

# Evolucija satelitnih DNA u vrstama oblića roda *Meloidogyne*

---

**Korlević, Marino**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2009**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:645332>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-16**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

**MARINO KORLEVIĆ**

**EVOLUCIJA SATELITNIH DNA U VRSTAMA OBLIĆA  
RODA *Meloidogyne***

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2009.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za strukturu i funkciju heterokromatina, Instituta "Ruđer Bošković", pod vodstvom dr. sc. Nevenke Meštrović Radan i predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. inž. biologije, smjer molekularna biologija.

Dr. sc. Nevenki Meštrović Radan, voditeljici rada, zahvaljujem na ukazanom povjerenju, nesebičnoj podršci, pomoći i susretljivosti tijekom izrade rada i probijanja "deadline-ova".

Prof. dr. sc. Kristianu Vlahovičeku, suvoditelju, zahvaljujem na kritičkom čitanju rada.

Dr. sc. Miroslavu Plohu, voditelju Laboratorija za strukturu i funkciju heterokromatina, zahvaljujem na kritičkom čitanju rada i korisnim savjetima.

Dr. sc. Phillipeu Castagnone-Serenou zahvaljujem na proslijeđenim bioinformatičkim analizama konzorcija za analizu genoma vrste *M. incognita*.

Martini Pavlek, dipl. ing. i Evi Šatović, dipl. ing. zahvaljujem na strpljenju i savjetima tijekom izrade rada te uvijek spremnoj riječi potpore na putu do diplome.

Dr. sc. Brankici Mavrinc zahvaljujem na susretljivosti, savjetima i pomoći tijekom izrade rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom studiranja i izrade rada!

<b>SADRŽAJ</b>	<b>stranica</b>
<b>SAŽETAK</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>V</b>
<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. PONAVLJAJUĆI SLJEDOV I U GENOMIMA</b>	<b>1</b>
<b>1.2. SATELITNA DNA</b>	<b>2</b>
1.2.1. Evolucija satelitnih DNA	4
1.2.2. Centromerna područja kromosoma	6
<b>1.3. OBLICI KORIJE NOV I H KVRŽICA-<i>Meloidogyne spp.</i></b>	<b>7</b>
1.3.1. Filogenetski odnosi roda <i>Meloidogyne</i>	8
1.3.2. Sekvenciranje genoma vrste <i>Meloidogyne incognita</i>	9
1.3.3. Evolucija satelitne DNA u vrstama roda <i>Meloidogyne</i>	10
<b>2. CILJ RADA</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	<b>12</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b>	<b>12</b>
3.1.1. Osnovne kemikalije i materijali	12
3.1.2. Osnovne puferske otopine	13
3.1.3. Kompleti reagencija	14
3.1.4. Plazmidni vektor	14
3.1.5. Bakterijski soj i hranjive podloge za uzgoj bakterija	15
3.1.6. Uređaji	15
3.1.7. Životinjski materijal	<b>15</b>
<b>3.2. METODE</b>	<b>16</b>
3.2.1. Bioinformatička analiza DNA sljedova	16
3.2.2. Izolacija genomske DNA iz organizama	16
3.2.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	17

3.2.3.1. Konstrukcija početnica	17
3.2.3.2. PCR reakcijska smjesa i uvjeti reakcije	18
3.2.4. Elektroforetsko razdvajanje fragmenata DNA u agaroznom gelu	18
3.2.5. Analiza restrikcijskim endonukleazama	19
3.2.6. AT-kloniranje i transformacija kompetentnih bakterijskih stanica	19
3.2.7. PCR na bakterijskim kolonijama	19
3.2.8. Izolacija plazmidne DNA	20
3.2.9. Određivanje slijeda nukleotida satelitne DNA	20
3.2.10. Hibridizacijska analiza po Southernu	20
3.2.10.1. Obilježavanje sondi	20
3.2.10.2. Predhibridizacija, hibridizacija i detekcija	21
3.2.11. Kapljična analiza	22
3.2.12. Fluorescencijska hibridizacija <i>in situ</i>	23
3.2.12.1. Priprema citogenetičkih preparata	23
3.2.12.2. Postupak hibridizacije <i>in situ</i>	23
<b>4. REZULTATI</b>	<b>25</b>
<b>4.1. ANALIZA INC SATELITNE DNA U VRSTI <i>M. incognita</i></b>	<b>25</b>
4.1.1. Analiza <i>in silico</i> INC satelitne DNA	25
4.1.2. Preliminarne analize smještaja INC satelitne DNA na kromosomima vrste <i>Meloidogyne incognita</i>	27
<b>4.2. ANALIZA NOVIH SATELITNIH DNA U VRSTAMA RODA <i>Meloidogyne</i></b>	<b>29</b>
4.2.1. Analiza <i>in silico</i> sljedova novih satelitnih DNA iz sekvenciranog genoma vrste <i>Meloidogyne incognita</i>	29
4.2.2. Pretraživanje vrsta roda <i>Meloidogyne</i> na prisutnost novih satelitnih DNA	37
4.2.2.1. Procjena kvalitete genomske DNA vrsta roda <i>Meloidogyne</i>	37
4.2.2.2. Analiza genoma vrsta roda <i>Meloidogyne</i> na prisutnost R1, R5, R7 i R8 satelitnih DNA	39
<b>4.3. USPOREDBA PRISUTNOSTI NOVIH I VEĆ OPISANIH SATELITNIH DNA U VRSTAMA RODA <i>Meloidogyne</i></b>	<b>46</b>

<b>5. RASPRAVA</b>	<b>47</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>53</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>54</b>

**SAŽETAK**



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

EVOLUCIJA SATELITNIH DNA U VRSTAMA OBLIĆA RODA *Meloidogyne*

Marino Korlević

Laboratorij za strukturu i funkciju heterokromatina, Institut "Ruđer Bošković", Bijenička  
54, Zagreb, Hrvatska

Oblici korijenovih kvržica roda *Meloidogyne* su biljni paraziti od iznimne agronomske važnosti koji imaju vrlo raznolike načine reprodukcije, od klasičnog spolnog razmnožavanje do mitotske partenogeneze. Vrsta *Meloidogyne incognita* nedavno je odabrana kao modelni organizam te je njezin genomski projekt postao dostupan. U ovom radu, provedena je cjelokupna analiza satelitnih DNA u vrstama roda *Meloidogyne* koja je sadržavala analize novootkrivenih satelitnih DNA izlučenih iz baze podataka sekvenciranog genoma zajedno s ranije opisanih satelitnim sljedovima.

Analize monomernih varijanti izlučenih iz *contig*-a koji su sadržavali ranije opisanu INC satelitnu DNA otkrile su varijabilnost jedinica ponavljanja koja je specifična za niz što ukazuje na homogenizacijske procese na razini niza. Kako bi se odredio položaj INC satelitne DNA na holocentričnim kromosomima vrste *Meloidogyne incognita* provedena je FISH analiza. Rezultati su pokazali lokalizaciju signala na samo dva kromosoma. Nadalje, *contig*-zi koji su sadržavali predvidivo nove sljedove satelitnih DNA izlučeni su programima Repeat Scout i Tandem Repeat Finder te su karakterizirani *in silico* analizom. Sljedovi novih satelitnih DNA (R1, R5, R7 i R8) pokazuju nisku unutar-satelitnu varijabilnost monomera, visok udio A i T nukleotida, beznačajnu međusobnu sličnost u nukleotidnim sljedovima te nizak udio u genomu (<0,1%). Nadalje, međuvrsna rasprostranjenost novih satelitnih DNA u pet srodnih vrsta roda *Meloidgyne* provedena je metodom PCR-a i hibridizacijskom analizom po Southernu. Na temelju rasprostranjenosti novih satelitnih DNA (R1, R5, R7, R8) i onih opisanih ranije potvrđena je hipoteza prema kojoj rasprostranjenost satelitnih DNA može biti relevantni kriterij za određivanje evolucijskih odnosa.

(58 stranica, 18 slika, 3 tablice, 60 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: evolucija, rod *Meloidogyne*, "biblioteka" satelitnih DNA

Voditelj: dr. sc. Nevenka Meštrović Radan, znanstveni suradnik

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Kristian Vlahoviček

prof. dr. sc. Mirjana Kalafatić

doc. dr. sc. Dubravka Hranilović

Rad prihvaćen: 3. lipnja 2009.

## **ABSTRACT**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science and Mathematics  
Department of Biology

Graduation Thesis

### EVOLUTION OF SATELLITE DNAs IN NEMATODE SPECIES OF THE GENUS *Meloidogyne*

Marino Korlević

Laboratory for structure and function of heterochromatin, Ruđer Bošković Institute,  
Bijenička 54, Zagreb, Croatia

Root-knot nematodes (RKN) of the genus *Meloidogyne* are plant parasites of major agricultural importance, which exhibit different modes of reproduction, from classical amphimixis to mitotic parthenogenesis. Recently, *Meloidogyne incognita* was selected as a model organism and its genome project became available. In this work, comprehensive analyses of satellite DNAs based on data published in the genome project including already characterized satellite DNAs were performed.

Analyses of monomer variants retrieved from contigs containing already characterized INC satellite DNA revealed array specific variability pointing out that sequences are predominantly homogenized on the array level. To define the localization of INC satellite DNA on holocentric *M. incognita* chromosomes, FISH analyses were performed. Results showed localization of INC satellite DNA on only two chromosomes. In addition, contigs with candidate satellite DNA sequences were extracted by RepeatScout and Tandem Repeat Finder and further characterized *in silico*. Sequences of newly described satellite DNAs (R1, R5, R7 and R8) exhibit low intrasatellite monomer variability, high A+T content, insignificant mutual sequence similarity and each of them makes up <0,1% of the genome. In addition, the interspecific distribution of new satellite DNAs detected in five congeneric *Meloidogyne* species was performed by PCR and Southern hybridization. Based on genomic distribution of four satellite DNAs (R1, R5, R7 and R8) together with results concerning distribution of previously characterized satellites we tested the hypothesis that the distribution of satellite DNA could be a relevant criterion to resolve evolutionary relationships.

(58 pages, 18 figures, 3 tables, 60 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in central biological library

Key words: evolution, genus *Meloidogyne*, satellite DNA library

Supervisor: dr. sc. Nevenka Meštrović Radan, associate researcher

Reviewers: prof. dr. sc. Kristian Vlahoviček

prof. dr. sc. Mirjana Kalafatić

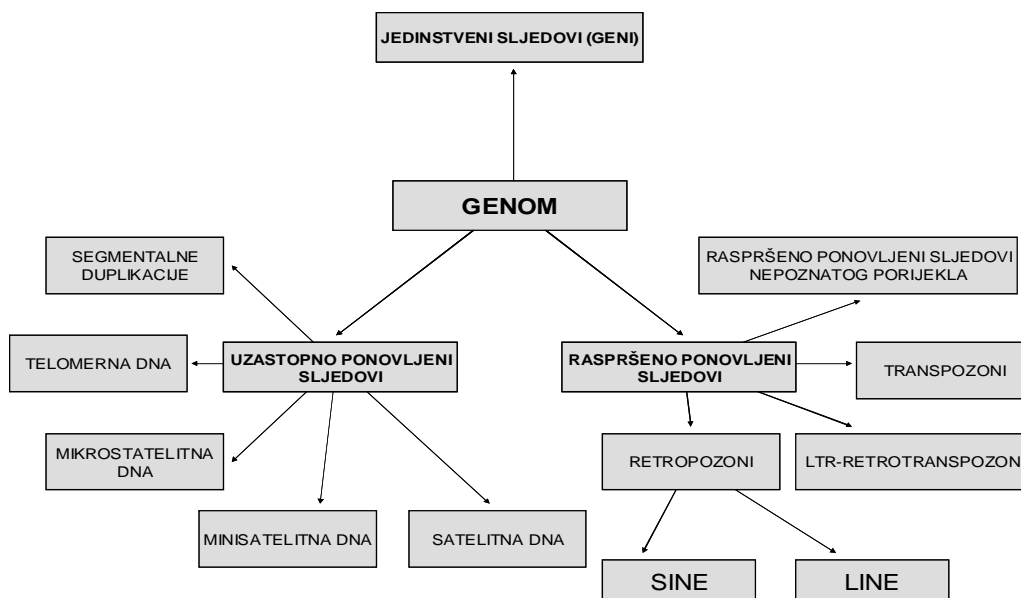
doc. dr. sc. Dubravka Hranilović

Thesis accepted: June 3<sup>rd</sup> 2009

## **1. UVOD**

## 1.1. PONAVLJAJUĆI SLJEDOVI U GENOMIMA

Nukleotidni sljedovi u genomima eukariotskih organizama dijele se na jedinstvene sljedove (u takve ubrajamo i većinu gena), uzastopno ponovljene sljedove te raspršene ponovljene sljedove (Slika 1.1.). Uzastopno ponovljene sljedove čine: mikrosatelitna DNA, minisatelitna DNA, satelitna DNA, telomerna DNA te segmentalne duplikacije (Moran i Morish, 2005). Mikrosatelitnu DNA sačinjavaju uzastopno ponovljene jedinice duljine 2-6 pb (parova baza) dok kod minisatelitne DNA takve jedinice imaju duljinu 15-60 parova baza. Satelitna DNA sadrži uzastopno ponovljene jedinice duljine od nekoliko parova baza do 1 kb. Ono što razlikuje satelitnu od mikrosatelitne i minisatelitne DNA jesu nekoliko Mb (megabaza) dugi nizovi ponovljenih jedinica smješteni u konstitutivnom heterokromatinu koji su u slučaju mikrosatelitne i minisatelitne DNA mnogo diskretniji i smješteni uglavnom u eukromatinskim regijama (Plohl i sur., 2008). Poseban oblik mikrosatelitne DNA je telomerna DNA koja gradi krajeve svih eukariotskih kromosoma (Moran i Morish, 2005). Segmentalne duplikacije predstavljaju nukleotidne sljedove veličine 1-200 kb koje su prisutne na dva ili više mjesta u genomu i čija je sličnost u nukleotidnom slijedu >90% (Lander i sur., 2001).



**Slika 1.1.** Vrste nukleotidnih sljedova u genomima eukariotskih organizama

Raspršene ponovljene sljedove čine: transpozoni, LTR-retrotranspozoni (engl. LTR, *long terminal repeat*), retropozoni te raspršeni ponovljeni sljedovi nepoznatog porijekla. Transpozoni sadrže gen za specifičnu integrazu (transpozazu) čija aktivnost omogućava premještanje transpozona s jednog mjesta u genomu na drugo. Postoje dva načina transpozicije: nereplikativna (konzervativna) transpozicija kojom ne nastaje nova kopija transpozona i replikativna transpozicija čiji su produkt dvije kopije transpozona (Kleckner, 1990). Retropozoni se dijele na LINE (engl. LINE, *long interspersed nuclear elements*) i SINE (engl. SINE, *short interspersed nuclear elements*). LINE retropozoni sadrže nekoliko gena među kojima i gen za reverzu transkriptazu što im omogućuje reverznu transpoziciju. SINE retropozoni ne sadrže gene te se umnažaju koristeći enzime kodirane LINE retropozonomima (Moran i Morish, 2005).

## 1.2. SATELITNA DNA

"Satelitna DNA" kao pojam uveden je iz povijesnih razloga jer je prvi puta izolirana iz satelitnih vrpca u eksperimentima centrifugiranja u gradijentu gustoće zbog većeg udjela A i T nukleotida od ostatka DNA (Szybalski, 1968). Satelitne DNA su uzastopno ponovljeni sljedovi prisutni u velikom broju kopija u genomu. Osnovna jedinica ponavljanja satelitne DNA naziva se monomer. Satelitne DNA su organizirane u dugim nizovima koji su smješteni u konstitutivnom heterokromatinu, eukariotskim kromosomskim regijama koje ostaju kondenzirane kroz cijeli stanični ciklus (Heitz, 1928). Konsenzusni slijed pojedine satelitne DNA je "uprosječeni" nukleotidni slijed izveden iz nasumično kloniranih varijanti monomera ili izlučenih iz baza podataka sekvenciranog genoma. Određenu satelitnu DNA opisuje duljina monomera, nukleotidni slijed i broj kopija monomera. Osnovne ponavljajuće jedinice, satelitni DNA monomeri, sadrže velik udio A i T nukleotida te duljinu monomera u rasponu najčešće od 150 do 180 pb te od 300 do 360 pb. Uzastopno ponovljeni sljedovi mogu graditi monomernu nizove duljine do 100 Mb. Sadržaj satelitne DNA u genomima eukariotskih organizama značajno varira te može sačinjavati i do 50% ukupne DNA. Satelitne DNA se u velikom broju slučajeva znatno razlikuju u nukleotidnom slijedu između pojedinih, čak i blisko srodnih vrsta (Henikoff i sur., 2001).

Prve hipoteze o ulozi satelitne DNA u genomu osporavale su bilo kakvu funkciju smatrajući satelitnu DNA beskorisnim genomskim otpadom (Ohno, 1972) ili genomskim parazitom (Orgel i Crick, 1980). Suprotno ovim hipotezama razvijeno je funkcionalističko gledište koje predviđa ulogu satelitne DNA u mnogim procesima od kromosomske organizacije i sparivanja do staničnog metabolizma i specijacije (Henikoff i sur., 2001). Novija saznanja potvrđuju funkcionalističke pretpostavke povezujući ulogu satelitne DNA s mnogim kompleksnim osobinama eukariotskog genoma. Upravo je satelitna DNA čest uzrok velike razlike u veličini genoma među različitim eukariotima (Plohl i sur., 2008).

Satelitna DNA uglavnom nije transkripcijski aktivna što je očekivano jer se nalazi u transkripcijski suprimiranom heterokromatinskom okruženju, međutim istraživanja novijeg datuma upućuju na postojanje transkripata satelitnih DNA. Iako satelitna DNA ne sadrži otvorene okvire čitanja niti je translacija transkripata dokazana, moguće su neke ostale funkcije transkripata satelitne DNA. Uočena je diferencijalna ekspresija satelitnih DNA ovisno o tkivu ili razvojnom stadiju što upućuje na regulacijsku funkciju (Pathak i sur., 2006). Poznato je da transkripti satelitne DNA iz kukaca, oblića i vodozemaca mogu imati ribozimsku aktivnost (Rojas i sur., 2000). Također, uočeno je da se transkripti nekih centromernih satelitnih sljedova procesiraju u male interferirajuće RNA (siRNA, engl. *small interfering RNA*) koje sudjeluju u heterokromatinskoj kondenzaciji i epigenetskoj regulaciji gena (Grewal i Elgin, 2007).

