

Raznolikost, evolucijski odnosi i uloga proteina SSB, DnaB i DnaG u bakterijama roda 'Candidatus Phytoplasma'

Brkić, Doris

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:592564>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doris Brkić

**Raznolikost, evolucijski odnosi i uloga
proteina SSB, DnaB i DnaG u bakterijama
roda '*Candidatus Phytoplasma*'**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doris Brkić

**Diversity, evolutionary relationships and role
of SSB, DnaB and DnaG proteins in bacteria
from genus '*Candidatus Phytoplasma*'**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije (mag. biol. mol.).

ZAHVALE

Zahvaljujem se obitelji i prijateljima na podršci tijekom studiranja. Posebno se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Martini Šerugi Musić na pomoći i podršci prilikom izrade ovog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Raznolikost, evolucijski odnosi i uloga proteina SSB, DnaB i DnaG u bakterijama roda '*Candidatus Phytoplasma*'

Doris Brkić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*' su bakterije bez stanične stijenke koji nastanjuju floem biljaka i kukce-vektore, a nije ih moguće uzgajati u čistoj kulturi in vitro. Njihovi genomi su mali i reducirani, no često bogati ponavljajućim sljedovima koji mogu biti organizirani u potencijalne mobilne jedinice (*potential mobile unit*; PMU). Geni koje ovi elementi nose mogu biti prisutni u više kopija u genomu, a neki od njih su geni *ssb*, *dnaB* i *dnaG* koji kodiraju za proteine replisoma. Napravljena je filogenetska analiza nukleotidnih i proteinskih sekvenci gena *ssb*, *dnaB* i *dnaG* iz uzoraka sekvenciranih u ovom radu preuzetih iz sekvenciranih i anotiranih genoma bakterija roda '*Ca. Phytoplasma*', *Acholeplasma* i *Spiroplasma* iz NCBI baze podataka. Analiza je pokazala da su se u slučaju sva tri istraživana gena sekvence koje pripadaju PMU dijelovima genoma izdvojile od drugih sekvenci što upućuje na njihovu neovisnu evoluciju tijekom horizontalnog prijenosa kroz različite vrste fitoplazmi. Gen *ssb* kod fitoplazmi nalazi se kao izvorna kopija u genomu te kao geni s drugačijim evolucijskim porijeklom na PMU elementima, dok su kod gena *dnaB* i *dnaG* sekvence na PMU nastale kao kopije gena iz stabilnog dijela genoma. Gen *dnaB* razdvojio se na dvije velike skupine koje odgovaraju varijantama gena *dnaB1* i *dnaB2*, a samo varijanta gena *dnaB1* sadržava sekvence koje pripadaju PMU elementima. Iz svega navedenog proizlazi da je uloga višestrukih kopija ovih gena u genomima fitoplazmi u povećanju plastičnosti njihovog genoma kako bi bile sposobne za nastanjivanje različitih domaćina i životnih uvjeta.

(37 stranica, 13 slika, 6 tablica, 33 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: evolucija, replisom, nestabilnost genoma, horizontalni prijenos gena, potencijalna mobilna jedinica, biljni patogen, sekvenciranje

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Ocjenitelji:

izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

v. pred. dr. sc. Julija Erhardt

Rad prihvaćen: 15.09.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Diversity, evolutionary relationships and role of SSB, DnaB and DnaG proteins in bacteria from genus '*Candidatus Phytoplasma*'

Doris Brkić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bacteria of the genus '*Candidatus Phytoplasma*' are bacteria without a cell wall that inhabit the phloem of plants and insect vectors, and they cannot be grown in pure culture in vitro. Their genomes are small and reduced, but often rich in repetitive sequences that can be organized into potential mobile units (PMUs). The genes carried by these elements may be present in multiple copies in the genome, such as *ssb*, *dnaB*, and *dnaG* genes encoding replisome proteins. A phylogenetic analysis of the nucleotide and protein sequences of the *ssb*, *dnaB* and *dnaG* genes was performed on sequences obtained within this study as well as on samples taken from sequenced and annotated genomes of bacteria of the genus '*Ca. Phytoplasma*', *Acholeplasma* and *Spiroplasma* from the NCBI database. The analysis showed that in the case of all three investigated genes, the sequences belonging to the PMU parts of the genome were separated from other sequences suggesting their independent evolution during horizontal transfer through different strains of phytoplasmas. The *ssb* gene in phytoplasmas is found as the original copy in the genome as well as sequences with a different evolutionary origin on PMU elements, while *dnaB* and *dnaG* sequences on PMU elements were copied from the gene from a stable part of the genome. The *dnaB* gene has split into two large groups corresponding to the *dnaB1* and *dnaB2* gene variants, and only the *dnaB1* gene variant contains sequences belonging to the PMU elements. All the above suggests that the role of multiple copies of these genes on PMU elements is to increase genome plasticity to make phytoplasmas capable of inhabiting different hosts and living conditions.

(37 pages, 13 figures, 6 tables, 33 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: evolution, replisome, genome instability, horizontal gene transfer, potential mobile unit, plant pathogen, sequencing

Supervisor: Assoc. Prof. Martina Šeruga Musić

Reviewers:

Assoc. Prof. Martina Šeruga Musić

Prof. Dunja Leljak-Levanić

senior lecturer PhD Julija Erhardt

Thesis accepted: 15.09.2021.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Fitoplazme	1
1.2. Genom fitoplazme	3
1.3. Replisom	4
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	6
3. MATERIJAL I METODE	7
1. Materijali.....	7
3.1.1. Lokacija prikupljanja uzoraka.....	7
3.1.2. Prikupljanje sekvenci iz NCBI baze podataka.....	7
3.2. Metode	8
3.2.1. Izrada početnica i umnažanje gena <i>ssb</i> , <i>dnaB</i> i <i>dnaG</i> iz ' <i>Ca. P. solani</i> '	8
3.2.1.1. Umnažanje gena <i>ssb</i>	9
3.2.1.2. Umnažanje gena <i>dnaB</i>	10
3.2.1.3. Umnažanje gena <i>dnaG</i>	11
3.2.2. Agarozna gel-elektroforeza.....	12
3.2.3. Pročišćavanje i sekvenciranje uzoraka	12
3.3. Filogenetska analiza sekvenci.....	13
3.3.1. Uređivanje sekvenci izoliranih gena	13
3.3.2. Izrada filogenetskih stabala.....	13
3.3.2.1. Izrada nukleotidnog i aminokiselinskog stabla gena <i>ssb</i> i proteina SSB	14
3.3.2.2. Izrada nukleotidnog i aminokiselinskog stabla gena <i>dnaB</i> i proteina DnaB	15
3.3.2.3. Izrada nukleotidnog i aminokiselinskog stabla gena <i>dnaG</i> i proteina DnaG.....	15
4. REZULTATI	16
4.1. Umnažanje gena <i>ssb</i> , <i>dnaB</i> i <i>dnaG</i> iz ' <i>Ca. P. solani</i> '	16
4.2. Filogenetska analiza	19
4.2.1. Nukleotidno i aminokiselinsko stablo gena <i>ssb</i> i proteina SSB.....	20
4.2.3. Nukleotidno i aminokiselinsko stablo gena <i>dnaG</i> i proteina DnaG.....	26
5. RASPRAVA	29
6. ZAKLJUČAK.....	33

7. LITERATURA	34
8. PRILOZI	
ŽIVOTOPIS.....	

KRATICE

'Ca. P.' – '*Candidatus* Phytoplasma'

PMU – potencijalna mobilna jedinica (eng. *potential mobile unit*)

SSB – protein koji se veće na jednolančanu DNA (eng. *single-stranded DNA-binding protein*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction*)

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

MEGA – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

ML - metoda maksimalne vjerojatnosti (*Maximum Likelihood*)

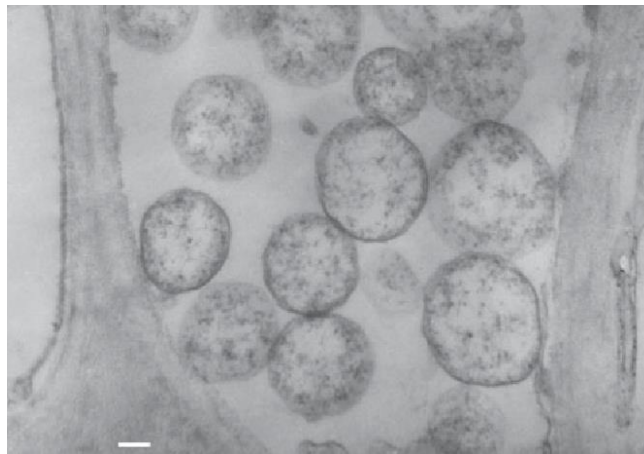
NJ – *Neighbor Joining* metoda

SNP - polimorfizam jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*)

1. UVOD

1.1. Fitoplazme

Bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*' (fitoplazme) su bakterije bez stanične stijenke, obligatni unutarstanični paraziti koji nastanjuju floem biljaka (Slika 1.1.) i kukce-vektore te ih nije moguće uzgajati u čistoj kulturi in vitro (Hogenhout i sur., 2008.). Kako nemaju staničnu stijenku, nemaju ni stalan oblik već ga mogu mijenjati što se naziva pleomorfnost, a uglavnom su okruglog oblika (Slika 1.1; Lee i sur., 2000.). Veličine su 200 nm do 800 nm te imaju širok spektar domaćina od kojih uzimaju hranjive tvari i metabolite koji im nedostaju. Zanimljivo je da im odgovaraju domaćini iz dva različita kraljevstva, biljnog i životinjskog, što upućuje na njihovu izuzetnu adaptivnu moć koja im osigurava preživljavanje u bitno različitim životnim uvjetima i okolišima. Kako su fitoplazme patogene bakterije, one uzrokuju preko 600 bolesti kod biljaka koje nastanjuju, a s jedne biljke na drugu se prenose unutar hemolimfe kukaca-vektora koji se hrane floemom biljaka (Bertaccini i Lee, 2018). Neki od simptoma biljnih bolesti uzrokovanih fitoplazmama su mali listovi, abnormalan razvoj cvjetova u strukture nalik listovima (filodija), ozelenjavanje biljnih dijelova koji inače nisu zeleni (virescencija), zatim veliki pupoljci te nekontrolirana proliferacija aksilarnih pupova što se naziva „vještija metla“ (Slika 1.2.; Hogenhout i sur., 2008.).



Slika 1.1. Fitoplazme u floemu *P. grandiflore*, marker = 300 nm. (Preuzeto iz rada Ajayakumar i sur., 2007.)

Fitoplazme uzrokuju probleme u agrikulturi jer često napadaju važne poljoprivredne kulture kao što su krumpir, voćke i orašasti plodovi te uzrokuju manji prinos plodova. Osim što ovakve bolesti biljaka uzrokuju ekonomske štete, u siromašnim državama dovode do nestašice hrane i materijala za gradnju poput palme kokosa (Strauss, 2009.; Bertaccini i sur., 2014.). Detaljnijim istraživanjem fitoplazmi, njihovih genoma, epidemiologije i mehanizama prijenosa između domaćina cilj je pronaći lijek ili ograničiti širenje ovih zaraznih bolesti kako bi se u budućnosti izbjegle nedaće povezane sa manjkom zdravih poljoprivrednih kultura.



Slika 1.2. Simptomi biljnih bolesti uzrokovanih fitoplazmama. a) veliki pupoljci, b) filodija, c) virescencija, d) vještičja metla, e) mali listovi. (Preuzeto i prilagođeno sa www.flickr.com)

1.2. Genom fitoplazme

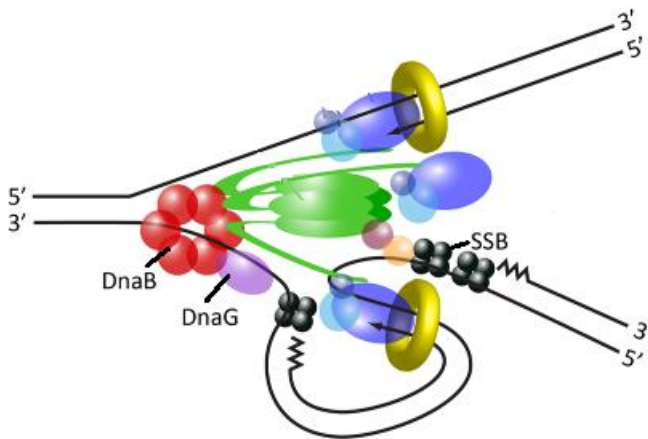
Fitoplazme su parazitski organizmi koji zbog svog načina života nemaju potrebu za proizvodnjom svih esencijalnih metabolita, već neke uzimaju od svojih domaćina. Tako je njihov genom malen i reduciran te ne sadrži gene za pojedine metabolite jer su oni s vremenom postali suvišni i izgubili se. Genom fitoplazmi je kromosom veličine između 0,53 - 1,35 Mpb (Marcone i sur., 1999.) ovisno o vrsti fitoplazme. Osim kromosoma, fitoplazme često imaju i nekoliko plazmida, iako kod '*Ca. P. mali*' nije pronađen nijedan plazmid (Kube i sur., 2012.). Do sada su u potpunosti sekvencirani i opisani genomi 6 različitih sojeva fitoplazmi, tri soja vrste '*Candidatus Phytoplasma asteris*': onion yellows M soj (OY-M; Oshima i sur., 2004.), aster yellows-witches broom soj (AY-WB; Bai i sur., 2006.) i maize bushy stunt phytoplasma soj (MBSP; Orlovskis i sur., 2017.), zatim genomi dva soja '*Candidatus Phytoplasma australiense*' PAa soj (Tran-Nguyen i sur., 2008.) i strawberry lethal yellows soj (SLY; Andersen i sur., 2013.), te genom vrste '*Candidatus Phytoplasma mali*' (Tran-Nguyen i sur., 2008.) koji je za razliku od većine drugih fitoplazmatskih kromosoma linearan. U Hrvatskoj je najzastupljeniji SA-1 soj '*Candidatus Phytoplasma solani*' koji je nedavno sekvenciran i anotiran (Šeruga Musić i sur., 2019.) te će ovo istraživanje uključivati izolaciju gena upravo iz ovog soja.

Fitoplazmatski genomi su često bogati klasterima ponavljajućih sljedova organiziranih u potencijalne mobilne jedinice (*potential mobile unit*; PMU). PMU su genetički elementi slični replikativnim transpozonomima i mobilnim elementima u drugim vrstama bakterija čija veličina iznosi oko 20kb, a sadrže gene potrebne za rekombinaciju i replikaciju u točno određenom redoslijedu (Bai i sur., 2006.). Kod '*Ca. P. solani*' u PMU pronađene su varijacije u redoslijedu tih gena, kao i geni s nepoznatim funkcijama koji ne dijele sličnost s drugim genima fitoplazmi (Šeruga Musić i sur., 2019.) iz tog razloga je ova vrsta interesantna za proučavanje. Tek od nedavno se PMU povezuju s nestabilnošću fitoplazmatskih genoma te se smatra da mobilni elementi bakterijama pomažu u prilagodbi na život u različitim uvjetima (Hogenhout i sur., 2008.; Kazlauskas i sur., 2018.) odnosno povećavaju im fitness. U slučaju fitoplazmi, pretpostavlja se da im PMU pomažu u nastanjanju različitih domaćina i adaptaciji na raznolike uvjete života te stoga ne čudi da se na elementima PMU fitoplazmi nalaze upravo geni za replisom koji omogućavaju replikaciju PMU elemenata kao i fitoplazmatskog genoma. Kako bi bakterije povećale svoju sposobnost preživljavanja u različitim životnim uvjetima one mogu međusobno izmjenjivati

genetički materijal procesom horizontalnog prijenosa gena te na taj način primiti korisni gen. Geni sa PMU elemenata nisu sekvencom identični genima iz stabilnog dijela genoma, a prijašnja istraživanja su pokazala da je upravo horizontalni prijenos gena s PMU čest između različitih vrsta fitoplazmi. Stoga je pretpostavka da je do promjena u sekvenci gena na PMU došlo tijekom horizontalnog prijenosa gena između različitih vrsta fitoplazmi (Šeruga Musić i sur., 2019.).

1.3. Replisom

Replisom bakterija čine proteini molekularne mašinerije potrebne za replikaciju bakterijske DNA kao što su proteini SSB (*single-stranded DNA-binding protein*), DnaB (DNA helikaza) i DnaG (DNA primaza). Prilikom replikacije bakterijskog genoma (Slika 1.2.), DNA se mora razmotati iz dvolančane u jednolančanu što čini DNA helikaza (DnaB), takva DNA mora ostati razmotana, a to osiguravaju proteini SSB koji se vežu na jednolančanu DNA i sprječavaju da lanci asociraju. Razmotana DNA je spremna za replikaciju pomoću DNA polimeraze, ali da bi replikacija mogla započeti potrebna je početnica koju stvara upravo DNA primaza (DnaG).



Slika 1.2. Grafički prikaz bakterijskog replisoma s označenim proteinima SSB, DnaB i DnaG. (Prilagođeno iz rada Beattie i Reyes-Lamothe, 2015.)

