

SLIČNOSTI I RAZLIKE U MOLEKULARNOM PATERNU ITS REGIONA NEKIH *GLOBODERA ROSTOCHIENSIS* POPULACIJA

VIOLETA ORO, NENAD DOLOVAC, ŽARKO IVANOVIĆ

Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, Srbija
e-mail: viooro@yahoo.com

REZIME

Evolutivni odnosi organizama u prošlosti su zasnovani na morfološkim, biogeografskim i paleontološkim podacima. Pojava molekularnih alata omogućila je izučavanje genetičke strukture organizama i proučavanje njihove filogenije uz pomoć proteinskih ili nukleotidnih sekvenci, što je posebno značajno kod organizama kao što su cistolike nematode koje nemaju fosilnih ostataka a morfološki su veoma slične. U ovom radu je data molekularna karakterizacija nekih populacija *G. rostochiensis* sa naših prostora u molekularnom paternu ITS regiona. Molekularna karakterizacija ispitivanih populacija je pokazala sličnosti ispitivanih populacija sa već ranije okarakterisanim populacijama ali i neke razlike.

Ključne reči: *Globodera rostochiensis*, populacije, ITS, sličnosti, razlike

UVOD

Evolutivni odnosi organizama u prošlosti su se zasnivali na morfološkim, biogeografskim i paleontološkim podacima. Problem je postajao složeniji ukoliko je neki od ovih elemenata nedostajao kao što je slučaj sa nematodama koje gotovo da nemaju fosilnih ostataka a morfološki su veoma slične. Pojava molekularnih alata omogućila je izučavanje genetičke strukture organizama i proučavanje njihove filogenije uz pomoć proteinskih ili nukleotidnih sekvenci. Na ovaj način su i cistolike nematode krompira (CNK): *Globodera pallida* Stone i *Globo-*

dera rostochiensis Wollenweber kao sestričke a uz to i karantinske vrste mogle da se lakše identifikuju i da se utvrde smernice njihove specijacije u vremenu i prostoru.

Utvrđeno je da se one razlikuju u 70% polipeptida. Ovako velika divergencija upućuje da su razlike u proteinima akumulirane milionima godina unazad bez značajnijih promena u morfologiji (Bakker and Bowman-Smits, 1988).

Globodera rostochiensis je prisutna u našoj zemlji od 2000. god. (Krnjaić et al., 2000). Do danas je utvrđena na više lokaliteta u centralnoj i zapadnoj Srbiji a dva nalaza sa lokaliteta Tomanj i Teočin su i

morfološki okarakterisana (Oro, 2011).

U ovom radu je data njihova molekularna karakterizacija kao i sličnosti i razlike u molekularnom paternu ITS regiona ovih i nekih drugih populacija *G. rostochiensis* sa ovih prostora. Prema navodima Dorris et al., (1999) ribozomski RNA cistron je prisutan u oko 55 kopija u genomu nematoda i obuhvata malu gensku podjedinicu-SSU (18S), interni transkribovani spejser ITS-1, zatim 5.8S gen, ITS-2, i veliku gensku podjedinicu-LSU (28S). Eksterni ne transkribovani spejser (NTS) razdvaja svaki transkribovani cistron.

ITS region sadrži dovoljno informacija za dijagnostikovanje većine nematodnih vrsta (Powers, 2004). Ovaj region se koristi kao "molekularni marker" različitih filuma eukariota (Coleman, 2007) a i kao univerzalni molecular metod za identifikaciju biljnih vrsta (Linder et al., 2000).