### 1.2.1. Evolucija satelitnih DNA

Satelitne DNA obilježava brza evolucijska promjena kako u kvantitativnom tako i u kvalitativnom smislu kroz promjenu broja kopija monomera i promjene nukleotidnog slijeda monomera. Navedene promjene vrlo često dovode do pojavljivanja vrsno specifičnog profila satelitnih DNA. Međuvrsta raznolikost u nukleotidnom slijedu (kvalitativna promjena), te u isto vrijeme, niska unutarvrsta varijabilnost posljedica je mehanizama usklađene evolucije. Navedeni mehanizam posljedica je dvostupanjskog procesa nazvanog *molecular drive* koji se sastoji od homogenizacije mutacija među članovima porodice te istovremenog fiksiranja između grupe reproduktivno povezanih jedinki (Dover, 1982, 1986).

Molekularni mehanizmi poput točkastih mutacija i replikacijskog proklizavanja sudjeluju u nastajanju novih varijanti monomera pojedine satelitne porodice (Smith, 1976). Homogenizacija mutacija monomera među članovima porodice unutar vrste odvija se procesima nejednolikog *crossing overa*, konverzije gena, umnažanja mehanizmom kontrolirajućeg kruga, reinsercijom i izmjenom posredovanom transpozonom (Stephan, 1986; Dover, 2002; Glinka i sur., 2006). Nadalje, njihovo rasprostranjenje kroz populaciju (fiksacija) osigurava se nasumičnom razdiobom homolognih kromosoma tijekom spolne reprodukcije. Prema procesu *molecular drive* brza evolucija satelitnih sljedova posljedica je postupne akumulacije mutacija visokom učestalošću u satelitnim porodicama te homogenizacije i fiksacije u reproduktivno odvojenim organizmima.

Međutim, vrsno-specifični profil satelitnih DNA može biti i posljedica isključivo kvantitativne promjene satelitnih DNA u kratkom evolucijskom periodu u genomima srodnih vrsta (Plohl i sur., 2008). Ove kvantitativne promjene opisane su modelom "biblioteke" (Fry i Salser, 1977; Meštrović i sur., 1998). Do sada je otkriveno podosta primjera gdje genomi srodnih vrsta dijele "biblioteku" različitih satelitnih sljedova (Kubis i sur., 1997; Pons i sur., 2002). Umnažanje ili kontrakcija pojedinačnih satelitnih sljedova iz "biblioteke" je u tom slučaju uzrok pojavljivanja vrsno-specifičnog profila satelitnih DNA u srodnim vrstama (Ugarković i Plohl, 2002). U pojedinoj vrsti određeni član "biblioteke" može biti umnožen i pojavljivati se kao glavna satelitna DNA, dok su ostali prisutni u malom broju kopija. Smatra se kako je nejednoliki *crossing over* glavni



mehanizam ekspanzije ili kontrakcije nekog satelitnog niza (Smith, 1976). Dokazano je da su satelitne DNA u "biblioteci" sačuvane u nukleotidnom slijedu, npr. kod nekih vrsta kukaca *Tenebrionidae* čak 60 milijuna godina (Mravinac i sur., 2005). Neobično je da su, inače vrlo promjenjivi slijedovi, u nekim genomima sačuvani kroz dugi vremenski period. Međutim, novija istraživanja monomernih slijedova srodnih satelitnih DNA u "biblioteci" ukazuju na postojanje vrlo varijabilnih, umjereno varijabilnih i sačuvanih dijelova nukleotidnog slijeda monomera što govori u prilog međudjelovanju slučajnih događaja i selekcijskog pritiska u evoluciji nukleotidnog slijeda satelitne DNA (Hall i sur., 2003; Meštrović i sur., 2006). Seleksijski pritisak se najvjerojatnije održava interakcijom satelitne DNA s vezujućim proteinima čija je evolucija usko vezana uz promjene u satelitnoj DNA (Hall i sur., 2003; Meštrović i sur., 2006).

### 1.2.2. Centromerna područja kromosoma

Sljedovi satelitnih DNA glavni su sastavni dio centromernog i pericentromernog heterokromatina, dviju epigenetski determiniranih regija odgovornih za pravilno sparivanje i odvajanje eukariotskih kromosoma u mitozu i mejozi (Plohl i sur., 2008). Navedeni procesi vezani uz centromerno područje izrazito su konzervirani kod eukariota dok su satelitne DNA i proteini centromernog područja iznimno brzoevoluirajući (Henikoff i sur., 2001). Pretpostavka je da brzoevoluirajuće centromerne DNA pokreću adaptivnu evoluciju N-terminalnog dijela histonu H3 sličnog centromernog proteina CenH3 koji služi kao spona između brzoevoluirajuće satelitne DNA i sačuvanih kinetohora (Henikoff i sur., 2001). Ova dualna priroda centromernog područja može se pomiriti hipotezom da centromerno područje s jedne strane mora održati funkciju koju obavlja u mitozu i mejozi, a s druge strane ima ulogu akumulatora razlika koje mogu imati bitnu ulogu u reproduktivnoj izolaciji vrsta (Henikoff i sur., 2001, Meštrović i sur., 1998, 2006). Model "biblioteke" na neki način miri ovu dualnu prirodu centromernog područja: postojanje različitih satelitnih DNA u biblioteci koje su podložne selekciji za ulaz u biblioteku, (vjerojatno prema principu da mogu biti posrednici u centromernoj funkciji) osiguravaju različitost koja može osigurati brze promjene samo naglom promjenom u broju kopija pojedinačne satelitne DNA (Meštrović i sur., 1998, 2006).

Citološkim tehnikama davno je uočeno da eukarioti posjeduju dva tipa kromosoma s obzirom na centromerno područje. Monocentrični se kromosomi vežu za mikrotubule na određenoj lokaliziranoj regiji (centromeri) te se u anafazi kreću prema polovima stanice vođeni centromerom. Naprotiv, holocentrični kromosomi vežu mikrotubule cijelom svojom duljinom te se u anafazi kreću poprečno prema polovima. Holocentrični se kromosomi pojavljuju sporadično među organizmima životinjskog i biljnog carstva te su najvjerojatnije produkt konvergentne evolucije ili je predak svih eukariotskih organizama sadržavao holocentrične kromosome. Oblič vrste *Caenorhabditis elegans* i vrste roda *Meloidogyne* imaju holocentrične kromosome te su dobri modelni organizmi za proučavanje holocentrične centromere (Dernburg, 2001).

Većina studija evolucije, organizacije i strukture satelitnih DNA napravljena je na vrstama koje posjeduju monocentrične kromosome, dok su studije na holocentričnim

kromosomima malobrojne. S obzirom da se radi o potpuno različitom sustavu centromernog područja, studije satelitnih DNA u ovakvim vrstama doprinose globalnom razumijevanju uloge satelitnih DNA u genomima.

### **1.3. OBLIĆI KORIJENOVIH KVRŽICA-*Meloidogyne* spp.**

Oblici korijenovih kvržica (RKN, engl. *root-knot nematodes*) su mali (300  $\mu$ m-2 mm) crvoliki organizmi koji pripadaju razredu Tylenchida i endoparaziti su korijenja biljaka. Stvaraju kvržice na korijenu što ima za posljedicu zakržljali rast i uvenuće biljke te zbog toga predstavljaju veliki agronomski problem (Castagnone-Sereno, 2006).

Životni im ciklus i način reprodukcije varira ovisno o vrsti, od klasične amfimiksije do obligatorne mitotičke partenogeneze (Triantaphyllou, 1985). U slučaju amfimiksije mejotičkom se diobom stvaraju gamete iz kojih se nakon oplodnje razvija sljedeća generacija (Castagnone-Sereno, 2006). Amfimiktičke vrste s obzirom na rasprostranjenost, broj domaćina i ekonomski utjecaj predstavljaju manju skupinu oblića korijenovih kvržica (Jepson, 1987). Većina se oblića korijenovih kvržica razmnožava nekim od dvije vrste različitih partenogenetskih oblika razmnožavanja. Neke se vrste (*M. chitwoodi*, *M. exigua*, *M. fallax*, većina populacija vrste *M. hapla* itd.) razmnožavaju spolno i mejotičkom (automiktičkom) partenogenezom. Kada su u populaciji prisutni mužjaci razmnožavanje je spolno, a u nedostatku mužjaka jaje prolazi kroz redukciju broja kromosoma mejozom nakon čega se broj kromosoma ponovno uspostavlja fuzijom pronukleusa jajne stanice sa sekundarnom polarnom jezgrom (Triantaphyllou, 1966, Van der Beek i sur., 1998). Treći način reprodukcije je obligatorna mitotička (apomiktička) partenogeneza koja se javlja u geografski najraširenijih i agronomski najštetnijih vrsta kao što su: *M. arenaria*, *M. incognita* i *M. javanica*. U ovakvom obliku razmnožavanja uopće ne postoji redukcijska dioba (mejoza) već se jaje direktno razvija u embrij.

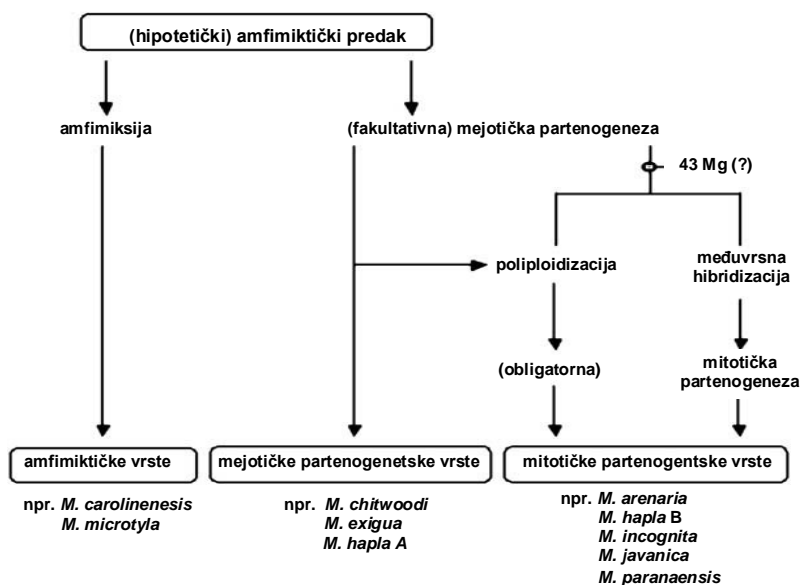
Općenito je prihvaćeno kako je haploidni broj kromosoma roda *Meloidogyne*  $n=18$ , međutim u većini populacija somatski broja kromosoma varira između 30 i 50 te se smatraju diploidnim ili triploidnim populacijama (Triantaphyllou, 1985). Somatski broj kromosoma koji je djeljiv s 18 nije čest što ukazuje na veliku pojavnost aneuploidije ili polisomije te strukturnih rearanžmana kao što su delecije, duplikacije i translokacije.

Smatra se kako su ovakvi događaji česti jer oblici korijenovih kvržica sadrže holocentrične centromere kojima nedostaje lokalizirana kinetohorna aktivnost (Triantaphyllou, 1983).

### **1.3.1. Filogenetski odnosi roda *Meloidogyne***

Trenutno je opisano 80 vrsta oblića korijenovih kvržica koji tvore raznolikost teško usporedivu s bilo kojom skupinom unutar životinjskog carstva (Karssen i Van Hoenselaar, 1998). Najznačajniji oblici korijenovih kvržica razmnožavaju se partenogenetski te je stoga definicija biološke vrste temeljena na reproduktivnoj izolaciji na njih neprimjenjiva. Determinacija oblića korijenovih kvržica temelji se prvenstveno na morfološkim značajkama kao što su duljina i oblik stileta, oblik spikula i zadnjeg kraja mužjaka i sl. Podaci dobiveni genetičkim istraživanjima uglavnom podržavaju podjele temeljene na morfološkim osobinama. Istraživanja temeljena na elektroforezi aloenzima dokazala su da se većina oblića korijenovih kvržica može razlikovati na temelju esteraznih aloenzima. Zadnjih 20 godina istraživanja temeljena na proučavanju DNA sljedova poput dijagnostike ribosomske DNA, mitohondrijske DNA i anonimnih lokusa (npr. RFLP, RAPD i AFLP) omogućile su dodatne informacije u determinaciji oblića korijenovih kvržica. Novija saznanja uglavnom potvrđuju morfološku determinaciju vrsta (Castagnone-Sereno, 2006). Također, napravljena su i istraživanja satelitne DNA u mejotičkih partenogenetskih vrsta *Meloidogyne hapla* (Piotte i sur., 1995) i *Meloidogyne exigua* (Randing i sur., 2002) u kojima je uočena ograničenost određenog satelitnog slijeda na populacije koje pripadaju istoj vrsti što upućuje na mogućnost korištenja satelitne DNA kao taksonomskog biljega.

Na temelju podataka dobivenih citogenetičkim metodama te analizom izoenzima pretpostavlja se da su drevni oblici korijenovih kvržica bili amfimiktički organizmi čiji su današnji najbliži srodnici amfimiktičke vrste (npr. vrste *M. carolinensis* i *M. megatyta*). Fakultativni partenogenetski (mejotski) oblici razvili su se iz amfimiktičkih dok su se obligatorni partenogenetski (mitotski) oblici razvili iz fakultativnih partenogenetskih oblika potiskivanjem mejoze tijekom sazrijevanja oocite (Castagnone-Sereno, 2006).



**Slika 1.2.** Shematski prikaz evolucije vrsta roda *Meloidogyne* (Mg-milijuna godina; Castagnone-Sereno, 2006)

### 1.3.2. Sekvenciranje genoma vrste *Meloidogyne incognita*

Genom oblića korijenovih kvržica vrste *Meloidogyne incognita* sekvenciran je 2008. godine (Abad i sur., 2008) *shotgun* metodom. Kod *shotgun* sekvenciranja DNA se pocijepa nasumično na vrlo male preklapajuće segmente (2-10 kb). Nakon određivanja primarne strukture dobiju se segmenti duljine oko 500 pb nazvani *reads*. Ovi segmenti se metodom automatskog slaganja genoma, prema principu preklapanja sličnih sekvenci, slažu u *contig*-e i *supercontig*-e. U kontekstu sekvenciranja genoma općenito postoje veliki problemi u izlaznim analizama povezani s regijama genoma koji posjeduju ponovljene sljedove. Naročito je to izraženo kod dugih nizova uzastopno ponovljenih satelitnih DNA. Problemi već počinju na razini kloniranja s obzirom da su ove regije problematične za kloniranje, a onda i na razini slaganja genoma s obzirom da se radi o velikom broju vrlo sličnih sljedova (Plohl i sur., 2008).

Slaganjem genoma vrste *M. incognita* dobiveno je 2817 *supercontig*-a ukupne veličine 86 Mb. 36% genoma sadrži uzastopno i raspršeno ponovljene sljedove (Abad i sur., 2008). Sveukupno je detektirano 4041 (36% genoma) različitih ponavljajućih

porodica od čega oko 5 % otpada na LTR-retrotranspozone i transpozone. Čak 3066 porodica nema uočena obilježja transpozona. Iako još nije napravljena detaljnija analiza ovih ponovljenih sljedova autori smatraju da se vjerojatno većim djelom radi o različitim satelitnim DNA.

### 1.3.3. Evolucija satelitne DNA u vrstama roda *Meloidogyne*

Vrste roda *Meloidogyne* dijele "biblioteku" satelitnih DNA koje su ostale sačuvane u nukleotidnom slijedu među vrstama. Navedenu "biblioteku" sačinjavaju međusobno vrlo srodne (MEL172 porodica), kao i međusobno vrlo različite satelitne DNA (INC, MPA2; Meštrović i sur., 2006a, 2006b). Istraživanje sličnosti monomerih sljedova INC satelitne DNA (originalno izolirane iz vrste *M. incognita*) iz četiri različite mitotske partenogenetske vrste roda *Meloidogyne* (*M. arenaria*, *M. paranaensis*, *M. incognita*, i *M. hapla* B) pokazalo je očuvanost navedenih sljedova od čak 45 milijuna godina i najvjerojatniju prisutnost u hipotetskom pretku u nepromijenjenom obliku. Prema teoriji usklađene evolucije međudjelovanje slučajnih događaja i selekcijskog pritiska omogućuje konzervaciju određenih satelitnih sljedova tijekom dugog evolucijskog razdoblja (Ohta i Dover, 1984) Za razliku od monomernih nukleotidnih sljedova, koji nisu bili dovoljno informativni, prisutnost odnosno odsutnost određene satelitne porodice u genomu određene vrste uglavnom je pratila do tada definirane filogenetske odnose roda *Meloidogyne* (Meštrović i sur., 2009). Utvrđeno je da sve analizirane vrste roda *Meloidogyne* sadrže MPA1 i MPA2 satelitne DNA. Mitotska skupina roda *Meloidogyne* koju čine vrste *M. incognita*, *M. javanica*, *M. paranaensis* i *M. hapla* B sadrže MARJA i INC satelitnu porodicu dok je satelitna DNA AJL ograničena samo na vrstu *M. incognita* i sestrinske vrste *M. javanica* i *M. arenaria*. Satelitna DNA pMcCo prisutna je samo u mejotskoj partenogenetskoj vrsti *M. fallax*, a pMhM satelitna DNA samo u vrsti *M. hapla*. Prisutnost odnosno odsutnost određene satelitne porodice predstavlja mogući filogenetski biljeg koji sa standardno korištenim mitohondrijskim biljezima može ponuditi širu sliku evolucijskih događaja (Meštrović i sur., 2009).

## **2. CILJ RADA**

Poznato je da je satelitna DNA glavi sastavni dio centromernog i pericentromernog područja kromosoma (Plohl i sur., 2008). Provedena su mnoga istraživanja (peri)centromernog područja monocentričnih kromosoma, međutim nema relevantnih podataka o strukturi satelitne DNA holocentričnih kromosoma. Također, rasprostranjenost pojedine satelitne porodice kroz populaciju (fiksacija) osigurava se, prema *molecular drive* mehanizmu, nasumičnom razdiobom homolognih kromosoma tijekom spolne reprodukcije. Malo je poznato o načinima fiksacije pojedine satelitne porodice u partenogenetskih organizama (Dover, 1982, 1986). Iz navedenih razloga vrste roda *Meloidogyne* nameću se kao pogodan modelni organizam za proučavanje dinamike satelitnih DNA zbog posjedovanja holocentričnih kromosoma i partenogenetskog načina razmnožavanja.

Genom vrste *Meloidogyne incognita* sekvenciran je 2008. godine (Abad i sur., 2008) *shotgun* metodom što omogućava analizu do sada opisanih satelitnih DNA na razini duljih genomskih slijedova i *in silico* detekciju novih satelitnih DNA. Eksperimentalnim pristupom do sada je opisano sedam porodica satelitnih DNA (Meštrović i sur., 2005, 2006a, 2006b, 2009; Castagnone-Sereno i sur., 1998, Piotte i sur., 1994) u vrstama roda *Meloidogyne*.

Cilj prvog dijela rada bilo je istražiti genomsku strukturu INC satelitne DNA (Piotte i sur., 1994) koja se nalazi u najvećem broju kopija u genomu vrste *M. incognita*. Bioinformatičkim metodama analizirani su *contig*-zi koji sadrže INC satelitnu DNA iz sekvenciranog genoma vrste *M. incognita* u cilju dobivanja rezultata o strukturi ovih monomernih nizova u genomu. Nadalje, fluorescencijskom hibridizacijom *in situ* (FISH) cilj je bio utvrditi položaj INC satelitne DNA na kromosomima vrste *M. incognita*.