Geni koji se nalaze na elementima PMU fitoplazmi mogu biti prisutni u više kopija u genomu te su to često geni koji kodiraju upravo za proteine replisoma (Li i sur., 2010.; Mir-Sanchis i sur., 2016.). Prisutnost više kopija istovrsnih gena u genomu preduvjet je za njihovu evoluciju kroz postupne mutacije koje dovode do promjene proteinske strukture što dovodi do izmjene same funkcije proteina. Proteini replisoma posebno su važni jer se bez njih bakterije ne mogu dijeliti, a ako ih posjeduju u više kopija povećavaju mogućnost da dođe do korisnih mutacija poput ubrzavanja procesa replikacije ili omogućavanja replikacije pri različitim okolišnim uvjetima (Carlin, 2011.). Za ovo istraživanje odabrana su tri gena koji kodiraju za proteine SSB, DnaB i DnaG iz razloga što ih se može pronaći u više kopija u genomu te se nalaze u PMU dijelovima genoma koji su podložni horizontalnom prijenosu i mutacijama.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su odrediti raznolikost, brojnost i evolucijske odnose fitoplazmatskih gena za proteine fitoplazmi SSB, DnaB i DnaG te ih usporediti s onima srodnih bakterijskih rodova unutar razreda Mollicutes, a to su rodovi *Acholeplasma* i *Spiroplasma*. Isto tako, jedan od ciljeva je utvrditi imaju li kopije istraživanih gena koje se nalaze unutar elemenata PMU drugačije evolucijsko porijeklo od ostalih te, nadalje, pokušati razjasniti potencijalnu ulogu višestrukih kopija gena za proteine SSB, DnaB i DnaG u genomima fitoplazmi.

3. MATERIJAL I METODE

1. Materijali

3.1.1. Lokacija prikupljanja uzoraka

Kao materijal za umnažanje gena za proteine SSB, DnaB i DnaG koristila sam prethodno karakterizirane izolate fitoplazme '*Ca. P. solani*' iz kolekcije Zavoda za mikrobiologiju (Šeruga Musić, neobjavljeni rezultati). Izolati su porijeklom iz zaraženih biljaka koprive (47), vinove loze (IS8, SIZ), vinke (HR2, STOL) i lavande (DEP) te kukca-vektora *Hyalesthes obsoletus* Signoret (HO), a koji su prikupljeni u Hrvatskoj (HR2, IS8, 47, SIZ, HO), Srbiji (STOL) i Francuskoj (DEP) prije početka izrade mog diplomskog rada.

3.1.2. Prikupljanje sekvenci iz NCBI baze podataka

Ostatak nukleotidnih i aminokiselinskih sekvenci za gene *ssb*, *dnaB* i *dnaG* iz sekvenciranih i anotiranih genoma '*Ca. Phytoplasma*', *Acholeplasma* i *Spiroplasma* koje sam koristila za izradu filogenetskih stabala preuzela sam iz baze NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pretraživanjem pomoću alata *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Pronađene sekvence sam spremila u FASTA datoteku za daljnju analizu.

3.2. Metode

3.2.1. Izrada početnica i umnažanje gena *ssb*, *dnaB* i *dnaG* iz '*Ca. P. solani*'

Gene sam umnožila lančanom reakcijom polimerazom (PCR) uz korištenje ranije iskušanih i novonapravljenih ciklusa. Za umnažanje gena *ssb* koristila sam unaprijed napravljene početnice rpsF_POF1 (uzvodna početnica) i rpsF_POR1 (nizvodna početnica) za koje je poznato da umnažaju taj gen. Početnice za gene *dnaB* i *dnaG* sam konstruirala pomoću programa Geneious Prime 2021 (<https://www.geneious.com>) nakon čega sam ih poslala u tvrtku MacroGen Europe B.V. (Amsterdam, Nizozemska) na sintezu. Za umnažanje i sekvenciranje gena *dnaB* i *dnaG* napravila sam po dva seta početnica jer je, osim jednog para koji je korišten za umnažanje fragmenata, bio potreban još jedan par početnica za sekvenciranje umnoženih fragmenata gena pošto su ti fragmenti relativno dugi pa se mora koristiti više početnica za sekvenciranje. U tablici 3.1. prikazane su sve početnice koje su korištene za umnažanje gena *ssb*, *dnaB* i *dnaG* i sekvenciranje gena *dnaB* i *dnaG* te njihove temperature prijanjanja.

Tablica 3.1. Početnice za umnažanje gena *ssb*, *dnaB* i *dnaG* i sekvenciranje gena *dnaB* i *dnaG*.

gen	ime	smjer	sekvenca	duljina(nt)	T _m (°C)
<i>ssb</i>	rpsF_POF1	uzvodno	5'-GGTTATTATCGTTGGTTTAG-3'	20	54
<i>ssb</i>	rpsF_POR1	nizvodno	5'-AGTCTATTTTTGAGAGTACC-3'	20	54
<i>dnaB</i>	6F	uzvodno	5'-AGTTGGTGGAAGAGGCACTTA-3'	21	59,4
<i>dnaB</i>	33F	uzvodno	5'-TCCTTTGTGTCAAAAACATACGCA-3'	24	60,1
<i>dnaB</i>	1405R	nizvodno	5'-CTGATTTGTGTTTTAATGTCTGGCA-3'	25	60,9
<i>dnaB</i>	1520R	nizvodno	5'-GCGATAACCGTCTTGGCTTTC-3'	21	61,3
<i>dnaG</i>	156F	uzvodno	5'-TCCATCCCTTTTAGCGCCTT-3'	21	59,4
<i>dnaG</i>	397F	uzvodno	5'-ACAACAAGAACTATGACCCTAGA-3'	24	60,1
<i>dnaG</i>	1560R	nizvodno	5'-GCTAGACCCTGATGAGTATATCC-3'	23	62,9
<i>dnaG</i>	2393R	nizvodno	5'-TGGTCTTTTGAATGCCAGCTT-3'	21	57,4

3.2.1.1. Umnažanje gena *ssb*

Reakcijska smjesa za PCR za gen *ssb* (Tablica 3.2.) sadržavala je 12,5 µl G2 Colorless MMix 2x, 9 µl vode bez nukleaza, po 1 µl svake početnice rpsF_POF1 i rpsF_POR1 koncentracije 5 µM te 1,5 µl uzorka koncentracije 30 ng/µL. Uz 7 uzoraka HR2, IS8, 47, SIZ, HO, STOL, DEP, napravila sam i negativnu kontrolu (1,5 µl H₂O).

Tablica 3.2. Količine reagensa korištene za reakcijsku smjesu PCR-a za umnažanje gena *ssb* iz '*Ca. P. solani*'.

reagens	µl
G2 Colorless MMix 2x	12,5
voda bez nukleaza	9
početnica rpsF_POF1 (5 µM)	1
početnica rpsF_POR1 (5 µM)	1
Uzorak (30 ng/µL)	1,5
ukupna reakcijska smjesa	25

Uvjeti za PCR reakciju umnažanja gena *ssb* uz ove početnice iskušani su ranije te sam pretpostavljala da će se uz temperature prikazane u tablici 3.3. gen *ssb* uspješno umnožiti.

Tablica 3.3. PCR uvjeti za umnažanje gena *ssb* iz '*Ca. P. solani*'.

koraci PCR-a	vrijeme (min)	temperatura (°C)
Početna denaturacija	4	94
Denaturacija	1	94
Prijanjanje početnice na kalup	2	50
Sinteza komplementarnih lanaca DNA	3	68
Završno produljenje lanaca	7	68

3.2.1.2. Umnažanje gena *dnaB*

Reakcijska smjesa za PCR za gen *dnaB* (Tablica 3.4.) sadržavala je 12,5 μl 2x GoTaq® Green Master Mix-a, 7 μl vode bez nukleaza, po 2 μl svake početnice 33F i 1520R koncentracije 5 μM te 1,5 μl uzorka koncentracije 30 ng/ μL . Uz 7 uzoraka HR2, IS8, 47, SIZ, HO, STOL, DEP napravila sam i negativnu kontrolu gdje sam umjesto 1,5 μl uzorka dodala vodu. Iako sam napravila 2 para početnica (Tablica 3.1.), u ovoj reakciji iskoristila sam samo jedan par za umnažanje gena *dnaB*.

Tablica 3.4. Količine reagensa korištene za reakcijsku smjesu PCR-a za umnažanje gena *dnaB* iz '*Ca. P. solani*'.

reagens	μl
2x GoTaq® Green Master Mix	12,5
voda bez nukleaza	7
početnica 33F (5 μM)	2
početnica 1520R (5 μM)	2
uzorak (30 ng/ μL)	1,5
ukupna reakcijska smjesa	25

Kako sam početnice za gen *dnaB* tek konstruirala, morala sam odrediti uvjete PCR reakcije te sam koristila temperature nešto više od onih za umnažanje gena *ssb* kako bi temperatura prijanjanja početnica na kalup bila odgovarajuća (Tablica 3.5.).

Tablica 3.5. PCR uvjeti za umnažanje gena *dnaB* iz '*Ca. P. solani*'.

koraci PCR-a	vrijeme (min)	temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Početna denaturacija	4	95
Denaturacija	1	95
Prijanjanje početnice na kalup	2	55
Sinteza komplementarnih lanaca DNA	3	68
Završno produljenje lanaca	7	68

3.2.1.3. Umnažanje gena *dnaG*

Za umnažanje gena *dnaG* koristila sam jednake količine reakcijskih smjesa (Tablica 3.4.) te iste uvjete PCR reakcije (Tablica 3.5.) kao i za umnažanje gena *dnaB*. U ovom slučaju sam koristila drugačije početnice konstruirane za umnažanje gena *dnaG* 397F i 1560R koncentracije 5 μ M. Ovakvo umnažanje nije uspjelo, stoga sam napravila direktni pa ugniježđeni PCR, s vanjskim (156F i 2393R) i unutarnjim početnicama (397F i 1560R) koncentracija 5 μ M koristeći količine reakcijskih smjesa prikazanih u tablici 3.6. Uvjeti za direktnu i ugniježđenu PCR reakciju prikazani su u tablici 3.5., samo što sam kod direktnog PCR-a snizila temperaturu prijanjanja na 52 °C. Ni na ovaj način nisam uspjela dobiti umnoženi gen niti u jednom uzorku te sam dalje optimizirala PCR reakciju tako da sam koristila drugačije kombinacije istih početnica 156F-1560R i 397F-2393R uz količine reagensa prikazane u tablici 3.6. te uvjete PCR reakcije iz tablice 3.5.

Tablica 3.6. Količine reagensa korištene za reakcijsku smjesu PCR-a za umnažanje gena *dnaG* iz '*Ca. P. solani*'.

reagens	μl
2x GoTaq® Green Master Mix	12,5
voda bez nukleaza	10
početnica 397F (5 μ M)	1
početnica 2393R (5 μ M)	1
Uzorak (30 ng/ μ L)	0,5
ukupna reakcijska smjesa	25

3.2.2. Agarozna gel-elektroforeza

Nakon umnažanja svakog od tri gena, napravila sam elektroforezu na 1%-tnom agaroznom gelu kako bih utvrdila da je fragment odgovarajuće veličine doista umnožen u svim uzorcima. Za izradu 1%-tnog agaroznog gela otopila sam 350 mg agaroze u 35 ml TBE x0,5 puferu te sam smjesi dodala 0,7 µl SYBR™ Safe DNA *Gel Stain* (ThermoFischer Scientific, SAD) boje za vizualizaciju uzoraka na gelu. Prije nanošenja uzoraka s umnoženim genom *ssb* pomiješala sam 5 µl uzorka s 1 µl boje 6x TriTrack DNA *loading dye* (ThermoFisher Scientific, SAD) te sam u prvu jažicu dodala 8 µl markera 1 kb DNA *ladder* (ThermoFisher Scientific, SAD) također pomiješanog s 1 µl boje. Prilikom nanošenja 5 µl uzoraka s umnoženim fragmentima gena *dnaB* i *dnaG* nije bilo potrebno dodavati uzorcima boju pošto sam u PCR reakciji koristila 2x GoTaq® Green Master Mix koji je već sadržavao boju za elektroforezu. Markeri dodani na gel sa fragmentima gena *dnaB* i *dnaG* bili su jednaki kao i kod umnažanja gena *ssb*. Elektroforezu sam pokrenula na 150V u trajanju od 20 minuta, nakon čega sam fragmente u uzorcima vizualizirala pod UV svjetlosti na transiluminatoru te dokumentirala.

3.2.3. Pročišćavanje i sekvenciranje uzoraka

Prije slanja fragmenata DNA dobivenih umnažanjem metodom PCR na sekvenciranje, potrebno je bilo pročitati umnoženu DNA od suviška početnica i mogućih drugih fragmenata dobivenih nespecifičnim vezanjem početnica. Koristila sam metodu enzimatskog pročišćavanja uz reagens Illustra ExoProStar™ 1-Step (Cytiva, Marlborough, MA, SAD) gdje se na 5 µl uzorka dodaje 2 µl enzima te se takva smjesa 15 minuta zagrijava na 37 °C kako bi enzim pocijepao nespecifično umnožene fragmente, a zatim 15 minuta na 80 °C da se enzim inaktivira. Uzorke sa pročišćenom DNA označila sam barkodovima nalijepivši ih na Eppendorf tubice i poslala ih na određivanje primarne strukture DNA Sanger metodom u u komercijalni servis Genewiz (Leipzig, Republika Njemačka) zajedno s početnicama. Početnice koje sam slala uz umnožene fragmente gena *ssb* i *dnaB* bile su iste one koje sam koristila za njihovo umnažanje, rpsF_POF1 i rpsF_POR1 za gen *ssb* te 33F i 1520R za gen *dnaB*. Fragment gena *dnaG* bio je veći pa sam poslala tri početnice kako bi se uspio sekvencirati, a to su bile 397F, 1560R i 2393R. Kako bih dobila odgovarajuće aminokiselinske sekvence iz nukleotidnih, translatala sam sekvenciranu DNA pomoću internetske stranice *ExpASy – translate tool* (web.expasy.org/translate/).

3.3. Filogenetska analiza sekvenci

3.3.1. Uređivanje sekvenci izoliranih gena

Dobivene sekvence bilo je potrebno urediti i sastaviti što sam napravila u računalnom programu Geneious Prime 2021 (<https://www.geneious.com>). Svaki fragment sekvenciran je u oba smjera te je potrebno preklopiti oba lanca i pronaći konsenzus sekvencu. Stoga sam u program unijela i označila dobivene sekvence kao i referentnu sekvencu te odabrala opciju *Map to reference* kako bi se sekvence posložile u odnosu na referentnu sekvencu. Potom sam sekvence po potrebi ručno uredila iz razloga što se tijekom sekvenciranja ponekad očita netočni nukleotid koji se može pogrešno protumačiti kao polimorfizam jednog nukleotida (*single nucleotide polymorphism*, SNP) pa je bilo potrebno ispraviti te pogreške. Tako uređene sekvence sam spremila u format FASTA.

3.3.2. Izrada filogenetskih stabala

Filogenetska analiza se provodi na način da se uspoređuje međusobna sličnost nukleotidnih ili aminokiselinskih sekvenci gena ili proteina te se pretpostavlja da su one sekvence koje su sličnije ujedno i evolucijski povezanije tj. srodnije (Hillis, 1997.). Prvi korak analize je sravniti sekvence istog gena ili proteina izoliranog iz različitih vrsta bakterija kako bi se dobilo najbolje moguće sravnjenje koje uključuje dodavanje minimalnog broja nepodudarnosti (eng. *mismatch*), insercija, delecija i praznina (eng. *gap*) unutar sekvenci da bi one bile sravnjene. Prikupljene sekvence sravnila sam koristeći softver ClustalX verzija 2.1 (Larkin i sur., 2007.) te ga spremila u NEXUS formatu. Izradu filogenetskih stabala i evolucijsku analizu radila sam unutar MEGA-X verzija 10.2.2 (Tamura i sur., 2021.) softvera.

Dobivena sravnjenja u NEXUS obliku pretvorila sam u MEGA oblik datoteke kako bih napravila filogenetska stabla koristeći kriterij procjene metodom maksimalne vjerojatnosti (*Maximum Likelihood*, ML) koji računa najbolje stablo kao ono za koje su promatrani podatci najvjerojatniji s obzirom na pretpostavljeni model evolucije. U ovoj metodi početna stabla za heurističko pretraživanje računaju se automatski primjenom algoritama Neighbor-Join i BioNJ na matricu udaljenosti (eng. *pairwise distance matrix*) u kojoj je numerički zapisano sravnjenje. Modeli

evolucije tj. način na koji su se tijekom evolucije uvodile insercije, delecije i nepodudarnosti koje sam koristila bili su Tamura-Nei model (TN) koji matematički procjenjuje broj tranzicija i transverzija nukleotida po mjestu, kao i ukupni broj nukleotidnih supstitucija (Tamura i Nei, 1993.), te model korekcije Poissonove udaljenosti (PC) koja pretpostavlja jednakost stope supstitucije među mjestima i jednake frekvencije aminokiselina, a u isto vrijeme korigira višestruke supstitucije na istom mjestu (Zuckerkindl i Pauling, 1965.; *Poisson Correction (PC) distance*, 30.07.2021.).