MATERIJAL I METODE

Ciste *Globodera* sa lokaliteta Tomanj, Teočin i Gojna gora su ekstrahovane Spirsovim aparatom (Spears, 1968) i sakupljene na situ od 150 mm. DNK je ekstrahovana iz pojedinačnih cisti sa Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) u saglasnosti sa instrukcijama proizvođača. PCR je urađen sa prajmerima za sekvenciranje: TW 81 and AB 28, prema Skantar et al., 2007. Sekvence ovih populacija su deponovane u NCBI GenBank pod sledećim brojevima: Tomanj V51 KC 508108, Tomanj V50 KC 508109, Teocin KC 508110 i Gojna gora KC 508111. Poređenja su rađena sa populacijama iz iste baze podataka: DQ847118 Scarcliffe (UK), GU084809 Laguna Pampa (Bolivia), AY700060 Libelice (Slovenia), EF153840 York (UK), EF622524 Victoria (Australia), DQ847120 AaMoscow (Russia), DQ847117 BbMoscow (Russia), DQ847119 CcMoscow (Russia), EF153839 New York (USA), GQ294517 Saint Hyacinthe (Canada), FJ212162 Quebec (Canada), AF016876 Falkland Islands, DQ887562 South Africa, AF016872 Allpachaka (Peru), AF016874 Anta (Peru), AF016873

Peru, AB207271 Japan, FJ212164 Avondale (Canada), GU084810 Tiraque (Bolivia), AF016877 Cuapiaxtla (Mexico), EU855120 Poland, HM159430 Milatovići (Serbia). Filogenetske analize su urađene u okviru MEGA 4.0.2 (Tamura et al., 2007), Phym1 2.4.4 (Guindon and Gascuel, 2003) i MrBayes 3.1.2. (Huelsenbeck and Ronquist, 2005) kompjuterskih softvera.

REZULTATI I DISKUSIJA

Molekularna karakterizacija ispitivanih populacija je pokazala sličnost ispitivanih populacija sa već ranije okarakterisanim populacijama (Oro and Oro Radovanović, 2012) ali i neke različitosti. Interni transkribovani spejser (ITS) region sadrži 883 nukleotida od kojih je ITS-1 region predstavljen od 1. do 514. nukleotida kao parcijalni segment, 5.8 S je obuhvatao oblast od 515. do 672. nukleotida kao kompletan segment, i ITS-2 se nalazi od 673. do 883. pozicije kao parcijalni segment. Sekvence populacija Teočin (izolat V55) i Tomanj (izolat V51) su se podudarile sa populacijom Milatovići i bile slične populaciji Gojna gora (izolat V3).

Međutim u populaciji Tomanj se pojavio haplotip (izolat V50) koji se razlikovao od ovih populacija a kako se kasnije pokazalo i od drugih populacija u svetu. Kada je ispitivan procenat razlike haplotipa V50 preko direktnog sparivanja populacija (p-distance) on je varirao od 0.9 u poredjenju sa ostalim haplotipovima populacija Teočin, Tomanj i Milatovići i 0.8 u poredjenju sa populacijom iz Gojne gore a u odnosu na strane populacije se kretao između 0.37 u poredjenju sa populacijama Scarcliffe iz Engleske, ccMoscow iz Rusije, 1.12 u odnosu na populaciju sa Folklandskih ostrva, 1.31 u odnosu na populaciju Anta iz Perua i Poljsku do 1.87 u odnosu na populaciju Laguna Pampa iz Bolivije.

Razlike u genetičkom smislu između haplotipa V50 i ostalih haplotipova naših populacija su se pokazale na 11 varirajućih segmenata koji su bili pozicionirani na: 72. mestu T umesto C, 73. G umesto

A, 79. mestu A umesto G, 80. mestu T umesto C, 88. mestu G kao i kod Gojne gore a ne T kao kod Milatovića, Tomnja i Teočina, 149. mestu A umesto G, 653. mestu T umesto C, 708. mestu T kao kod Gojne gore umesto T ili A, 739. mestu C umesto T ili C, 754. mestu G umesto T ili G i 763. mestu G umesto T. Pozicije značajne za «parsimony princip» su na 88., 708., 739. i 754. mestu a «singleton» na 72., 73., 79., 80., 149., 653. i 763. mestu. Najveći broj varijacija je bio u ITS-1 regionu (6), zatim u ITS-2 regionu (4) a najmanje na 5.8S genu (1). Sadržaj azotnih baza (Tabela 1) je varirao i bio u saglasnosti sa prethodnim ispitivanjima. Sve naše populacije su (u proseku) imale veći sadržaj guanina (27.6) i timina (27.3), dok je procenat adenina (20.5) bio najmanji. Sadržaj GC je bio nešto veći od AT.