Cilj drugog dijela rada bio je bioinformatičkim metodama i kapljičnom analizom odrediti osnovne karakteristike do sada neopisanih satelitnih slijedova izlučenih iz sekvenciranog genoma vrste *M. incognita*. Nadalje, pretražiti vrste roda *Meloidogyne* na prisutnost novih satelitnih DNA osjetljivom metodom lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) te hibridizacijskom analizom po Southernu.



### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Osnovne kemikalije i materijali

- Tris: Sigma Chemical Company, Njemačka
- natrijev dodecil sulfat (SDS), etidijev bromid: Serva Feinbiochemica Co., Njemačka
- reagens za blokiranje: Roche, Njemačka
- Tween 20: Sigma Chemical Company, SAD
- streptavidin vezan na alkalnu fosfatazu, Roche, Njemačka
- pozitivno nabijene najlonske membrane: Roche, Njemačka
- autoradiografski filmovi, Amersham, Engleska
- 5-brom-4-klor-3-indolil- $\beta$ -D-galaktozid (X-gal), izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktozid (IPTG),
- LB-agar: GIBCO BRL, SAD
- agaroz: Sigma Chemical Company, SAD
- orange G: Sigma Chemical Company, SAD
- marker veličine fragmenata "GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use", Fermentas, Njemačka
- smjesa dNTP-ova (10 mM svaki) New England BioLabs, SAD
- 1mM biotin-dNTP (1 mM dCTP, dGTP, dTTP i 0,84 mM dATP/0,16 mM biotin-dATP): New England BioLabs, SAD
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol dihidroklorid): Roche, Njemačka
- DABCO (1,4-diaza[2.2.2]biciklooktan): Sigma Chemical Company, SAD
- RNaza A: Roche, Njemačka
- pepsin: Roche, Njemačka
- dekstran-sulfat: Sigma Chemical company, SAD
- avidin-FITC: Vector Laboratories, SAD
- $\alpha$ -avidin<sup>biotin</sup>: Vector Laboratories, SAD

Ostale kemikalije bile su uobičajene laboratorijske kemikalije p.a. kvalitete.

### 3.1.2. Osnovne puferske otopine

- ELEKTROFORETSKI PUFER-TAE (pH 8,3): 10 mM Tris-HCl, 20 mM Na-acetat, 2 mM EDTA (puferu se dodaje etidijev bromid do konačne koncentracije od 0,5 µg/ml)
- DENATURACIJSKI PUFER: 0,4 M NaOH
- 20xSSC (pH 7,0): 3 M NaCl, 0,3 M Na-citrat
- PUFER ZA SOUTHERN HIBRIDIZACIJU: 0,25 M fosfatni pufer (pH 7,2), 1 mM EDTA (pH 8,0), 20% SDS (w/v), 0,5% reagens za blokiranje (w/v)
- PUFER ZA ISPIRANJE SONDE U SOUTHERN HIBRIDIZACIJI: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 1% SDS
- PUFER 1 (pH 8,0): 0,1 M maleinska kiselina, 3 M NaCl, 0,3% Tween 20
- PUFER 2: reagens za blokiranje otopljen u puferu 1 do koncentracije od 0,01 g/ml
- PUFER 3: 0,1 M Tris-HCl (pH 9,5), 0,1 M NaCl
- TE PUFER (pH 8,0): 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
- NEUTRALIZACIJSKI PUFER: 0,5 M Tris-HCl (pH 7,4), 1,5 M NaCl
- FIKSATIV: octena kiselina:etanol u omjeru 1:3
- OTOPINA DAPI-a: DAPI u 2xSSC puferu (2 µg/ml)
- OTOPINA ANTIFADE REAGENSA: 23,3 mg/ml DABCO, 8% ddH<sub>2</sub>O (v/v), 2% Tris-HCl (pH 8,0; v/v), 90% glicerol (v/v)
- DENATURACIJSKA OTOPINA: 70% formamid u 2xSSC-u
- DeSO<sub>4</sub> PUFER: 4xSSC, 20% dekstran-sulfat (v/v), 50 mM natrijev fosfat (pH 7,0)
- HIBRIDIZACIJSKI PUFER ZA FISH: 60% deionizirani formamid (v/v), 40% DeSO<sub>4</sub> pufer
- PUFER ZA ISPIRANJE SONDE ZA FISH: 50% formamida (v/v) u 2xSSC puferu
- 4M PUFER: 5% reagensa za blokiranje (v/v) u 4xSSC puferu
- 4T PUFER: 0,05% Tween 20 (v/v) u 4xSSC puferu

### 3.1.3. Kompleti reagencija

- komplet "DNaeasy Tissue Kit" za izdvajanje DNA iz tkiva; QIAGEN, SAD
- komplet "GoTaq Flexi DNA Polymerase" za lančanu reakciju polimerazom (PCR; engl. *polymerase chain reaction*) koji sadržava: *Taq* polimerazu (5 U/μl), 5x koncentrirani GoTaq Flexi pufer i 25 mM MgCl<sub>2</sub>; Promega, SAD
- komplet "QIAquick Gel Extraction Kit" za pročišćavanje DNA iz agaroznog gela; QIAGEN, SAD
- komplet "QIAquick PCR Purification Kit" za pročišćavanje produkata PCR reakcije; QIAGEN, SAD
- kompleti restrikcijskih endonukleaza *Hind*II i *Dra*I sa puferima za restrikcijsku analizu, Fermentas, Njemačka
- komplet "pGEM-T Easy Vector System" za kloniranje produkata PCR-a koji sadržava: plazmidni vektor pGEM-T (50 ng/μl), enzim T4 DNA ligazu i pufer za T4 DNA ligazu; Promega, SAD
- komplet "QIAGEN Plasmid Mini Kit" za izolaciju plazmidne DNA; QIAGEN, SAD
- komplet "CDP-*Star*, ready to use" za detekciju signala koji sadržava: 25x koncentrirani pufer i otopinu kemiluminiscentnog supstrata za alkalnu fosfatazu (CDP-*Star*); Roche, Njemačka
- komplet kompetentnih DH5α bakterijskih stanica; Invitrogen, SAD

### 3.1.4. Plazmidni vektor

Produkti PCR reakcije klonirani su u pGEM-T plazmidni vektor iz kompleta "pGEM-T Easy Vector System". *Taq* polimeraza ostavlja na 3' krajevima umnoženih odsječaka dAMP koji se komplementarno sparuje s dTTP na 5' krajevima vektora što omogućuje direktnu ligaciju produkata PCR-a. Ovakva se vrsta kloniranja u plazmidne konstrukte s 3' slobodnim dTTP-om naziva AT-kloniranje.

pGEM-T vektor sadrži gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin (*amp*<sup>r</sup>) što omogućuje selekciju bakterija koje su transformirane pGEM-T plazmidom. Također, sadrži i *lacZ* gen koji kodira za enzim β-galaktosidazu što omogućuje plavo-bijelu

selekciju bakterijskih kolonija s plazmidom koji imaju ugrađeni DNA odsječak od interesa.

### **3.1.5. Bakterijski soj i hranjive podloge za uzgoj bakterija**

Za umnažanje plazmida korištene su kompetentne bakterijske stanice vrste *Escherichia coli* soja DH5 $\alpha$ , Invitrogene. Bakterije su uzgajane na tekućoj i krutoj LB (Lurija-Bertani) podlozi. Tekuća podloga je sadržavala: 10 g baktotriptonu, 5 g kvašćevog ekstrakta te 10 g NaCl-a u 1 l dH<sub>2</sub>O. Za dobivanje krute LB podloge u tekuću LB podlogu dodan je agar do konačne koncentracije od 32 g/l. Za selekciju transformiranih bakterija korišten je antibiotik ampicilin čija je koncentracija u podlozi iznosila 0,1 mg/ml. Za plavo-bijelu selekciju bakterija s rekombinantnim plazmidnim vektorom na krutu LB podlogu dodano je 50  $\mu$ l X-gal otopine (20 mg/ml u dimetilformamidu) i 50  $\mu$ l otopine IPTG-a (100 mM).

### **3.1.6. Uređaji**

Značajniji uređaji koji su korišteni u eksperimentalnom radu su: PCR uređaj (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems), sustav za elektroforezu (Biorad), UV transiluminator sa sustavom za snimanje agaroznih gelova (G:BOX, Syngene), stolna mikrocetrifuga (Eppendorf), hibridizacijska pećnica (OV1, Biometra), uređaj za kapljičnu analizu (Minifold I Dot-Blotter), termoblok, vodena kupelj, tresilica, termostatski inkubator, fluorescencijski mikroskop Olympus BX51 s filterima za plavu (DAPI) i zelenu (flurescein) boju i digitalna kamera Olympus DP70.

### **3.1.7. Životinjski materijal**

Organizmi roda *Meloidogyne* uzgojeni su na rajčicama (*Solanum lycopersicum* cv. Saint Pierre) u stakleniku na 20°C u Laboratoriju za istraživanje interakcija nematoda i biljaka u Sophia Antipolisu, Francuska. Jaja i juvenilne jedinke su sakupljene iz zaraženog korijenja prema protokolu opisanom u Castagnone-Sereno i sur., 2000.

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Bioinformatička analiza DNA sljedova

Koristeći podatke sa mrežne stranice sekvenciranog genoma vrste *Meloidogyne incognita* (<http://meloidogyne.toulouse.inra.fr/cgi-bin/consortium/meloidogyne.cgi>) (Abad i sur., 2008) bioinformatičari konzorcija za analizu genoma vrste *M. incognita* pomoću programa Repeat Scout (Price i sur., 2005) i Tandem Repeat Finder (Benson, 1999) izlučili su *contig*-e koji sadrže uzastopno ponovljene sljedove. Kako se radi o suradničkom laboratoriju, rezultati njihove analize mogli su biti korišteni kao osnova za daljnju analizu koja je opisana u ovom radu. Uzastopno ponovljeni sljedovi dobiveni su u FASTA formatu te su najprije obrađeni programom WinKSA (Rosandić i sur., 2003) koji omogućava rezanje uzastopno ponovljenih sljedova na osnovne jedinice ponavljanja (monomere).

Program BioEdit (Hall, 1999) korišten je za analize nukleotidnih sljedova poput: sravnjivanja sljedova, određivanje nukleotidnog sastava slijeda, izdvajanje konsenzusa nukleotidnih slijedova itd. DNAsp programom određena je nukleotidna varijabilnost unutar satelitnih porodica (Rozas i sur., 1999). DNASTar program (DNASTar, Inc., Madison, WI) je korišten za odstranjivanje nukleotidnog slijeda plazmidne DNA te za analizu nukleotidnih sljedova *dot plot*-om kako bi se utvrdilo uzastopno ponavljanje.

### 3.2.2. Izolacija genomske DNA iz organizama

Genomska DNA iz pojedine vrste roda *Meloidogyne* izolirana je iz 100-200  $\mu$ l jaja koristeći "DNAeasy Tissue Kit" prema uputama proizvođača. Koncentracija genomske DNA u eluatu procijenjena je usporedbom s DNA poznate koncentracije ( $\lambda$ -DNA koncentracije 50 ng/ $\mu$ l) nakon elektroforeze na 1% agaroznom gelu.

### 3.2.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Prisutnost određene satelitne DNA u genomima pojedinih vrsta roda *Meloidogyne* utvrđivana je lančanom reakcijom polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) koristeći specifične početnice za određeni satelitni slijed i genomsku DNA pojedine vrste kao kalup.

#### 3.2.3.1. Konstrukcija početnica

Specifične početnice korištene za umnažanje četiri različite satelitne DNA (R1, R5, R7, R8) konstruirane su koristeći mrežni program Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) na temelju konzensusnog slijeda monomera pojedinih satelitnih DNA. Odabrane su sljedeće specifične početnice:

R1L 5'-GGCTATCTCTTTATTAACCATGGAA-3'

R1R 5'-TTTGCTGGTAGGCATATTTTATTT-3'

R5L 5'-CTACTATTGAATAACTTAATGG-3'

R5R 5'-TGATGCCAAAAATGAAGTATATCG-3'

R7L 5'-CCAAAATTTAAGAGGGAC-3'

R7R 5'-GGAATAACCGTTTGTAGACC-3'

R8L 5'-CTAGTAATGTATTCGAATTCG-3'

R8R 5'-AAATATGGCACTAATAATTTTGAC-3'

Procjena čistoće pojedinog uzorka genomske DNA određivana je SCAR (engl. *sequence-characterized amplified region*) analizom (Zijlstra i sur, 2000). Kontaminacija pojedinog uzorka genomske DNA drugom vrstom otkrivana je koristeći SCAR početnice koje umnažaju polimorfne DNA odsječke specifične samo za jednu vrstu. Korištene su OPB06 početnice specifične za genomsku DNA vrste *M. incognita* sljedećeg nukleotidnog slijeda:

L(inc) 5'-CTCTGCCCAATGAGCTGTCC-3'

R(inc) 5'-CTCTGCCCTCACATTAAG-3'

### 3.2.3.2. PCR reakcijska smjesa i uvjeti reakcije

Umnažanje satelitnih sljedova PCR-om provedeno je u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 25 µl koja je sadržavala: 1xPCR pufer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM smjesu dNTP-a, 1,5 U Taq polimeraze (GoTaq Flexi), 0,4 µM specifičnih početnica i 20 ng genomske DNA. Program umnažanja započinjao je preddenaturacijom 3 min. na 94°C, nastavljao se s 30 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacije 30 s na 94°C, sparivanja početnica s homolognim sljedovima 30 s na 58°C i produljivanja lanca 30 s na 72°C, a završno produljivanje lanca bilo je 10 min. na 72°C. Završno produljenje lanca u trajanju od 10 minuta je osiguralo dodatak dAMP-a na 3' kraju odsječka.

PCR u slučaju SCAR analize proveden je u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 10 µl koja je imala isti sastav kao prethodno opisana. Program umnažanja prilikom SCAR analize započinjao je preddenaturacijom 5 min. na 94°C, nastavljao se s 30 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacije 30 s na 94°C, sparivanja početnica s homolognim sljedovima 30 s na 61°C i produljivanja lanaca 1 min. na 72°C, a završno produljivanje lanca bilo je 7 min. na 72°C.

Produkti PCR-a su za daljnju analizu pročišćeni koristeći komplet "QIAquick PCR Purification Kit" prema uputama proizvođača.

### 3.2.4. Elektroforetsko razdvajanje fragmenata DNA u agaroznom gelu

Satelitne DNA umnožene PCR-om ili produkti razgradnje restrikcijskim endonukleazama razdvajani su na 1% agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem agaroze u elektroforetskom puferu-TAE koji je sadržavao etidijev bromid u koncentraciji 0,5 µg/ml. Elektroforeza se odvijala u istom puferu u električnom polju jakosti 5 V/cm.. Veličina razdvojenih fragmenata određivana je usporedbom s biljegom za veličinu DNA odsječka "Gene Ruler DNA Ladder Mix, ready-to-use".



### **3.2.5. Analiza restrikcijskim endonukleazama**

Produkti PCR-a (satelitni sljedovi) podvrgnuti su dodatnoj analizi restrikcijskim endonukleazama. Pročišćeni produkti PCR-a analizirani su restrikcijskim enzimima koristeći komplet restrikcijskih endonukleaza *HindII* i *DraI* (sadrže vlastiti 10xTango pufer) prema uputama proizvođača.

### **3.2.6. AT-kloniranje i transformacija kompetentnih bakterijskih stanica**

Produkti PCR-a predviđeni za sekvenciranje klonirani su u pGEM-T plazmidni vektor koji omogućava AT-kloniranje. Reakcija ligacije provedena je koristeći komplet "pGEM-T Easy Vector System" prema uputama proizvođača.

Kompetentne stanice vrste *Escherichia coli* soja DH5 $\alpha$  transformirane su pGEM-T vektorom metodom temperaturnog šoka. U 50  $\mu$ l otopine kompetentnih stanica na ledu dodano je 2  $\mu$ l ligacijske smjese i inkubirano 30 min. na ledu. Temperaturni šok je postignut inkubacijom smjese kompetentnih stanica i ligacijske smjese 20 s pri 37°C te ponovnim vraćanjem smjese na led 2 min. Bakterije su regenerirane dodavanjem 800  $\mu$ l LB medija i inkubacijom na 37°C 1 sat. Nadalje, bakterije su nacijepljene na selektivnu LB podlogu s ampicilinom kojoj je dodan X-gal i IPTG.

### **3.2.7. PCR na bakterijskim kolonijama**

Korištenje pGEM-T plazmidnog vektora omogućava plavo-bijelu selekciju kolonija. Međutim, kako bi se odredila veličina ugrađenog odsječka provodio se PCR na bakterijskim kolonijama. Sterilnim nastavkom dotakne se bakterijska kolonija te se uroni u 5  $\mu$ l mQ H<sub>2</sub>O. Uzorak se inkubira u PCR uređaju pri 95°C 10 min. PCR reakcija provodi se u volumenu od 5  $\mu$ l reakcijske smjese koja sadrži: 1xPCR pufer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM smjesu dNTP-a, 0,5 U *Taq* polimeraze (*GoTaq Flexi*), 0,4  $\mu$ M M13F i M13R plazmidnih početnica i 0,5  $\mu$ l prethodno pripremljene suspenzije bakterija. Program umnažanja započinjao je preddenaturacijom 1 min. na 94°C, nastavljao se s 25 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacije 30 s na 94°C, sparivanja početnica 30 s na

58°C i produljivanja lanca 30 s na 72°C, a završno produljivanje lanca bilo je 7 min. na 72°C.

Produkti PCR-a na bakterijskim kolonijama analizirani su na 1% agaroznom gelu. Kolonije koje su sadržavale odsječke željene veličine uzgojene su u 5 ml tekuće LB selektivne podloge s ampicilinom preko noći na temperaturi od 37°C u tresilici.

### **3.2.8. Izolacija plazmidne DNA**

Bakterije s ugrađenim željenim odsječkom koje su uzgojene preko noći na tekućoj LB podlozi oborene su centrifugiranjem. Plazmidna DNA izolirana je koristeći komplet "QIAGEN Plasmid Mini Kit" prema uputama proizvođača.

### **3.2.9. Određivanje slijeda nukleotida satelitne DNA**

Određivanje slijeda nukleotida satelitne DNA obavljeno je u Macrogene servisu za sekvenciranje (Koreja) s plazmidnim početnicama T7.

### **3.2.10. Hibridizacijska analiza po Southernu**

Hibridizacijska analiza po Southernu korištena je kako bi se dobila dodatna potvrda prisutnosti određenog satelitnog slijeda u genomima pojedinih vrsta te kako bi se otklonila mogućnost postojanja varijanti određenog satelita koji se ne mogu razlikovati PCR-om.

