UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mojca PLANTAN

OPTIMIZACIJA MIKROSATELITNIH LOKUSOV PRI MORSKEM KLOBUKU (*RHIZOSTOMA PULMO*)

DIPLOMSKO DELO Univerzitetni študij

OPTIMIZATION OF MICROSATELLITE LOCI IN BARREL JELLYFISH (*RHIZOSTOMA PULMO*)

GRADUATION THESIS University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo (Morski biološki postaji) in na Katedri za zoologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Alenko Malej in za recenzenta prof. dr. Petra Trontlja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Tom TURK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biokemijo
Član:	prof. dr. Peter TRONTELJ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zoologijo
Članica:	prof. dr. Alenka MALEJ Morska biološka postaja Piran, enota Nacionalnega inštituta za biologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo diplomskega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je diplomsko delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Mojca Plantan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

- UDK 593.73
- KG *Rhizostoma pulmo*/genetski markerji/mikrosateliti/PCR/poliakrilamidna elektroforeza
- AV PLANTAN, Mojca
- SA MALEJ, Alenka (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2008
- IN Optimizacija mikrosatelitnih lokusov pri morskem klobuku (*Rhizostoma pulmo*)
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 47 str., 4 pregl., 13 sl., 6 pril., 74 vir.
- IJ sl
- JI sl/en

AI Optimizirali smo verižne reakcije s Taq-polimerazo (PCR) za pomnoževanje petih mikrosatelitnih lokusov pri vrsti Rhizostoma pulmo. Mikrosatelitni lokusi so bili izolirani iz ene meduze vrste Rhizostoma pulmo in vsi imajo sestavljen motiv iz di- in tri-nukleotidnih ponovitev (Ramšak, 2005a, Ramšak, 2005b, Weldt in sod., 2005a, 2005b, 2005c). Izjema je lokus RHIZPUL MS5, ki ima motiv sestavljen iz petih nukleotidov. Za pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov smo uporabili genomsko DNA izolirano iz 13 meduz morskega klobuka. Za vsak mikrosatelitni lokus smo posebej optimizirali termalni profil PCR in koncentracijska razmerja posameznih sestavin v reakcijski mešanici. Pri štirih mikrosatelitnih lokusih je bilo pomnoževanje pri različnih temperaturah naleganja neuspešno, zato smo pri teh uporabili »touch down« PCR profil. Pomnožene produkte PCR smo nato ločili na poliakrilamidni elektroforezi na sekvenatorju ALFexpress[™] in določili njihove dolžine s programom AlleleLocator 1.03. Število pomnoženih alelov za posamezni lokus se je gibalo od 5 do 14. Največje število alelov smo ugotovili pri lokusu RHIZPUL MS5 (14 alelov) in pri RHIZPUL MS1 (13 alelov). Aleli so bili v razponu velikosti od 156 bp do 438 bp. Najmanjši velikostni razpon v dolžinah alelov smo ugotovili pri lokusu RHIZPUL MS2. Opažena heterozigotnost se je gibala od 0,308 do 0,9 in je bila pri vseh lokusih manjša od izračunane pričakovane heterozigotnosti. Največjo opaženo (0,9) in največjo pričakovano heterozigotnost (0,963) smo našli pri lokusu RHIZPUL MS5. Največ ničelnih alelov smo ugotovili na lokusu RHIZPUL MS4 in sicer osem, medtem ko jih pri lokusu RHIZPUL MS2 nismo našli. Ugotovili smo, da so obravnavani mikrosatelitni lokusi polimorfni in primerni za populacijske študije morskega klobuka.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC 593.73
- CX *Rhizostoma pulmo*/genetic markers/microsatellites/PCR/polyacrylamide electrophoresis
- AU PLANTAN, Mojca
- AA MALEJ, Alenka (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2008
- TI Optimization of microsatellite loci in barrel jellyfish (*Rhizostoma pulmo*)
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 47 p., 4 tab., 13 fig., 6 ann., 74 ref.
- LA sl
- AL sl/en

AB Polymerase chain reaction (PCR) was optimized for five microsatellite loci for the scyphozoan jellyfish Rhizostoma pulmo. Microsatellite loci were extracted from the one jellyfish Rhizostoma pulmo (Ramšak, 2005a, Ramšak, 2005b, Weldt et al., 2005a, 2005b, 2005c). Four of them have dinucleotide and trinucleotide repeats with exception of locus RHIZPUL MS5 which has pentanucleotide repeats. Genomic DNA extracted from 13 jellyfish Rhizostoma pulmo was used for amplification of microsatellite loci. Thermal profile PCR was optimized for each microsatellite locus individually. First, we optimized thermal profile and then concentration ratios of each ingredient of reaction mixture. Touchdown PCR profile was used in four cases where microsatellite loci amplification at various annealing temperatures was unsuccessful. AlleleLocator 1.03 software programme was used to determine allele length. Five to 14 amplified alleles were found at loci. Highest number of alleles were discovered at locus RHIZPUL MS5 (14 alleles) and at locus RHIZPUL MS1 (13 alleles). Alleles ranged from 156bp to 438bp in length. Smallest size range in allele length was discovered at locus RHIZPUL MS2. Observed heterozygosity ranged from 0,308 to 0,9 and was smaller from expected heterozygosity. Highest observed (0,9) and highest expected heterozygosity (0,963) was discovered at locus RHIZPUL MS5. Eight null alleles were found at locus RHIZPUL MS4, while we did not discover any null alleles at RHIZPUL MS2. It was determined that microsatellite loci under study are highly polymorphous and well suited genetic markers in population genetics.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
2.2.1 Rod Rhizostoma	4
2. 2. 2 Morfologija meduze rodu Rhizostoma	5
2.2.3 Življenjski krog rodu Rhizostoma	6
IZOLACIJA GENOMSKE DNA	22
5.2 Optimizacija verižne reakcije Z DNA-polimerazo	
5. 3 POLIAKRILAMIDNA ELEKTROFOREZA	
<u>7 VIRI 41</u>	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Pregled uporabljenih mikrosatelitnih lokusov	14
Preglednica 2: Optimizirani temperaturni profili za pomnoževanje mikrosatelitnih	
lokusov	23
Preglednica 3: Velikosti pomnoženih alelov pri 13 analiziranih vzorcih na petih	
mikrosatelitnih lokusih	33
Preglednica 4: Vrednosti dejanske in pričakovane heterozigotnosti ter frekvenca ničeln	nih
alelov	34