Genetička divergencija domaćih i stranih populacija može i grafički da se prikaže različitim filogenetskim metodama poput Neighbour Joining, Maximum Likelihood, Bayesian inference itd. Filogenetski odnosi naših i stranih populacija sa grafika 1 su dobijene Neighbour Joining metodom (Saitou and Nei, 1987). Kružni dendrogram je dobijen od 500 replikacija uz korišćenje Maximum composite modela. Pozicije kodona su bile tri plus ne kodirajuća. Filogenetske analize su urađene uz pomoć MEGA 4.0.2 (Tamura et al., 2007) kompjuterskog programa.

Neighbour Joining kružni dendrogram (Graf. 1) je generisao tri klastera i u svakom od njih se nalaze naše populacije. Populacije Milatovići, Tomanj V51 i Teočin su u zajedničkoj klasternoj jedinici (kladi) zajedno sa populacijama AaMoscow (Russia), Victoria (Australia), Quebec, Saint Hyacinthe (Canada), South Africa, New York, Alpachaka (Peru) kao i nešto divergentnijim Libelice (Slovenia) i Falkland Islands. U sledećem klasteru je naša populacija Gojna gora sa populacijama Japan, Avondale (Canada), York (UK), BbMoscow (Russia), Peru i Laguna Pampa iz Bolivije. U poslednjem klasteru je naša populacija Tomanj haplotip V50 sa popu-

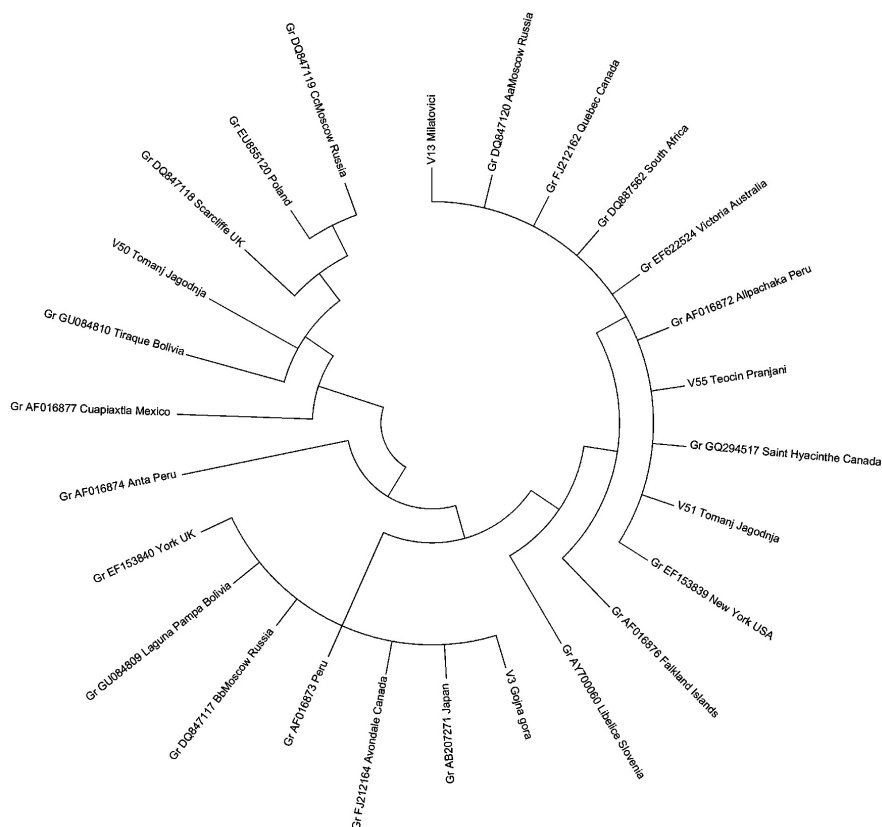
lacijama Tiraque (Bolivia), Scarcliffe (UK), Poland, CcMoscow (Russia) i Cuapiaxtla (Mexico). Pošto se smatra da sve populacije potiču iz oblasti Anda u južnoj Americi, prvi klaster ukazuje na monofiletско poreklo naših populacija Milatovići, Tomanj V51 i Teočin i Alpachaka iz Perua. Drugi klaster ukazuje na poreklo ovih populacija pa i naše iz Gojne gore iz Perua odn. Bolivije dok za treći klaster potencijalna predačka populacija ne može da se precizira.