#### **3.2.10.1. Obilježavanje sondi**

Specifične sonde za hibridizacijsku analizu po Southernu obilježene su biotin-16-dUTP-om PCR-om. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 50 µl sadržavala je: 1xPCR pufer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM biotin-dNTP-ovi 5 U Taq polimeraze (GoTaq Flexi), 0,4 µM specifičnih početnica i 20 ng pročišćenog produkta PCR-a (umnoženih satelitnih sljedova iz genomske DNA vrste *M. incognita*). Program umnažanja započinjao je

preddenaturacijom 3 min. na 94°C, nastavljao se s 30 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacije 30 s na 94°C, sparivanja početnica s homolognim sljedovima 30 s na 55°C i polimerizacije 30 s na 72°C, a završavao je polimerizacijom 10 min. na 72°C.

### **3.2.10.2. Predhibridizacija, hibridizacija i detekcija**

Nakon razdvajanja produkata PCR-a na 1% agaroznom gelu uslijedio je kapilarni prijenos na pozitivno nabijene najlonske membrane koji se provodi u denaturacijskom puferu preko noći. Tijekom prolaza kroz gel lužnati denaturacijski pufer denaturira odsječke DNA te prenosi kapilarnim prijenosom negativno nabijene jednolančane odsječke DNA na pozitivno nabijenu najlonsku membranu. Nakon prijenosa membrana je isprana u 2xSSC puferu, osušena na zraku i DNA je dodatno fiksirana na membranu pečenjem na 120°C 20-30 min.

Predhibridizacija, hibridizacija i ispiranje membrana odvijalo se u staklenim valjcima u hibridizacijskoj pećnici. Predhibridizacija se odvijala 1,5-2 sata na 68°C u puferu za Southern hibridizaciju. DNA sonda je denaturirana na 100°C 10 min. Hibridizacija se odvijala preko noći u puferu za Southern hibridizaciju koji je sadržavao DNA sondu u koncentraciji 10-20 ng/ml. Nakon hibridizacije su membrane su isprane 3x20 min. u puferu za ispiranje sonde na 65°C.

Detekcija se odvijala u plastičnim kadicama uz protresanje na tresilici pri sobnoj temperaturi. Membrane su isprane u puferu 1 5 min., te inkubirane u puferu 2 60 min. Inkubacija membrana sa streptavidinom vezanim na alkalnu fosfatazu (0,75 U/μl) u puferu 2 (razrijeđenje streptavidina u puferu2; 1:15000) trajala je 30 min. Slijedilo je ispiranje membrana 5x10 min. u puferu 1 te inkubacija 2x5 min. u puferu 3. Kemiluminiscentna detekcija signala provedena je koristeći komplet "CDP-*Star*, ready to use" prema uputama proizvođača (CDP-*Star* je razrijeđen u vlastitom puferu u omjeru 1:100). Nakon kemiluminiscentne detekcije membrane su izložene autoradiografskim filmovima. Autoradiografski filmovi su razvijeni u fotografskom razvijaju do pojavljivanja signala i fiksirani u fotografskom fiksiru.

### 3.2.11. Kapljična analiza

Kapljična analiza (engl. *dot-blot*) je hibridizacijska metoda kojom se utvrđuje udio pojedinog nukleotidnog slijeda u ukupnoj genomskej DNA nekog organizma. Korištena je kako bi se utvrdio približni udio pojedinog satelitnog slijeda u genomu vrste *Meloidogyne incognita*.

Uzorci genomske DNA vrste *Meloidogyne incognita* razrijeđeni su u određenim koncentracijama u TE puferu do konačnog volumena od 100 µl. Denaturacija uzoraka je izvršena 5 min. na 100°C nakon čega su uzorci stavljeni na led ~5min. Uzorci se kratko centrifugiraju kako bi se oborio sadržaj sa čepa te im se dodaje 100 µl 20xSSC pufera. Nanošenje uzoraka na membranu provedeno je koristeći uređaj za kapljičnu analizu (Minifold I Dot-Blotter). Filter papir je postavljen na donji dio uređaja, membrana preko njega, a sve je učvršćeno hvataljkama sa strane i priključeno na vakuum sisaljku. U pojedine jažice nanoseni su uzorci koji su usisani na pozitivno nabijenu najlonsku membranu. Membrana se osuši na zraku te se peče 20-30 min. na 120°C kako bi se DNA fiksirala. Nakon fiksiranja membrana je inkubirana u denaturacijskom puferu 5-10 min. nakon čega je slijedila inkubacija u neutralizacijskom puferu 3x5 min. Daljnji postupci predhibridizacije, hibridizacije, ispiranja i detekcije jednaki su kao i u slučaju hibridizacijske analize po Southernu.

### 3.2.12. Fluorescencijska hibridizacija *in situ* (FISH)

#### 3.2.12.1. Priprema citogenetičkih preparata

Kromosomski preparati pripremljeni su iz juvenilnog stadija vrste *Meloidogyne incognita* nakon izolacije organizama iz korijenovih kvržica u 0,9% otopini NaCl-a. Proveden je hipotonični šok u 75 mM otopini KCl-a 15 min. nakon čega je slijedila fiksacija u fiksativu 10 min. Preparati su pripremljeni *squash* tehnikom u 45%-tnoj otopini octene kiseline nakon čega je slijedilo smrzavanje u tekućem dušiku.

#### 3.2.12.2. Postupak hibridizacije *in situ*

Fluorescencijska hibridizacija *in situ* provedena je prema ranije utvrđenom protokolu (Lichter i Cramer, 1992) uz određene preinake. Sva ispiranja te dio inkubacija proveden je u staklenim posudama za predmetna stakalca Coplin jar.

Preparati su tretirani RNazom A (100 µg/ml u 2xSSC) 1 sat na 37°C, a potom pepsinom (100 µg/ml pepsina u 10 mM HCl-u) 10 min. na 37°C. Dehidracija preparata provedena je prolaskom kroz seriju hladnih etanola (70%→90%→100%; 3 min. svaki) nakon čega je slijedila denaturacija u denaturacijskoj otopini 2 min. na 70°C. Preparati su ponovno dehidrirani prolaskom kroz seriju hladnih etanola (70%→90%→100%; 3 min. svaki).

Sonde koje su korištene u FISH-u obilježene su PCR-om biotin-16-dUTP-om kao što je objašnjeno u poglavlju 3.2.10.1. 100 ng liofilizirane DNA sonde otopljeno je u 10 µl hibridizacijske otopine te je denaturirano 5 min. na 75°C. Sonde su ohlađene na ledu i nanese na kromosomske preparate. Hibridizacija je provedena inkubacijom preko noći na 37°C u vlažnoj komorici.

Posthibridizacijsko ispiranje kromosomskih preparata provedeno je u otopini za ispiranje 3x5 min. na 37°C. Imunodetekcija je provedena upotrebom avidin-FITC-a i α-avidin<sup>biotin</sup>-a. Nespecifični signali blokirani su inkubacijom preparata u 4M puferu 30 min. na 37°C u vlažnoj komorici nakon čega je slijedila inkubacija u 4M puferu koji je sadržavao avidin-FITC u razrjeđenju 1:500. Inkubacijom preparata u razrijeđenom α-

avidin<sup>biotin</sup>-u u 4M puferu (1:100) te naknadna inkubacija u razrijeđenom avidin-FITC-u u 4M puferu (1:2000) osiguravala je amplifikaciju signala. Inkubacije u avidin-FITC-u i  $\alpha$ -avidin<sup>biotin</sup>-u provedene su 30 min. na 37°C dok su ispiranja između inkubacija provedena u 4T puferu 3x5 min.

Kromosomski preparati su završno dehidrirani prolaskom kroz seriju hladnih etanola (70%→90%→100%; 3 min. svaki) nakon čega je uslijedilo bojanje u otopini DAPI-a te nakon sušenja uklapanje u otopinu antifade reagensa.

Mikroskopiranje je provedeno na Olympus BX51 fluorescencijskom mikroskopu uz korištenje filtera za plavu (DAPI) i zelenu (flurescein) boju. Signali su fotografirani digitalnom kamerom Olympus DP70 spojenom na računalo. Slike su integrirane u programu Adobe Photoshop 7.0.

## **4. REZULTATI**

## 4.1. ANALIZA INC SATELITNE DNA U VRSTI *M. incognita*

### 4.1.1. Analiza *in silico* INC satelitne DNA

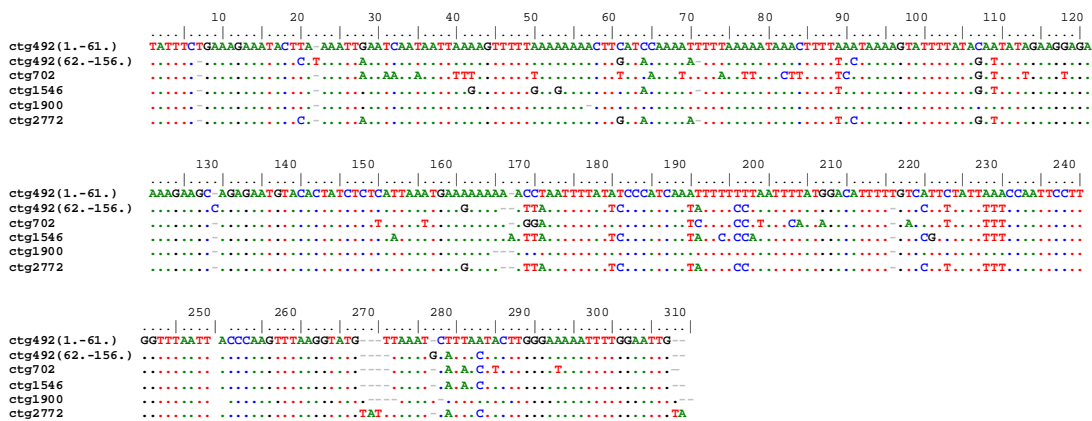
INC satelitna DNA izolirana je iz vrste *M. incognita* kloniranjem nakon restrikcije cjelokupne genomske DNA te su određeni sljedovi nekoliko monomera (Piotte i sur., 1994). Također, određena je duljina monomera od 312 pb i udio INC satelitne DNA u genomu koji iznosi čak 3,5%. Kako je 2008. godine sekvenciran genom vrste *M. incognita* omogućena je opsežnija analiza ovih sljedova u genomu. Pitanje koje se nameće u uvjetima *shotgun* sekvenciranja, kakvo je provedeno kod vrste *M. incognita*, je da li je automatsko slaganje genoma (engl. *assembly*) uzastopno ponovljenih sljedova vjerodostojno, s obzirom da se radi o vrlo sličnim sljedovima koji se u genomu pojavljuju u velikom broju kopija i na različitim pozicijama. Cilj ovog dijela rada bio je izlučiti *contig*-e koji sadrže INC satelitnu DNA te analizirati duge nizove monomernih sljedova.

Svi *contig*-zi analizirani u ovom poglavlju dobiveni su pretraživanjem sekvenciranog genoma vrste *M. incognita* na mrežnoj stranici (<http://meloidogyne.toulouse.inra.fr/cgi-bin/consortium/meloidogyne.cgi>) s monomernim sljedom INC satelitne DNA (Piotte et al., 1994). Prvi dio obrade sadržavao je izrezivanje monomernih sljedova iz pojedinačnih *contig*-a pomoću WinKSA programa (Rosandić i sur, 2003). Navedeni program sadrži mogućnost izlučivanja monomernih sljedova izrezujući ih na mjestima zadanog, kratkog nukleotidnog slijeda (4-6 pb). Nakon sravnjivanja monomernih sljedova nizova pojedinačnih *contig*-a izračunata je njihova prosječna nukleotidna varijabilnost (Pi) te varijabilnost svih analiziranih monomernih sljedova (Tablica 4.1.)



**Tablica 4.1.** Prosječna nukleotidna varijabilnost (Pi) monomernih sljedova nizova pojedinačnih *contig*-a te svih analiziranih monomernih sljedova korištenih u analizi INC satelitne DNA.

<i>contigs</i>	broj analiziranih monomera	prosječna nukleotidna varijabilnost-Pi (%)
svi monomeri <i>contig</i> -a	256	6,2
ctg492 (1.-61. monomera)	61	2,1
ctg492 (62.-156. monomera)	94	0,8
ctg702	10	0,5
ctg1546	76	1,2
ctg1900	23	0,8
ctg2772	12	0,6

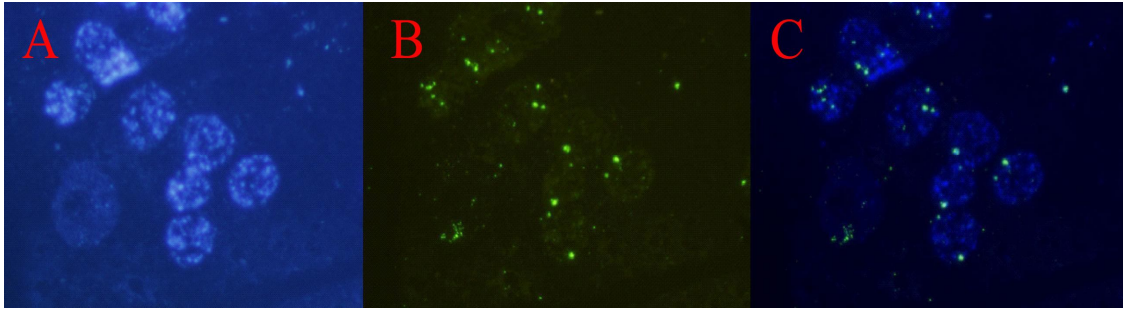


**Slika 4.1.** Svrnjenje konsenzusnih sljedova monomera pojedinačnih *contig*-a (ctg492 od 1. do 61. monomera), ctg492(od 62. do 156. monomera), ctg702, ctg1546, ctg1900, ctg2772).

Usporedbom navedenih nukleotidnih varijabilnosti (Tablica 4.1.) među monomerima može se uočiti da monomeri koji se nalaze u jednom nizu imaju manju međusobnu varijabilnost od varijabilnosti sveukupnih monomera. Ovo ukazuje na sklonost grupiranju istih ili vrlo sličnih varijanti monomera u nizu u *contig*-u. Međutim, sa zaključcima temeljenim na analizama uzastopno ponovljenih sljedova nakon automatskog slaganja genoma treba biti oprezan. Daljnje analize koje bi mogle utvrditi da li se radi o stvarnoj organizaciji monomernih sljedova ili o artefaktu slaganja dijelova genoma koji sadrže uzastopno ponovljene sljedove nakon *shotgun* sekvenciranja su sekvenciranje BAC biblioteke, RE analiza i rekloniranje BAC-ova.

#### **4.1.2. Preliminarne analize smještaja INC satelitne DNA na kromosomima vrste *M. incognita***

Poznato je da se satelitne DNA najčešće nalaze na centromernim regijama kromosoma i to vrlo često na svim centromerama kromosoma. Kako INC satelitna DNA ima najveći udio u genomu vrste *M. incognita*, od do sada opisanih satelitnih DNA ove vrste, proveda se fluorescencijska hibridizacija *in situ* (FISH) radi utvrđivanja smještaja na kromosomima. Za pripremu kromosomskih preparata korištene su ženske jedinke u srednjoj fazi sazrijevanja koje su bile izolirane iz tkiva kvržica korijena. Međutim, priprema preparata već je na početku imala ograničenja s obzirom da ne postoji literatura koja bi mogla dati neke smjernice za izradu preparata. Prvo, radi se o organizmina koji se razmnožavaju obligatornom mitotskom (apomiktičkom) partenogenezom (Castagnone-Sereno, 2006) što znači da ne sadrže reproduktivne organe s jezgrama u mejotskim metafazama koje su najpogodnije za FISH analize. Nadalje, sama je veličina organizma (jedinke u ovoj fazi imaju veličinu od svega 300  $\mu\text{m}$  do 2 mm) onemogućavala izolaciju tkiva (npr. reproduktivnog organa) koje je mitotski aktivno tako da se na preparat nanosila cijela životinja. To je smanjivalo udio pogodnih jezgara te je pridonijelo pojavi velike količine nepotrebnog materijala na preparatu. Na kraju, fiksacija citogenetičkog materijala u tekućem dušiku, koja je jedina pogodna za FISH analize, dovela je do izrazitog gubljenja ionako malog broja metafaznih jezgara.



**Slika 4.2.** Interfazne jezgre obojane DAPI bojom (A), fluorescencijski signali dobiveni vezanjem sonde specifične za INC satelitni slijed (B) i integrirani prikaz bojanja DAPI bojom i fluorescencijskih signala (C).

Nakon mnogobrojnih izrada preparata jedino što se moglo utvrditi FISH analizom na interfaznim jezgrama sa sondom INC satelitne DNA (Slika 4.2.) bilo je grupiranje signala na jednom ili dva mjesta. S obzirom da se nije uspjela izolirati nijedna metafaza ovakva lokalizacija upućuje na prisutnost INC satelitne DNA najvjerojatnije samo na jednom ili dva kromosoma.