Od početnih stabala softver odabere topologiju s najvećom vrijednošću log vjerojatnosti. Model sam odabrala na temelju procjene koju je napravio sam softver tako što je izračunao najtočnije stablo koje najpreciznije prikazuje odnose između sekvenci. Prilikom izrade većine stabala korišten je parametar diskretne gama raspodjele koja služi za modeliranje razlika u stopi evolucije među pozicijama (5 kategorija (+G)) kao i *Bootstrap* statistička analiza koja računa veličinu greške originalnog seta podataka tako da uzima podskupove iz originalnog seta podataka sa zamjenom (*with replacement*) i računa grešku za svaki od tih podskupova. Prosjek svih grešaka daje dobru procjenu ukupne greške prilikom izrade stabla iz izvornih podataka (Felsenstein, 1985.). Bootstrap vrijednost koju sam koristila prilikom izrade svakog stabla bila je 500.

3.3.2.1. Izrada nukleotidnog i aminokiselinskog stabla gena *ssb* i proteina SSB

Metodom maksimalne vjerojatnosti i uz upotrebu Tamura-Nei modela (Tamura i Nei, 1993.) dobivena je evolucijska povijest nukleotidnih sekvenci za gen *ssb*. U rezultatima je prikazano stablo s najvećom log vjerojatnošću (-7037,91). U ovu analizu uključeno je 58 nukleotidnih sekvenci jedna sekvenca manje nego kod proteinske analize, sekvenca „284 09 ssb1 FO393427“ je isključena iz razloga što objavljeni genom nije bio točno anotiran pa se nije moglo doći do nje. U konačnom skupu podataka bilo je ukupno 502 pozicije uz odabrani parametar *use all sites*.

Postupak određivanja evolucijske povijesti aminokiselinskih sekvenci proteina SSB dobivena je ML metodom i modelom Poissonove korekcije. U rezultatima je prikazano stablo s najvećom log vjerojatnošću (-4512,19). Diskretna gama raspodjela za 5 kategorija iznosi 1,8151. U ovu analizu uključeno je 59 aminokiselinskih sekvenci. U konačnom skupu podataka bilo je ukupno 178 pozicija.

3.3.2.2. Izrada nukleotidnog i aminokiselinskog stabla gena *dnaB* i proteina DnaB

Evolucijska povijest nukleotidnih sekvenci za gen *dnaB* dobivena je ML metodom i Tamura-Nei modelom. U rezultatima je prikazano stablo s najvećom log vjerojatnošću (-59377,74). Diskretna gama raspodjela za 5 kategorija iznosi 2,4230. U ovu analizu uključeno je 100 nukleotidnih sekvenci. U konačnom skupu podataka bilo je ukupno 1643 pozicije uz odabranu postavku *use all sites*.

Evolucijska povezanost aminokiselinskih sekvenci proteina DnaB dobivena je ML metodom i modelom Poissonove korekcije. U rezultatima je prikazano stablo s najvećom log vjerojatnošću (-39648,87). Diskretna gama raspodjela za 5 kategorija iznosi 3,1593. U ovu analizu uključeno je 104 aminokiselinskih sekvenci. U konačnom skupu podataka bilo je ukupno 572 pozicije.

3.3.2.3. Izrada nukleotidnog i aminokiselinskog stabla gena *dnaG* i proteina DnaG

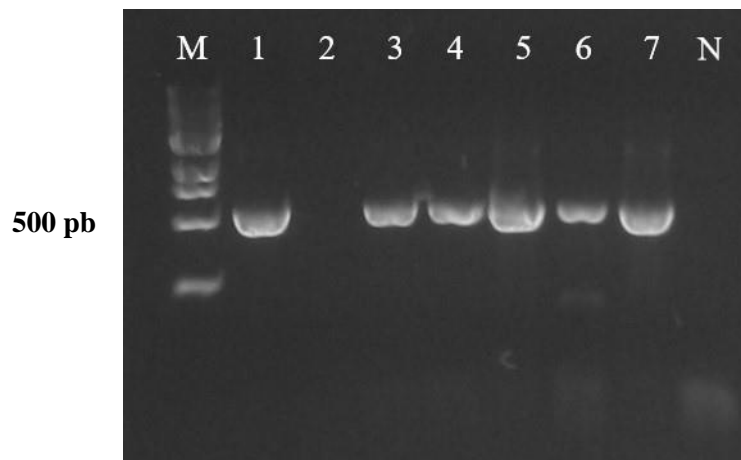
Evolucijska povijest nukleotidnih sekvenci za gen *dnaG* dobivena je ML metodom i Tamura-Nei modelom. U rezultatima je prikazano stablo s najvećom log vjerojatnošću (-41997,18). Diskretna gama raspodjela za 5 kategorija iznosi 1,8317. U ovu analizu uključeno je 56 nukleotidnih sekvenci. U konačnom skupu podataka bilo je ukupno 2023 pozicija uz odabranu postavku *use all sites*.

Evolucijska povezanost aminokiselinskih sekvenci proteina DnaG dobivena je ML metodom i modelom Poissonove korekcije. U rezultatima je prikazano stablo s najvećom log vjerojatnošću (-39648,87). Diskretna gama raspodjela za 5 kategorija iznosi 5,2753. U ovu analizu uključeno je 57 aminokiselinskih sekvenci, dok je u konačnom skupu podataka bilo ukupno 835 pozicija.

4. REZULTATI

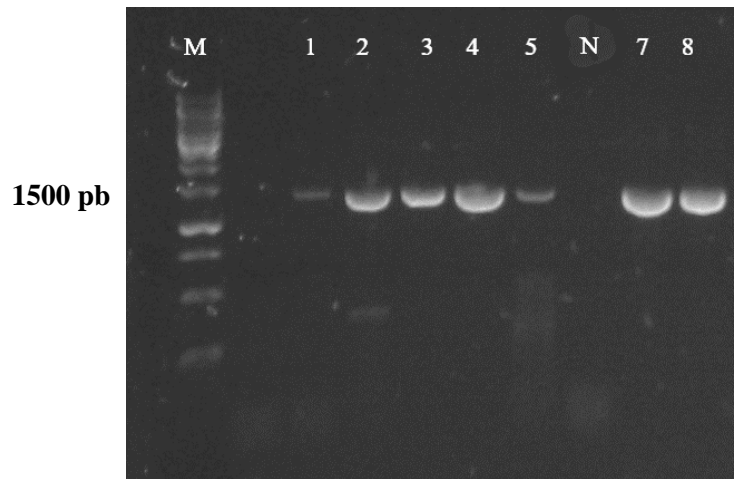
4.1. Umnažanje gena *ssb*, *dnaB* i *dnaG* iz '*Ca. P. solani*'

Prilikom umnažanja gena *ssb* iz uzoraka koristeći početnice rpsF_POF1 i rpsF_POR1, gen se umnožio i fragment je vidljiv na gelu (Slika 4.1.1.) u svim uzorcima osim kod uzorka IS8 (2) i kod negativne kontrole (N). Veličina fragmenta je oko 500 parova baza.



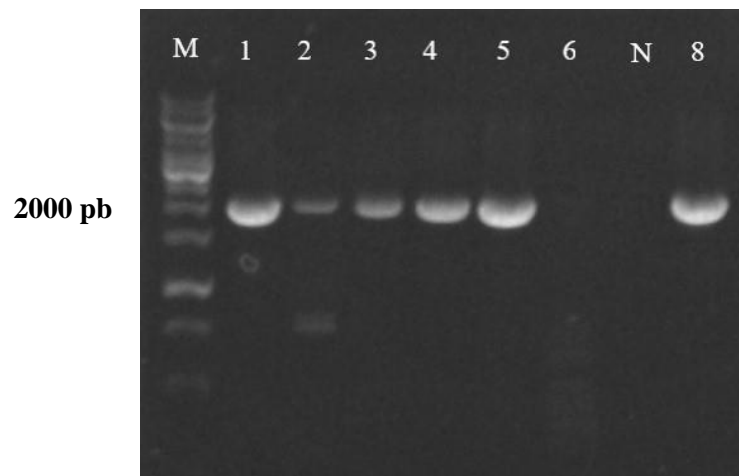
Slika 4.1.1. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze umnoženog gena *ssb* uz početnice rpsF_POF1 i rpsF_POR1. Brojevima su označeni fragmenti umnoženi iz različitih uzoraka, **M** - 1 kb molekularni marker, **N** - negativna kontrola.

Gen *dnaB* umnožen je u svim uzorcima osim kod negativne kontrole (N) te veličina fragmenta odgovara fragmentu markera na 1500 pb (Slika 4.1.2.). U jažicama 1 i 5 koje odgovaraju uzorcima IS8 i HO vidljiva je manja koncentracija umnožene DNA. Isprobano je više kombinacija početnica, ali početnice 33F i 1520R pokazale su se najbolje za umnažanje gena *dnaB*.



Slika 4.1.2. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze umnoženog gena *dnaB* uz početnice 33F i 1520R. Brojevima su označeni fragmenti umnoženi iz različitih uzoraka, **M** - 1 kb molekularni marker, **N** - negativna kontrola.

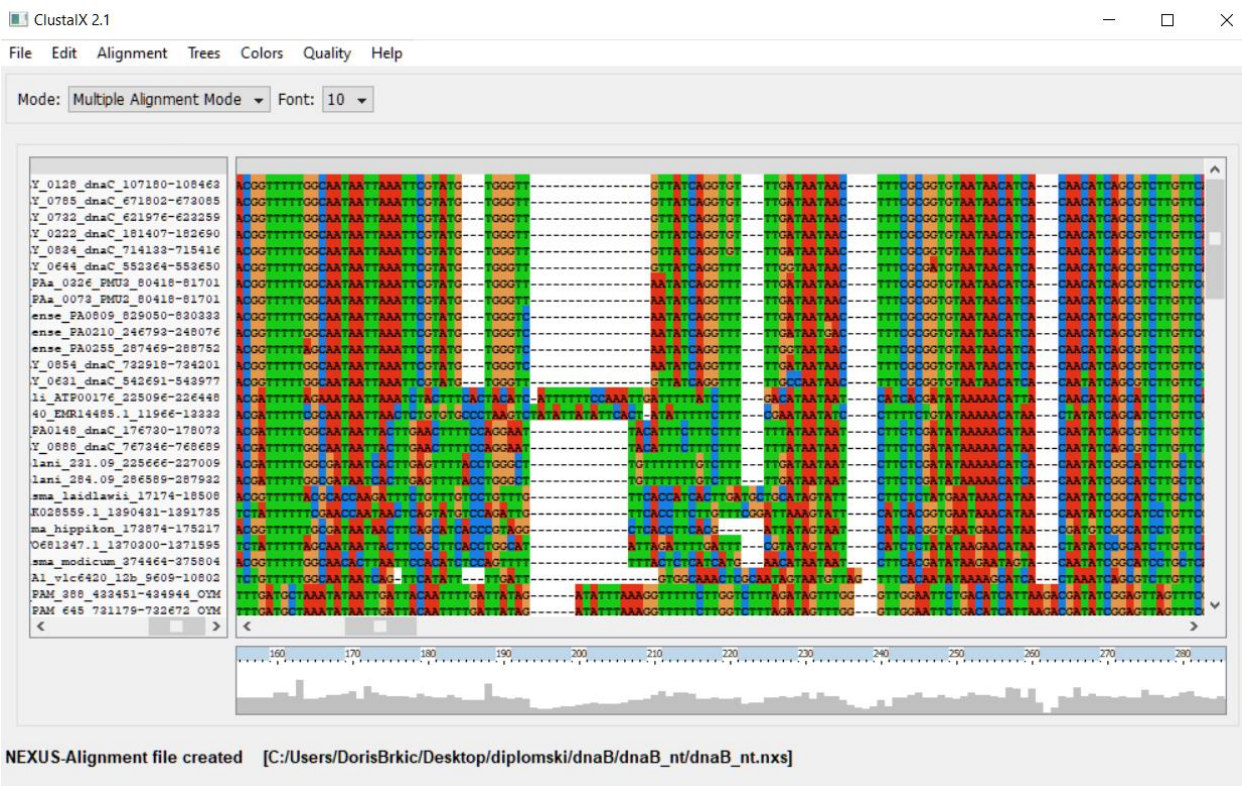
Umnažanje gena *dnaG* također je bilo potrebno optimizirati pa je umnažanje uspješno tek iz trećeg pokušaja nakon optimiziranja temperatura i kombiniranja početnica. Na slici 4.1.3. prikazan je gel na kojem je gen *dnaG* umnožen u svim uzorcima osim u HO (6) i kod negativne kontrole (N). Također su isprobane sve kombinacije početnica, ali najbolji rezultati prikazani na slici 4.1.3. dobiveni su korištenjem početnica 397F i 2393R. Veličina umnoženog fragmenta prema markeru iznosi oko 2000 parova baza.



Slika 4.1.3. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze umnoženog gena *dnaG* korištenjem početnica 397F i 2393R. Brojevima su označeni fragmenti umnoženi iz različitih uzoraka, **M** - 1 kb molekularni marker, **N** - negativna kontrola.

4.2. Filogenetska analiza

Višestruko sravnjenje nukleotidnih i aminokiselinskih sekvenci napravljeno u ClustalX softveru pokazalo je sličnosti između sekvenci te je iskorišteno u daljnjoj analizi. Na slici 4.2.1. prikazano je jedno od sravnjenja gdje su istovrsni nukleotidi obojani istom bojom radi lakšeg vizualnog snalaženja, a crtice predstavljaju praznine ubačene u sekvencu kako bi se dobilo što točnije sravnjenje. Svaki red je jedna sekvenca, dok je svaki stupac jedna pozicija unutar sekvence.

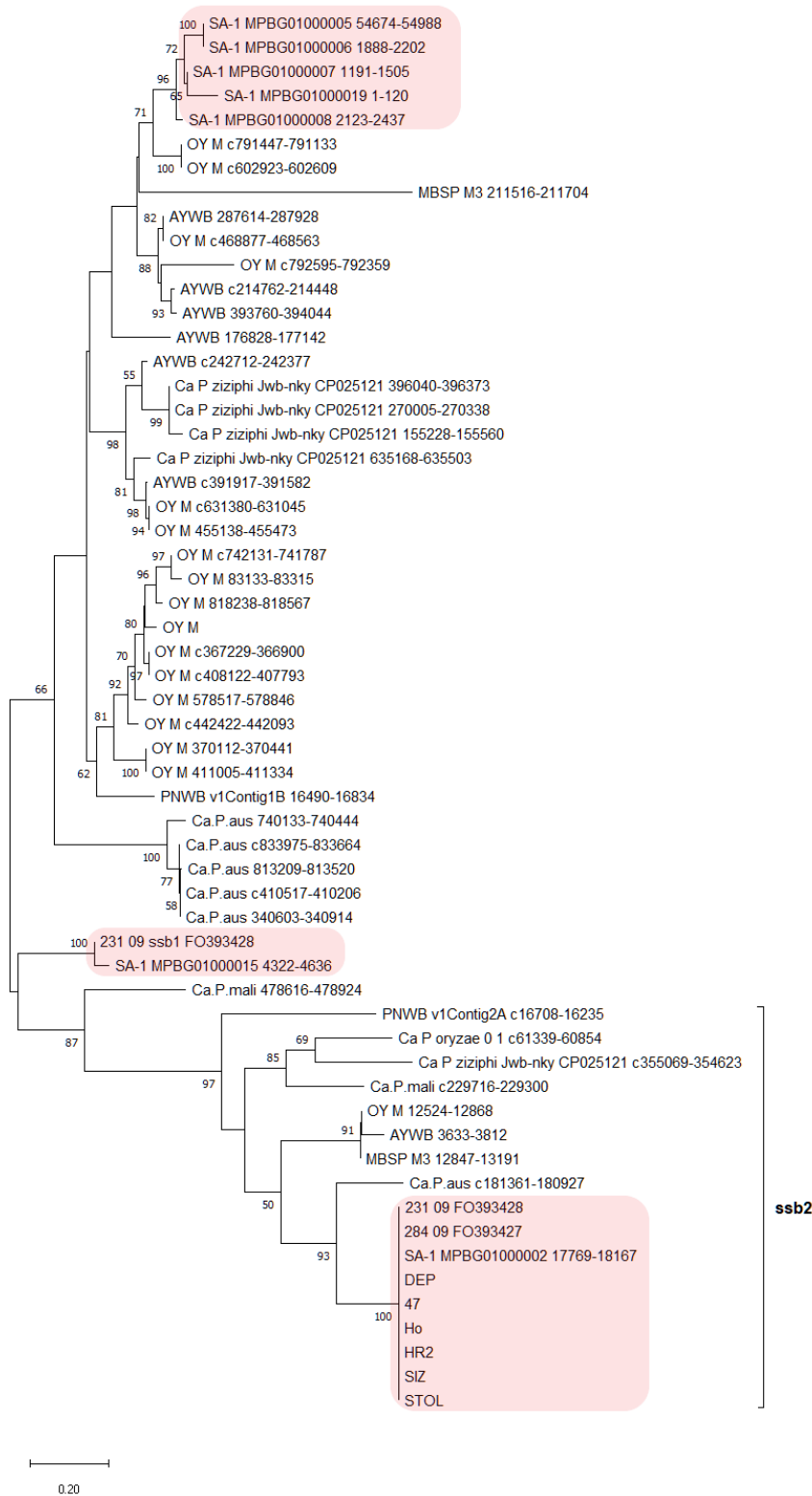


Slika 4.2.1. Prikaz višestrukog sravnjenja nukleotidnih sekvenci gena *dnaB* u ClustalX softveru. Nukleotidi su označeni različitim bojama: A-crveno, T-zeleno, G-žuto, C-plavo.