Filogenetske analize sa grafika 2 su urađene uz pomoć Phym1 2.4.4 programa (Guindon and Gascuel, 2003), model nukleotidne supstitucije je Hasegawa, Kishino i Yano model (Hasegawa et al., 1985) uz 100 replikacija a sama grafička prezentacija dendrograma je dobijena eksportovanjem Newick formata u MEGA 4 (Tamura et al., 2007).

Dendrogram maksimalne verovatnoće (Graf. 2) je klastirao populacije Milatovići, Tomanj V51 i Teočin u zajedničku kladu sa populacijama AaMoscow (Russia), Victoria (Australia), Quebec, Saint Hyacinthe (Canada), South Africa, New York, Alpachaka (Peru) kao i nešto divergentnijim Libelice (Slovenia) i Falkland Islands. Populacija Tomanj V50 je zajedno sa Tiraque (Bolivia), Scarcliffe (UK), Poland i CcMoscow (Russia), dok je populacija Gojna gora u istom klasteru sa York (UK), BbMoscow (Russia) i Japan kao i divergentnijim populacijama Peru, Avondale (Canada) i Laguna Pampa (Bolivia).

Filogenetske analize (Graf. 3) su dobijene uz pomoć Bayesian inference korišćenjem MrBayes 3.1.2. kompjuterskog softvera (Huelsenbeck and Ronquist, 2005). Model nukleotidne evolucije je bio model Hasegawa, Kishino i Yano. Dendrogram je dobijen uz pomoć 500 000 generacija (Markov Chain Monte Carlo) i frekvencijom uzorka 100.

Bajesov dendrogram je slično prethodnim grupisao naše populacije Milatovići, Tomanj V51 i Teočin u zajednički klaster sa populacijama AaMoscow (Russia), Victoria (Australia), Quebec, Saint Hyacinthe (Canada), South Africa, New York, Al-



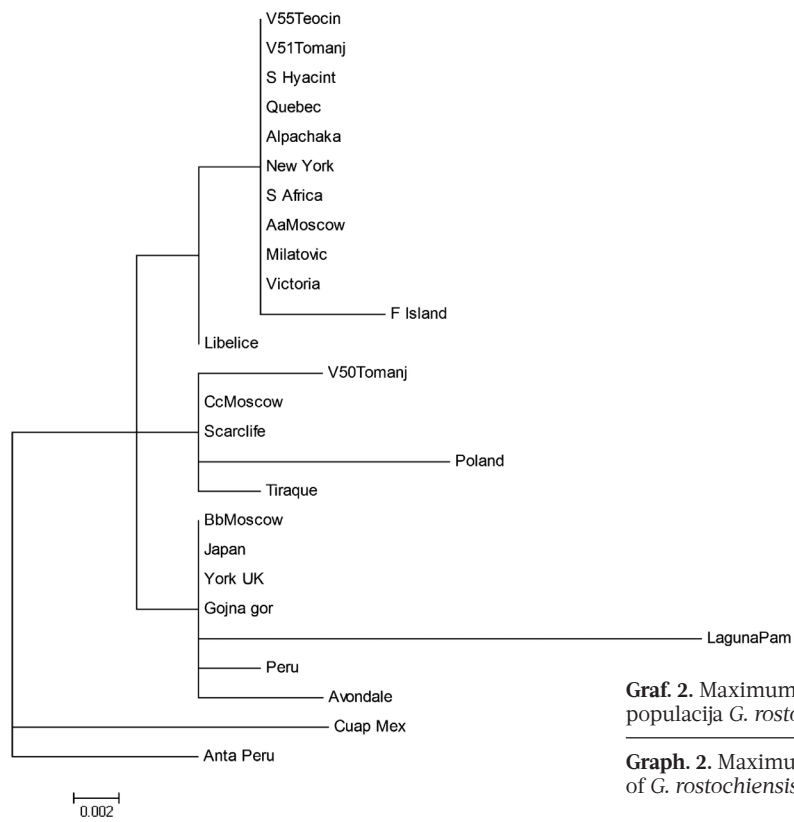
Graf. 1. Neighbour Joining kružni dendrogram populacija *G. rostochiensis*.