## **4.2. ANALIZA NOVIH SATELITNIH DNA U VRSTAMA RODA *Meloidogyne***

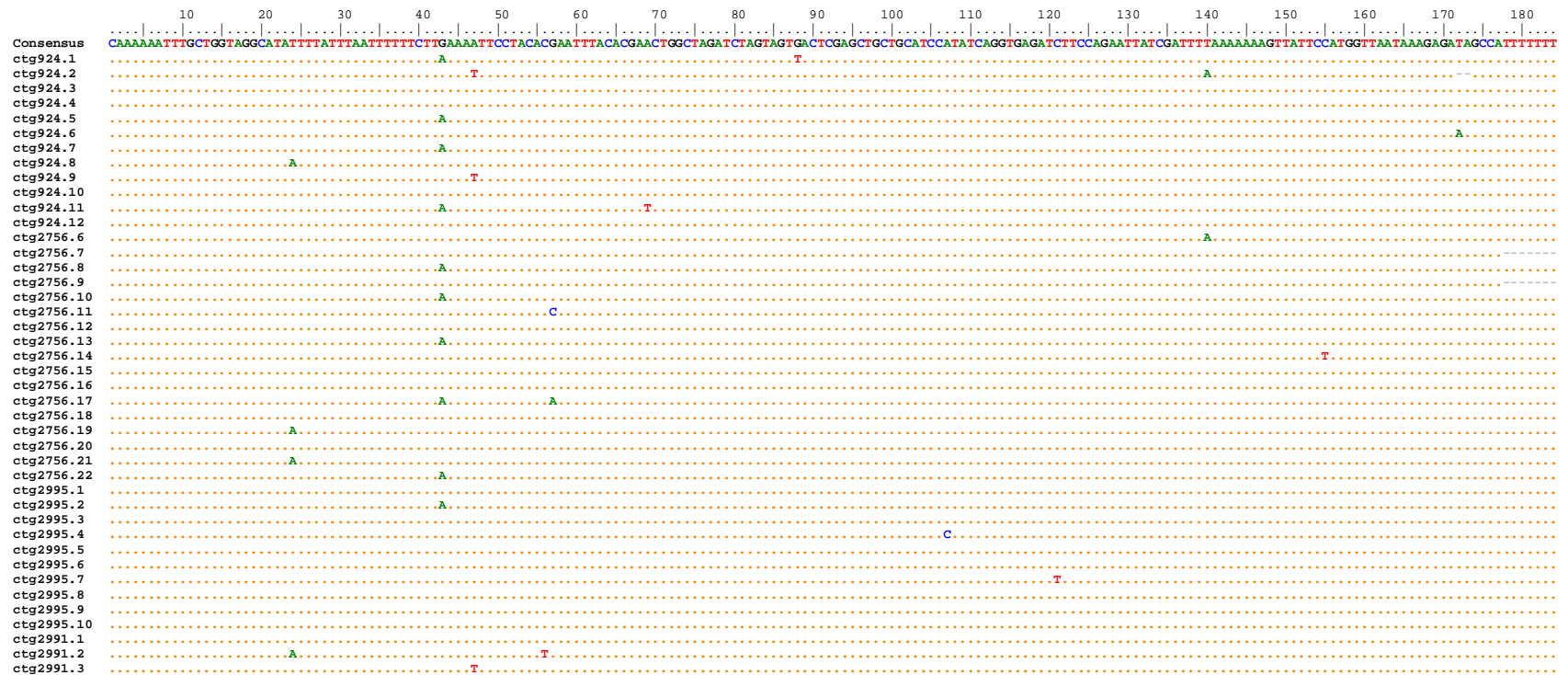
### **4.2.1. Analiza *in silico* sljedova novih satelitnih DNA iz sekvenciranog genoma vrste *Meloidogyne incognita***

Uzastopno ponavljajući sljedovi predvidljivo novih satelitnih DNA preuzeti su od suradničkog laboratorija koji je dio konzorcija za sekvenciranje genoma vrste *M. incognita*. Bioinformatička grupa ovog konzorcija je nakon obrade programima Scout Repeat i Tandem Repeat Finder odabrala one *contig*-e koji su imali obilježja do sada neopisanih uzastopno ponovljenih sljedova te nam ih je prosljedila na daljnju analizu. Svi *contig*-zi analizirani u ovom poglavlju (Tablica 4.2.) dostupni su na mrežnoj stranici (<http://meloidogyne.toulouse.inra.fr/cgi-bin/consortium/meloidogyne.cgi>). Tablica 4.2 sadrži imena i duljine pojedinačnih *contig*-a koji su grupirani prema vrsti satelitne DNA (R1, R5, R7 i R8) od koje su sastavljeni.

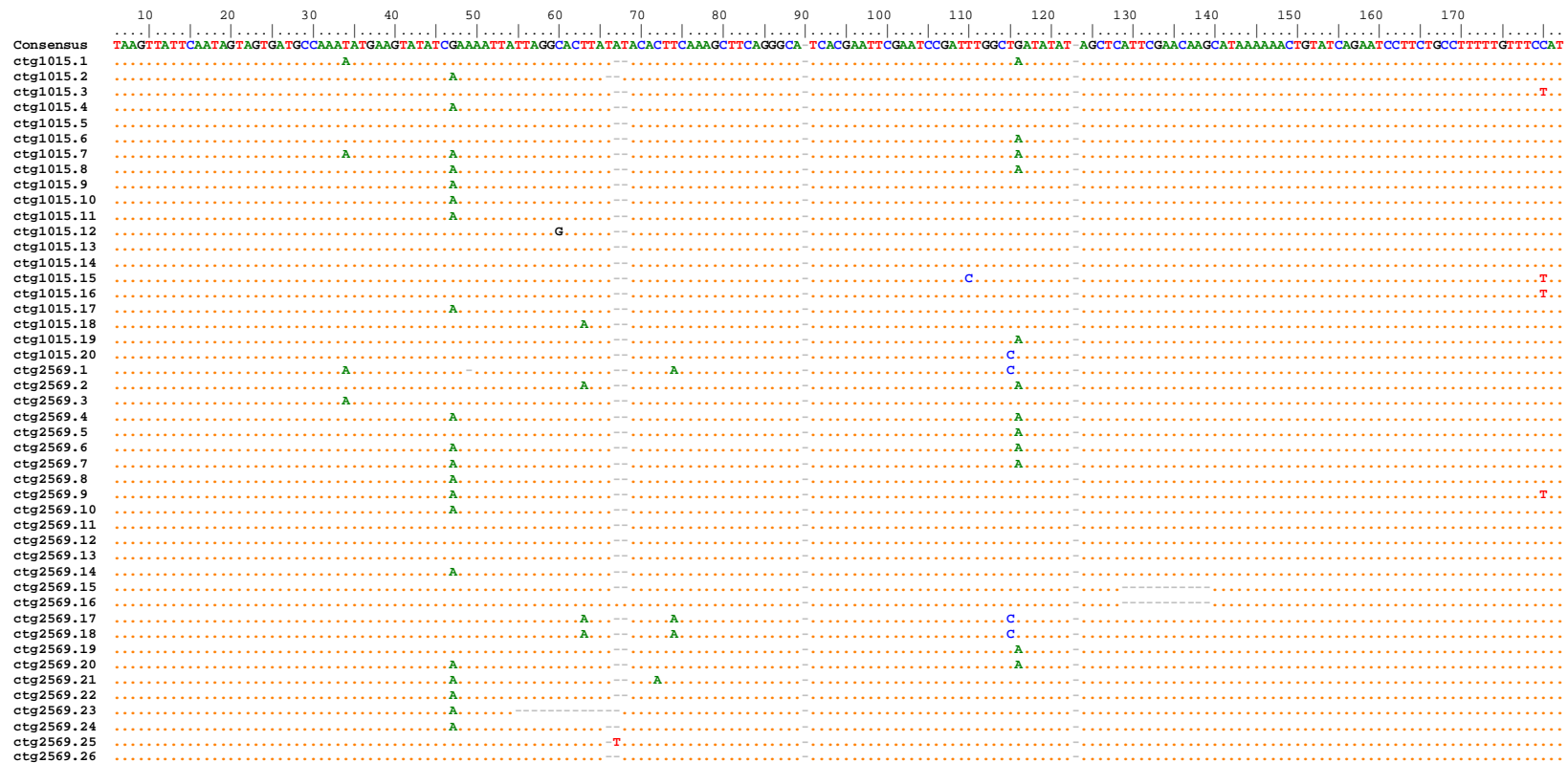
**Tablica 4.2.** Odabrani *contig*-zi koji posjeduju potencijalno nove satelitne DNA iz sekvenciranog genoma vrste *M. incognita*.

satelitne DNA	<i>contig</i>	veličina (bp)
R1	MiV1ctg924	25615
	MiV1ctg2991	664
	MiV1ctg2955	2784
	MiV1ctg2756	4056
R5	MiV1ctg2569	4529
	MiV1ctg1015	22677
R7	MiV1ctg1441	2760
	MiV1ctg2750	14706
	MiV1ctg2676	4262
	MiV1ctg2304	5295
	MiV1ctg2097	6126
R8	MiV1ctg1797	7867
	MiV1ctg1555	11169
	MiV1ctg1905	6992

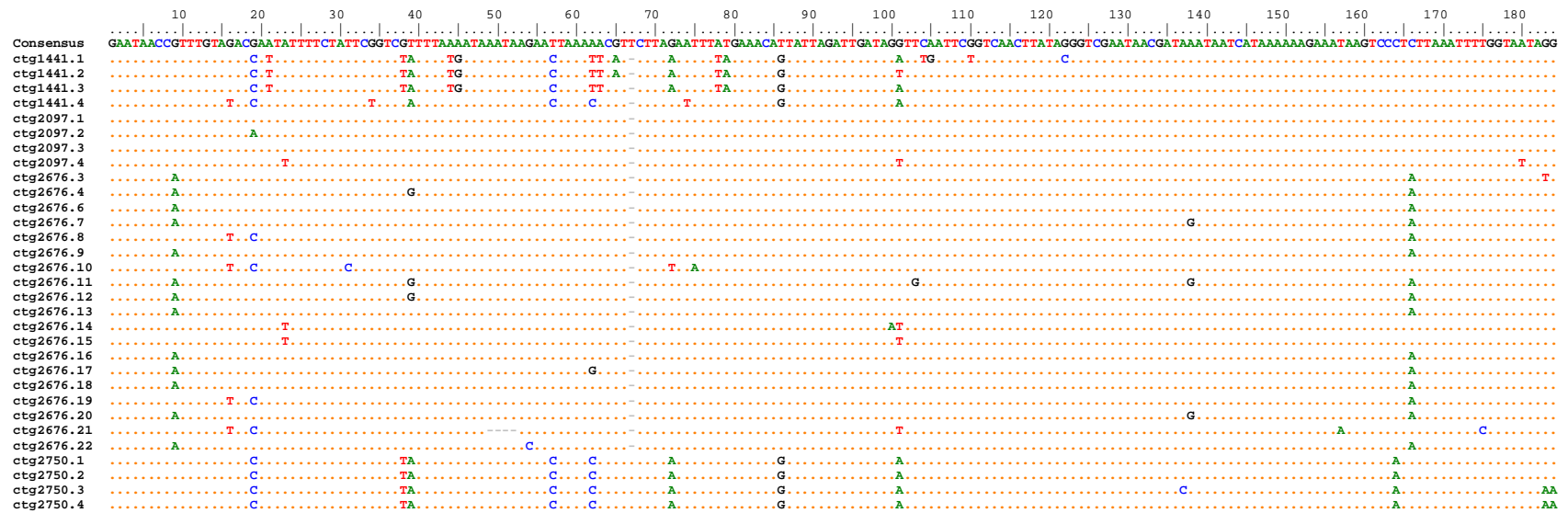
Cilj daljnjih analiza navedenih *contig*-a bio je određivanje osnovnih karakteristika (duljina monomera, udio A i T nukleotida i nukleotidna varijabilnost) pojedinih satelitnih DNA (R1, R5, R7 i R8) te usporedba s do sada opisanim satelitnim DNA vrste *M. incognita*. Prvi dio obrade sadržavao je izrezivanje monomernih slijedova iz pojedinačnih *contig*-a pomoću WinKSA programa (Rosandić i sur., 2003). Nakon izrezivanja *contig*-a, monomerni slijedovi pojedinačnih satelitnih DNA su sravnjeni korištenjem programa BioEdit (Hall, 1999) te je izlučen konsenzusni slijed za svaku satelitnu DNA (Slika 4.3., 4.4., 4.5., 4.6.) prema kriteriju 60%-tne prisutnosti određenog nukleotida na pojedinačnoj poziciji monomernog slijeda.



**Slika 4.3.** Usporedba pojedinačnih monomera R1 satelitne DNA dobivenih izdvajanjem iz *contig*-a (ctg2995, ctg2756, ctg924). Označene su promjene u pojedinačnim klonovima s obzirom na konsensusni slijed, (–) označava delecije u slijedu.

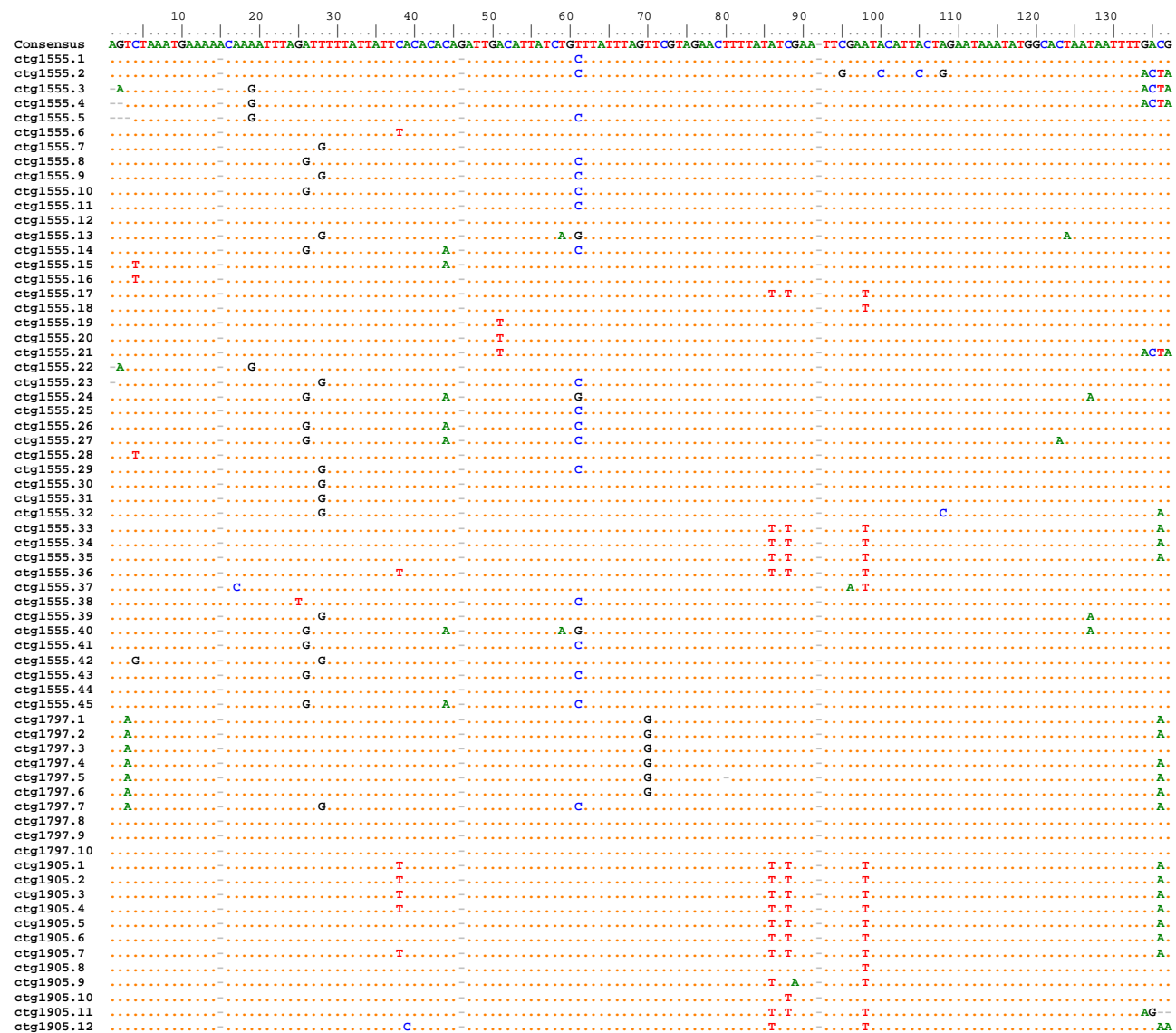


**Slika 4.4.** Usporedba nekih pojedinačnih monomera R5 satelitne DNA dobivenih izdvajanjem iz *contig*-a (ctg1015, ctg2569). Označene su promjene u pojedinačnim klonovima s obzirom na konsensusni slijed, (–) označava delecije u slijedu.



**Slika 4.5.** Usporedba pojedinačnih monomera R7 satelitne DNA dobivenih izdvajanjem iz *contig*-a (ctg1441, ctg2097, ctg2676, ctg2750). Označene su promjene u pojedinačnim klonovima s obzirom na konsensusni slijed, (–) označava delecije u slijedu.





**Slika 4.6.** Usporedba pojedinačnih monomera R8 satelitne DNA dobivenih izdvajanjem iz *contig*-a (ctg1555, ctg1797, ctg1905). Označene su promjene u pojedinačnim klonovima s obzirom na konsenzusni slijed, (–) označava delecije u nukleotidnom slijedu.

Nadalje, da bi se ustanovio stupanj sličnosti među sljedovima kako novih satelitnih DNA (R1, R5, R7 i R8) tako i u usporedbi s prije opisanim napravljena je "Local BLAST" analiza u BioEdit programu. Ovom analizom omogućeno je pronalaženje homologije među nukleotidnim sljedovima odabranih odsječaka. Usporedbom pojedinačne nove satelitne DNA sa svim ostalim satelitnim DNA u genomu vrste *M. incognita* ustanovljeno je da nove satelitne DNA (R1, R5, R7 i R8) ne posjeduju nikakvu značajnu međusobnu homologiju niti homologiju s prije opisanim satelitnim DNA (INC, MPA1, MPA2, MARJA, i AJL) vrste *M. incognita*. Moglo se ustanoviti da se radi o potpuno novim satelitnim DNA u vrsti *M. incognita*.

**Tablica 4.3.** Karakteristike novoobrađenih satelitnih DNA (crveno označene) u usporedbi s ranije opisanim satelitnim DNA vrste *M. incognita*.

naziv satelitne DNA	duljina monomera (bp)	udio A+T (%)	prosječna nukleotidna varijabilnost-Pi (%)	udio u genomu (%)
R1	184	66,9	0,7	<0,1*
R5	184	62,5	1,1	<0,1*
R7	183	70,5	4,5	<0,1*
R8	138	69,6	2,9	<0,1*
INC	312 <sup>a</sup>	68,6 <sup>a</sup>	6,0 <sup>a</sup>	3,5 <sup>a</sup>
MPA1	170 <sup>b</sup>	74,6 <sup>b</sup>	5,0 <sup>b</sup>	0,2 <sup>b</sup>
MPA2	170 <sup>c</sup>	74,4 <sup>c</sup>	5,8 <sup>c</sup>	1,0 <sup>c</sup>
MARJA	170 <sup>b</sup>	72,1 <sup>b</sup>	4,0 <sup>b</sup>	0,2 <sup>b</sup>
AJL	170 <sup>d</sup>	69,8 <sup>d</sup>	0,5 <sup>d</sup>	0,2 <sup>d</sup>

\* Udio u genomu ustanovljen je metodom kapljične analize. U ovom slučaju metoda kapljične analize nije bila dovoljno osjetljiva da odredi točan udio pojedinačne satelitne DNA u genomu.

<sup>a</sup> Meštrović i sur., 2009

<sup>b</sup> Meštrović i sur., 2005

<sup>c</sup> Meštrović i sur., 2006b

<sup>d</sup> Meštrović i sur., 2006a

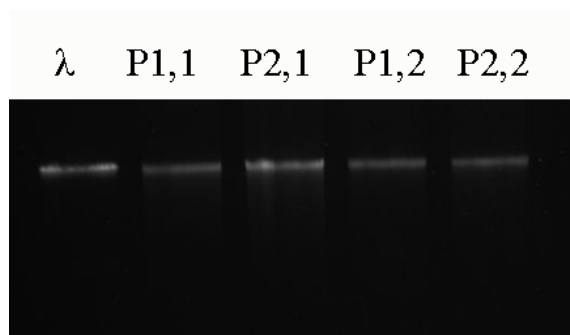
Osim uzastopne organizacije monomera karakteristične za ovu vrstu sljedova nove satelitne DNA (R1, R5, R7 i R8) pokazuju i ostale uobičajene karakteristike satelitnih sljedova kao što su duljina monomera ~170 pb, visok AT sastav (62-70%) i niska varijabilnost monomernih varijanti (Tablica 4.3.). Za razliku od prije opisanih satelitnih DNA njihova zastupljenost u genomu je izrazito niska (< 0,1%). Ova činjenica je vjerojatno razlog što do sada još nisu bile izolirane konvencionalnim metodama (npr. restrikcijom cjelokupne genomske DNA i kloniranjem) nego su uočene tek nakon pažljive analize cjelokupnog sekvenciranog genoma.

