženih vzorcev glede na obravnavanje

MIKROSATELITSKI LOKUS / alelni profil, izražen v številu bp	OBRAVNAVANJA	ŠTEVILO USPEŠNO NAMNOŽENIH VZORCEV	POVPREČJE ± SD	MIN	MAX
VVMD7 (262:264)	PL1 ^{b,c}	9	482,17 ± 235,74	75,0	836,0
	PL2 ^{b,c}	8	552,41 ± 263,16	62,0	898,0
	PM1 ^{a,b}	9	396,44 ± 214,84	131,0	740,0
	PM2 ^c	10	664,75 ± 252,08	83,0	1036,0
	JL1 ^a	7	223,79 ± 100,42	60,0	427,0
	JL2 ^{a,b}	9	370,72 ± 150,30	154,0	768,0
	JK2 ^{b,c}	10	518,2 ± 191,23	55,0	802,0
VVMD27 (208:208)	PL1 ^{a,b}	9	963,67 ± 630,89	231,0	2254,0
	PL2 ^b	8	1579,75 ± 591,75	260,0	2216,0
	PM1 ^{a,b}	9	925,78 ± 549,17	269,0	1688,0
	PM2 ^b	10	1512,5 ± 682,04	243,0	2299,0
	JL1 ^a	7	597,29 ± 409,28	140,0	1327,0
	JL2 ^{a,b}	10	1091,9 ± 458,88	133,0	1623,0
	JK2 ^b	10	1448,3 ± 614,46	151,0	2227,0
VVMD32 (266:288)	PL1 ^{b,c}	6	111,33 ± 29,88	61,0	156,0
	PL2 ^{b,c}	6	116,33 ± 38,55	67,0	204,0
	PM1 ^{a,b}	3	83,67 ± 17,79	64,0	114,0
	PM2 ^c	9	131,89 ± 28,46	92,0	206,0
	JL1 ^a	1	62,5 ± 6,36	58,0	67,0
	JL2 ^{a,b}	6	75,83 ± 19,53	52,0	111,0
	JK2 ^{b,c}	9	120,72 ± 30,31	57,0	167,0
VRZAG62 (212:214)	PL1 ^{b,c}	9	444,11 ± 220,09	58,0	822,0
	PL2 ^{c,d}	8	584,56 ± 225,24	92,0	812,0
	PM1 ^{a,b}	9	264,06 ± 145,28	64,00	501,00
	PM2 ^d	10	644,65 ± 231,95	86,00	894,00
	JL1 ^a	6	202,83 ± 95,62	93,00	396,00
	JL2 ^{a,b}	10	286,25 ± 133,79	53,00	518,00
	JK2 ^{c,d}	9	569,11 ± 157,17	383,0	863,00

¹ pri enem vzorcu je bil nad mejo detekcije samo en alel (v statistično analizo je bilo vključenih 17 podatkov).
črke a, b, c, d označujejo obravnavanja, med katerimi niso bile ugotovljene statistično značilne razlike.

Pri vseh mikrosatelitskih lokusih je bilo najmanjše število namnoženih vzorcev pri obravnavanju JL1, kjer je bila ugotovljena tudi najnižja intenziteta signala. Pri ostalih obravnavanjih se je uspešno namnožilo vsaj 8 vzorcev, razen pri mikrosatelitu VVMD32, kjer je bil uspeh namnoževanja slabši. Najboljši uspeh je bil ugotovljen pri obravnavanjih, kjer smo pri izolaciji uporabili protokol 2 (PM2, JK2). Rezultati nakazujejo, da je kljub slabši optimizaciji reakcije PCR s pravilno izbranim protokolom za izolacijo moč doseči dobre rezultate.

Rezultati, tako kot pri količini DNA, tudi pri uspešnosti namnoževanja mikrosatelitov in intenziteti fluorescentnega signala potrjujejo našo domnevo, da izolacijski protokol 2 omogoča bolj kakovostno izolacijo. Protokol 2 vsebuje kemikalije, ki omogočajo odstranitev sekundarnih metabolitov in polisaharidov. Le-ti lahko namreč zmanjšajo učinkovitost izolacije.

Glede na ugotovitev, da je bila intenziteta signala pri dveh junijskih obravnavanjih pri 3 lokusih: PM2, PL2 ter pri lokusu VrZAG62 tudi PL1, statistično značilno največja, sklepamo, da ima na koncentracijo produkta PCR pomembno vlogo tudi vsebnost polisaharidov, saj imajo 3 od 4 oktobrskih vzorcev povprečne vrednosti razmerja A_{260}/A_{230} nižje od 1,79.

4 ZAKLJUČEK

V zaključni nalogi smo se s pregledom literature seznanili s problematiko izolacije DNA iz rastlin z večjo vsebnostjo sekundarnih metabolitov in polisaharidov, v primerjavi z rastlinami, ki vsebujejo manjše količine omenjenih spojin.

Z raziskavo smo ugotovili razlike v količini in čistosti DNA, tako med protokoli, kot med različnimi termini in različnim rastlinskim materialom. Glede na rezultate raziskave lahko sklepamo, da je protokol, ki so ga objavili Japelaghi in sod. (2011) učinkovitejši pri odstranjevanju sekundarnih metabolitov in polisaharidov. Višja koncentracija NaCl v CTAB izolacijskem pufu pomaga pri boljši odstranitvi polisaharidov, medtem ko dodan PVP pomaga pri odstranitvi sekundarnih metabolitov. Pomembno vlogo ima po navajanju literature tudi β -merkaptoetanol z antioksidativnim delovanjem. Bolj optimalen protokol poda boljše rezultate za količino izolirane DNA in tudi za njeno čistost. Listi na splošno vsebujejo večjo količino sekundarnih metabolitov, vendar pri raziskavi nismo ugotovili razlik v kakovosti izolirane DNA iz listov ter iz kambija in mladik. Razlike smo ugotovili pri količini DNA, saj največ DNA pridobili iz listov. Metoda izolacije iz kambija se priporoča, ko listi vinske trte niso na voljo.