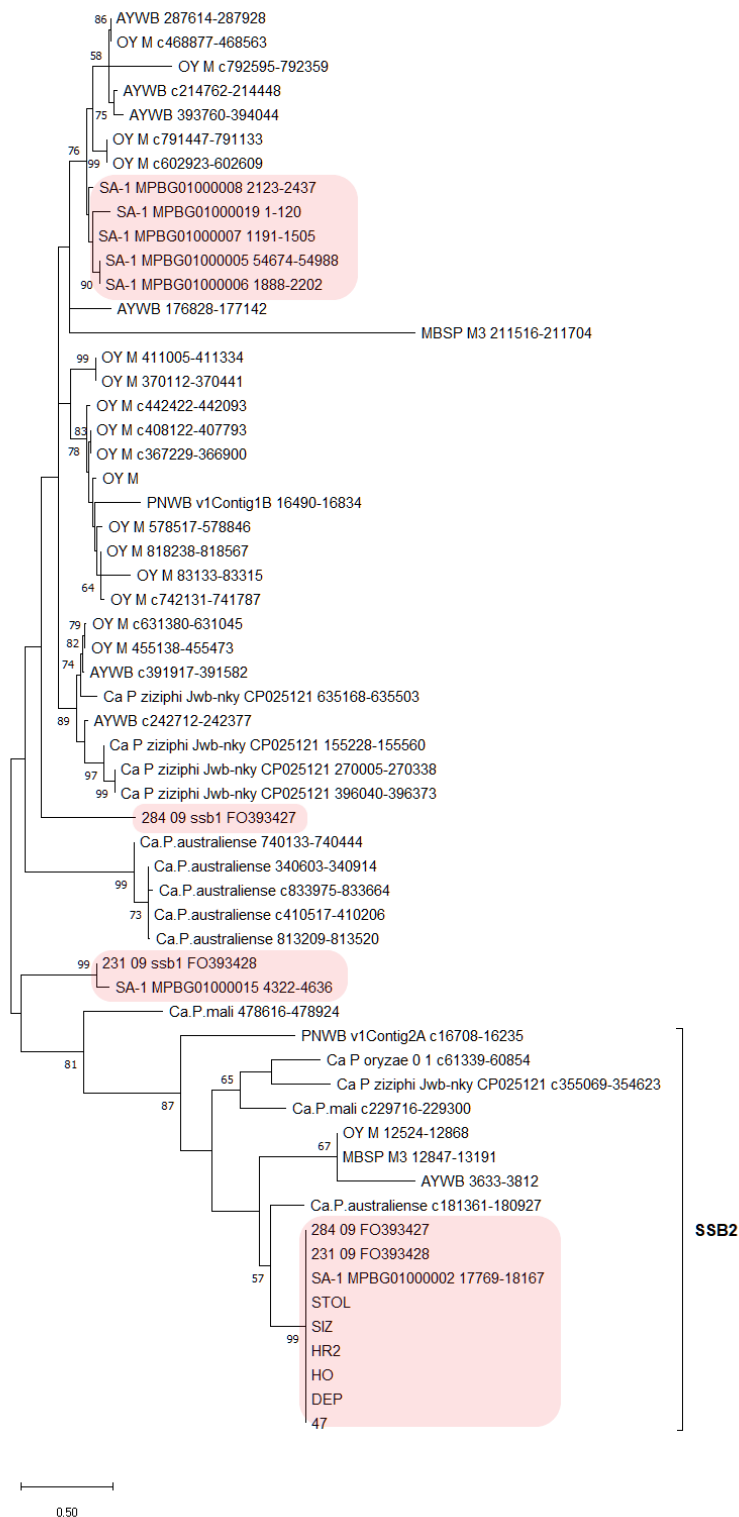
Rezultati filogenetske analize nukleotidnih i proteinskih sekvenci napravljenih u MEGA-X softveru prikazani su u obliku filogenetskih stabala. Stablo sadržava grane na kraju kojih se nalaze sekvence i čvorove koji prikazuju mjesto odvajanja pojedinih grana. Duljina grana prikazuje izračune koji ovise o kriterijima za procjenu prikladnosti podataka na stablu. Prikazana su stabla s najvećom log vjerojatnošću koja su nacrtana u mjerilu tako da duljine grana predstavljaju broj supstitucija po mjestu (*number of substitutions per site*).

4.2.1. Nukleotidno i aminokiselinsko stablo gena *ssb* i proteina SSB

Filogenetska analiza nukleotidnih sekvenci gena *ssb* prikazuje više kopija gena *ssb* unutar genoma različitih vrsta fitoplazmi, a soj OY-M ima najviše kopija istog gena. Vidljivo je grupiranje izvornih sekvenci (Slika 4.2.2.; varijanta gena *ssb2*). U tom ogranku prisutna je po jedna sekvenca gena *ssb* iz genoma svake vrste uključene u analizu. Novosekvencirani geni (DEP, 47, HO, HR2, SIZ, STOL) koji potječu iz vrste '*Ca. P. solani*', a međusobno imaju identične sekvence, su se grupirali u klaster sa izvornom varijantom gena. Ostale sekvence odgovaraju drugim varijantama gena *ssb* poput varijante *ssb1* iz vrste '*Ca. P. solani*' na stablu označene crvenom bojom, čija sekvenca je dovoljno različita da se odvojila od izvorne varijante gena. Filogenetsko stablo dobiveno analizom aminokiselinskih sekvenci proteina SSB gotovo je identično nukleotidnom stablu. Na slici 4.2.3. vidljiva je još jedna sekvenca gena *ssb1*, a to je sekvenca „284 09 ssb1 FO393427“ iz vrste '*Ca. P. solani*' koja se odvojila od izvorne varijante gena, a koja nije bila uključena u nukleotidnu analizu.



Slika 4.2.2. Filogenetsko stablo nukleotidnih sekvenci gena *ssb* napravljeno ML metodom i Tamura-Nei modelom. Postotak stabala u kojima se pridruženi taksoni grupiraju zajedno (bootstrap vrijednost: 500 ponavljanja) prikazan je uz grane. Crvenom bojom označene su sekvence iz vrste '*Ca. P. solani*'.



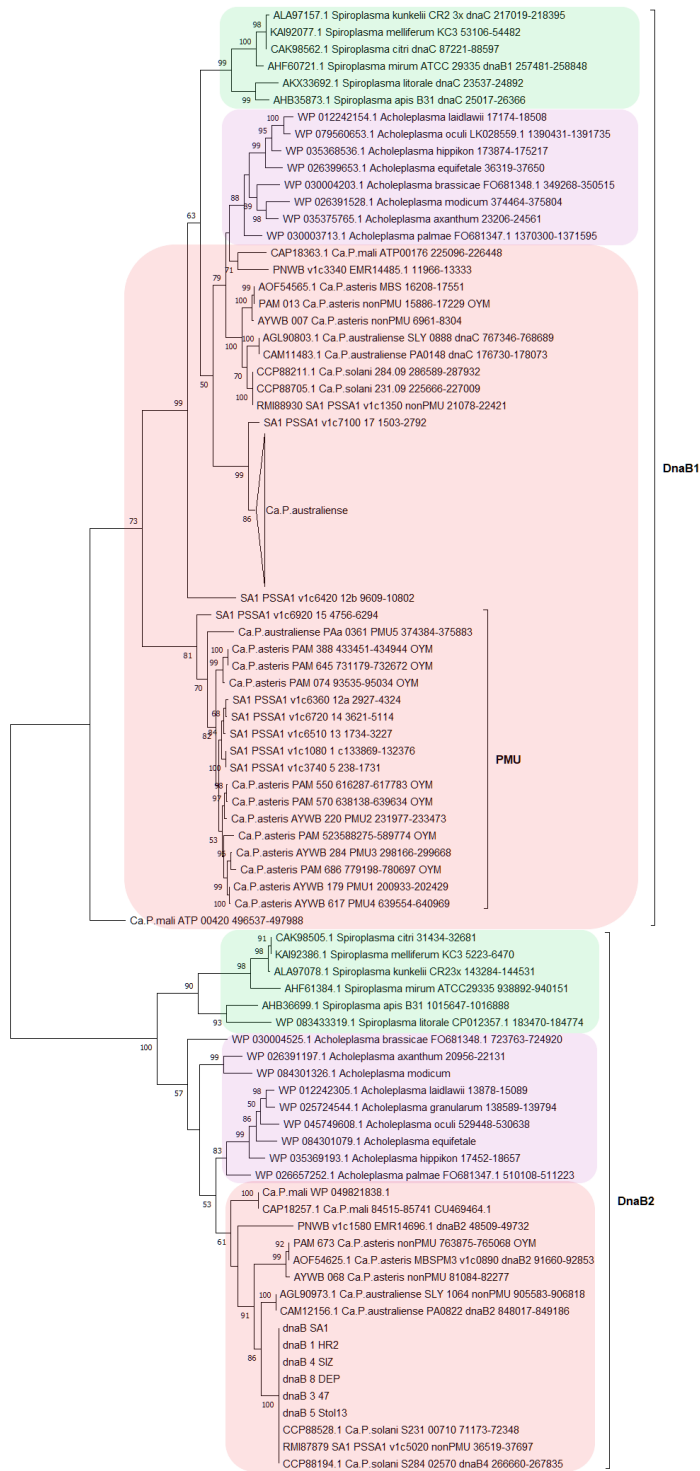
Slika 4.2.3. Filogenetsko stablo aminokiselnih sekvenci proteina SSB napravljeno ML metodom i modelom Poissonove korekcije. Postotak stabala u kojima se pridruženi taksoni grupiraju zajedno (bootstrap vrijednost: 500 ponavljanja) prikazan je uz grane. Crvenom bojom označene su sekvence iz vrste '*Ca. P. solani*'.

4.2.2. Nukleotidno i aminokiselinsko stablo gena *dnaB* i proteina DnaB

Filogenetska analiza gena *dnaB* (Slika 4.2.4.) i odgovarajućih aminokiselinskih sekvenci (Slika 4.2.5.) pokazala je da su u oba slučaja odnosi između rodova i vrsta slični uz zanemarive iznimke. Na oba stabla sekvence su razvrstane u dvije skupine koje odgovaraju dvama različitim, ranije opisanim varijantama gena *dnaB1* i *dnaB2* (Kube i sur., 2012.). Unutar svake skupine gena vidljive su tri različite filogenetske skupine gena grupirane prema rodovima, *Spiroplasma* (zeleno), *Acholeplasma* (ljubičasto), '*Ca. Phytoplasma*' (crveno). Osim toga, unutar *dnaB1* skupine sekvenci odvojile su se sekvence porijeklom sa PMU elemenata na fitoplazmatskom genomu. Kod *DnaB2* skupine, takve sekvence nisu prisutne. Novosekvencirani izolati 47, DEP, STOL, SIZ i HR2 skoro su identičnih sekvenci te pripadaju varijanti gena *dnaB2*, jedina razlika su SNP-ovi na poziciji 118 koji je kod 47 i HR2 adenin, dok je kod ostalih sekvenci gvanin te adenin kod HR2 na poziciji 1219, dok je kod ostalih gvanin. Ovi polimorfizmi nisu utjecali na aminokiseline koje kodiraju kodoni sa tih pozicija tako da su proteini translatirani od ovih nukleotidnih sekvenci identični.



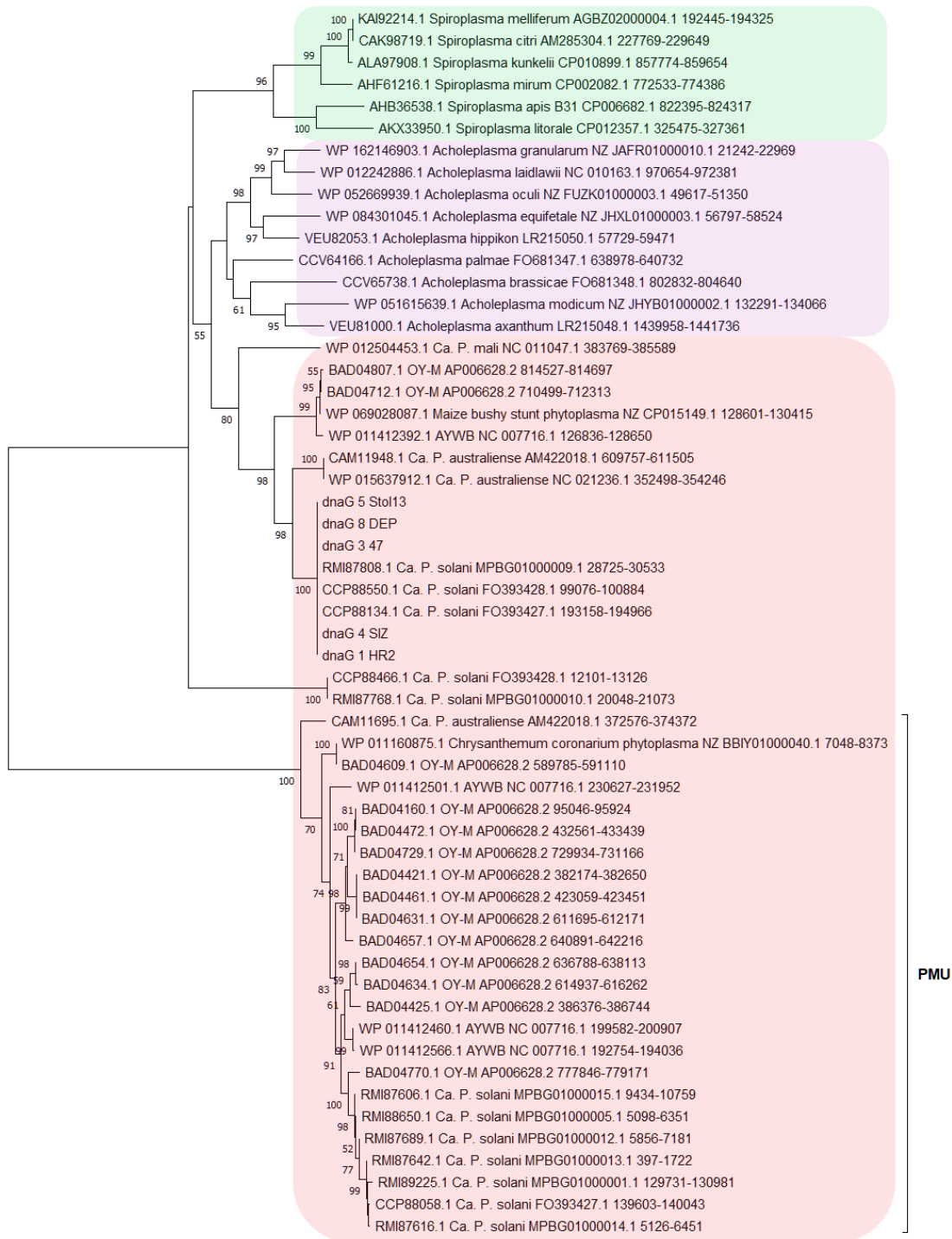
Slika 4.2.4. Filogenetsko stablo nukleotidnih sekvenci gena *dnaB* napravljeno ML metodom i Tamura-Nei modelom. Postotak stabala u kojima se pridruženi taksoni grupiraju zajedno (bootstrap vrijednost: 500 ponavljanja) prikazan je uz grane. Rodovi bakterija označeni su različitim bojama *Spiroplasma* (zeleno), *Acholeplasma* (ljubičasto), '*Ca. Phytoplasma*' (crveno).