#### 4.2.2. Pretraživanje vrsta roda *Meloidogyne* na prisutnost novih satelitnih DNA

Da bi se dobili podaci o evoluciji novih satelitnih DNA (njihovo rađanje u genomima te promjenu ili očuvanost u nukleotidnom slijedu) provedeno je pretraživanje srodnih vrsta roda *Meloidogyne* na prisutnost novih satelitnih DNA osjetljivom metodom PCR-a.

##### 4.2.2.1. Procjena kvalitete genomske DNA vrsta roda *Meloidogyne*

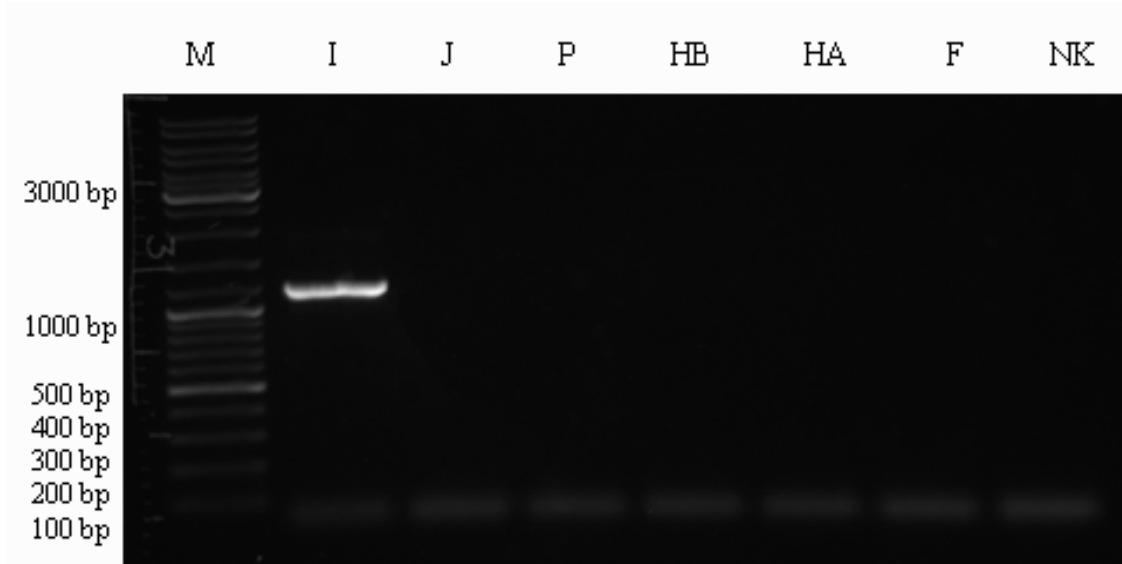
Osnovni preduvjet za vjerodostojne rezultate pretraživanja srodnih genoma na prisutnost satelitnih DNA koje su izolirane iz srodne vrste, u ovom slučaju iz vrste *M. incognita*, je kvaliteta izolirane genomske DNA. Izdvajanje je napravljeno korištenjem komercijalnog kompleta za izdvajanje DNA iz malih količina tkiva, a koncentracija izolirane genomske DNA određivana je usporedbom s DNA poznate koncentracije.



**Slika 4.7.** Procjena koncentracije genomske DNA izolirane iz vrste *M. paranaensis* usporedbom s  $\lambda$ -DNA koncentracije 0,5 ng/ $\mu$ l ( $\lambda$ ). Procijenjena koncentracija: P1,1 20 ng/ $\mu$ l (genomska DNA iz 1. uzorka organizama u 1. eluciji), P2,1 30 ng/ $\mu$ l (genomska DNA iz 2. uzorka organizama u 1. eluciji), P1,2 20 ng/ $\mu$ l (genomska DNA iz 1. uzorka u 2. eluciji), P2,2 20 ng/ $\mu$ l (genomska DNA iz 2. uzorka u 2. eluciji).

Kontaminacija pojedinog uzorka genomske DNA drugom vrstom može se otkriti SCAR analizom. SCAR početnice umnažaju polimorfne DNA odsječke koji su specifični samo za jednu vrstu, u ovom slučaju vrstu *M. incognita* (Zijlstra i sur, 2000). Nakon elektroforetskog razdvajanja produkata PCR reakcije dobiveno je umnažanje samo u

slučaju genomske DNA vrste *M. incognita* što dokazuje čistoću uzorka genomske DNA ostalih vrsta (Slika 4.8.).



**Slika 4.8.** SCAR analiza genomskih DNA vrsta *M. incognita* (I), *M. javanica*(J), *M. paranaensis* (P), *M. hapla* B (HB), *M. hapla* A (HA) i *M. fallax* (F) specifičnim početnicama za genomsku DNA vrste *M. incognita* (OPB06). Linija NK predstavlja negativnu kontrolu (PCR smjesu bez genomske DNA). M je biljeg veličine odsječaka.

#### 4.2.2.2. Analiza genoma vrsta roda *Meloidogyne* na prisutnost R1, R5, R7 i R8 satelitnih DNA

Analiza prisutnosti novih satelitnih sljedova (R1, R5, R7 i R8) u genomima nekih vrsta roda *Meloidogyne* (*M. javanica*, *M. paranaensis*, *M. hapla* B, *M. hapla* A i *M. fallax*) provedena je lančanom reakcijom polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) s početnicama specifičnim za pojedinu satelitnu DNA te hibridizacijskom analizom po Southernu. Specifične početnice za pojedinu satelitnu DNA dizajnirane su programom Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) na temelju konsenzusnih sljedova pojedine satelitne DNA (Slika 4.9.). Standardna PCR reakcijska smjesa za svaku satelitnu DNA sadržavala je specifične početnice te 20 ng genomske DNA iz analiziranih vrsta. Kao pozitivna kontrola korištena je genomska DNA vrste *M. incognita*, a kao negativna kontrola reakcijska PCR smjesa bez genomske DNA.

##### R1 monomer

```
CAAAAAATTGCTGGTAGGCATATTTTATTTAAATTTTTCTTAAAAATTCCTACACGAATTTACACGAAGTGGCTAGATCTAGTA
          R1R
GTTACTCGAGCTGCTGCATCCATATCAGGTGAGATCTTCCAGAATTATCGATTTTAAAAAAGTTATCCATGGTTAATAAAGA
          R1L
GATAGCCATTTTTTT
```

##### R5 monomer

```
TAAGTTATTCAATAGTAGTGATGCCAAAAATGAAGTATATCGAAAATTATTAGGCACCTTATACACTTCAAAGCTTCAGGGCATC
          R5L          R8R
ACGAATTCGAATCCGATTTGGCTAATATATAGCTCATTCGAACAAAGCATAAAAAACTGTATCAGAATCCTTCTGCCTTTTTGTT
TCCAT
```

##### R7 monomer

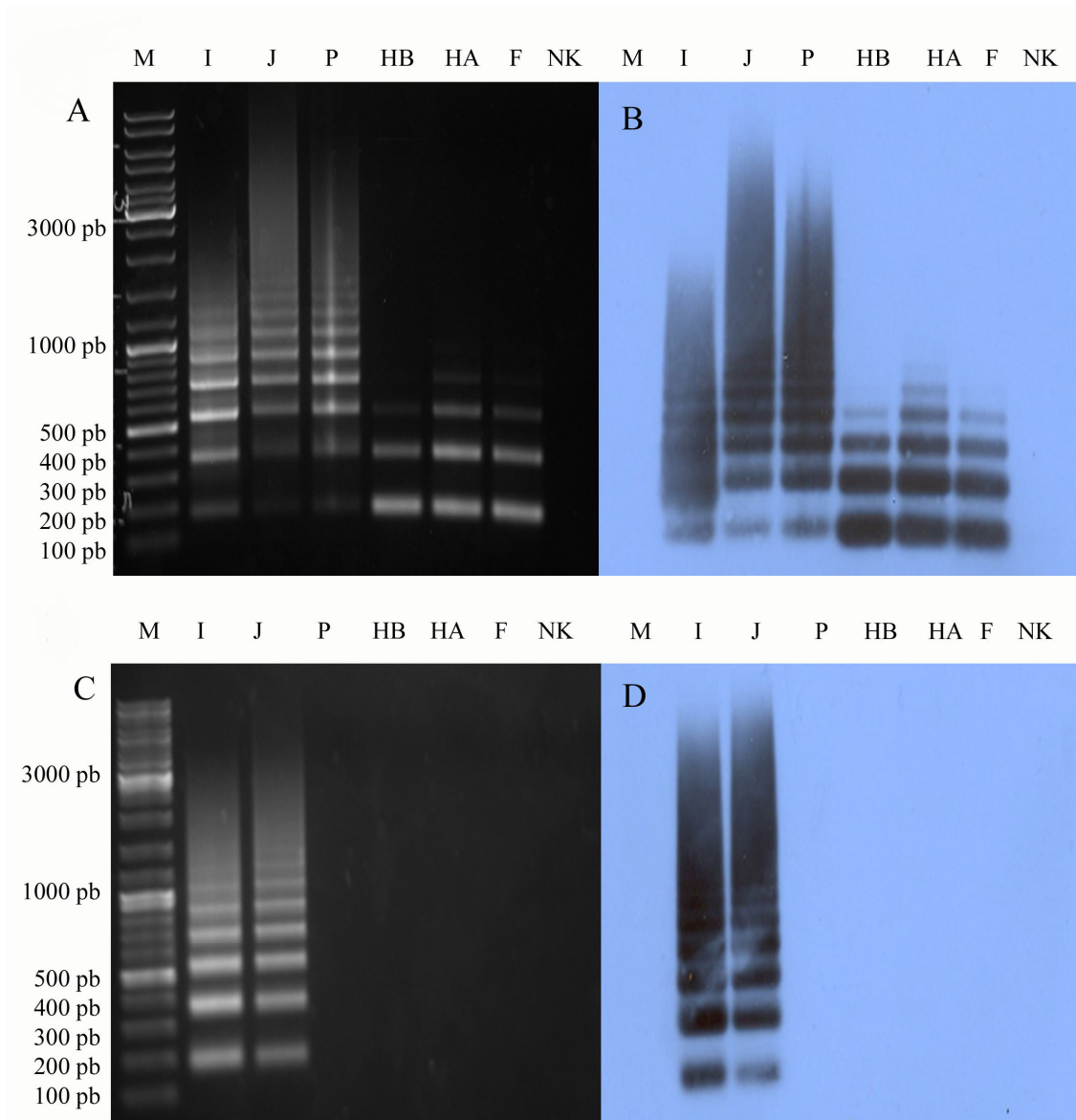
```
TTAGATTGATAGATTTGATTCTGTCAACTTATACGGTCGAATAACGATAAATAATCATAAAAAGAAATAAGTCCCTCTTAAATT
          R7L
TTGGTAATAGGGAATAACCGTTTGTAGACCATTATTTTCTATTCGGTCTATTTATGATAAATAAGAACTAAATTCATCTTAAAT
          R7R
TTTAGAAACAGTA
```

##### R8 monomer

```
AGTCTAAATGAAAACAAAATTAGATTTTTATTTACACACAATTGACATTATCTGCTTATTTAGTTTCGTAGAACTTTTATATC
GAATTCGAATACATTACTAGAATAAATA TGGCACTAATAATTTTGACG
          R8L          R8R
```

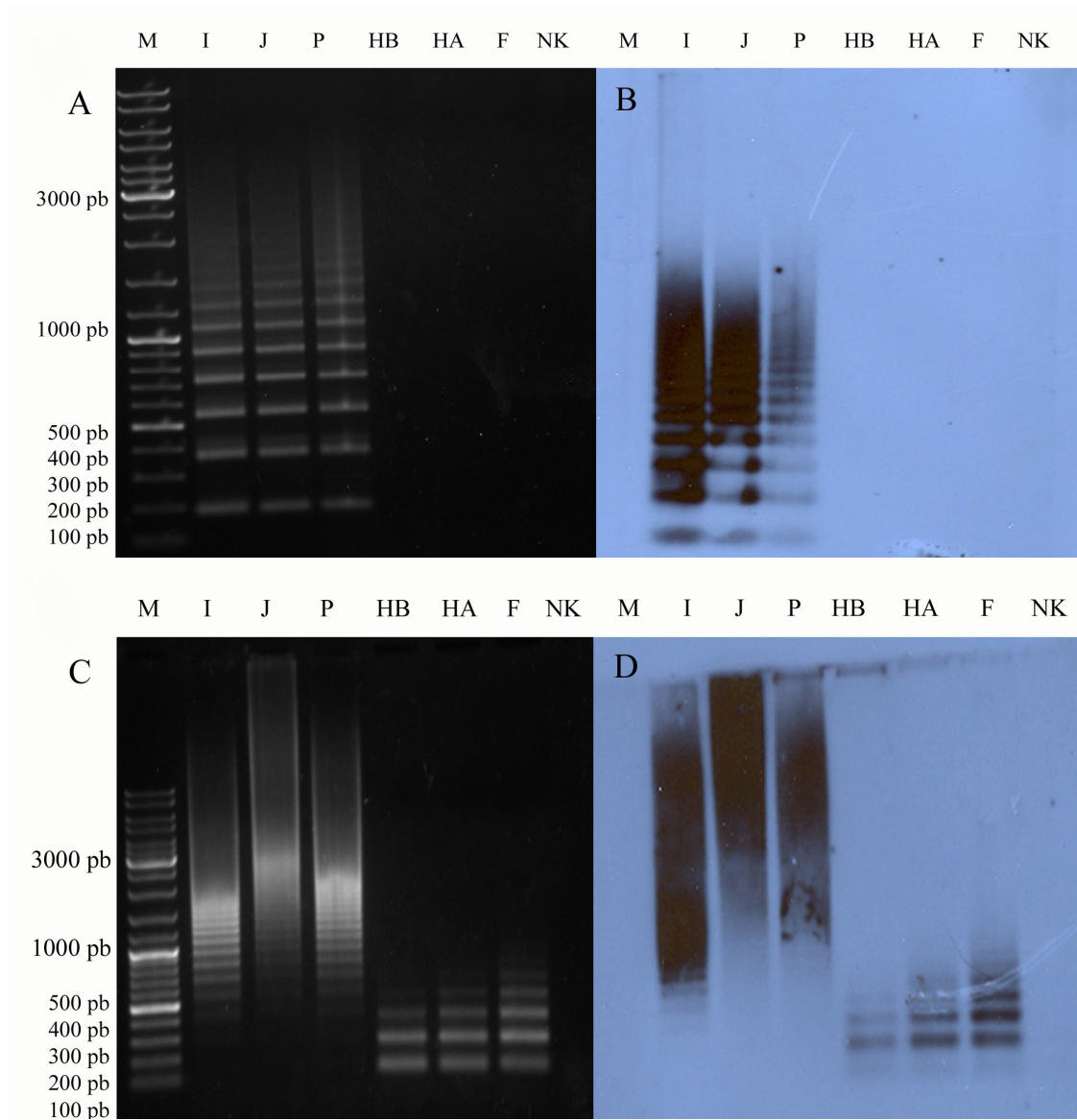
**Slika 4.9.** Konsenzusni sljedovi monomera R1, R5, R7 i R8 satelitnih DNA vrste *M. incognita*. Smještaj i naziv početnica je označen strelicama ispod DNA sljedova.

Gel elektroforezom produkata PCR reakcije s početnicama specifičnim za satelitnu DNA R1 (Slika 4.10.) i R8 (Slika 4.11.) utvrđeno je postojanje satelitne DNA R1 i R8 u svim testiranim vrstama. Hibridizacijskom analizom po Southernu pri strogim uvjetima hibridizacije (68°C) dokazano je da se radi o sljedovima koji su vrlo slični izvornoj R1 (Slika 4.10.) odnosno R8 (Slika 4.11.) satelitnoj DNA iz vrste *M. incognita*. U slučaju pretraživanja genoma sa satelitnom DNA R8 u vrstama *M. incognita*, *M. javanica* te *M. paranaensis* dobiveni su PCR produkti veće duljine što se pripisuje većem udjelu ove satelitne DNA u genomu koji je utjecao na dinamiku PCR reakcije. Gel elektroforezom produkata PCR reakcije s početnicama specifičnim za satelitni slijed R5 kao i hibridizacijskom analizom po Southernu pri strogim uvjetima hibridizacije utvrđeno je da je vrlo homologna satelitna DNA R5 osim u vrsti *M. incognita* prisutna još samo u vrsti *M. javanica*. Elektroforezom produkata PCR reakcije s početnicama specifičnim za satelitnu DNA R7 utvrđena je prisutnost ovog slijeda u vrstama *M. javanica* i *M. paranaensis*. Hibridizacijskom analizom po Southernu pri strogim uvjetima hibridizacije dobiven je snažan signal u slučaju *M. javanice*, ali je taj signal u slučaju *M. paranaensis* bio znatno slabiji, a količina dobivenih PCR produkata bila je vrlo slična. Slabiji signal pri strogim uvjetima hibridizacije može upućivati na novu varijantu satelitnog slijeda R7 ili na prevladavanje jedne od izvornih varijanti, s obzirom da strogi uvjeti hibridizacije podrazumijevaju više od 80% sličnosti u nukleotidnom slijedu.



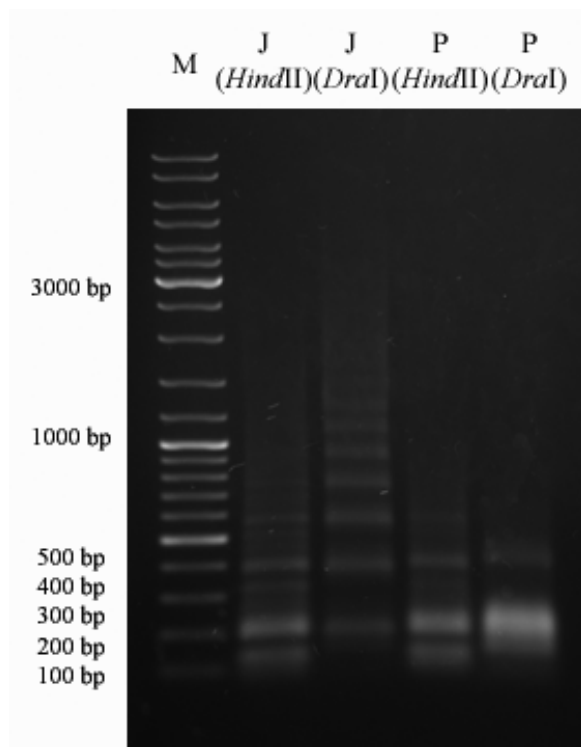
**Slika 4.10.** Elektroforetsko odvajanje produkata PCR-a dobivenih umnažanjem satelitnih DNA genomske DNA vrsta *M. incognita* (I-pozitivna kontrola), *M. javanica* (J), *M. paranaensis* (P), *M. hapla B* (HB), *M. hapla A* (HA) te *M. fallax* (F) sa specifičnim početnicama za satelitni slijed R1 (A) i R5 (C). Odgovarajuća hibridizacijska analiza po Southernu sa sondom na satelitni slijed R1 (B) i R5 (D). Linija NK predstavlja negativnu kontrolu (PCR reakcijsku smjesu bez genomske DNA). M je biljeg veličine odsječaka.