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prilov meduz morskega klobuka (Rhizostoma pulmo)	2
Slika 2: Morski klobuk <i>Rhizostoma pulmo</i>	4
Slika 3: Efira Rhizostoma pulmo	4
Slika 4: Skica meduze Rhizostoma pulmo	6
Slika 5: Življenjski krog morskega klobuka (Rhizostoma pulmo)	7
Slika 6: Homoplazija	11
Slika 7: Izolacija genomske DNA iz međuze morskega klobuka (<i>Rhizo</i> metodo CTAB	ostoma pulmo) z 22
Slika 8: Na agaroznem gelu ločeni produkti neoptimizirane reakcije PCR mikrosatelitni lokus RHIZPUL MS1	za 24
Slika 9: Na agaroznem gelu ločeni produkti optimizirane reakcije PCR z lokus RHIZPUL MS1 pri vzorcih 3, 5, 12, 22, 25, 36, 38, 46 in 48	za mikrosatelitni 26
Slika 10: Na agaroznem gelu ločeni produkti optimizirane reakcije PCR z lokus RHIZPUL MS1 pri vzorcih 54, 55 in 57	za mikrosatelitni 26
Slika 11: Na agaroznem gelu ločeni produkti optimizirane reakcije PCR z lokus RHIZPUL MS2 pri vzorcih 3, 5, 12, 22, 25, 36, 38, 46, 48, 5	za mikrosatelitni 54, 55, 56 in 57 28
Slika 12: Na agaroznem gelu ločeni produkti optimiziranega PCR-a z lokus RHIZPUL MS3 pri vzorcih 3, 5, 12, 22, 25, 36, 38 in 48	za mikrosatelitni 29
Slika 13: Na agaroznem gelu ločeni produkti optimiziranega PCR-a z lokus RHIZPUL MS4 in RHIZPUL MS 5 pri vzorcih 3, 12, 22, 2 48	za mikrosatelitni 25, 36, 38, 46 in 32

PRILOGA A: Izpisi iz GenBank

PRILOGA B1: Elektroforegram mikrosatelitov lokusov RHIZPUL MS1, RHIZPUL MS2, RHIZPUL MS3, RHIZPUL MS4 (»gel view«)

KAZALO PRILOG

- PRILOGA B2: Elektroforegram mikrosatelitov lokusov RHIZPUL MS1, RHIZPUL MS2 (»curve view«)
- PRILOGA B3: Elektroforegram mikrosatelitov lokusov RHIZPUL MS2, RHIZPUL MS3, RHIZPUL MS4 (»curve view«)
- PRILOGA C1: Elektroforegram mikrosatelitov lokusov RHIZPUL MS3, RHIZPUL MS4 (»gel view«)
- PRILOGA C1: Elektroforegram mikrosatelitov lokusov RHIZPUL MS3, RHIZPUL MS4 (»curve view«)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	adenin
ang.	angleško
bp	bazni par
С	citozin
СТАВ	Br-deciltrimetilamonij
Cy5	indopentamethinecyanin fluorescentno barvilo
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	2'-deoksinukleozid 5'-trifosfat
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilen-diamino-tetraocetna kislina
F	»forward primer«, vodilni začetni oligonukleotid
G	gvanin
H _e	pričakovana heterozigotnost
H _o	opažena heterozigotnost
μ	mikro
n	število obravnavanih osebkov
Na	dejansko število heterozigotov
PCR	verižna reakcija s polimerazo
рН	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
PIC	»polymorphic information content« informativna vrednost
	lokusa
pufer TAE	raztopina Trisa, acetata in EDTA
pufer TBE	raztopina Trisa, borata in EDTA
r	frekvenca ničelnih alelov
R	»reverse primer«, povratni začetni oligonukleotid
Т	timidin
Taq DNA-polimeraza	DNA-polimeraza, izolirana iz Thermus aquaticus
TRIS	trishidroksietilaminometan

1 UVOD

Morski klobuk (*Rhizostoma pulmo*) je klobučnjaška meduza, ki je v Sredozemskem morju stalno prisotna in je bolj pogosta v jesensko-zimskih mesecih. Predvsem v zadnjih letih je v Tržaškem zalivu pogostejša (Sporočila za ..., 2007) in zaradi številčnosti negativno vpliva na ribištvo (Statistične informacije ... , 2004, 2005). Večina do sedaj zbranih podatkov nakazuje, da se množičnost pojavljanja meduz spreminja glede na podnebne cikle, vendar je desetletje opazovanj premalo za potrditev te domneve. Raziskovalci poudarjajo tudi spremembe v morskem ekosistemu, ki so povezane z antropogenimi vplivi in naj bi posredno vplivale na pogostejša množična pojavljanja klobučnjaških meduz (Purcell in sod., 2007).

Trenutno je na voljo izjemno malo podatkov o pojavljanju, razširjenosti, populacijski dinamiki in ekologiji morskega klobuka. Namen diplomske naloge je bil optimizirati pogoje verižne reakcije z DNA-polimerazo za pomnoževanje petih mikrosatelitnih lokusov pri vrsti morski klobuk, ki bi omogočale proučevanje populacijske strukture. Do sedaj še niso bili opisani mikrosatelitni označevalci, ki bi jih lahko uporabili za študij genetske strukture populacij morskega klobuka. Mikrosateliti so genetski označevalci za populacijske študije, ki omogočajo proučevanje genetske strukture populacij, pretoka genov in učinka ozkega grla. Tovrstne študije so na klobučnjaških međuzah redke in težko izvedljive zaradi njihovega težko predvidljivega pojavljanja. Optimizirani mikrosatelitni označevalci bodo omogočili raziskovalcem izpeljavo študij, v katerih bodo lahko spremljali genski pretok med geografsko oddaljenimi populacijami in spreminjanje genetske strukture v času. Na ta način bo morda mogoče raziskati povezanost med množičnimi pojavljanji morskega klobuka v različnih delih Sredozemskega morja. Še vedno ni znano ali nastajajo množična pojavljanja lokalno, ali pa gre za osrednjo populacijo, ki se širi v različna območja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MNOŽIČNO POJAVLJANJE KLOBUČNJAKOV