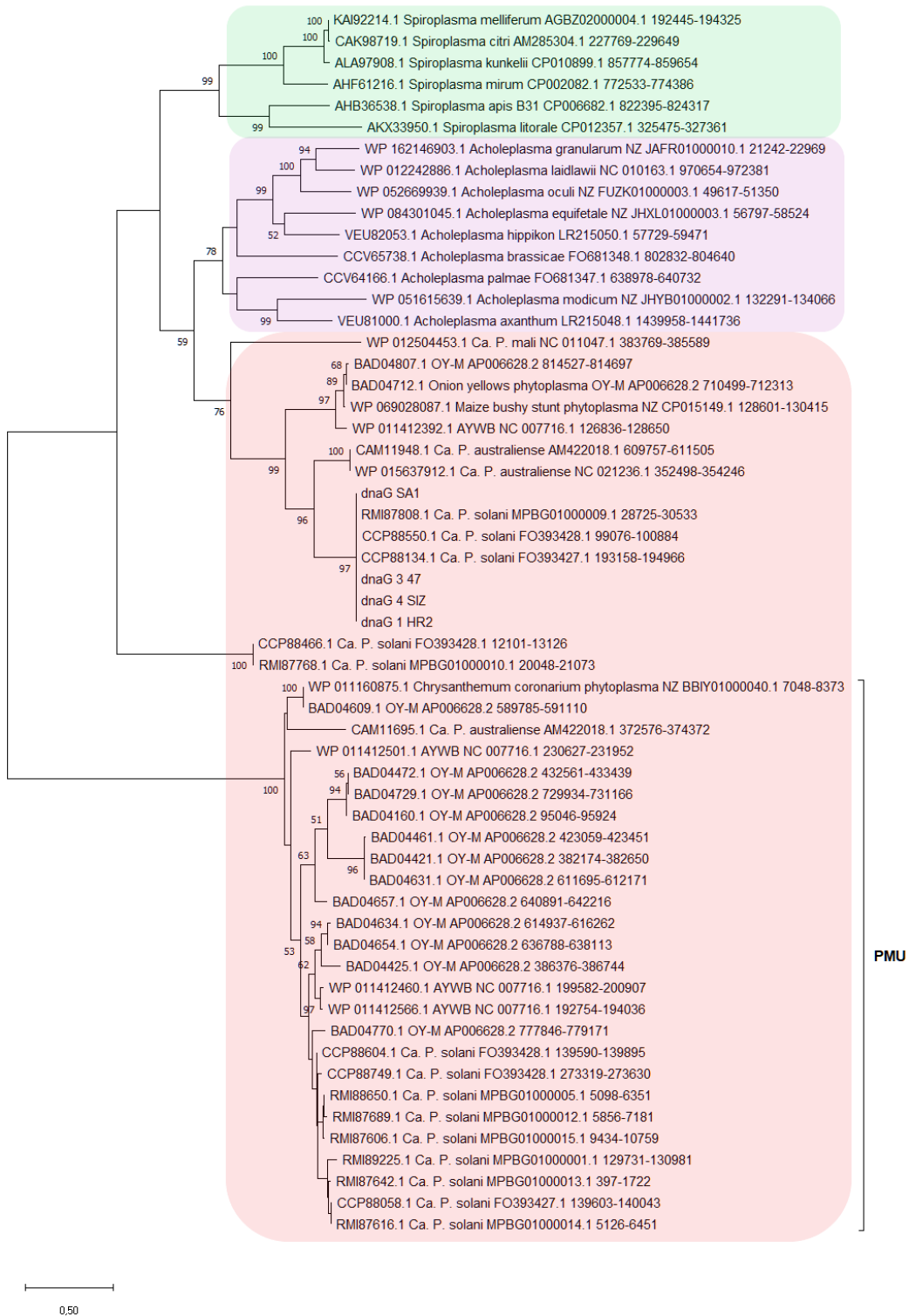
Slika 4.2.5. Filogenetsko stablo aminokiselinskih sekvenci proteina DnaB napravljeno ML metodom i modelom Poissonove korekcije. Postotak stabala u kojima se pridruženi taksoni grupiraju zajedno (bootstrap vrijednost: 500 ponavljanja) prikazan je uz grane. Rodovi bakterija označeni su različitim bojama *Spiroplasma* (zeleno), *Acholeplasma* (ljubičasto), '*Ca. Phytoplasma*' (crveno).

4.2.3. Nukleotidno i aminokiselinsko stablo gena *dnaG* i proteina DnaG

U filogenetsku analizu gena *dnaG* i proteina osim sekvenci '*Ca. Phytoplasma*' također su bile uključene sekvence iz bakterijskih rodova *Spiroplasma* i *Acholeplasma* koje su se na stablima odvojile u zasebne filogenetske skupine (Slika 4.2.6. i slika 4.2.7.). Fitoplazmatske sekvence gena *dnaG* su se razdvojile u dvije skupine, jedna koja je evolucijski srodnija drugim dvama rodovima bakterija, te sekvence koje su odvojene od te skupine, a koje se nalaze na PMU elementima genoma. Novoizolirane sekvence svrstale su se u skupinu sekvenci koje ne pripadaju PMU elementima te pripadaju grani na kojoj se nalaze druge sekvence izolirane iz '*Ca. P. solani*'. One se međusobno razlikuju u nukleotidima na 398. poziciji gdje HR2, SIZ i STOL imaju citozin, dok DEP i 47 imaju timin, 699. poziciji gdje svi osim STOL imaju citozin, dok on ima timin, i na 1959. poziciji gdje SIZ ima citozin, a svi ostali timin. Kod sravnjenja aminokiselinskih sekvenci dobivenih translacijom novosekvenciranih sekvenci pronađena je razlika u 134 aminokiselini koja je kod sekvence 47 tirozin, a kod HR2 i SIZ histidin.



Slika 4.2.6. Filogenetsko stablo nukleotidnih sekvenci gena *dnaG* napravljeno ML metodom i Tamura-Nei modelom. Postotak stabala u kojima se pridruženi taksoni grupiraju zajedno (bootstrap vrijednost: 500 ponavljanja) prikazan je uz grane. Rodovi bakterija označeni su različitim bojama *Spiroplasma* (zeleno), *Acholeplasma* (ljubičasto), '*Ca. Phytoplasma*' (crveno).



Slika 4.2.7. Filogenetsko stablo aminokiselinskih sekvenci proteina DnaG napravljeno ML metodom i modelom Poissonove korekcije. Postotak stabala u kojima se pridruženi taksoni grupiraju zajedno (bootstrap vrijednost: 500 ponavljanja) prikazan je uz grane. Rodovi bakterija označeni su različitim bojama *Spiroplasma* (zeleno), *Acholeplasma* (ljubičasto), '*Ca. Phytoplasma*' (crveno).

5. RASPRAVA

Iako su fitoplazme su kao uzročnici biljnih bolesti otkrivene krajem 60-tih godina prošlog stoljeća još uvijek ne postoji veliki broj znanstvenika niti znanstvenih studija koje bi se bavile fitoplazmama i nestabilnošću njihovog genoma. Jedan od razloga je što fundamentalna istraživanja genoma fitoplazmi znaju biti dugotrajna zbog nemogućnosti uzgoja u čistoj kulturi *in vitro* te velike količine repetitivnih sekvenci, no baš te sekvence su se pokazale zanimljivima za proučavanje. Fitoplazmatski genomi su s jedne strane mali i reducirani, dok istovremeno sadržavaju istovrsne gene u više kopija pogotovo u PMU regijama genoma (Tran-Nguyen i sur., 2008.; Šeruga Musić i sur., 2019.). Postavlja se pitanje čemu služi višestruko pojavljivanje gena kao što su geni za replikacijsku mašineriju u genomu fitoplazmi. Geni *dnaB*, *dnaG* i *ssb* osim na uobičajenom mjestu u genomu, prisutni su i na PMU elementima koji se često izrezuju iz genoma poput transpozona (Bai i sur., 2006.).

Prije prelaska na filogenetsku analizu treba spomenuti rezultate dobivene umnažanjem gena *ssb*, *dnaB* i *dnaG* te sekvenciranjem umnoženih fragmenata gena *dnaB* i *dnaG*. Kod gena *ssb*, početnice koje su korištene i uvjeti reakcije umnažanja optimizirani su ranije te je umnažanje gena *ssb* bilo uspješno za većinu uzoraka. Unatoč tomu, gen *ssb* nije umnožen u uzorku IS8. Razlog neumnažanja može biti korištenje lošeg razrjeđenja DNA iz ovog uzorka vinove loze koje nije sadržavalo dovoljnu količina DNA za umnažanje ili se izolirana DNA fragmentirala tijekom pohrane uzorka pa nije bilo moguće prijanjanje početnica. Umnažanje gena *dnaB* sa kombinacijom početnica 33F i 1520R bilo je u potpunosti uspješno, fragment gena *dnaB* se umnožio u svim uzorcima, osim kod negativne kontrole, ali sekvenciranje nije bilo uspješno za uzorke IS8 i HO pa su oni izbačeni iz filogenetske analize. Najteže je bilo optimizirati uvjete i početnice za umnažanje gena *dnaG*, ali je uz korištenje početnica 397F i 2393R uspješno umnožen željeni fragment u svim uzorcima osim kod kukca-vektora (HO) i negativne kontrole. Neumnažanje u ovom uzorku može se pripisati korištenju novih početnica koje nisu isprobane ranije te one ne mogu umnožiti gen *dnaG* u ovom uzorku jer možda regija oko gena na koju početnice prijanjaju nije savršeno kompatibilna s početnicama. Jedino u slučaju gena *dnaG* uspješno su sekvencirana samo tri uzorka HR2, 47 i SIZ od njih 6 koji se vide na gelu (Slika 4.1.3.) pa su samo ta tri uzorka uključena u filogenetsku analizu.

Razlika u nukleotidnim, a potom i aminokiselinskim sekvencama između istih gena u različitim vrstama fitoplazmi vidljiva je na filogenetskim stablima gdje su sličnije sekvence prikazane na bližim i istim granama iz čega se može zaključiti da dijele zajedničku evolucijsku prošlost (Hillis, 1997.).

Filogenetska analiza gena *ssb* pokazuje da su nukleotidni slijedovi između kopija gena unutar iste vrste različiti. Kako se nukleotidne sekvence razlikuju, razlikuju se i aminokiselinske sekvence, unatoč tomu, struktura proteina SSB evolucijski je očuvana. Do sada istraženi proteini SSB međusobno se razlikuju u čak 140 do 300 aminokiselina, ali se smatra da je uvijek prvih 120 aminokiselina na N-kraju očuvane strukture iz razloga što oni čine OB petlju koja ima ulogu vezanja DNA što je i osnovna zadaća proteina SSB (Das i sur., 2007.). Postoji izvorna sekvenca gena *ssb2*, te ostali geni *ssb* koji ne pripadaju u ovu skupinu, a nalaze se na PMU elementima genoma (Slika 4.2.2. i 4.2.3., *ssb1*) za koje se smatra da imaju drugačije evolucijsko porijeklo (Kube i sur., 2013.). Izvorna sekvenca je kod gena *ssb* očuvana u svim analiziranim vrstama fitoplazmi pošto su one grupirane zajedno na filogenetskom stablu. Proučavanjem okoline izvorne kopije gena *ssb* utvrđeno je da se ona nalazi u točno određenoj okolini između gena *rpsF* i *rpsR* te obično nije prisutna u mobilnim jedinicama i plazmidima, stoga je moguće da su geni *ssb* unutar iste vrste paralozi (Linder i sur., 2004.).

Na filogenetskim stablima gena *dnaB* i *dnaG* moguće je uočiti da se geni sa PMU dijelova genoma razlikuju u sekvencama od ostalih gena, kao što je slučaj kod gena *dnaG* (Slika 4.2.6. i 4.2.7.) i kod varijante gena *dnaB1* (Slika 4.2.4. i 4.2.5.). U oba slučaja, sekvence koje pripadaju PMU elementima su vidljivo odvojene na stablu od ostalih fitoplazmatskih sekvenci. Kod gena *dnaB* i *dnaG* osim fitoplazmi, u analizu su također bile uključeni i geni iz bakterija roda *Spiroplasma* i *Acholeplasma* kako bi se potvrdila njihova evolucijska povezanost. U ovom slučaju situacija je još jasnija jer su se geni *dnaG* i *dnaB1* izolirani iz fitoplazmi, a koji se nalaze na PMU elementima, u potpunosti odvojili od sekvenci svojih kopija iz stabilnog dijela fitoplazmatskog genoma. Sekvence gena *dnaG* i *dnaB* iz stabilnog dijela genoma sličnije su izoliranih iz bakterija roda *Spiroplasma* i *Acholeplasma*, nego genima sa PMU elemenata iz vlastitog genoma što je pokazano ranije u istraživanju Samaržija i Šeruga Musić (2019.). Takvo odvajanje upućuje na zajedničku evolucijsku prošlost gena *dnaG* i *dnaB* u genomu tih triju rodova bakterija, ali i na to da su sekvence gena koje se nalaze na PMU elementima značajno promijenjene u odnosu na sekvence

iz genoma bakterija. Tako značajna razlika najvjerojatnije je rezultat horizontalnog prijenosa gena sa PMU elemenata koji su prenašanjem iz jedne vrste fitoplazmi u drugu evoluirali na drukčiji način od gena koji se stalno nalaze u istim uvjetima unutar jedne vrste fitoplazme.

Osim razlika u nukleotidnim sekvencama, u slučaju proteina DnaG postoji i razlika u aminokiselinama na 134 poziciji gdje je kod jednog izolata to tirozin, a kod drugih histidin. Ove dvije aminokiseline imaju različita fizikalna i kemijska svojstva koja mogu dovesti do razlike u smatanju proteina pa tako i do promjene funkcije konačnog proteina. Moguće promjene trebalo bi detaljnije proučiti i pronaći kako zamjena tirozina za histidin utječe na smatanje i funkciju takvog proteina DnaG. Uvođenjem višestrukih kopija gena u varijabilne regije genoma kao što su PMU elementi fitoplazme su dobile više prostora za eksperimentiranje i stvaranje modificiranih proteina s drukčijim ulogama koji im potencijalno mogu poslužiti za preživljavanje u vrlo različitim životnim uvjetima.

U slučaju gena *dnaB*, sekvence su podijeljene u dvije velike skupine od kojih svaka sadržava sva tri roda bakterija '*Ca. Phytoplasma*', *Spiroplasma* i *Acholeplasma*. Ranije je pokazano da se gen *dnaB* kod pripadnika razreda Mollicutes ustvari dijeli na dva homologna gena *dnaB1* i *dnaB2* koji pripadaju istoj proteinskoj obitelji (Kube i sur., 2012.) što je i vidljivo na stablima na slikama 4.2.4. i 4.2.5. gdje dvije skupine na koje su podijeljeni geni *dnaB* odgovaraju varijantama gena *dnaB1* i *dnaB2* te da sva tri roda posjeduju obje varijante gena. Varijante se razlikuju po tome što protein DnaB1 ima N-terminalnu i C-terminalnu helikaznu domenu, dok ih protein DnaB2 nema, već on tek zadržava funkcije vezanja za membranu i inicijaciju transkripcije (Kube i sur., 2012.). Unutar skupine koja odgovara varijanti gena *dnaB1* odvojile su se i sekvence koje se nalaze na PMU elementima, dok kod varijante *dnaB2* takvih sekvenci nema. Ne-PMU sekvence dijele veću sličnost sa genima iz drugih rodova nego sa genima iz svog roda koji se nalaze na PMU elementima, što potvrđuje hipotezu u neovisnoj evoluciji gena.

Sve navedeno upućuje na sklonost PMU sekvenci, kao mobilnih genetičkih elemenata, ka premještanju i rearanžiranju gena te ukazuje ulogu tih regija u plastičnosti genoma fitoplazmi i mogućnosti stjecanja novih sekvenci rekombinacijom i horizontalnim prijenosom gena (Šeruga Musić i sur., 2019.). Plastičnost genoma fitoplazme dovodi u prednost naspram drugih bakterija jer im omogućuje prilagođavanje životu u različitim domaćinima, biljnim i animalnim, te im otvara vrata ka širenju životnog prostora (Hogenhout i sur., 2008.). Replisom ima veliku ulogu u

propagaciji bakterija jer se bakterije ne mogu dijeliti ukoliko nemaju proteinske replisome koji će im umnožiti genetički materijal što je prvi korak u dijeljenju bakterija. Stoga, ako fitoplazme imaju više funkcionalnih proteina replisoma u genomu i to u regijama podložnim horizontalnom prijenosu, kod nekih od tih gena doći će do mutacija i promjene strukture proteina za kojeg kodiraju što će dovesti do mogućnosti replikacije pri drukčijim uvjetima (višoj ili nižoj temperaturi, bržoj ili sporijoj replikaciji) što će na kraju utjecati na njihovu mogućnost preživljavanja i pomoći im u nastanjanju različitih domaćina (Carlin, 2011.). Kako bismo ih prestigli u tome i spriječili u daljnjem širenju i patogenom djelovanju na biljne kulture o kojima ovisimo kao civilizacija, potrebno je provoditi fundamentalna istraživanja na fitoplazmama koja mogu dovesti do otkrića kako ih zaustaviti.

6. ZAKLJUČAK

- Geni na PMU elementima podložni su horizontalnom prijenosu gena između različitih vrsta fitoplazmi.
- Bioinformatičkim analizama gena za proteine SSB u bakterijama roda '*Candidatus Phytoplasma*' čiji su genomi dostupni u bazama podataka pokazano je da izvorna kopija gena *ssb* ima drugačije porijeklo i okolinu u genomu od ostalih fitoplazmatskih gena *ssb*. Nadalje, pokazano je da su sekvence gena *dnaB* i *dnaG* iz konzerviranog dijela genoma sličnije istovrsnim genima drugih rodova bakterija *Spiroplasma* i *Acholeplasma* nego istim tim genima iz fitoplazmi, ali sa PMU elemenata.
- Evolucija gena *ssb*, *dnaB* i *dnaG* na PMU elementima drugačija je od evolucije tih gena u genomu fitoplazmi.
- Filogenetska analiza gena *dnaB* razdvojila je sekvence na varijante gena *dnaB1* i *dnaB2* te varijanta *dnaB1* sadržava sekvence porijeklom sa PMU elemenata.
- Moguća uloga višestrukih kopija ovih gena u PMU elementima genoma podložnim mutacijama i horizontalnom prijenosu je u povećanju plastičnosti fitoplazmatskih genoma kako bi fitoplazme bile sposobne za nastanjivanje različitih domaćina i životnih uvjeta.