**Slika 4.11.** Elektroforetsko odvajanje produkata PCR-a dobivenih umnažanjem satelitnih sljedova genomske DNA vrsta *M. incognita* (I-pozitivna kontrola), *M. javanica* (J), *M. paranaensis* (P), *M. hapla B* (HB), *M. hapla A* (HA) te *M. fallax* (F) sa specifičnim početnicama za satelitni slijed R7 (A) i R8 (C). Odgovarajuća hibridizacijska analiza po Southernu sa sondom na satelitni slijed R7 (B) i R8 (D). Linija NK predstavlja negativnu kontrolu (PCR reakcijsku smjesu bez genomske DNA). M je biljeg veličine odsječaka.

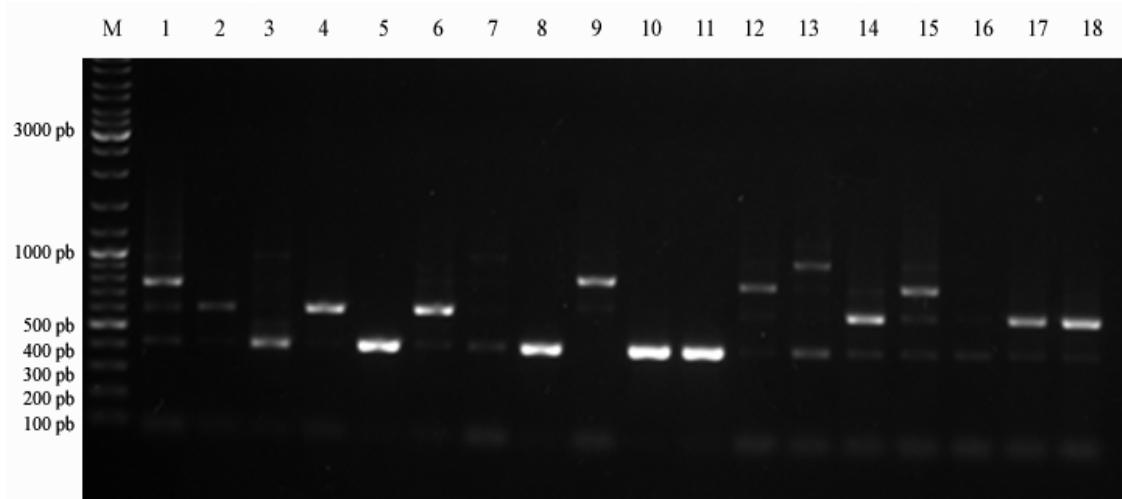
Produkti PCR reakcije s početnicama specifičnim za satelitni slijed R7 i genomskom DNA vrsta *M. javanica* i *M. paranaensis* podvrgnuti su cijepanju restriksijskim enzimima *Hind*II i *Dra*I kako bi se utvrdilo da li se radi o različitim varijantama satelitnog slijeda R7 ili prevladavanju jedne od izvornih varijanti. Odabrani su restriksijski enzimi *Hind*II i *Dra*I jer na temelju konsenzusnog slijeda R7 satelitna DNA sadrži restriksijska mjesta za ove enzime. Gel elektroforezom produkata restriksijske razgradnje dobiveni su različiti obrasci veličine odsječaka (u slučaju restriksijskog enzima *Dra*I razlika je izraženija) što govori u prilog novoj varijanti satelitnog slijeda R7 u *M. paranaensis*.



**Slika 4.12.** Elektroforetsko razdvajanje produkata restrikcije R7 satelitne DNA iz vrsta *M. javanica* (J) i *M. paranaensis* (P) restriksijskim endonukleazama *Hind*II i *Dra*I. M je biljeg za određivanje veličine odsječaka.

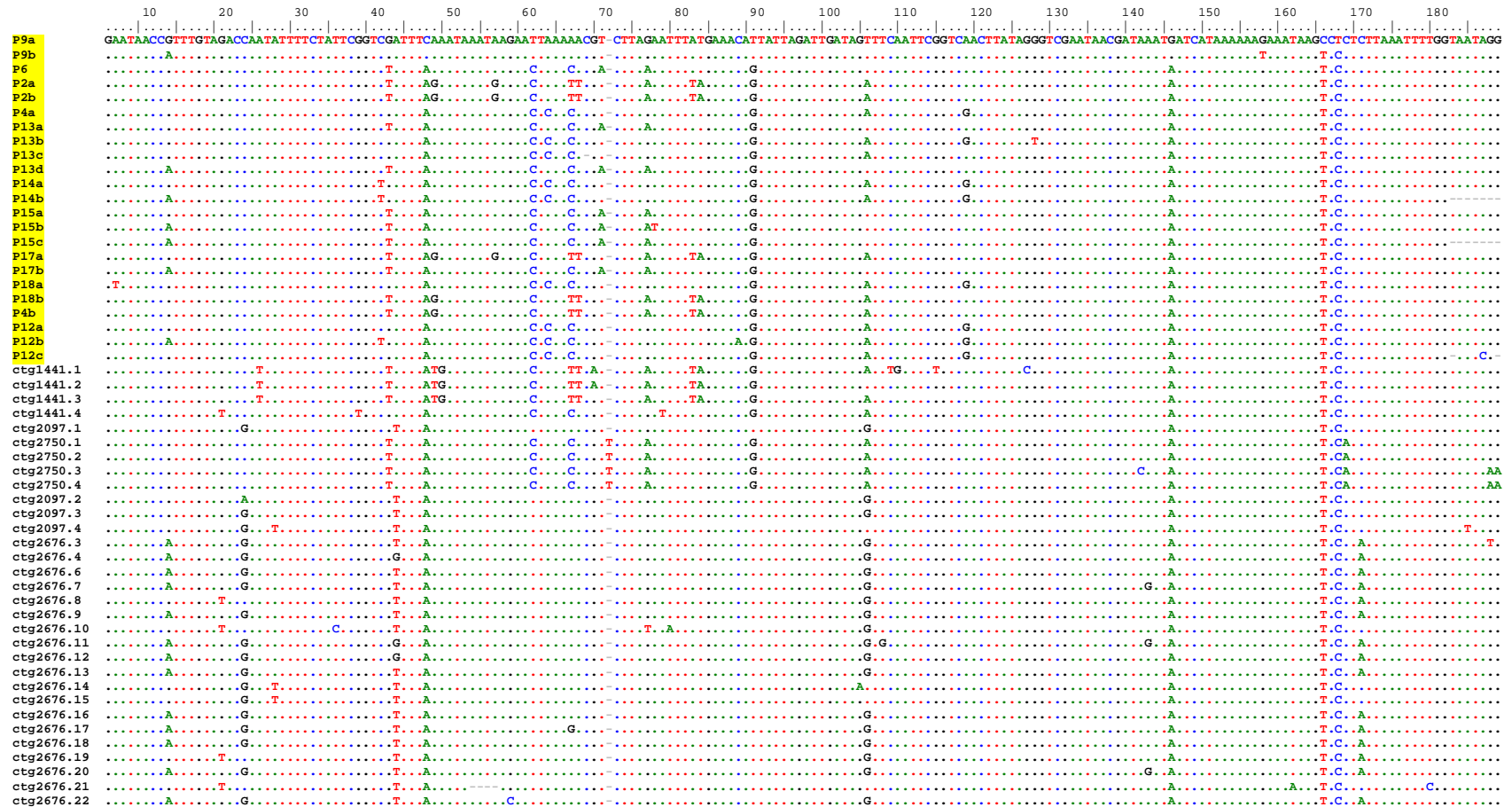
Produkti PCR reakcije s početnicama specifičnim za satelitnu DNA R7 umnoženi na genomskoj DNA vrste *M. paranaensis* klonirani su u AT-vektor. Bakterijske kolonije podvrgnute su PCR-u na kolonijama s vanjskim (plazmidnim) početnicama M13 kako bi

se odredila veličina ugrađenih odsječaka (Slika 4.13.). Za sekvenciranje su odabrani veći odsječci pod rednim brojevima: 1,2,4,6,9,12,13,14,15,17,18.



**Slika 4.13.** Elektroforetsko odvajanje produkata PCR-a na kolonijama dobivenih umnažanjem ukoloniranih fragmenata M13 vanjskim (plazmidnim) početnicama. Za sekvenciranje su odabrani veći odsječci pod rednim brojevima: 1,2,4,6,9,12,13,14,15,17,18.

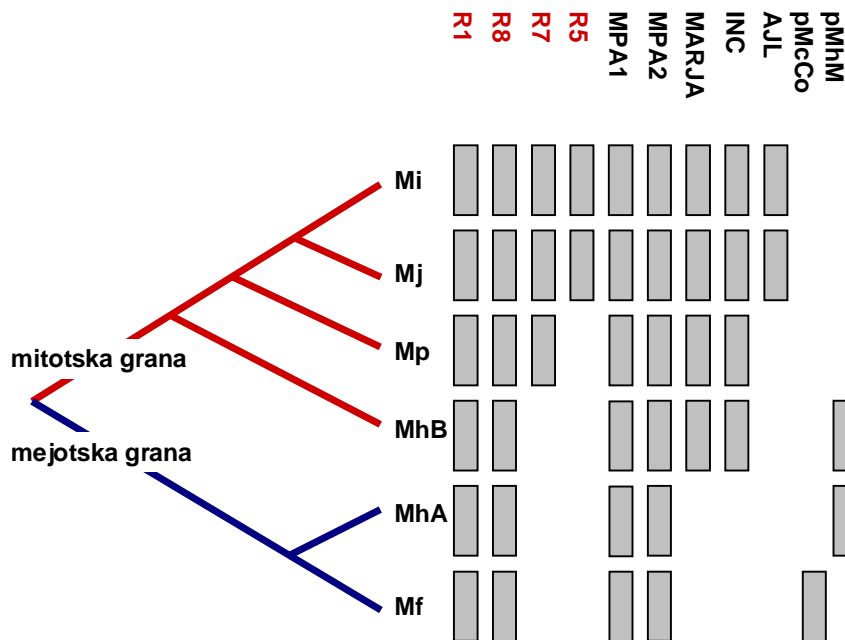
Sljedovi nukleotida dobiveni sekvenciranjem pGEM-T plazmida s ukloniranim produktima PCR-a na genomskoj DNA vrste *M. paranaensis* s početnicama specifičnim za R7 satelitnu DNA obrađeni su u DNASTar programu u smislu odstranjivanja plazmidnog nukleotidnog sljeda. Napravljeno je sravnjivanje R7 satelitne DNA iz vrste *M. paranaensis* zajedno s monomerima R7 satelitne DNA izlučenim iz *contig*-a (ctg1441, ctg2097, ctg2750, ctg2676) vrste *M. incognita* (Slika 4.14). Uočeno je da su sekvencirani monomeri jednaki nekim već postojećim varijantama R7 satelitne DNA izlučenih iz ctg1441, ctg2097 i ctg2750. Prema tome, slabiji hibridizacijski signal koji je dobiven Southern hibridizacijskom analizom pri strogim uvjetima hibridizacije (više od 80% nukleotidne sličnosti) posljedica je prevladavanja jedne već izlučene varijante u genomu vrste *M. paranaensis*, a ne postojanja nove varijante.



**Slika 4.14.** Usporedba pojedinačnih monomera R7 satelitne DNA dobivenih izdvajanjem iz *contig*-a (ctg1441, ctg2097, ctg2750, ctg2676) i sekvenciranih produkata PCR-a s početnicama specifičnim za satelitnu DNA R7 (označeno žutom podlogom). Označene su promjene u pojedinačnim klonovima s obzirom na konsensusni slijed, (-) označava delecije u slijedu

### 4.3. USPOREDBA PRISUTNOSTI NOVIH I VEĆ OPISANIH SATELITNIH DNA U VRSTAMA RODA *Meloidogyne*

Kako bi se dobile informacije o evoluciji satelitne DNA potrebno je istražiti prisutnost određenih satelitnih sljedova u genomima bliskih vrsta. Vrste roda *Meloidogyne* međusobno dijele "biblioteku" satelitnih DNA koju sačinjavaju već opisane satelitne DNA: MPA1, MPA2, MARJA, INC, AJL, pMcCo i pMhM (Meštrović i sur., 2005, 2006a, 2006b, 2009; Castagnone-Sereno i sur., 1998; Piotte i sur., 1994) kao i novoopisane satelitne porodice R1, R5, R7 i R8 (Slika 4.15.). Satelitna DNA R1 i R8 prisutna je u svim proučavanim vrstama te se ponaša kao i već opisane porodice MPA1 i MPA2. Satelitna porodica R5 prisutna je u mitotskim partenogenetskim vrstama *M. incognita* i *M. javanica* isto kao i već opisana porodica AJL. Prisutnost R7 porodice koja je prisutna u mitotskim partenogenetskim vrstama *M. incognita*, *M. javanica* i *M. paranaensis* nije ranije zabilježena niti u jednoj već opisanoj satelitnoj porodici. Niti jedna od novoproučenih satelitnih porodica nije imala distribuciju među vrstama roda *Meloidogyne* kao već opisane satelitne DNA INC, pMcCo i pMhM.



Slika 4.15. Distribucija novokarakteriziranih satelitnih DNA (crveno označene) u usporedbi s već opisanim među vrstama roda *Meloidogyne* (Mi-*M. incognita*, Mj-*M. javanica*, Mp-*M. paranaensis*, MhB-*M. hapla* B, MhA-*M. hapla* A, Mf-*M. fallax*).

## **5. RASPRAVA**

Iznimna raznolikost satelitnih DNA u nukleotidnom slijedu, složenosti, udjelu u genomu, kao i postojanje velikog broja različitih satelitnih DNA u jednom genomu, onemogućava direktno pripisivanje funkcije ovakvim uzastopno ponovljenim sljedovima. Unatoč velikom broju studija satelitnih DNA na različitim modelnim organizmima izravni dokazi o njihovoj ulozi i evolucijskim mehanizmima još uvijek nedostaju. Većina zaključaka o evolucijskim mehanizmima nastajanja, širenja i mijenjanja ovih slijedova u genomu još uvijek počiva na parcijalnim zaključcima u nedostatku izravnih eksperimentalnih dokaza (Plohl i sur., 2008). Poznato je da se evolucija satelitnih DNA odvija dvostupanjskim procesom nazvanim *molecular drive* koji se sastoji od homogenizacije mutacija među članovima porodice te fiksacije između grupe reproduktivno povezanih jedinki (Dover 1982, 1986). Velika većina istraživanja provedena je na organizmima s monocentričnim kromosomima pa tako i studije evolucije satelitnih DNA prema modelu "biblioteke". Malo je činjenica poznato o načinima fiksacije i dinamici "biblioteke" u partenogenetskih organizama s holocentričnim kromosomima poput vrsta roda *Meloidogyne*.

Kako je genom vrste *M. incognita* sekvenciran 2008. godine (Abad i sur., 2008) omogućena je izravnija analiza ovih sljedova u genomima oblića korjenovih kvržica. Metode koje omogućuju pronalaženje novih satelitnih DNA u sekvenciranim genomima i njihovu detaljnu analizu doprinose stvaranju kompletne slike o strukturi i evoluciji ovih sljedova u genomu pa tako i poimanju genoma u cjelini.

U slučaju uzastopno ponavljajućih sljedova *shotgun* metoda sekvenciranja kojom je sekvenciran genom vrste *M. incognita* ima mnoga ograničenja, od problema kloniranja ponavljajućih sljedova s visokim udjelom A i T nukleotida, pa do problema automatskog slaganja (engl. *assembly*) uzastopno ponavljajućih sljedova. Objektivno pitanje koje se postavlja u slučaju *shotgun* sekvenciranja i slaganja ponovljenih sljedova jest da li ovakva metoda daje vjerodostojne rezultate o strukturi ponovljenih sljedova u genomu. Pretragom sekvenciranog genoma vrste *M. incognite* s INC satelitnom DNA izoliranom ranije iz ove vrste pronađeno je pet različitih *contiga*-a koji sadrže navedenu satelitnu DNA. Svrnjenje svih monomera iz *contig*-a nije pokazalo značajniju divergenciju među monomernim sljedovima što upućuje na zaključak da se definitivno radi o jednoj porodici satelitne DNA. Nadalje, analiza varijabilnosti monomera među različitim *contig*-zima

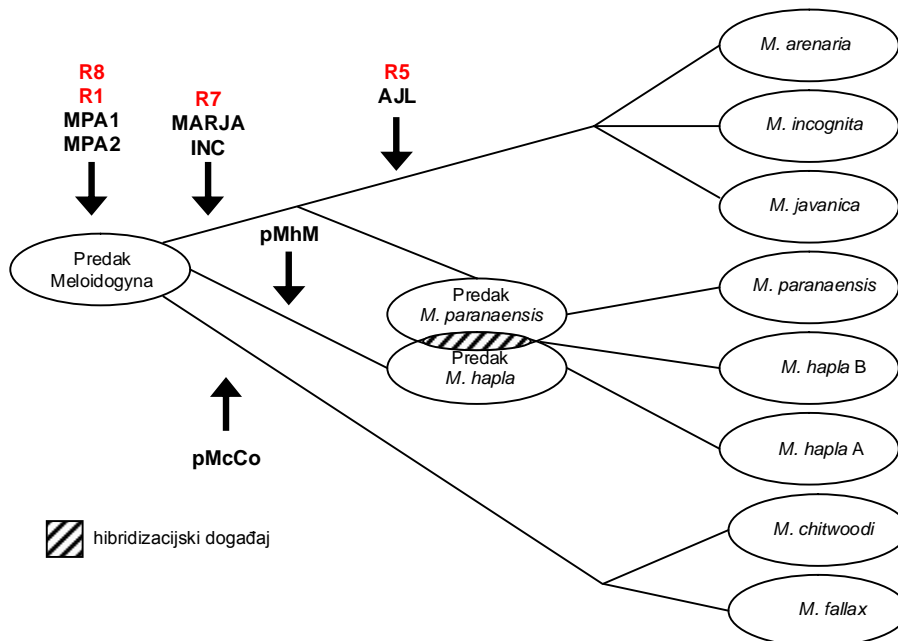
pokazala je veću varijabilnost ako su analizu uzeti svi monomeri od varijabilnost monomera unutar jednog *contig*-a. Ovakva sličnost monomera u nizu može ukazivati na homogenizacijske procese koji djeluju na razini niza i djelotvorniji su među monomerima koji se nalaze fizički bliže. Međutim najvažnije pitanje koje se može postaviti iz ovih analize je da li su *contig*-zi izlučeni iz genoma nakon automatskog slaganja stvarni nizovi ili se radi o artefaktima programa koji nije usmjereno konstruiran za obradu uzastopno ponovljenih sljedova. S druge strane, veliki broj INC satelitnih monomera se nalazi u bazi *unplaced reads* koja uključuje slijedove koji nisu mogli biti definirani automatskim slaganjem. Zaključak gore navedenih analiza jest da se podaci o uzastopno ponavljajućim slijedovima dobiveni *shotgun* metodom sekvenciranja i automatskim slaganjem moraju nadopuniti dodatnim analizama. Za detaljniji uvid strukture ovih slijedova u genomu neophodno je provesti daljnje sekvenciranje klonova iz BAC biblioteke, zatim njihovu RE analiza i rekloniranje BAC-ova.