Opazovanja v zadnjih desetih letih nakazujejo na vse pogostejše in vse bolj številčno pojavljanje klobučnjaških meduz in drugih skupin, kot so plaščarji, rebrače, meduze drugih ožigalkarjev, ki jih skupno imenujemo želatinozni plankton (Mills, 2001). V nadaljevanju bomo uporabljali izraz meduza za meduze klobučnjakov, kadar ni izrecno omenjeno za katere meduze ožigalkarjev se izraz meduza nanaša.



Slika 1: Prilov meduz vrste Rhizostoma pulmo (foto: Robert Radolović)

Množično pojavljanje meduz negativno vpliva na gospodarske panoge povezane z morjem. Meduze vplivajo na obalni turizem, ker povzročajo nevšečnosti kopalcem zaradi ožigov. Na ribištvo lahko vplivajo neposredno, ker se ujamejo v ribiške mreže in zmanjšajo količino ulova. Veliki ulovi meduz lahko zaradi svoje teže tudi raztrgajo ribiške mreže. Meduze tudi posredno vplivajo na ribištvo, ker se nekatere vrste meduz hranijo z ikrami, larvami in mladicami rib ter s tem vplivajo na populacije rib. Množično pojavljanje meduz v morskem ribogojstvu povzroča pogine rib, ker manjše meduze in lovke velikih meduz vstopijo skozi mreže kletk in povzročijo krvavitve škrg zaradi česar ribe poginejo. Veliko gospodarsko škodo povzročijo meduze, kadar ovirajo delovanje jedrskih elektrarn, ki uporabljajo morsko vodo za hlajenje. Privzem morske vode poteka skozi filtre, ki jih lahko zamašijo meduze in zato se mora delovanje jedrske elektrarne zmanjšati ali celo prekiniti (Purcell, 2007).

Trenutno je poznavanje vplivov okoljskih dejavnikov na velikost meduznih populacij skromno. Človeške aktivnosti so povzročile spremembe v morskih ekosistemih, ki domnevno ugodno vplivajo na populacije meduz. Globalno segrevanje omogoča nekaterim

vrstam klobučnjakov večjo prostorsko razširjenost in številčnejše populacije (Purcell, 2005). Med poglavitne globalne probleme spada tudi onesnaženje morja. Vodotoki s spranimi gnojili iz kmetijstva, kanalizacijske vode in površinski odtoki vode iz urbanih površin vnašajo hranila v morja in povzročajo predvsem v obalnih območjih evtrofikacijo (Parsons in Lalli, 2002). Posledica evtrofikacije je povečana količina fito in zooplanktona, motnost vode in hipoksija in v takih pogojih bolje uspevajo međuze kot ribe (Arai, 2001, Benović in sod., 2000, Purcell in sod., 2001). Nadalje je prelov rib povzročil spremembe v prehranjevalnih verigah v morju. Populacije međuz se lahko povečajo z odstranitvijo rib s katerimi tekmujejo za zooplanktonsko hrano. Veliko vrst rebrač in međuz se prehranjuje z mezozooplanktonom, kot so majhni raki, ličinke nevretenčarjev, jajčeca in ličinke rib. Velikost međuznih populacij ni neposredno kontrolirana z odstranitvijo rib razen malih pelagičnih rib s katerimi tekmujejo za hrano (Parsons in Lalli, 2002). Kadar se številčnost zooplanktivornih vrst rib bistveno zmanjša, nastanejo razmere, ko se želationozni plankton lahko namnoži, ker več hranil prehaja v njihovo prehranjevalno verigo (Greve in Parsons,

Na številčnost populacij klobučnjakov poleg antropogenih vplivov delujejo tudi dejavniki okolja; klimatske spremembe, fizikalno-kemijski dejavniki (temperatura, slanost, stratifikacija) in razpoložljivi viri hrane. Pri vrstah z bentoškim stadijem v razvoju je pomemben dejavnik dostopnost primernih trdnih substratov (Parsons in Lalli, 2002). Pogosto se zgodi, da je veliko število klobučnjaških međuz na določenem območju posledica zbiranja zaradi fizikalno oceanografskih procesov (Graham in sod., 2001).

1977, Parsons in Lalli, 2002, Purcell, 2007).

Množično pojavljanje klobučnjaških meduz beležijo od začetka devedesetih let v laguni Mar Menor v Španiji. Prvotne soline so bile podvržene onesnaževanju iz urbanih naselij in kmetijskih površin. Ko so v laguni poglobili naravno povezavo s Sredozemskim morjem je slanost padla od 52 na 45 PSU. V laguni je bil nato najprej v velikem številu prisoten uhati klobučnjak (*Aurelia aurita*), ki ni povzročal težav lokalnemu prebivalstvu. V začetku devetdesetih sta se v laguni pojavila morski klobuk (*Rhizostoma pulmo*) in morska cvetača (*Cotylorhiza tuberculata*) in od takrat sta obe vrsti prisotni skozi celo leto ter se množično pojavljata s tisočimi osebki. Množično pojavljanje meduz morskega klobuka so zabeležili tudi v Tržaškem zalivu na začetku poletja in v jesenskih mesecih leta 2003 (Sporočila za ..., 2007), ko je veliko število meduz onemogočalo ribolov (slika 1).

Vzrokov za množična pojavljanja klobučnjakov je več in verjetno delujejo vzajemno. V prihodnosti se bo človekov vpliv na morske ekosisteme povečeval in zato se bodo najverjetneje povečevale tudi populacije klobučnjakov.