7. LITERATURA

Ajayakumar P. V., Samad A., Shasany A. K., Gupta M. K., Alam M., Rastogi, S. (2007): First record of a *Candidatus* phytoplasma associated with little leaf disease of *Portulaca grandiflora*. *Australasian Plant Disease Notes* 2:, 67.

Andersen M. T., Liefting L.W., Havukkala I., Beever R.E. (2013): Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of “*Candidatus* Phytoplasma australiense” reveals genome plasticity. *BMC Genomics* 14: 529.

Bai X., Zhang J., Ewing A., Miller S.A., Radek A.J., Shevchenko D.V., Tsukerman K., Walunas T., Lapidus A., Campbell J.W., Hogenhout S.A. (2006): Living with genome instability: The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* 188: 3682–3696.

Beattie T.R., Reyes-Lamothe R. (2015): A Replisomes journey through the bacterial chromosome. *Frontiers in Microbiology* 6: 562.

Bertaccini A., Duduk B., Paltrinieri S., Contaldo N. (2014): Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. *American Journal of Plant Sciences* 5: 1763–1788.

Bertaccini A., Lee, I. M. (2018): Phytoplasmas: An Update. In: Rao G., Bertaccini A., Fiore N., Liefting L. (eds) *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria – I: Characterisation and Epidemiology of Phytoplasma - Associated Diseases*. Springer, Singapore: str. 1–29.

Carlin, J. L. (2011): Mutations Are the Raw Materials of Evolution. *Nature Education Knowledge* 3:10.

Das D., Hyun H., Lou Y., Yokota H., Kim R., Kim S.-H. (2007): Crystal structure of a novel single-stranded DNA-binding protein from *Mycoplasma pneumoniae*. *Proteins: Struct, Funct, Bioinf* 67: 776-782.

Felsenstein J. (1985): Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39: 783.

Hillis D.M. (1997): Phylogenetic analysis. *Current Biology* 7: 129–131.

Hogenhout S.A., Oshima K., Ammar E. D., Kakizawa S., Kingdom H.N., Namba S. (2008): Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects. *Mol Plant Pathol* 9: 403–423.

Kazlauskas D., Sezonov, G., Charpin N., Venclovas Č., Forterre P., Krupovic M. (2018): Novel Families of Archaeo-Eukaryotic Primases Associated with Mobile Genetic Elements of Bacteria and Archaea. *Journal of Molecular Biology* 430: 737–750.

Kube M., Mitrovic, J., Duduk B., Rabus R., Seemüller E. (2012): Current View on Phytoplasma Genomes and Encoded Metabolism. *The Scientific World Journal* 2012: 1–25.

Larkin, M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.

Kube M., Siewert C., Migdoll A.M., Dudak B., Holz S., Rabus R., Seemüller E., Mitrovic J., Müller I., Büttner C., Reinhart R. (2013): Analysis of the complete genomes of *Acholeplasma brassicae*, *A. palmae* and *A. laidlawii* and their comparison to the obligate parasites from ‘Candidatus Phytoplasma’. *J Mol Microbiol Biotechnol* 24: 19-36.

Lee I.M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D. E. (2000): Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 221-255.

Li, J., Liu J., Zhou L., Pei H., Zhou J., Xiang H. (2010): Two distantly homologous DnaG primases from *Thermoanaerobacter tengcongensis* exhibit distinct initiation specificities and priming activities. *Journal of Bacteriology* 192: 2670–2681.

Lindner C., Nijland R., van Hartskamp M., Bron S., Hamoen L. W., Kuipers O. P. (2004): Differential expression of two paralogous genes of *Bacillus subtilis* encoding single-stranded DNA binding protein. *J Bacteriol* 186: 1097-1105.

Marcone C., Neimark H., Ragozzino A., Lauer U., Seemüller E. (1999): Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89: 805–810.

Mir-Sanchis I., Roman, C.A., Misiura A., Pigli Y.Z., Boyle-Vavra S., Rice P. A. (2016): Staphylococcal SCCmec elements encode an active MCM-like helicase and thus may be replicative. *Nature Structural and Molecular Biology* 23: 891–898.

Šeruga Musić M., Samaržija I., Hogenhout S.A., Haryono M., Cho S.T., Kuo C.H. (2019): The genome of “*Candidatus Phytoplasma solani*” strain SA-1 is highly dynamic and prone to adopting foreign sequences. *Systematic and Applied Microbiology* 42: 117–127.

Orlovskis Z., Canale M.C., Haryono M., Lopes J.R.S., Kuo C.H., Hogenhout S.A. (2017): A few sequence polymorphisms among isolates of Maize bushy stunt phytoplasma associate with organ proliferation symptoms of infected maize plants. *Annals of Botany* 119: 869–884.

Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Jung H.Y., Wei W., Suzuki S., Arashida R., Nakata D., Miyata S.I., Ugaki M., Namba S. (2004): Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* 36: 27–29.

web.expasy.org/translate/ (pristupljeno 15.07.2021.)

www.flickr.com (pristupljeno 16.08.2021.)

www.geneious.com (pristupljeno 20.03.2021.)

www.megasoftware.net/mega4/WebHelp/part_iv___evolutionary_analysis/computing_evolutionary_distances/distance_models/amino_acid_substitution_models/hc_poisson_correction_distance.htm (pristupljeno 30. 07. 2021).

Samaržija, I. i Šeruga Musić, M. (2019): Phylogenetic analyses of phytoplasma replisome proteins demonstrate their distinct and complex evolutionary history. *Phytopathogenic Mollicutes* 9: 227–228.

Strauss E. (2009): Phytoplasma research begins to bloom. *Science* 325: 388–390.

Tamura K. i Nei M. (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512–526.

Tamura K., Stecher G., Kumar S. (2021): MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022–3027.

Tran-Nguyen, L.T.T., Kube M., Schneider B., Reinhardt R., Gibb K. S. (2008): Comparative genome analysis of “*Candidatus Phytoplasma australiense*” (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and “*Ca. phytoplasma asteris*” strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology* 190: 3979–3991.

Zuckerlandl E. i Pauling, L. (1965): Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins. *Evolving Genes and Proteins*: 97–116

8.PRILOZI

- 8.1. Novosekvencirani geni *ssb* iz '*Ca. P. solani*'
- 8.2. Novosekvencirani geni *dnaB* iz '*Ca. P. solani*'
- 8.3. Novosekvencirani geni *dnaG* iz '*Ca. P. solani*'

8.1. Novosekvencirani geni *ssb* iz '*Ca. P. solani*'

>STOL

```
ATGATTAATAAAGTTATTTTGGTTGGAAGAATCACCAAAGATCCCGAATTAATAATCTTATCACGGCGACAATAATT
ACGTTAAATTTACTTTGGCTGTCAATAGGTCTTTTAGTAGTCAAGATGAAAACAAAAAACTGATTTTCATTAATTG
CGTTGTTTGGCGTAAACAAGCAGAAAATTTAAGCCGATATATTTCTAAAGGTAGTTTGTAGGGGTTGAAGGCAGT
GTGCGTGTGAAAAATGGGAAAAAGATGGCAAACTAACTGGTCAACAGAAATTAGTTGCACTAACATTCACTTT
TTAGAATCAAAAAAAGCACTAGTTCAGAATATGACGAAACGTCATCACATAATCAATTTACCAAGAAGAAACA
CTAGATAATAGTCCTTTTTAA
```

>SIZ

```
ATGATTAATAAAGTTATTTTGGTTGGAAGAATCACCAAAGATCCCGAATTAATAATCTTATCACGGCGACAATAATT
ACGTTAAATTTACTTTGGCTGTCAATAGGTCTTTTAGTAGTCAAGATGAAAACAAAAAACTGATTTTCATTAATTG
CGTTGTTTGGCGTAAACAAGCAGAAAATTTAAGCCGATATATTTCTAAAGGTAGTTTGTAGGGGTTGAAGGCAGT
GTGCGTGTGAAAAATGGGAAAAAGATGGCAAACTAACTGGTCAACAGAAATTAGTTGCACTAACATTCACTTT
TTAGAATCAAAAAAAGCACTAGTTCAGAATATGACGAAACGTCATCACATAATCAATTTACCAAGAAGAAACA
CTAGATAATAGTCCTTTTTAA
```

>HR2

```
ATGATTAATAAAGTTATTTTGGTTGGAAGAATCACCAAAGATCCCGAATTAATAATCTTATCACGGCGACAATAATT
ACGTTAAATTTACTTTGGCTGTCAATAGGTCTTTTAGTAGTCAAGATGAAAACAAAAAACTGATTTTCATTAATTG
CGTTGTTTGGCGTAAACAAGCAGAAAATTTAAGCCGATATATTTCTAAAGGTAGTTTGTAGGGGTTGAAGGCAGT
GTGCGTGTGAAAAATGGGAAAAAGATGGCAAACTAACTGGTCAACAGAAATTAGTTGCACTAACATTCACTTT
TTAGAATCAAAAAAAGCACTAGTTCAGAATATGACGAAACGTCATCACATAATCAATTTACCAAGAAGAAACA
CTAGATAATAGTCCTTTTTAA
```

>HO

```
ATGATTAATAAAGTTATTTTGGTTGGAAGAATCACCAAAGATCCCGAATTAATAATCTTATCACGGCGACAATAATT
ACGTTAAATTTACTTTGGCTGTCAATAGGTCTTTTAGTAGTCAAGATGAAAACAAAAAACTGATTTTCATTAATTG
CGTTGTTTGGCGTAAACAAGCAGAAAATTTAAGCCGATATATTTCTAAAGGTAGTTTGTAGGGGTTGAAGGCAGT
GTGCGTGTGAAAAATGGGAAAAAGATGGCAAACTAACTGGTCAACAGAAATTAGTTGCACTAACATTCACTTT
TTAGAATCAAAAAAAGCACTAGTTCAGAATATGACGAAACGTCATCACATAATCAATTTACCAAGAAGAAACA
CTAGATAATAGTCCTTTTTAA
```

>DEP

```
ATGATTAATAAAGTTATTTTGGTTGGAAGAATCACCAAAGATCCCGAATTAATAATCTTATCACGGCGACAATAATT
ACGTTAAATTTACTTTGGCTGTCAATAGGTCTTTTAGTAGTCAAGATGAAAACAAAAAACTGATTTTCATTAATTG
CGTTGTTTGGCGTAAACAAGCAGAAAATTTAAGCCGATATATTTCTAAAGGTAGTTTGTAGGGGTTGAAGGCAGT
GTGCGTGTGAAAAATGGGAAAAAGATGGCAAACTAACTGGTCAACAGAAATTAGTTGCACTAACATTCACTTT
TTAGAATCAAAAAAAGCACTAGTTCAGAATATGACGAAACGTCATCACATAATCAATTTACCAAGAAGAAACA
CTAGATAATAGTCCTTTTTAA
```

>47

```
ATGATTAATAAAGTTATTTTGGTTGGAAGAATCACCAAAGATCCCGAATTAATAATCTTATCACGGCGACAATAATT
ACGTTAAATTTACTTTGGCTGTCAATAGGTCTTTTAGTAGTCAAGATGAAAACAAAAAACTGATTTTCATTAATTG
CGTTGTTTGGCGTAAACAAGCAGAAAATTTAAGCCGATATATTTCTAAAGGTAGTTTGTAGGGGTTGAAGGCAGT
GTGCGTGTGAAAAATGGGAAAAAGATGGCAAACTAACTGGTCAACAGAAATTAGTTGCACTAACATTCACTTT
TTAGAATCAAAAAAAGCACTAGTTCAGAATATGACGAAACGTCATCACATAATCAATTTACCAAGAAGAAACA
CTAGATAATAGTCCTTTTTAA
```

8.2. Novosekvencirani geni *dnaB* iz '*Ca. P. solani*'

>*dnaB_SA1*

```
ATGTCCGATTGCTTTACTTTGTTTAAAATAGAAAACCAAATTTCTTTGTCGTTAGAAGACCATAAAACACTCAATTT
ACTTTATCAACCATTAATTGGGGCCCAAGCTTTAGGGTTTTATTATATTTTTTTGTCCTTTAAAACATGATTTTGAATA
TGAACATCGATTTTTATTAGATCTTGCTGGCGTTACTACAAATATTTTTATCGAAAATAAAGAAAAATTAGAAGCT
CTTAATTTATTAGCTACTTACCAAAACGTTAACCAAAAGAAAAAAATTTATTTTTTGATTGCTCCTTTAAGGGTAA
TGATTTTTTACAAGATCCTCTTTAAGTGATTTTTTGTAAAGCGAAATCGGAGAAAAACATTATTTCACTTACAAA
GTCATTTTTTGCAAACAAATATCAACTTAAAAGAACTAAAAGATGTTAGCAAAAAATTCGATGATATCTACCAATT
CCAAAAAATTAACCTTCAATAAAGAATTTAACCAAAAAAATCTATTAGTAATTTAGGAAAAAGTTTTCTAAGACT
AATTTTGATTATGAACTGTTTTAACCATTACCAGACCGTTTTAAAAACCTTCTTTGATAGAACAAAAACAAT
CGATTTTATCCAAAAAGTAAGTTTATGATTTAAAACTGAACAAATAGCAGAAATTTATCAAAAAAGCTTT
CCTAATCCAAATGATATTGATTTATCAAAATTGCGTTTTAAATGTTAAAAAATATCATCATAAAAAACAATATTAATC
AGCAAAATATTGCTCTAAAAAATTACAAGACGATGAAGAAGCAACAATTGCTTACTTAAAACAAGCAACTCCA
CGAAAGAATTATCAAGATTATTGTCAAAAAACATCCAAACAATGGCAAGTGATATTGTTTTCCAATTATTAGA
AAGAAATGATTTGAAATAGGTTTAGTCAACGCATTATTGATTTATATTTAAGATATCGCGATGGCGTGTGCCTT
TAAATGTAATTTATTTGGAAAAACCTTAAAATCGTGGGCACAAAAAGGGATTGTTGATACAGAAACAGCTTATG
ATTTTTTGATAGAAGATAAAACACAACAAGCCAAAATTAATAATCCTAAGGCAAGCCAAAATAAGCCTACTTGGAT
TAGATGAAGTTAAAAAAAATGGCAATCATAA
```

>*dnaB_1_HR2*

```
ATGTCCGATTGCTTTACTTTGTTTAAAATAGAAAACCAAATTTCTTTATCGTTAGAAGACCATAAAACACTCAATTT
ACTTTATCAACCATTAATTGGGGCCCAAGCTTTAGGGTTTTATTATATTTTTTTGTCCTTTAAAACATGATTTTGAATA
TGAACATCGATTTTTATTAGATCTTGCTGGCGTTACTACAAATATTTTTATCGAAAATAAAGAAAAATTAGAAGCT
CTTAATTTATTAGCTACTTACCAAAACGTTAACCAAAAGAAAAAAATTTATTTTTTGATTGCTCCTTTAAGGGTAA
TGATTTTTTACAAGATCCTCTTTAAGTGATTTTTTGTAAAGCGAAATCGGAGAAAAACATTATTTTCACTTACAAA
GTCATTTTTTGCAAACAAATATCAACTTAAAAGAACTAAAAGATGTTAGCAAAAAATTCGATGATATCTACCAATT
CCAAAAAATTAACCTTCAATAAAGAATTTAACCAAAAAAATCTATTAGTAATTTAGGAAAAAGTTTTCTAAGACT
AATTTTGATTATGAACTGTTTTAACCATTACCAGACCGTTTTAAAAACCTTCTTTGATAGAACAAAAACAAT
CGATTTTATCCAAAAAGTAAGTTTATGATTTAAAACTGAACAAATAGCAGAAATTTATCAAAAAAGCTTT
CCTAATCCAAATGATATTGATTTATCAAAATTGCGTTTTAAATGTTAAAAAATATCATCATAAAAAACAATATTAATC
AGCAAAATATTGCTCTAAAAAATTACAAGACGATGAAGAAGCAACAATTGCTTACTTAAAACAAGCAACTCCA
CGAAAGAATTATCAAGATTATTGTCAAAAAACATCCAAACAATGGCAAGTGATATTGTTTTCCAATTATTAGA
AAGAAATGATTTGAAATAGGTTTAGTCAACGCATTATTGATTTATATTTAAGATATCGCGATGGCGTGTGCCTT
TAAATGTAATTTATTTGGAAAAACCTTAAAATCATGGGCACAAAAAGGGATTGTTGATACAGAAACAGCTTATG
ATTTTTTGATAGAAGATAAAACACAACAAGCCAAAATTAATAATCCTAAGGCAAGSCAAAATAAGCCTACTTGGAT
TAGATGAAGTTAAAAAAAATGGCAATCATAA
```