Nadalje, FISH analizom genoma sondom specifičnom za INC satelitnu DNA uočena je lokalizacija signala na jednom ili dva mjesta što govori u prilog smještaju INC satelitne DNA na jednom ili dva kromosoma. Iz ovoga se može zaključiti da INC satelitna DNA s 3 %-tnim udjelom u genomu definitivno nije jedini posrednik u centromernoj funkciji holocentričnih kromosoma (ako uopće jest posrednik) s obzirom da pokazuje smještaj samo na jednom ili dva kromosoma.

Do sada je opisano sedam satelitnih porodica u genomima vrsta roda *Meloidogyne*; (Meštrović i sur., 2005, 2006a, 2006b, 2009; Castagnone-Sereno i sur., 1998, Piotte i sur., 1994). Pretraživanjem sekvenciranog genoma vrste *M. incognita* izlučena su četiri nova satelitna slijeda (R1, R5, R7 i R8). Izlučene satelitne DNA ne razlikuju se od ranije opisanih po duljini monomera (~170 pb), udjelu A i T nukleotida (62-70%) te nukleotidnoj varijabilnosti monomera već samo po udjelu u genomu koji je izrazito mali (<0,1%). Nizak udio u genomu najvjerojatniji je razlog zbog kojeg navedene satelitne porodice nisu ranije otkrivene, već su uočene tek nakon analize sekvenciranog genoma vrste *M. incognita*. Pretraživanjem genoma mitotskih partenogenetskih vrsta *M. javanica*, *M. paranaensis*, *M. hapla B* te mejotskih parenogenetskih vrsta *M. hapla A* i *M. fallax* na prisutnost novih satelitnih DNA određen je potpuniji satelitski profil navedenih vrsta koji je diskutiran u okvirima poznatih



filogenetskih odnosa. Pretraživanje genoma srodnih vrsta roda *Meloidogyne* nedvojbeno je pokazalo da se radi o evoluciji satelitnih sljedova prema modelu "biblioteke" (Meštrović i sur., 2006; Meštrović i sur., 2009). U ovom radu nadopunjeni su rezultati raspodjele satelitnih DNA u ovim vrstama uključujući i analizu novootkrivenih satelitnih DNA dobivenih pretraživanjem sekvenciranog genoma vrste *M. incognita*. U prijašnjim radovima utvrđeno je da satelitne DNA iz "biblioteke" vrsta roda *Meloidogyne* ostaju sačuvane u nukleotidnom slijedu. I rezultati ovog rada dokazuju isto. Naime kloniranje i sekvenciranje R7 satelitne DNA iz vrste *M. paranaensis* pokazalo je usporedbom s R7 satelitnom DNA iz vrste *M. incognita* da se radi o potpuno sačuvanoj satelitnoj DNA pri čemu je jedino udio varijanti monomera u različitim genomima oscilirao.



**Slika 5.1.** Pretpostavljeni evolucijski razvoj vrsta roda *Meloidogyne* temeljen na distribuciji satelitnih DNA (strelice označavaju porijeklo i distribuciju satelitnih DNA). Crveno su označene satelitne DNA koje su analizirane u ovom radu.

Može se zaključiti da analize monomernih nukleotidnih sljedova među srodnim vrstama roda *Meloidogyne* nisu filogenetski informativne, dok se analiza njihove razdiobe među vrstama pokazala informativnom.

Nove satelitne DNA R1 i R8 zajedno s prije analiziranim MPA1 i MPA2 pojavljuju se najvjerojatnije u pretku svih vrsta roda *Meloidogyne* te su do danas ostale prisutne u svim

promatranim vrstama. Nova satelitna DNA R7 zajedno s prije analiziranima MARJA i INC pojavljuje se kasnije na evolucijskoj skali te je prisutna samo u mitotskim partenogenetskim vrstama. R5 porodica pojavljuje se najkasnije te je prisutna samo u srodnim vrstama *M. incognita*, *M. javanica* i *M. arenaria*. Grupiranje ovih vrsta je nedvojbeno pokazano i na temelju filogenetskih analiza s drugim biljezima (npr. rDNA, Hugall i sur., 1999; ESTs, Scholl i Bird, 2005).

Na temelju ranije opisane razdiobe satelitnih DNA kao i razdiobe novih satelitnih DNA najteže je bilo obrazložiti evolucijski put vrsta *M. paranaensis* i *M. hapla* (soj A i B). Vrste *M. paranaensis* i *M. hapla* B spadaju u mitotske partenogenetske vrste za razliku od vrste *M. hapla* A koja je mejotska partenogenetska vrsta. Iako se *M. hapla* definira kao jedina vrsta (Triantaphyllou, 1985; Hugall i sur., 1994) s različitim načinom partenogenetskog razmnožavanja pa se s obzirom na to dijeli na soj A i B mnoge analize vezane za njihovo evolucijsko porijeklo i srodstvene odnose su oprečne i još nejasne. Rezultati filogenetskih analiza zasnovanih na cjelokupnoj ITS (engl. *internal transcribed spacer*) pokazale su rezultate gdje se *M. hapla* B grupira s mitotskim vrstama *M. arenaria*, *M. incognita* i *M. javanica* dok se *M. hapla* A grupira s mejotskim vrstama *M. chitwoodi* i *M. trifoliophila* (Hugall i sur., 1999). Ovi rezultati su u skladu s našim rezultatima te dovode u sumnju postavljenu hipotezu direktnog prijelaza sa fakultativne mejotske partenogeneze vrste *M. hapla* A u obligatornu mitotsku partenogenezu vrste *M. hapla* B. Nadalje, razdioba satelitnih DNA u vrstama *M. hapla* B i *M. paranaensis* ukazuje na mogući hibridizacijski događaj u predaka ovih dviju vrsta. Sve ovdje navedeno sugerira kompleksni evolucijski put opisanih vrsta koji vjerojatno uključuje hibridizacijske događaje. Slični događaji pretpostavljeni su i kod partenogenetskih vrsta guštera (Moritz, 1993) i poliploidnih apomiktičnih račića (Little i Hebert, 1997).

Može se zaključiti da u skladu s evolucijskim modelom "biblioteke", razdioba satelitnih DNA među srodnim vrstama može biti valjani biljeg za utvrđivanje filogenetskih odnosa. Nedavne studije kromosomske distribucije dvije satelitne DNA u vrstama porodice Bovidae (Chaves i sur., 2005) pokazale su da su ovakve analize informativne u filogenetskim okvirima nadopunjujući rezultate dobivene klasičnim filogenetskim biljezima (npr. mtDNA).

## **6. ZAKLJUČCI**

Na temelju bioinformatičkih analiza satelitnih DNA iz sekvenciranog genoma vrste *Meloidogyne incognita* te pretraživanjem genoma srodnih vrsta roda *Meloidogyne* na prisutnost novootkrivenih satelitnih DNA mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Varijabilnost monomera između pojedinih *contig*-a INC satelitne DNA veća je od varijabilnosti unutar pojedinog *contig*-a što upućuje na zaključak da homogenizacijski mehanizmi ovih uzastopno ponovljenih sljedova djeluju na razini niza. Naime pri tom se ne smije zaboraviti na činjenicu da metoda automatskog slaganja genoma pri slaganju ovakvih uzastopno ponovljenih sljedova može davati i nevjerodostojne rezultate te bi daljnje analize mogle potvrditi ili opovrgnuti gore izložen zaključak.
2. FISH analizom sa sondom specifičnom za INC satelitnu DNA dobivena je lokalizacija signala na jednom ili dva mjesta u kompletu kromosoma što upućuje na mogućnost da se INC satelitna DNA nalazi na jednom ili eventualno dva kromosoma.
3. R1, R5, R7 i R8 uzastopno ponovljeni sljedovi izlučeni iz sekvenciranog genoma vrste *M. incognita* ne pokazuju značajnu međusobnu homologiju niti homologiju s prije opisanim satelitnim sljedovima što dokazuje da se radi o novim satelitnim porodicama.
4. Novokarakterizirani uzastopno ponovljeni sljedovi imaju uobičajene karakteristike satelitnih DNA: duljinu monomera ~170 pb, visok AT sastav (62-70%) te nisku varijabilnost (0,7-4,5%). Zastupljenost u genomu je vrlo mala (<0,1%), što je vjerojatni razlog da do sada nisu bile otkrivene standardnim metodama kloniranja iz genoma.
5. Analize distribucije novih satelitnih DNA u genomima srodnih vrsta roda *Meloidogyne* pokazale su da se njihova evolucija odvija prema modelu "biblioteke". Ove analize su također podržale prije postavljenu hipotezu da razdioba satelitnih DNA među srodnim vrstama može biti valjani biljeg za utvrđivanje filogenetskih odnosa u srodnim organizmima te da u nekim slučajevima može razlučiti neke evolucijske događaje koji se klasičnim filogenetskim biljezima ne mogu.

## **7. LITERATURA**

Abad P i sur. (2008) Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnol* 26: 909-915.

Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 27: 573–580.

Castagnone-Sereno P, Leroy H, Semblat JP, Leroy F, Abad P, Zijlstra C (1998) Unusual and strongly structured sequence variation in a complex satellite DNA family from the nematode *Meloidogyne chitwoodi*. *J Mol Evol* 46: 225-233.

Castagnone-Sereno P, Leroy F, Abad P (2000) Cloning and characterization of an extremely conserved satellite DNA family from the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria*. *Genome* 43: 346-353.

Castagnone-Sereno P (2006) Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. *Heredity* 96: 282-289.

Chaves R, Guedes-Pinto H, Heslop-Harrison JS (2005) Phylogenetic relationships and the primitive X chromosome inferred from chromosomal and satellite DNA analysis in Bovidae. *Proc R Soc B* 272: 2009-2016.

Dernburg AF (2001) Here, There, and Everywhere: Kinetochore Function on Holocentric Chromosomes. *J Cell Biol* 153: F33-F38.

Dover GA (1982) Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299: 111-117.

Dover GA (1986) Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet* 2, 159-165.

Dover GA (2002) Molecular drive. *Trends Genet* 18: 587-589.

Fry K, Salser W (1977) Nucleotide sequences of HS-alpha satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. *Cell* 12: 1069-1084.

Glinka S, De Lorenzo D, Stephan W (2006) Evidence of gene conversion associated with a selective sweep in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* 23: 1869-1878.

Grewal SI, Elgin SC (2007) Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* 447: 399-406.

Hall SE, Kettler G, Preuss D (2003) Centromere Satellite From *Arabidopsis* populations: maintenance of conserved and variable domains. *Genome Res* 13: 195-205.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp* 41: 95-98.

Heinkoff S, Ahmad K, Malik HS (2001) The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* 293: 1098-1102.

Heitz E (1928) Das Heterochromatin der Moose. *I Jahrb Wiss Bot* 69: 762-818.

Hugall A, Moritz C, Stanton J, Wolstenholme DR (1994) Low, but strongly structured mitochondrial DNA diversity in root knot nematodes (*Meloidogyne*). *Genetics* 136: 903-192.

Hugall A, Stanton J, Moritz C (1999) Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomictic *Meloidogyne*. *Mol Biol Evol* 16: 157-164.

Janati A, Bergé JB, Triantaphyllou AC, Dalmaso A (1982) Nouvelles données sur l'utilisation des isoestérases pour l'identification des *Meloidogyne*. *Revue Nématol* 5:147-154.

Jepson SB (1987) Identification of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species). CAB International: Wallingford, UK.

Karszen G, Van Hoenselaar T (1998) Revision of the genus *Meloidogyne* Göldi, 1892 (Nematoda: Heteroderidae) in Europe. *Nematologica* 44: 713-788.

Kleckner N (1990) Regulation of transposition in bacteria. *Annu Rev Cell Biol* 6: 297-327.

Kubis S, Heslop-Harrison JS, Schmidt T (1997) A family of differentially amplified repetitive DNA sequences in the genus *Beta* reveals genetic variation in *Beta vulgaris* subspecies and cultivars. *J Mol Evol* 44:310-320.

Lander ES, Linton LM, Birren B *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.

Lichter i Cramer (1992) Non-isotopic *in situ* hybridization to metaphase and interphase nuclei. EMBO practical course.

Little TJ, Hebert PDN (1997) Clonal diversity in high arctic ostracodes. *J Evol Biol* 10: 233-252.



Marais M, Kruger JCW (1991) The cytogenetics of some South African root-knot nematodes (Heteroderidae: Nematoda). *Phytophylactica* 23: 267-272.

Meštrović N, Plohl M, Mravinac B, Ugarković Đ (1998) Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus*-experimental evidence for the library hypothesis. *Mol Biol Evol* 15: 1062-1068.

Meštrović N, Randig O, Abad P, Plohl M, Castagnone-Sereno, P (2005) Conserved and variable domains in satellite DNAs of mitotic parthenogenetic root-knot nematode species. *Gene* 362, 44-50.

Meštrović N, Castagnone-Sereno P, Plohl M (2006a) Interplay of selective pressure and stochastic events directs evolution of the MEL172 satellite DNA library in root-knot nematodes. *Mol Biol Evol* 23: 2316-2325.

Meštrović N, Castagnone-Sereno, P, Plohl M. (2006b) High conservation of the differentially amplified MPA2 satellite DNA family in parthenogenetic root-knot nematodes. *Gene* 376, 260-267.

Meštrović N, Plohl M, Castagnone-Sereno P (2009) Relevance of satellite DNA genomic distribution in phylogenetic analysis: A case study with root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne*. *Mol Phylogenet Evol* 50: 204-208.

Moran JV, Morrish TA (2005) Chromosomes: Noncoding DNA (Including Satellite DNA). U: *Encyclopedia of Life Science*. John Wiley & Sons

Moritz C (1993) The origin and evolution of parthenogenesis in the *Heteronotia binoei* complex: synthesis. *Genetica* 90: 269-280.

Mravinac B, Ugarković Đ, Franjević D, Plohl M (2005) Long inversely oriented subunits from a complex monomer of *Tribolium brevicornis* satellite DNA. *J Mol Evol* 60: 513-525.

Ohno S (1972) So much "junk" DNA in our genome. *Brookhaven Symp Biol* 23: 366-370.

Ohta T, Dover GA (1984) The cohesive population genetics of molecular drive. *Genetics* 108: 501–521.

Orgel LE, Crick FH (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284: 604-607.

Pathak D i sur., (2006) Chromosomal localization, copy number assessment, and transcriptional status of *BamHI* repeat fractions in water buffalo *Bubalus bubalis*. *DNA Cell Biol* 25: 206-214.

Piotte C, Castagnone-Sereno P, Bongiovanni M, Dalmaso A, Abad P (1994) Cloning and characterization of a two satellite DNAs in the low-C-value genome of the nematode *Meloidogyne* spp. *Gene* 138: 175-180.

Piotte C, Castagnone-Sereno P, Bongiovanni M, Dalmaso A, Abad P (1995) Analysis of a satellite DNA from *Meloidogyne hapla* and its use as a diagnostic probe. *Phytopathology* 85: 458-462.

Plohl M, Luchetti A, Meštrović N, Mantovani B (2008) Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene* 409: 72-82.

Pons J, Bruvo B, Petitpierre E, Plohl M, Ugarković Đ, Juan C (2004) Complex structural features of satellite DNA sequences in the genus *Pimelia* (Coleoptera: Tenebrionidae): random differential amplification from a common "satellite DNA library". *Heredity* 92: 418-427.

Price AL, Jones NC, Pevzner PA (2005) De novo identification of repeat families in large genomes. *Bioinformatics*. 21: 351–358.

Randing O, Bongiovanni M, Carneiro RMDG, Sarah JL, Castagnone-Sereno P (2002) A species-specific satellite DNA family in the genome of the coffee root-knot nematode *Meloidogyne exigua*: application to molecular diagnostic of the parasite. *Mol Plant Pathol* 3: 431-437.

Rojas AA i sur. (2000) Hammerhead-mediated processing of satellite pDo500 family transcripts from *Dolichopoda* cave crickets. *Nucleic Acid Res* 28: 4037-4043.

Rosandić M, Paar V, Basar I (2003) Key-string segmentation algorithm and higher-order repeat 16mer (54 copies) in human alpha satellite DNA in chromosome 7. *Journal Theor Biol* 221(1):29-37.

Rozas J, Rozas R (1999) DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15:174–175.

Smith GP (1976) Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* 191: 528-535.

Stephan W (1986) Recombination and the evolution of satellite DNA. *Gene Res* 47(3): 167-174.

Scholl EH, Bird DMcK (2005) Resolving tylenchid evolutionary relationships through multiple gene analysis derived from EST data. *Mol Phylogenet Evol* 36: 535-545.

Szybalski W (1968) Use of cesium sulfate for equilibrium density gradient centrifugation. *Methods Enzymol* 12B: 330-360.

Triantaphyllou AC (1966) Polyploidy and reproductive patterns in the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *J Morphol* 118: 403-413.

Triantaphyllou AC (1983) Cytogenetic aspects of nematode evolution. U: Stone AR, Platt HM, Khalil LF (ur) *Concepts in Nematode Systematic*. Academic Press: London. pp 55-71.

Triantaphyllou AC (1985) Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. U: Sasser JN, Carter CC (ur) *An Advanced Treatise on Meloidogyne*, Vol. 1. North Carolina State University Graphics: Raleigh. pp 113-126.

Ugarković Đ, Plohl M (2002) Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. *EMBO J*. 21: 5955-5959.

Van der Beek JG, Los JA, Pijnacker LP (1998) Cytology of parthenogenesis of five *Meloidogyne* species. *Fundam Appl Nematol* 21: 393-399.

Zijlstra C, Donkers-Venne DTHM, Fargette M (2000) Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2: 847-853.