2.2 TAKSONOMSKA UVRSTITEV

Morski klobuk (*Rhizostoma pulmo*) pripada deblu ožigalkarjev (*Cnidaria*), poddeblu *Medusozoa*, razredu klobučnjaki (*Scyphozoa*), podrazredu *Discomedusae*, redu korenousti klobučnjaki (*Rhizostomeae*), družini *Rhizostomatidae* in rodu *Rhizostoma* (ITIS, 2007).



Slika 2: Morski klobuk *Rhizostoma pulmo* (foto: Tihomir Makovec)



Slika 3: Efira *Rhizostoma pulmo* (foto: Valentina Turk)

Novejše filogenetske študije, ki temeljijo na nukleotidnih zaporedjih velike in male podenote ribosomske RNA in na morfoloških znakih, so preuredile razred klobučnjakov. Razred sedaj združuje red *Coronatae* in podrazred *Discomedusae* z redoma *Rhizostomeae* in *Semaeostomeae*. V red *Rhizostomeae* pa uvrščamo podredova *Daktyliophorae* in *Kolpohorae* in družine *Rhizostomatidae*, *Archirhizidae*, *Cassiopeidae*, *Mastigiidae* (Collins, 2002, Marques in Collins, 2004).

Nadalje v družino *Rhizostomatidae* uvrščamo meduze, ki imajo na vsaki ustni rami enojen končni privesek brez ust. V družino *Rhizostomatidae* spadajo trije rodovi: *Rhizostoma*, *Rhopilema* in *Stomolophus* (Mayer, 1910, Russell, 1970).

2.2.1 Rod Rhizostoma

Rhizostoma pulmo (Macri, 1778) skupaj z vrstama *Rhizostoma luteum* (Quoy in Gaimard, 1827) in *Rhizostoma octopus* (Linnaeus, 1788) spada v rod *Rhizostoma*. Značilnosti meduz tega rodu so majhne epolete na bazi ustnega stožca, ustna ramena se zaključujejo s paličasto oblikovanim končnim priveskom. Meduze imajo razločno razvit krožni kanal, iz katerega izhajajo številni kanali, ki tvorijo gastrovaskularni sistem (Russell, 1970). Vrsti *Rhizostoma pulmo* in *Rhizostoma octopus* sta po zgradbi podobni. Razlikujeta se po številu robnih krp na klobuku meduze in po območju razširjenosti. *Rhizostoma pulmo* ima

običajno osem robnih krp na osmini klobuka ter je razširjena v Črnem in Sredozemskem morju. *Rhizostoma octopus* ima povprečno deset robnih krp na osmini klobuka in je razširjena v Atlantskem oceanu, ob severozahodni obali Evrope, ob obalah Skandinavije, v Irskem morju, ob južnih in zahodnih obalah britanskih otokov in v južnem delu Severnega morja (Russell, 1970). Drugih razpoznavnih taksonomskih znakov za razlikovanje med vrstama ni, zato mnogi predvidevajo, da gre za eno vrsto. Na meji razširjenosti obeh vrst živi ob obalah Portugalske *Rhizostoma luteum*.

2. 2. 2Morfologija meduze rodu Rhizostoma

Klobuk meduze ima obliko kupole, je čvrst in je opisan kot zelenkaste, modrikaste, zelenkasto modre, roza rjave ali mlečnobele bleščeče barve.

Meduza morskega klobuka je zgrajena iz dveh zarodnih plasti ektoderma in endoderma med katerima je mezogleja. Mezogleja vsebuje celice in vlakna ter je zelo čvrsta. V osrednjem delu je debela in proti obrobju gastrovaskularne votline se tanjša. Površina klobuka je pokrita z majhnimi, tesno stisnjenimi nematocistami. Rob klobuka je razdeljen v številne polkrožne robne krpe, ki so temno obarvane z intenzivno vijolično modrim pigmentom. Na robu klobuka je tudi osem parov manjših koničastih ropalijskih krp, ki razdeljujejo rob klobuka na osem delov. Subumbrelarne krožne mišice so dobro razvite, medtem ko radialne mišice niso razvite. Dno gastralne votline se med razvojem meduze razdeli na štiri interradialne trikotne površine. Med vsemi štirimi deli se nahaja režasta ugreznina, ki vodi do bazalnega dela ustnega stožca. Mezoglejske odebelitve v gastralni votlini so lahko na vrhu te votline popolnoma zrasle in pri tem je izvorna gastralna votlina popolnoma zaprta (Mayer, 1910). Šestnajst radialnih kanalov vodi od gastralne votline do roba klobuka. Na robu klobuka se radialni kanali združijo v primarni krožni kanal, ki pa je prisoten samo v stadiju efire. V odrasli meduzi ti kanali tvorijo sekundarni krožni kanal, ki ima vlogo glavnega krožnega kanala. Med robom klobuka in glavnim krožnim kanalom leži mreža anastomoznih kanalov, ki povezuje radialne kanale ter robni in glavni krožni kanal (Mayer, 1910).

Odebeljen bazalni del ustnega stožca je razširjen preko subumbrele in obdaja subgenitalno votlino. Štiri interradialno neenakomerno nagubane gonade se nahajajo na gastrodermu in so rumenkaste barve. Razlik v obarvanosti gonad pri morskih klobukih iz Črnega morja, ki bi omogočale razlikovanje med spoloma, niso našli (Paspalev, 1938), medtem ko so pri vrsti *Rhizostoma octopus* našli razlike v obarvanosti gonad med spoloma (Holst in sod., 2007).



Slika 4: Skica meduze morskega klobuka Rhizostoma pulmo (prirejeno po Mayer, 1910: slika 73)

Ustni stožec je sestavljen iz kratkega, stebru podobnega dela, ki se nadaljuje v šestnajst epolet sestavljenih iz nagubanih trakastih struktur. Na zunanjih robovih teh struktur se nahajajo v nizih številne ustne odprtine. Pod epoletami se začnejo ustna ramena; teh je osem in so urejena v štiri pare. Na vsakem ustnem ramenu se nahaja naguban trikrilni del z ustnimi odprtinami, ki jim sledi gladek podaljšan končni privesek brez ustnih odprtin (Mayer, 1910).