Graph. 1. Neighbour Joining circle dendrogram of *G. rostochiensis* populations.

Tabela 1. Sadržaj azotnih baza naših populacija *G. rostochiensis*.

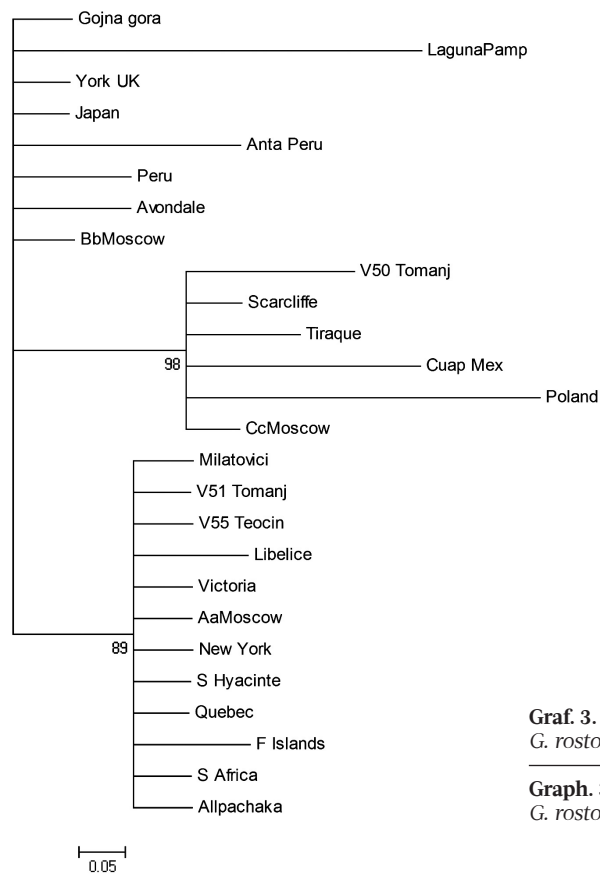
Table 1. Content of nitrogen bases of local *G. rostochiensis* populations.

Populacije	T (U)	C	A	G	GC	AT	GC/AT
Gojna gora	27.20	24.60	20.40	27.80	52.40	47.60	1.10
Milatovići	27.30	24.70	20.50	27.60	52.30	47.80	1.09
Tomanj V50	27.40	24.30	20.50	27.70	52.00	47.90	1.08
Tomanj V51	27.40	24.60	20.50	27.50	52.10	47.90	1.09
Teočin	27.40	24.60	20.50	27.50	52.10	47.90	1.09
\bar{x}	27.30	24.60	20.50	27.60	52.18	47.82	1.09



Graf. 2. Maximum Likelihood dendrogram populacija *G. rostochiensis*.

Graph. 2. Maximum Likelihood dendrogram of *G. rostochiensis* populations.



Graf. 3. Bajesov dendrogram populacija *G. rostochiensis*.

Graph. 3 Bayesian dendrogram of *G. rostochiensis* populations.

pachaka (Peru) kao i nešto divergentnijim Libelice (Slovenia) i Falkland Islands. U sledećem klasteru je populacija Tomanj V50 zajedno sa Tiraque (Bolivia), Scarcliffe (UK), Poland, CcMoscow (Russia) i Cuapiaxtla (Mexico). Gojna gora je u grupi sa populacijama Japan, Avondale (Canada), York (UK), BbMoscow (Russia), Peru i Anta (takođe iz Perua) i Laguna Pampa iz Bolivije.