Glede na intenziteto signala ugotavljamo, da je postopek izolacije rastlinskega materiala najbolj optimalno opravljati v pomladnem času, ko je v listih in mladikah najnižja količina sekundarnih metabolitov in polisaharidov. Poleg optimalno določenega časovnega termina izolacije je treba določiti tudi optimalen protokol za posamezno rastlinsko vrsto.

5 LITERATURA

Akkurt M. 2012. Comparison between modified DNA extraction protocols and commercial isolation kits in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Genetics and Molecular Research* 11: 2343 – 2351.

Bandelj D., Jakše J. in Javornik B. 2004. Assessment of genetic variability of olive varieties by microsatellite and AFLP markers. *Euphytica* 136: 93 – 102.

Bavčar D. 2009. Kletarjenje danes. Ljubljana, ČZD Kmečki glas.

Bowers J.E., Dangl G.S., Vignani R., Meredith C.P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39: 628 – 633.

Bowers J.E., Dangl G.S., Meredith C.P. 1999. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 243 – 246.

Brown T.A. 2010. Gene cloning and DNA analysis: An Introduction. Wiley-Blackwell, 6th edition.

Components of the Reaction Mixture 2012. Thermo Fisher Scientific Inc. <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/components-reaction-mixture.pdf> (datum dostopa: 11.8.2014)

Doyle J.J. in Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13 – 15.

Draper D.E. 2004. A guide to ions and RNA structure. *RNA* 10 (3): 335 – 343.

Hanania U., Velcheva M., sahar N. in Perl A. 2004. An improved method for isolating high-quality DNA from *Vitis vinifera* Nuclei. *Plant Molecular Biology Reporter* 22:173 – 177.

Hladnik M. 2014. Proučevanje bolezni razbrazdanja lesa vinske trte (*Vitis* ssp.) na nivoju transkriptoma in karakterizacije tipov sorte žlahtne vinske trte 'Refošk' (*Vitis vinifera* L.). Doktorska disertacija, Ljubljana.

Hrček L., Korošec-Koruza Z. 1996. Sorte in podlage vinske trte. Ptuj, Slovenska vinska akademija Veritas.

Iandolino A.B., Goes da Silva F., Lim H., Choi H., Williams L.E. in Cook D.R. 2004. High-quality RNA, cDNA and derived EST libraries from grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 269 – 278.

Japelaghi Heidari R., Haddad R., Garoosi Ghasem-Ali 2011. Rapid and Efficient Isoaltion of High Quality Nucleic Acids from Plant Tissues Rich in Polyphenols and Polysaccharides. Springer 49: 129 – 137.

Jing Z., Ruan X., Wang R. in Yang Y. 2013. Genetic diversity and relationships between and within persimmon(*Diospyros* L.) wild species and cultivated varieties by SRAP markers. Plant Syst. Evol. 299: 1485 – 1492.

Keller M. 2010. The science of grapevines: anatomy and physiology. Elsevier Inc., Oxford.

Kump B., Javornik B. 1996. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. Plant Science 114: 149 – 158.

Lin H. in Walker M.A. 1997. Extracting DNA from cambium tissue for analysis of grape rootstocks. HortScience 32 (7): 1264 – 1266.

Lodhi M.A., Ye G.N., Weeden N. F. in Reisch B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Molecular Biology Reporter 12 (1): 6 – 13.

Murray M.G. in Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8 (19):4321 – 4325.

Piccolo S. L.,Alfonzo A., Conigliaro G., Moschetti G., Burruolo S., Barone A. 2012. A simple and rapid DNA extraction method from leaves of grapevine suitable for polymerase chain reaction analysis. African journal of Biotechnology 11: 10305 – 10309.

Sahu K.S., Thangaraj M. in Kathiresan K. 2012. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. ISRN Molecular Biology, Article ID 205049, 6 str.

Sefc K.M., Regner F., Turetschek E.,Glössl J.,Steinkellner H. 1999. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. Genome 42: 367 – 373.

Schuelke M. 2000. An economic method fort he fluorescent labelling of PCR fragments. Nat. Biotechnol. 18: 233 – 234.

Thaler N., Bajc M. 2013. Vpliv glivnih in rastlinskih sekundarnih metabolitov na verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Acta Silvae et Ligni 100: 25 – 40.

This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl G. S., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F., Grando S., Ibanez J., Lacombe T., Laucou V., Magalhaes R., Meredith C. P., Milani N., Peterlunger E., Regner F., Zulini L. in Maul E. 2004. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1448 – 1458.

Vršič S., Lešnik M. 2010. *Vinogradništvo*. Ljubljana, Kmečki glas.

Vršič S., Ivančič A., Šušek A., Zagradišnik B., Valdhuber J. in Šiško M. 2011. The World's oldest living grapevine specimen and its genetic relationships. *Vitis* 50(4): 197 – 171.

Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. 2005. *DNA fingerprinting in plants: principles, methods and applications*. Broken Sound Parkway NW, CRC Press.

Wilson I.G. 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied and Envir. Microbiology* 63: 3741 – 3751.

Wink M. 2010. *Biochemistry of Plant, Secondary Metabolism; Annual Plant Reviews Volume 40*, Wiley – Blackwell, 2nd edition.