Morski klobuki se hranijo s planktonom. Stotine majhnih ustnih odprtin obkrožajo resice z nematocistami. V času stradanja se lahko međuzam zmanjša teža na 12 do 7 odstotkov izhodiščne teže (Russell, 1970).

2.2.3Življenjski krog rodu Rhizostoma

V življenjskem krogu morskega klobuka se izmenjujeta pritrjen polip in prostoživeča meduza. Polip se razmnožuje nespolno z brstenjem in strobilacijo. Meduze so ločenega spola in sprostijo spolne celice v vodo. Iz oplojenega jajčeca se razvije prosto plavajoča omigetalčena ličinka planula, ki se kmalu pritrdi na podlago ter razvije v polip. Novi polipi lahko nastajajo s tvorbo stranskih brstov na polipu ali pa z odcepitvijo bazalnega dela polipa, ki se oblikuje v mirujočo tvorbo, obdano s hitinom (podocista), in je namenjena preživetju neugodnih razmer. V ugodnih razmerah se polip nespolno razmnožuje s strobilacijo. Telo polipa se podaljša in razvije se ena ali več krožnih vgreznitev pod tentakli. V tej fazi nastanejo zametki efire. Lovke polipov se nato resorbirajo, razvijejo se robne krpe. Pred odcepitvijo je efira povezana s polipom preko dobro razvitega manubrija. Efire se odcepljajo ena za drugo ali več hkrati (Holst in sod., 2007). Raziskovalci domnevajo, da je razvoj efire v međuzo podoben pri vseh vrstah rodu *Rhizostoma*.



Slika 5: Življenjski krog morskega klobuka (Rhizostoma pulmo)

Odcepljena efira (slika 5) ima osem robnih krp, ki so distalno razdeljene v dve ropalijski krpi; med njima se nahaja ropalij. Premer odcepljene efire (slika 3) je 2,7 do 5,8 mm. Dva do tri dni po sprostitvi efire se začnejo razvijati med robnimi krpami majhne krpe, ki v treh tednih dosežejo velikost robnih krp. V treh do štirih tednih se začne debeliti mezogleja in efira se razvije v zvonasto oblikovano meduzo. Odcepljena efira ima razvito ustno odprtino v obliki križa. Prvotni štirje ustni robovi se z nadaljnjo rastjo efire delijo in tvorijo osem ustnih ramen. Nadaljnje delitve distalnih delov ustnih ramen vodijo v tvorbo osmih odrastkov na ustnih ramenih. Sočasno se začnejo razvijati epolete na stranskem robu manubrija in tvorijo tesen obroč okrog ustnega stožca. Nazadnje se na končnih delih ustnih ramen razvijejo končni priveski.

Ob oddelitvi imajo efire razvito osrednjo gastrovaskularno votlino in šestnajst žarkasto razporejenih gastralnih vrečk, ki se z razvojem efire razvijejo v gastralne kanale. Ropalijski in adradialni kanali se nato bočno povežejo in tvorijo primarni krožni kanal, ki obdaja osrednjo gastrovaskularno votlino. Sledi razraščanje primarnega krožnega kanala, ki se poveže z radialnimi kanali na robu klobuka. Nadaljnje vejitve in povezovanje gastralnih kanalov tvori mrežo gastralnih kanalov na robu klobuka (Holst in sod., 2007).

2.3 MIKROSATELITI

Mikrosateliti so segmenti DNA, ki vsebujejo ponovitve nukleotidnih motivov dolžine od 1 do 6 bp. Po motivu delimo mikrosatelite na popolne, nepopolne in sestavljene. Popoln mikrosatelit je sestavljen iz neprekinjene ponovitve motiva, na primer CACACACA. Nepopoln mikrosatelit ima prekinjeno popolno ponovitev motiva z eno ali več bazami, na primer CACATCACA. Sestavljeni mikrosateliti so sestavljeni iz ponovitev z različnimi motivi, na primer CACATATATA (Estoup in Angers, 1998).

Z metodami *in situ* hibridizacije in z genetskim mapiranjem so ugotovili razmeroma enakomerno razporeditev mikrosatelitov v kromosomih. Manj pogosti so v telomerah in centromerah (Estoup in Angers, 1998). Pogosti so v nekodirajočih delih DNA in redki v kodirajočih delih. Razlike nastajajo zaradi negativne selekcije zoper mutacije, ki povzročajo premik bralnega okvirja v kodirajočih delih DNA (You-Chun in sod., 2002). Stopnja mutacij mikrosatelitov je ocenjena na 10⁻² do 10⁻⁶ mutacij na lokus na generacijo in je mnogo višja v primerjavi s točkovnimi mutacijami na kodirajočih lokusih genov, ki se gibljejo med 10⁻⁹ in 10⁻¹⁰ mutacij na lokus na generacijo. Na evolucijsko dinamiko mikrosatelitov vpliva: število ponovitev, dolžina in nukleotidna sestava motivov, zgradba bočnih regij ob mikrosatelitih, stopnja rekombinacije, stopnja traskripcije, taksonomska skupina in položaj na kromosomu (Jin in sod., 1996, Schlötterer in sod.,1998, Schlötterer, 2000).

Polimorfizem dolžine mikrosatelitov znotraj vrste je mogoče razlagati na podlagi dveh mutacijskih modelov. Prvi model je nepravilno parjenje zdrsnjene vijačnice med podvojevanjem DNA (angl. *replication slippage*). Pri podvojevanju DNA pride do zdrsa DNA v kompleksu z DNA-polimerazo na ponovljenih motivih. Če se matrična in novo sintetizirana veriga nepravilno parita, se pri slednji spremeni število osnovnih motivov (Levinson in Gutman, 1987). Drugi model je neenak "crossing-over" (angl. *unequal crossing-over*) in je posledica nepravilnega parjenja dveh homolognih kromosomov. Neenako prekrižanje povzroči delecijo v eni molekuli DNA in insercijo v drugi. Model predvideva večjo verjetnost nepravilnega parjenja na mikrosatelitnih regijah zaradi ponovljivih motivov (Smith, 1976, Dover, 1982).