Kako se sve naše populacije nalaze u različitim klasterima, ovi rezultati upućuju na njihovo poreklo iz različitih regiona, što znači da su preci naših populacija *G. rostochiensis* Milatovići, Tomanj V51, Teočin i Gojna gora mogli biti iz Perua odn. Bolivije. Prisustvo drugog haplotipa V50 u populaciji Tomanj ukazuje na mešanu populaciju dok je poreklo

te druge populacije subspecijskog nivoa ostalo nerazjašnjeno s' obzirom na činjenicu da se ona ne razlikuje samo od domaćih populacija već i od drugih stranih populacija. Kako se broj sekvenci povećava iz dana u dan, sekvenciranje istog dela genoma sa više različitih područja a posebno u Južnoj Americi bi moglo da odredi poreklo svih populacija i utvrdi smer biogeografskog rasprostranjenja ovih organizama.

ZAHVALNICA

Rad je podržan sredstvima Projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja TR 31018 i III 46007.

LITERATURA

- Bakker, J. and Bowman-Smits, L. (1988): Contrasting rates of protein and morphological evolution in cyst nematode species, *Phytopathology*, 78 (7): 900-904.
- Coleman, A.W. (2007): Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*, pp. 1-8.
- Dorris, M., De Ley, P. & Blaxter, M.L. (1999): Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. *Parasitology today*, 15(5): 188-193.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003): PhyML: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5): 696-704.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T. (1985): Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160-174.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2005): Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. *Statistics for biology and health*, part II, 183-226.
- Krnjaić, Đ., Bačić, J., Krnjaić, S. i Čalić, R. (2000): Prvi nalaz zlatnožute krompirove nematode u Jugoslaviji. XI Jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja, Zlatibor, Zbornik rezimea, 71.
- Linder, C.R., Moore, L.A. & Jackson, R.B. (2000): A universal molecular method for identifying underground plant parts to species. *Molecular Ecology*, 9: 1549-1559.
- Oro, V. (2011): Novi nalazi *Globodera rostochiensis* u Srbiji, *Zaštita bilja*, 62 (4), 278: 233-241.
- Oro, V. and Oro Radovanović, V. (2012): Molecular characterization of PCN populations from Serbia. *Genetika*, 44 (1): 189-200.
- Powers, T. (2004): Nematode molecular diagnostics: From bands to barcodes. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 367-383.

- Skantar, A.M., Handoo, Z.A., Carta, L.K. & Chitwood, D.J. (2007): Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with potato in Idaho. *Journal of Nematology*, 39 (2): 133-144.
- Spears, J.F. (1968): *The Golden Nematode Handbook-Survey, Laboratory, Control and Quarantine Procedures*. Agriculture Handbook 353, USDA, Agricultural Research Service. Washington, D.C., pp. 82.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.

(Primljeno: 10.11. 2012.)

(Prihvaćeno: 20.12. 2012.)

SIMILARITIES AND DIFFERENCES IN MOLECULAR PATTERN OF ITS REGION OF SOME *GLOBODERA ROSTOCHIENSIS* POPULATIONS

VIOLETA ORO, NENAD DOLOVAC, ŽARKO IVANOVIĆ

Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, Srbija

e-mail: viooro@yahoo.com

SUMMARY

Evolutionary relationships of organisms in the past are based on morphological, biogeographical, and paleontological data. The emergence of molecular tools has enabled the study of the genetic structure of organisms and study of their phylogeny using protein or nucleotide sequences, which is especially important for organisms such as cyst nematodes that have no fossil records and are morphologically very similar. This paper presents molecular characterization of some *G. rostochiensis* populations in our region based on molecular pattern of ITS region. Molecular characterization of the studied populations showed similarities with the previously characterized populations but also some differences.

Key words: *Globodera rostochiensis*, populations, ITS, similarities, differences

(Received: 10.11.2012.)

(Accepted: 20.12.2012.)