>*dnaB_3_47*

```
ATGTCCGATTGCTTTACTTTGTTTAAAATAGAAAACCAAATTTCTTTATCGTTAGAAGACCATAAAACACTCAATTT
ACTTTATCAACCATTAATTGGGGCCCAAGCTTTAGGGTTTTATTATATTTTTTTGTCCTTTAAAACATGATTTTGAATA
TGAACATCGATTTTTATTAGATCTTGCTGGCGTTACTACAAATATTTTTATCGARAATAAAGAAAAATTAGAAGCTC
TTAATTTATTAGCTACTTACCAAAACGTTAACCAAAAGAAAAAAATTTATTTTTTGATTGCTCCTTTAAGGGTAA
GATTTTTTACAAGATCCTCTTTAAGTGATTTTTTGTAAAGCGAAATCGGAGAAAAACATTATTTCACTTACAAAG
TCATTTTTTGCAAACAAATATCAACTTAAAAGAACTAAAAGATGTTAGCAAAAAATTCGATGATATCTACCAATTC
CAAAAAATTAACCTTCAATAAAGAATTTAACCAAAAAAATCTATTAGTAATTTAGGAAAAAGTTTTCTAAGACTA
ATTTTGATTATGAACTGTTTTAACCATTACCAGACCGTTTTAAAAACCTTCTTTGATAGAACAAAAACAATC
GATTTTATCCAAAAAGTAAGTTTATGATTTAAAACTGAACAAATAGCAGAAATTTATCAAAAAAGCTTTC
CTAATCCAAATGATATTGATTTATCAAAATTGCGTTTTAAATGTTAAAAAATATCATCATAAAAAACAATATTAATCA
GCAAAATATTGCTCTAAAAAATTACAAGACGATGAAGAAGCAACAATTGCTTACTTAAAACAAGCAACTCCA
GCAAAAGATTATCAAGATTATTGTCAAAAAACATCCAAACAATGGCAAGTGATATTGTTTTCCAATTATTAGA
AGAAATGATTTGAAATAGGTTTAGTCAACGCATTATTGATTTATATTTAAGATATCGCGATGGCGTGTGCCTT
AAATGTAATTTATTTGGAAAAACCTTAAAATCGTGGGCACAAAAAGGGATTGTTGATACAGAAACAGCTTATGA
TTTTTTGATAGAAGATAAAACACAACAAGCCAAAATTAATAATCCTAAGGCAAGCCAAAATAAGCCTACTTGGAT
AGATGAAGTTAAAAAAAATGGCAATCATAA
```

>dnaB_5_Stol13

ATGTCGGATTGCTTTACTTTGTTTAAAATAGAAAACCAAATTTCTTTGTCGTTAGAAGACCATAAAACACTCAATTT
ACTTTATCAACCATTAATTGGGGCCCAAGCTTTAGGGTTTTATTATATTTTTTTGTCTTTAAAACATGATTTTGAATA
TGAACATCGATTTTTATTAGATCTTGCTGGCGTTACTACAAATATTTTTATCGAAAATAAAGAAAAATTAGAAGCT
CTTAATTTATTAGCTACTTACCAAAACGTTAACCAAAAAGAAAAAATTTATTTTTTGATTGCTCCTTTTTAAGGGTAA
TGATTTTTTACAAGATCCTCTTTAAGTGATTTTTTGTAAAGCGAAATCGGAGAAAAACATTATTTTCACTTACAAA
GTCATTTTTTGCAAACAATATCAACTTAAAAGAACTAAAAGATGTTAGCAAAAAATTCGATGATATCTACCAATT
CCAAAAAATTAACCTCAATAAAGAATTTAACCAAAAAAATCTATTAGTAATTTAGGAAAAAGTTTTCTAAGACT
AATTTTGATTATGAACGTTTTTAACCATTACCAGACCGTTTTAAAAAACCTTCTTTGATAGAACAACAAAAACAAT
CGATTTTATCCAAAAAGTAAGTTTAGTTTATGATTTAAAACCTGAACAAATAGCAGAAATTTATCAAAAAAGCTTT
CCTAATCCAAATGATATTGATTTATCAAAATTGCGTTTTAAATGTTAAAAAATATCATCATAAAAAACAATATTAATC
AGCAAAATTATTGCTCTAAAAAATTACAAGACGATGAAGAAGCAACAATTGCTTACTTAAAACAAAGCAACTCCA
CGCAAGAATTATTCAAGATTATTGTCAAAAAAACATCCAAACAATGGCAAGTGATATTGTTTTCCAATTATTAGA
AAGAAATGATTTGAAATAGGTTTAGTCAACGCATTATTGATTTATATTTAAGATATCGCGATGGCGTGTTGCCTT
TAAATGTAATTTATTTGGAAAAACCTTAAAATCGTGGGCACAAAAAGGGATTGTTGATACAGAAACAGCTTATG
ATTTTTTGATAGAAGATAAAACACAACAAGCCAAAATTAATAATCCTAAGGCAAGCCAAAATAAGCCTACTTGGA
TAGATGAAGTTAAAAAAAATGGCAATCATAA

>dnaB_4_SIZ

ATGTCGGATTGCTTTACTTTGTTTAAAATAGAAAACCAAATTTCTTTGTCGTTAGAAGACCATAAAACACTCAATTT
ACTTTATCAACCATTAATTGGGGCCCAAGCTTTAGGGTTTTATTATATTTTTTTGTCTTTAAAACATGATTTTGAATA
TGAACATCGATTTTTATTAGATCTTGCTGGCGTTACTACAAATATTTTTATCGAAAATAAAGAAAAATTAGAAGCT
CTTAATTTATTAGCTACTTACCAAAACGTTAACCAAAAAGAAAAAATTTATTTTTTGATTGCTCCTTTTTAAGGGTAA
TGATTTTTTACAAGATCCTCTTTAAGTGATTTTTTGTAAAGCGAAATCGGAGAAAAACATTATTTTCACTTACAAA
GTCATTTTTTGCAAACAATATCAACTTAAAAGAACTAAAAGATGTTAGCAAAAAATTCGATGATATCTACCAATT
CCAAAAAATTAACCTCAATAAAGAATTTAACCAAAAAAATCTATTAGTAATTTAGGAAAAAGTTTTCTAAGACT
AATTTTGATTATGAACGTTTTTAACCATTACCAGACCGTTTTAAAAAACCTTCTTTGATAGAACAACAAAAACAAT
CGATTTTATCCAAAAAGTAAGTTTAGTTTATGATTTAAAACCTGAACAAATAGCAGAAATTTATCAAAAAAGCTTT
CCTAATCCAAATGATATTGATTTATCAAAATTGCGTTTTAAATGTTAAAAAATATCWTCATMAAAAACAATATTAATC
AGCAAAATTATTGCTCTAAAAAATTACAAGACGATGAAGAAGCAACAATTGCTTACTTAAAACAAAGCAACTCCA
CGCAAGAATTATTCAAGATTATTGTCAAAAAAACATCCAAACAATGGCAAGTGATATTGTTTTCCAATTATTAGA
AAGAAATGATTTGAAATAGGTTTAGTCAACGCATTATTGATTTATATTTAAGATATCGCGATGGCGTGTTGCCTT
TAAATGTAATTTATTTGGAAAAACCTTAAAATCGTGGGCACAAAAAGGGATTGTTGATACAGAAACAGCTTATG
ATTTTTTGATAGAAGATAAAACACAACAAGCCAAAATTAATAATCCTAAGGCAAGCCAAAATAAGCCTACTTGGA
TAGATGAAGTTAAAAAAAATGGCAATCATAA

>dnaB_8_DEP

ATGTCGGATTGCTTTACTTTGTTTAAAATAGAAAACCAAATTTCTTTGTCGTTAGAAGACCATAAAACACTCAATTT
ACTTTATCAACCATTAATTGGGGCCCAAGCTTTAGGGTTTTATTATATTTTTTTGTCTTTAAAACATGATTTTGAATA
TGAACATCGATTTTTATTAGATCTTGCTGGCGTTACTACAAATATTTTTATCGAAAATAAAGAAAAATTAGAAGCT
CTTAATTTATTAGCTACTTACCAAAACGTTAACCAAAAAGAAAAAATTTATTTTTTGATTGCTCCTTTTTAAGGGTAA
TGATTTTTTACAAGATCCTCTTTAAGTGATTTTTTGTAAAGCGAAATCGGAGAAAAACATTATTTTCACTTACAAA
GTCATTTTTTGCAAACAATATCAACTTAAAAGAACTAAAAGATGTTAGCAAAAAATTCGATGATATCTACCAATT
CCAAAAAATTAACCTCAATAAAGAATTTAACCAAAAAAATCTATTAGTAATTTAGGAAAAAGTTTTCTAAGACT
AATTTTGATTATGAACGTTTTTAACCATTACCAGACCGTTTTAAAAAACCTTCTTTGATAGAACAACAAAAACAAT
CGATTTTATCCAAAAAGTAAGTTTAGTTTATGATTTAAAACCTGAACAAATAGCAGAAATTTATCAAAAAAGCTTT
CCTAATCCAAATGATATTGATTTATCAAAATTGCGTTTTAAATGTTAAAAAATATCWTCATMAAAAACAATATTAATC
AGCAAAATTATTGCTCTAAAAAATTACAAGACGATGAAGAAGCAACAATTGCTTACTTAAAACAAAGCAACTCCA
CGCAAGAATTATTCAAGATTATTGTCAAAAAAACATCCAAACAATGGCAAGTGATATTGTTTTCCAATTATTAGA
AAGAAATGATTTGAAATAGGTTTAGTCAACGCATTATTGATTTATATTTAAGATATCGCGATGGCGTGTTGCCTT
TAAATGTAATTTATTTGGAAAAACCTTAAAATCGTGGGCACAAAAAGGGATTGTTGATACAGAAACAGCTTATG
ATTTTTTGATAGAAGATAAAACACAACAAGCCAAAATTAATAATCCTAAGGCAAGCCAAAATAAGCCTACTTGGA
TAGATGAAGTTAAAAAAAATGGCAATCATAA

8.3. Novosekvencirani geni *dnaG* iz '*Ca. P. solani*'

>dnaG_SA1

```
ATGCAAAAACAATTAATTAAGATGTTAACAAACAAACTTCGATAGTTGAATTAGTGCAAGAATTTGTTCAATTAA
AAAAATCTGGCAAAAATTATATGGGACTATGTCCTTTTCATGAGGAAAAAGCCCTTCTTTTTTCGGTTTCTCCTGAA
AAAAATATTGCTGTATGTATGTCTTGCAAAAAGGGCGGCGACCCAATCTTTTTTTACAAAAGTATTAATAATTTT
CTTTAATGAGGGCGCTTAATCAGTTGGCAGCTCGCTTAGGATTGACTTCTTTGTTGCTTACCAAATCAACTCATAAA
TACGCTCATTGTCATAAAATCATGCAAGAAACGCAAGATTTTTTTTGTGCATCAATTAACATAATAAACAAGCTT
TAGAATATCTAACCAAAAAGAGGTTTAGATGAAGCAACTATTGCCACTTTAAGTTAGGTTATGCTCCTAAATTTTCT
CTTTTATCGCGTTTTTTAACCGAAGAACTAAATTTAGTTATCAAGATTTAAAAACTTTAAGTTTAGTTAATCAAAA
TGAAGAAACAGGAAAATATTATGATTTTTTTTCAAAGTCGATTGATCTTTCCGATCACTTCTCCACATGGACAAGTC
ATTGCTTTTTCTAGTCGCAGTTTAGGGGATCAAACCCCTAAATACTTAAATAGTCCGGAAACGGTGCTTTTTAAAAA
AGGTGAAGTGTATATCAATTTTTTGAAAAACCAAGCGGAAATCAAAAAAAAAGAACTATCATCTTGCATGAAGG
TTTTTCGATGTTATAGCTTCCTTTTCAGGCGGGGGTAAAAAATGTTGTTGCCACTATGGGTACCAATCTAACTGAAA
AACATATCACACTTTTGAAAAAACTAACTAACCAAAATTGTGATTGCTTATGATGGAGATACCGCTGGAAAAAAG
CAGCCTTAGAGGTTGGATCAACTTTACATAAACATCAAATGGATGTTAAAATCCTTGAATTACCTGACAAGCTAGA
CCCTGATGAGTATATCCAAATCAAGGAGCATCTAAATATCGCCAATTATTAACCAATCACATAAAAAGCTTTTTTA
ACTTTAAAAATAGATCTTATTTGTCAAAAACCTTAATTTAATAATCGTAAAAAAATCGAAAACGAGTTAAAAGCTT
TATTACAAGGCGCAGATTTTGCTTCTAAGATGGTTTATCAAGAATATTACAAAACCAATATCAATTATTTATCAAT
TTAACCATCAACGAAACTATTGCAAGTGTCTACTCCAACCCAAAACCATATCAATTATAAAAAATTTGATTTTG
AGACTCATGTTTTAATTGAATTTATCAATAATAGAAGTTTTTTTTGAAAAAAATATCAAACCTTTGATGATGCCTCA
ATTTATTCGGATCTTGCTGTTATTTATTTTGTGCCCCAAATTAAGAATATTATAACAAAAATCCTCATCTTCAAGC
AATTCCTTGGTCTTATTTGCAATCTAAAAGTCACAACGAAAGCTACTAATGTTTTGTTATCAGAAATTA AAAACCACC
ATTTTTCAAAAATAAAAACCCTTTTGGAACAAACATTCTTTGAACAAGAAGTCAAATGAAAAAAATTAACAAAA
AAATCCAAGAAGTCAAGAAGCTATTGATCGGTTAAAAATAAGCTTAAAACCACTTATTGAATTCAAAAAAAGG
AAAAAAAAGAAGTGGCAGAAAAAATAATTAATTTACAAAAACAATTA AAAAGAATAAAAACAACAACGCCTTGAT
GTCATCAATGGCAAGTTTAATTAATTACTTATTAATGTTAGAAATAGAAAATAAAATCTAG
```

>dnaG_1_HR2

```
ATGCAAAAACAATTAATTAAGATGTTAACAAACAAACTTCGATAGTTGAATTAGTGCAAGAATTTGTTCAATTAA
AAAAATCTGGCAAAAATTATATGGGACTATGTCCTTTTCATGAGGAAAAAGCCCTTCTTTTTTCGGTTTCTCCTGAA
AAAAATATTGCTGTATGTATGTCTTGCAAAAAGGGCGGCGACCCAATCTTTTTTTACAAAAGTATTAATAATTTT
CTTTAATGAGGGCGCTTAATCAGTTGGCAGCTCGCTTAGGATTGACTTCTTTGTTGCTTACCAAATCAACTCATAAA
TACGCTCATTGTCATAAAATCATGCAAGAAACGCAAGATTTTTTTTGTGCATCAATTAACATAATAAACAAGCTT
TAGAATATCTAACCAAAAAGAGGTTTAGATGAAGCAACTATTGCCACTTTAAGTTAGGTTATGCTCCTAAATTTTCT
CTTTTATCGCGTTTTTTAACCGAAGAACTAAATTTAGTTATCAAGATTTAAAAACTTTAAGTTTAGTTAATCAAAA
TGAAGAAACAGGAAAATATTATGATTTTTTTTCAAAGTCGATTGATCTTTCCGATCACTTCTCCACATGGACAAGTC
ATTGCTTTTTCTAGTCGCAGTTTAGGGGATCAAACCCCTAAATACTTAAATAGTCCGGAAACGGTGCTTTTTAAAAA
AGGTGAAGTGTATATCAATTTTTTGAAAAACCAAGCGGAAATCAAAAAAAAAGAACTATCATCTTGCATGAAGG
TTTTTCGATGTTATAGCTTCCTTTTCAGGCGGGGGTAAAAAATGTTGTTGCCACTATGGGTACCAATCTAACTGAAA
AACATATCACACTTTTGAAAAAACTAACTAACCAAAATTGTGATTGCTTATGATGGAGATACCGCTGGAAAAAAG
CAGCCTTAGAGGTTGGATCAACTTTACATAAACATCAAATGGATGTTAAAATCCTTGAATTACCTGACAAGCTAGA
CCCTGATGAGTATATCCAAATCAAGGAGCATCTAAATATCGCCAATTATTAACCGATCACATAAAAAGCTTTTTTA
ACTTTAAAAATAGATCTTATTTGTCAAAAACCTTAATTTAATAATCGTAAAAAAATCGAAAACGAGTTAAAAGCTT
TATTACAAGGCGCAGATTTTGCTTCTAAGATGGTTTATCAAGAATATTACAAAACCAATATCAATTATTTATCAAT
TTAACCATCAACGAAACTATTGCAAGTGTCTACTCCAACCCAAAACCATATCAATTATAAAAAATTTGATTTTG
AGACTCATGTTTTAATTGAATTTATCAATAATAGAAGTTTTTTTTGAAAAAAATATCAAACCTTTGATGATGCCTCA
ATTTATTCGGATCTTGCTGTTATTTATTTTGTGCCCCAAATTAAGAATATTATAACAAAAATCCTCATCTTCAAGC
AATTCCTTGGTCTTATTTGCAATCTAAAAGTCACAACGAAAGCTACTAATGTTTTGTTATCAGAAATTA AAAACCACC
ATTTTTCAAAAATAAAAACCCTTTTGGAACAAACATTCTTTGAACAAGAAGTCAAATGAAAAAAATTAACAAAA
AAATCCAAGAAGTCAAGAAGCTATTGATCGGTTAAAAATAAGCTTAAAACCACTTATTGAATTCAAAAAAAGG
AAAAAAAAGAAGTGGCAGAAAAAATAATTAATTTACAAAAACAATTA AAAAGAATAAAAACAACAACGCCTTGAT
GTCATTAATGGCAAGTTTAATTAATTACTTATTAATGTTAGAAATAGAAAATAAAATCTAG
```