Raziskave so pokazale, da mikrosateliti lahko delujejo kot funkcijski elementi proteinskih molekul in kot regulacijski elementi transkripcije. Spremembe v številu ponovitev motiva mikrosatelita, ki je del kodirajočega nukleotidnega zaporedja proteina, povzroči spremembo v številu enakih aminokislin ter s tem spremembo funkcije proteina. Število ponovitev CAG, ki kodirajo glutamin, vpliva na delovanje androgenega receptorja, ki veže

androgen in nato aktivira prepis tarčnih genov. Posledica delecij ponovitev CAG v nukleotidnem zaporedju androgenega receptorja pri človeku ali podgani povzroči višjo transaktivacijo receptorja. Mutacije, ki povečajo število CAG ponovitev od 25 do 77, pa znižajo transaktivacijo receptorja in povzročijo znatni padec prepisa tarčnih genov (Chamberlain in sod., 1994). Mikrosateliti se kot regulacijska nukleotidna zaporedja nahajajo v distalnih promotorskih delih in delujejo kot elementi, ki ojačajo transkripcijo. V teh delih delujejo kot vezavna mesta za regulacijske proteine. Pri človeku so odkrili bolezni, ki so posledica pomnožitev trinukleotidnih motivov mikrosatelitov v nekodirajočih delih DNA (Rubinsztein, 1999).

2.3.1 Metode za izolacijo mikrosatelitnih označevalcev

Kadar mikrosatelitni označevalci za določeno vrsto niso na voljo, lahko najprej preverimo ali lahko uporabimo mikrosatelitne označevalce iz sorodne vrste. Znani so primeri uporabe mikrosatelinih označevalcev pri kitih (Schlötterer in sod., 1991), želvah (FitzSimmons in sod., 1995) in ribah (Rico in sod., 1996), ki omogočajo pomnoževanje mikrosatelitov pri vrstah, ki so se ločile tudi pred več kot 470 milijoni let. Pri uporabi mikrosatelitnih označevalcev sorodnih vrst se lahko le-ti slabše pomnožujejo ali pa so manj polimorfni (Ellegren in sod., 1995, Rubinsztein in sod., 1995, Morin in sod., 1998). Če v preiskovalnem testiranju ugotovimo, da niso primerni za uporabo, jih moramo izolirati iz preiskovane vrste. Do sedaj so bili opisani mikrosatelitni lokusi v razredu klobučnjakov le pri morski osi *Chironex fleckeri* (Coughlan in sod., 2005).

Opisanih je veliko metod za izolacijo mikrosatelitov (Zane in sod., 2002). Tradicionalne metode izolacije mikrosatelitov, ki vključujejo izdelavo genomske knjižnice organizma, kloniranje in preverjanje velikega števila rekombinantnih klonov s hibridizacijami, zamenjujejo novejše tehnike. Zane in sodelavci (2002) so razvili metodo imenovano FIASCO (<u>Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats</u>). Metoda temelji na restrikcijsko-ligacijski reakciji metode AFLP (<u>Amplified Fragment Lenght Polymorphism</u>). Genomsko DNA razrežemo z izbranim restrikcijskim encimom in fragmente DNA povežemo s sintetiziranimi nukleotidnimi adapterji. Pomnoževanje DNA fragmentov poteka s PCR in začetnimi oligonukleotidi, ki so narejeni na podlagi nukleotidnega zaporedja adapterjev. Sledi hibridizacija namnoženih DNA fragmentov z biotiliranimi sondami, ki so specifične za mikrosatelitna zaporedja. DNA fragmente, ki so hibridizirali z biotiliranimi sondami, zajamemo na paramagnetne delce, prevlečene s streptavidinom. Nato DNA speremo iz kompleksa delec-sonda v dveh korakih. V prvem koraku DNA speremo s temperaturno denaturacijo in nato v drugem koraku z NaOH. Oborjeno DNA v

naslednjem koraku pomnožimo s PCR. Pri tem uporabimo začetne oligonukleotide, ki smo jih uporabili pri pomnoževanju DNA fragmentov. PCR produkte nato uporabimo za izdelavo obogatene mikrosatelitne knjižnice.

2.3.2 Uporaba mikrosatelitov kot genetskih označevalcev

Mikrosateliti se uporabljajo kot genetski označevalci za identifikacijo osebkov, v sorodstvenih študijah, v populacijski genetiki, v varstveni biologiji in pri genetskem mapiranju. Na nivoju populacij nam omogočajo ugotavljanje efektivne velikosti populacij, proučevanje parjenja v sorodstvu, odkrivanja učinka ozkega grla, socialne strukture med osebki in genskega pretoka med populacijami. Zaradi svojega dolžinskega polimorfizma so mikrosateliti zelo uporabni v populacijskih študijah. Na voljo imamo nekaj matematičnih modelov, ki nam služijo kot osnova za izračun parametrov diferenciranosti populacije. Med njimi sta najbolj uporabljana IAM model (infinite alleles model, Kimura in Crow, 1964) in SMM model (stepwise mutational model, Kimura in Ohta, 1978). IAM model ne upošteva povratnih mutacij in homoplazij; izračun indeksov fiksacij temelji na varianci frekvence alelov (F-statistika). SMM model temelji na varianci v dolžini alelov (R-statistika). Danes poznamo tudi druge modele, ki so izpeljanke obeh osnovnih modelov (Balloux and Lugon-Moulin, 2002).

Prednosti mikrosatelitov kot genetskih označevalcev so (You-Chun in sod., 2002, Estoup in Angers, 1998):

- našli so jih v vseh do sedaj analiziranih genomih,
- njihova pogostnost in razpršenost v genomu je odvisna od taksonomske skupine,
- večinoma so brez očitne funkcije,
- so variabilni, pogosto z visoko stopnjo polimorfizma in zaradi tega zelo informativni,
- so lokusno specifični,
- dedujejo se kodominantno in po Mendlovih pravilih,
- bočne regije mikrosatelitov so večinoma ohranjene med ozko sorodnimi vrstami.

Tehnične prednosti uporabe so (Estoup in Angers, 1998):

- majhna količina tkiva, ker so pri PCR potrebne nanogramske količine DNA,
- elektroforetsko ločevanje produktov PCR na visokoločljivostnih gelih,
- možnost določevanja dolžin mikrosatelitov na avtomatskih aparaturah z ustrezno programsko opremo,

 informacije o začetnih oligonukleotidih in dolžinah alelov so primerljive med laboratoriji.

2.3.3 Težave pri uporabi mikrosatelitnih markerjev

2.3.3.1 Homoplazija

Homoplazija pri mikrosatelitih pomeni prisotnost vsaj dveh alelov z enako dolžino na istem lokusu, ki imata različen izvor (slika 6). Dolžinski polimorfizem mikrosatelitov je lahko zaradi homoplazije zavajujoč. Velikostno homoplazijo lahko potrdimo s sekvenciranjem namnoženih mikrosatelitov. Neupoštevanje homoplazije pri populacijskih študijah vodi do podcenjevanja dejanske raznolikosti med populacijami (Jarne in Lagoda, 1996). Vpliv homoplazije na rezultate se zmanjša s povečanjem števila mikrosatelitnih lokusov v raziskavi. Predvidevajo, da se homoplazija povečuje s stopnjo mutacij in s časom divergence med populacijami (Estoup in Angers, 1998).



Slika 6: Homoplazija. Iz alela 1 (CAG)₃ sta nastala alel 2 in 3. V alelu 3 je z mutacijo nastala še ena ponovitev CAG. V naslednji generaciji sta nastala iz alela 3 (CAG)₄ dva nova alela od katerih ima eden eno ponovitev motiva manj (alel 6) in je enak izvornemu alelu 1 ter alel 7 s štirimi ponovitvami osnovnega motiva. V drugi liniji se je ohranilo izvorno število ponovitev motiva. Na mikrosatelitnem lokusu so enaki aleli 4, 5 in 6, čeprav imajo različen evolucijski izvor (Melinek in sod., 2002).

2.3.3.2 Ničelni aleli

Uspešno pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov s PCR je odvisno tudi od prileganja začetnih oligonukleotidov na matrično DNA. Točkaste mutacije, substitucija ali delecija baz na mestu prileganja lahko zmanjšajo ali preprečijo prileganje enega ali obeh začetnih oligonukleotidov. Ničelni aleli (angl. *null allele*) spadajo zato med tehnične napake in predstavljajo alele mikrosatelitov, ki se ne pomnožijo v PCR reakciji. Ničelnega alela ne moremo odkriti, kadar je zamaskiran s pomnožitvijo normalnega alela homolognega kromosoma. Pri homozigotnem osebku ne dobimo nobenega produkta v PCR reakciji. Genotip heterozigotnega osebka pa napačno interpretiramo kot genotip homozigota. Pri

obravnavi populacije je navzočnost ničelnih alelov glavni vzrok za veliko odstopanje med dejansko in pričakovano heterozigotnostjo, ker je prisoten presežek homozigotov v populaciji (Freeland, 2005). Ničelne alele lahko odkrijemo tudi kot odklon od Mendlovih pravil dedovanja pri analizi izvora potomcev (Estoup in Angers, 1998). Kadar ničelni aleli preveč vplivajo na analize, je treba za pomnoževanje narediti nove začetne oligonukleotide.

2.3.3.3 Vezavno neravnovesje

Za mikrosatelitne lokuse velja splošna predpostavka, da se dedujejo neodvisno od drugih lokusov. Zgodi se, da se frekvence alelov v populaciji razlikujejo od predvidenih frekvenc alelov za katere velja predpostavka, da se dedujejo neodvisno. Lokusi takih alelov so v vezavnem neravnovesju kar pomeni, da se aleli s teh lokusov dedujejo skupaj še z drugim lokusom. Vezavno neravnovesje pomeni statistično povezavo med različnimi lokusi. Vzroki za vezavno neravnovesje so mutacije, ki so se zgodile pred kratkim, selekcija ali populacijska struktura.

2.3.3.4 Wahlundov pojav

Wahlundov pojav pomeni znižanje deleža heterozigotnih osebkov v populaciji, ker je populacija razdeljena na subpopulacije. Če ima dve ali več subpopulacij različne frekvence alelov in se subpopulacije nahajajo v Hardy-Weinbergovem ravnovesju, potem ima celotna populacija znižano heterozigotnost. V primeru, da ne poznamo mej subpopulacij in združimo osebke več subpopulacij, bo takšna populacija odstopala od Hardy-Weinbergovega ravnovesja in bo vodila v napačno predpostavljanje vpliva selekcijskih faktorjev, ki favorizirajo homozigote (Freeland, 2005).

2.4 POMNOŽEVANJE MIKROSATELITNIH LOKUSOV IN DOLOČANJE NJIHOVE VELIKOSTI

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) omogoča in vitro pomnožitev izbranega fragmenta molekule DNA v določenih reakcijskih pogojih. S sintetiziranimi kratkimi oligonukleotidi je določen fragment, ki se pomnoži v reakciji. PCR temelji na sposobnosti izmenične razklenitve dvovijačne DNA in sinteze komplementarne verige v kontroliranih pogojih. Reakcija se začne z ločitvijo komplementarnih verig DNA s temperaturno denaturacijo nad 90 °C na enoverižne DNA. Nato se temperatura reakcijske mešanice spusti na temperaturo, ki omogoči hibridizacijo začetnih oligonukleotidov na enoverižne DNA. DNA-polimeraza se premika po matrični verigi DNA v smeri 3` proti 5` in podaljšuje komplementarno

verigo od začetnih oligonukleotidov v smeri 5` proti 3`. Nato se celotni cikel ponovi, običajno število ciklov je od 20 do 35. Število fragmentov DNA v ciklih narašča eksponentno.