>dnaG_4_SIZ

ATGCAAAAACAATTAATTAAGATGTAAACAAACAAACTTCGATAGTTGAATTAGTGCAAGAATTTGTTCAATTAA
AAAAATCTGGCAAAAATTATATGGGACTATGTCCTTTTCATGAGGAAAAAGCCCTCTTTTTTCGGTTTCTCCTGAA
AAAAATATTGCTGTATGTATGTCTTGCAAAAAGGGCGGCGACCCAATCTTTTTTTACAAAAGTATTAATAATTTT
CTTTAATGAGGGCGCTTAATCAGTTGGCAGCTCGCTTAGGATTGACTTCTTTGTTGCTTACCAAATCAACTCATAAA
TACGCTCATTGTCATAAAAATCATGCAAGAAACGCAAGATTTTTTTTTGTCATCAATTAACATAATAAACAAGCTT
TAGAATATCTAACCAAAAAGAGGTTTAGATGAAGCAACTATTGCCACTTTAAGTTAGGTTATGCTCCTAAATTTTCT
CTTTATCGCGTTTTTTAACCGAAGAACTAAATTTAGTTATCAAGATTTAAAAACTTTAAGTTTAGTTAATCAAAA
TGAAGAAACAGGAAAATATTATGATTTTTTTCAAAGTCGATTGATCTTTCCGATCACTTCTCCACATGGACAAGTC
ATTGCTTTTTCTAGTCGCAGTTTAGGCGATCAAACCCCTAAATACTTAAATAGTCCGAAACGGTGCTTTTTAAAAA
AGGTGAAGTGTATATCAATTTTTTTGAAAACCAAGCGGAAATCAAAAAAAAAGAACTATCATCTTGCATGAAGG
TTTTTCGATGTTATAGCTTCCCTTTCAGGCGGGGGTAAAAAATGTTGTTGCCACTATGGGTACCAATCTAACTGAAA
AACATATCACACTTTTGAAAAAATACTAACTAACCAAAATTGTGATTGCTTATGATGGAGATACCGCTGGAAAAAAG
CAGCCTTAGAGGTTGGATCAACTTTACATAAACATCAAATGGATGTTAAAATCCTTGAATTACCTGACAAGCTAGA
CCCTGATGAGTATATCCAAATCAAGGAGCATCTAAATATCGCCAATTATTAACCGATCACATAAAAAGCTTTTTTA
ACTTTAAAAATAGATCTTATTTGTCAAAAATACTTAAATTTAATAATCGTAAAAAATCGAAAACGAGTTAAAAGCTT
TATTACAAGGCGCAGATTTTGTCTTCTAAGATGGTTTATCAAGAATATTTACAAACCAATATCAATTATTTATCAAT
TTAACCATCAACGAAACTATTGCAAGTGTCTACTCCAACCCAAAACCATATCAATTATAAAAAATTTGATTTTG
AGACTCATGTTTTAATTGAATTTATCAATAATAGAAGTTTTTTTTGAAAAAATTATCAAACCTTTGATGATGCCTCA
ATTTATTCGGATCTTGCTGTTATTTATTTGTTGCCAAAAATAAAGAATATTATAACAAAAATCCTCATCTTCAAGC
AATTCCTTGGTCTTATTTTCGAATCTAAAAGTCACAACGAAGCTACTAATGTTTTGTTATCAGAAATTAACCAAAA
ATTTTTCAAAAATAAAACCTTTTGGAAACAAACATTCTTTGAACAAGAAGTCAAAATGAAAAAATTAACAAAA
AAATCCAAGAAGTTCAAGAAGCTATTGATCGGTTAAAAATAAGCTTAAACCACTTATTGAATTCAAAAAAGG
AAAAAAGAAGTGGCAGAAAAAATAATTAATTTACAAAAACAATTAAAAAAGAATAAAAAACAACGCCTTGAT
GTCATCAATGGCAAGTTTAATTACTTATTAATGTTAGAAATAGAAAAATAAAATCTAG

>dnaG_5_Stol13

ATGCAAAAACAATTAATTAAGATGTAAACAAACAAACTTCGATAGTTGAATTAGTGCAAGAATTTGTTCAATTAA
AAAAATCTGGCAAAAATTATATGGGACTATGTCCTTTTCATGAGGAAAAAGCCCTCTTTTTTCGGTTTCTCCTGAA
AAAAATATTGCTGTATGTATGTCTTGCAAAAAGGGCGGCGACCCAATCTTTTTTTACAAAAGTATTAATAATTTT
CTTTAATGAGGGCGCTTAATCAGTTGGCAGCTCGCTTAGGATTGACTTCTTTGTTGCTTACCAAATCAACTCATAAA
TACGCTCATTGTCATAAAAATCATGCAAGAAACGCAAGATTTTTTTTTGTCATCAATTAACATAATAAACAAGCTT
TAGAATATCTAACCAAAAAGAGGTTTAGATGAAGCAACTATTGCCACTTTAAGTTAGGTTATGCTCCTAAATTTTCT
CTTTATCGCGTTTTTTAACCGAAGAACTAAATTTAGTTATCAAGATTTAAAAACTTTAAGTTTAGTTAATCAAAA
TGAAGAAACAGGAAAATATTATGATTTTTTTCAAAGTCGATTGATCTTTCCGATTACTTCTCCACATGGACAAGTCA
TTGCTTTTTCTAGTCGCAGTTTAGGCGATCAAACCCCTAAATACTTAAATAGTCCGAAACGGTGCTTTTTAAAAA
GGTGAAGTGTATATCAATTTTTTTGAAAACCAAGCGGAAATCAAAAAAAAAGAACTATCATCTTGCATGAAGGT
TTTTTCGATGTTATAGCTTCCCTTTCAGGCGGGGGTAAAAAATGTTGTTGCCACTATGGGTACCAATCTAACTGAAA
ACATATCACACTTTTGAAAAAATACTAACTAACCAAAATTGTGATTGCTTATGATGGAGATACCGCTGGAAAAANGC
AGCCTTAGAGGTTGGATCAACTTTACATAAACATCAAATGGATGTTAAAATCCTTGAATTACCTGACAAGCTAGAC
CCTGATGAGTATATCCAAATCAAGGAGCATCTAAATATCGCCAATTATTAACCGATCACATAAAAAGCTTTTTTAA
CTTTAAAAATAGATCTTATTTGTCAAAAATACTTAAATTTAATAATCGTAAAAAATCGAAAACGAGTTAAAAGCTTT
ATTACAAGGCGCAGATTTTGTCTTCTAAGATGGTTTATCAAGAATATTTACAAACCAATATCAATTATTTATCAATT
TAACCATCAACGAAACTATTGCAAGTGTCTACTCCAACCCAAAACCATATCAATTATAAAAAATTTGATTTTGA
GACTCATGTTTTAATTGAATTTATCAATAATAGAAGTTTTTTTTGAAAAAATTATCAAACCTTTGATGATGCCTCAA
TTTATTCGGATCTTGCTGTTATTTATTTGTTGCCAAAAATAAAGAATATTATAACAAAAATCCTCATCTTCAAGCA
ATTCCTTGGTCTTATTTTCGAATCTAAAAGTCACAACGAAGCTACTAATGTTTTGTTATCAGAAATTAACCAAAA
TTTTTTCAAAAATAAAACCTTTTGGAAACAAACATTCTTTGAACAAGAAGTCAAAATGAAAAAATTAACAAAA
AATCCAAGAAGTTCAGAGAAGCTATTGATCGGTTAAAAATAAGCTTAAACCACTTATTGAATTCAAAAAAGGA
AAAAAAGAAGTGGCAGAAAAAATAATTAATTTACAAAAACAATTAAAAAAGAATAAAAAACAACGCCTTGATG
TCATTAATGGCAAGTTTAATTACTTATTAATGTTAGAAATAGAAAAATAAAATCTAG

>dnaG_8_DEP

ATGCAAAAACAATTAATTAAGATGTAAACAAACAAACTTCGATAGTTGAATTAGTGCAAGAATTTGTTCAATTAA
AAAAATCTGGCAAAAATTATATGGGACTATGTCCTTTTCATGAGGAAAAAGCCCTCTTTTTTCGGTTTCTCCTGAA
AAAAATATTGCTGTATGTATGTCTTGCAAAAAGGGCGGCGACCCAATCTTTTTTTACAAAAGTATTA AAAATATTT
CTTTAATGAGGGCGCTTAATCAGTTGGCAGCTCGCTTAGGATTGACTTCTTTTGTGCTTACCAAATCAACTCATAAA
TACGCTCATTGTCATAAAAATCATGCAAGAAACGCAAGATTTTTTTTTGTTATCAATTA AACATAATAAACAAGCTT
TAGAATATCTAACCAAAAAGAGGTTTAGATGAAGCAACTATTGCCACTTTAAGTTAGGTTATGCTCCTAAATTTTCT
CTTTATCGCGTTTTTTAACCGAAGAACTAAATTTAGTTATCAAGATTTAAAAACTTTAAGTTTAGTTAATCAAAA
TGAAGAAACAGGAAAATATTATGATTTTTTTCAAAGTCGATTGATCTTTCCGATCACTTCTCCACATGGACAAGTC
ATTGCTTTTTCTAGTCGCAGTTTAGGCGATCAAACCCCTAAATACTTAAATAGTCCGAAACGGTGCTTTTTAAAAA
AGGTGAAGTGTATATCAATTTTTTTGAAAACCAAGCGGAAATCAAAAAAAAAGAACTATCATCTTGCATGAAGG
TTTTTTCGATGTTATAGCTTCCTTTTCAGGCGGGGGTAAAAAATGTTGTTGCCACTATGGGTACCAATCTAACTGAAA
AACATATCACACTTTTGAAAAAACTAACTAACCAAAATTGTGATTGCTTATGATGGAGATACCGCTGGAAAAAAG
CAGCCTTAGAGGTTGGATCAACTTTACATAAACATCAATGGATGTTAAAATCCTTGAATTACCTGACAAGCTAGA
CCCTGATGAGTATATCCAAATTC AAGGAGCATCTAAATATCGCCAATTATTAACCGATCACATAAAAAGCTTTTTTA
ACTTTAAAAATAGATCTTATTTGTCAAAAACCTTAATTTTAATAATCGTAAAAAAATCGAAAACGAGTTAAAAGCTT
TATTACAAGGCGCAGATTTTGTCTTCTAAGATGGTTTATCAAGAATATTTACAAACCAATATCAATTATTTATCAAT
TTAACCATCAACGAAACTATTGCAAGTGTCTACTCCAACCCAAAACCATATCAATTATAAAAAATTTGATTTTG
AGACTCATGTTTTAATTGAATTTATCAATAATAGAAGTTTTTTTTGAAAAAAATTATCAAACCTTTGATGATGCCTCA
ATTTATTCGGATCTTGCTGTTATTTATTTTGTGCCAAAAATTAAGAATATTATAACAAAAATCCTCATCTTCAAGC
AATTCCTTGGTCTTATTTTCGAATCTAAAAGTCACAACGAAAGCTACTAATGTTTTGTTATCAGAAATTA AAAACCACC
ATTTTTTCAAAAATAAAAACCTTTTGGAAACAAACATTCTTTGAACAAGAAGCTGCAAATGAAAAAAATTAACAAAA
AAATCCAAGAAGCTTCAAGAAGCTATTGATCGGTTAAAAATAAGCTTAAAACCACTTATTGAATTCAAAAAAAAGG
AAAAAAAAGAAGCTGGCAGAAAAAATAATTAATTTACAAAAACAATTA AAAAAGAATAAAAACAACAACGCCTTGAT
GTCATTAATGGCAAGTTTAATTAATTATTAATGTTAGAAATAGAAAATAAAAATCTAG

>dnaG_3_47

ATGCAAAAACAATTAATTAAGATGTAAACAAACAAACTTCGATAGTTGAATTAGTGCAAGAATTTGTTCAATTAA
AAAAATCTGGCAAAAATTATATGGGACTATGTCCTTTTCATGAGGAAAAAGCCCTCTTTTTTCGGTTTCTCCTGAA
AAAAATATTGCTGTATGTATGTCTTGCAAAAAGGGCGGCGACCCAATCTTTTTTTACAAAAGTATTA AAAATATTT
CTTTAATGAGGGCGCTTAATCAGTTGGCAGCTCGCTTAGGATTGACTTCTTTTGTGCTTACCAAATCAACTCATAAA
TACGCTCATTGTCATAAAAATCATGCAAGAAACGCAAGATTTTTTTTTGTTATCAATTA AACATAATAAACAAGCTT
TAGAATATCTAACCAAAAAGAGGTTTAGATGAAGCAACTATTGCCACTTTAAGTTAGGTTATGCTCCTAAATTTTCT
CTTTATCGCGTTTTTTAACCGAAGAACTAAATTTAGTTATCAAGATTTAAAAACTTTAAGTTTAGTTAATCAAAA
TGAAGAAACAGGAAAATATTATGATTTTTTTCAAAGTCGATTGATCTTTCCGATCACTTCTCCACATGGACAAGTC
ATTGCTTTTTCTAGTCGCAGTTTAGGCGATCAAACCCCTAAATACTTAAATAGTCCGAAACGGTGCTTTTTAAAAA
AGGTGAAGTGTATATCAATTTTTTTGAAAACCAAGCGGAAATCAAAAAAAAAGAACTATCATCTTGCATGAAGG
TTTTTTCGATGTTATAGCTTCCTTTTCAGGCGGGGGTAAAAAATGTTGTTGCCACTATGGGTACCAATCTAACTGAAA
AACATATCACACTTTTGAAAAAACTAACTAACCAAAATTGTGATTGCTTATGATGGAGATACCGCTGGAAAAAAG
CAGCCTTAGAGGTTGGATCAACTTTACATAAACATCAATGGATGTTAAAATCCTTGAATTACCTGACAAGCTAGA
CCCTGATGAGTATATCCAAATTC AAGGAGCATCTAAATATCGCCAATTATTAACCGATCACATAAAAAGCTTTTTTA
ACTTTAAAAATAGATCTTATTTGTCAAAAACCTTAATTTTAATAATCGTAAAAAAATCGAAAACGAGTTAAAAGCTT
TATTACAAGGCGCAGATTTTGTCTTCTAAGATGGTTTATCAAGAATATTTACAAACCAATATCAATTATTTATCAAT
TTAACCATCAACGAAACTATTGCAAGTGTCTACTCCAACCCAAAACCATATCAATTATAAAAAATTTGATTTTG
AGACTCATGTTTTAATTGAATTTATCAATAATAGAAGTTTTTTTTGAAAAAAATTATCAAACCTTTGATGATGCCTCA
ATTTATTCGGATCTTGCTGTTATTTATTTTGTGCCAAAAATTAAGAATATTATAACAAAAATCCTCATCTTCAAGC
AATTCCTTGGTCTTATTTTCGAATCTAAAAGTCACAACGAAAGCTACTAATGTTTTGTTATCAGAAATTA AAAACCACC
ATTTTTTCAAAAATAAAAACCTTTTGGAAACAAACATTCTTTGAACAAGAAGCTGCAAATGAAAAAAATTAACAAAA
AAATCCAAGAAGCTTCAAGAAGCTATTGATCGGTTAAAAATAAGCTTAAAACCACTTATTGAATTCAAAAAAAAGG
AAAAAAAAGAAGCTGGCAGAAAAAATAATTAATTTACAAAAACAATTA AAAAAGAATAAAAACAACAACGCCTTGAT
GTCATTAATGGCAAGTTTAATTAATTATTAATGTTAGAAATAGAAAATAAAAATCTAG

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 16.05.1997. u Zagrebu te sam pohađala OŠ Dragutin Tadijanović te XVI. jezičnu gimnaziju koju sam završila s odličnim uspjehom i kao domaturantica godine. Tijekom srednje škole stekla sam diplome iz engleskog (C2) i njemačkog jezika (C1). Osim toga bavila sam se volonterskim radom na Znanstvenom pikniku, a kasnije sam bila i voditeljica volontera na istom tom znanstveno-popularnom događanju. Nakon gimnazije upisala sam Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer molekularna biologija gdje sam u roku završila preddiplomski studij te nastavila studiranje upisom na diplomski studij molekularne biologije. Na drugoj godini fakulteta bila sam demonstrator na sekcijama iz zoologije, a tijekom druge i treće godine fakulteta sudjelovala sam na Noći biologije kao student edukator. Na drugoj godini fakulteta sam s dvije kolegice napisala znanstveni rad „Bijela ticala: *in silico* istraživanje neobjašnjelog evolucijskog fenomena“ za koji smo dobile Rektorovu nagradu 2018. godine. S tim radom sudjelovala sam kao izlagač plakata na Simpoziju studenata biologije BIOSFERA u Ljubljani te kao izlagač prezentacije na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja SISB 2018. godine. U ljetnom semestru 2020. godine odslušala sam predmete na Bečkom sveučilištu u sklopu Erasmus razmjene. Tijekom preddiplomskog studija primala sam STEM stipendiju, a na diplomskom studiju primam stipendiju Grada Zagreba za izvrsnost. Odradila sam prakse na institutu Ruđer Bošković u laboratoriju za molekularnu genetiku, na Institutu za istraživanje mozga u laboratoriju za istraživanje Alzheimerove bolesti te u Kielu na Institutu za kliničku molekularnu biologiju u laboratoriju za staru DNA.