Uspešnost pomnoževanja mikrosatelitnih lokusov najprej preverimo na agaroznih gelih in okvirno preverimo velikost pomnoženih produktov. Za ločevanje pomnoženih fragmentov po velikosti najpogosteje uporabljamo poliakrilamidno elektroforezo na ploščah ali ločevanje v kapilarah, ki vsebujejo poseben polimer. Poliakrilamidni gel nastane s polimerizacijo monomernih molekul akrilamida, ki se navzkrižno poveže z N,N'-metilenbis-akrilamid. Gel prestavlja zamrežen matriks, skozi katerega potujejo fragmenti DNA pod vplivom električnega toka od negativne proti pozitivno nabiti elektrodi. Velike molekule potujejo skozi gel počasneje kot manjše. Aparature za določevanje velikosti fragmentov DNA so avtomatski sekvenatorji. Mi smo uporabljali sekvenator ALF Express II.

3 MATERIALI IN METODE

1.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci tkiv

Meduze morskega klobuka smo ulovili s povlečno kočo v jugovzhodnem delu Tržaškega zaliva. Ulovljenim meduzam smo takoj po ulovu odrezali košček gonad. Vsak odrezan kos tkiva smo posebej shranili v 96-odstotnem etanolu. Vzorce smo do izolacije DNA hranili na -20 °C.

3.1.2 Mikrosatelitni lokusi

Optimizirali smo mikrosatelitne lokuse, ki so bili izolirani v predhodni študiji (Ramšak in sod., 2005a, 2005b, Weldt in sod., 2005a, 2005b, 2005c). Mikrosatelitni lokusi so bili izolirani po tehniki FIASCO (Zane in sod., 2002) iz ene meduze morskega klobuka, ulovljene v Tržaškem zalivu. Nukleotidna zaporedja izoliranih lokusov so shranjena v GenBank (priloga A). Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje s PCR so bili narejeni s programom Primer 3 (Rozen in Skaletsky, 2000). V preglednici 1 so vodilni (ang. *forward*) začetni oligonukleotidi so bili označeni s črko F, povratni (ang. *reverse*) pa s črko R. Vodilni začetni oligonukleotidi so bili označeni s fluorescentnim barvilom (Cy5), ki je potreben za fluorescentno detekcijo na aparatu ALFexpress II.

Lokus GenBank št.	Motiv	Nukleotidno zaporedje začetnega oligonukleotida (5`→3`)	Dolžina klona
RHIZPUL MS1 DQ093644	((AC) ₂ (ACGC) ₂) ₇ (AC) ₂ (ACGC)(AC) ₄ (ACGC)AC	F: TCTGCGGGTATCCCTCATAC R: CTCGCCATCAGGAGTCTCA	228 bp
RHIZPUL MS2 DQ093645	(TG)7(TTA)(GT)4 (GCT)2(GTT)((GCT)3(GTT))2(GCT)2	F: TCACGCTTCGCATACACTG R: CTTTTTCAAGGGTCAGGCCT	300 bp
RHIZPUL MS3 DQ075948	(GCT) ₂ (GTT)((GCT) ₃ (GTT)) ₂ (GCT) ₂ (GTA)	F: GCTGGTTTGCGTTTGGTATT R: TTGCATACGTCCCACTGTGT	406 bp
RHIZPUL MS4 DQ075951	$(T(AC)_2)_{14}T(AC)_3(T(AC)_2)_5$	F: CTAATAGAAACTAATCTAGA R: GTATGATTACGTGAAACGAT	339 bp
RHIZPUL MS5 DQ075950	(TACAC) ₁₁ (TACGC)(TACAC) ₄ (TACAT)(TACAC) ((TACAT)(TATAC)) ₂ (TACAT)(TACAC) ₂ (TGCAC) ₂ ((TACAC)(TACAA)) ₇	F: AGAGATGGAGGCGTGCAA R: AGTTTGCGATGAAAATCGTG	381 bp

Preglednica 1: Pregled uporabljenih mikrosatelitnih lokusov

GenBank št. - številka pod katero je vpisan lokus v GenBank

Encimi:

- 5U/µl *Taq* DNA-polimeraza (Fermentas)
- Proteinaza K (Fermentas)

3.1.4 Standardi DNA:

- GeneRulerTM 100bp DNA Ladder (100-1000 bp, Fermentas)
- GeneRulerTM 100bp DNA Ladder Plus (100-3000 bp, Fermentas)
- Lambda DNA/Hind III Marker, 2 (Fermentas); 23130-125 bp
- 50-500 bp Ladder (Amersham), redčen po navodilih proizvajalca

3.1.5 Puferske raztopine:

> Taq DNA-polimeraza v shranjevalnemu pufru (Fermentas)

- 20 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 1 mM DTT
- 0,1 mM EDTA
- 100 mM KCl
- 0,5-odstotni neionski detergent P40
- 0,5-odstotni Tween 20
- 50-odstotni glicerol

> 10-krat koncentrirani PCR-pufer (Fermentas)

- 100 mm Tris-HCl (pH 8.8 pri 25 °C)
- 500 mM KCl
- 0,8-odstotni neionski detergent P40

> Sestava pufra 2x CTAB:

- 1,4 M NaCl
- 100 mM Tris-Cl
- 2-odstotni cetiltrimetil amonijev bromid (CTAB)
- 0,2-odstotni ß-merkaptoetanol
- 20 mM EDTA
- pH 8.0

> Sestava nalagalnega pufra za agarozni gel:

- 0,05-odstotni bromofenolmodro
- 0,05-odstotni ksilen cianid v formamidu

• 40-odstotna (wt/vol) saharoza v dH₂O

> Sestava nanašalnega pufra za poliakrilamidno elektroforezo:

• 1 mg dextran blue v 1 ml dimetilformamida

> Sestava elektroforetskega pufra 1x TAE (tris acetatni pufer):

- 0,04 M Tris-acetat
- 0,001 M EDTA
- pH 8.0

> Sestava TE pufra:

- 10 mM Tris-HCl, pH 8
- 1 mM EDTA, pH 8

> Sestava 5-kratne založne raztopine TBE pufra:

- 445 mM Tris
- 445 mM borova kislina
- 1 mM EDTA

> Sestava »Bind silan«:

- 1000 µl 96-odstotnega etanola
- 250 µl 10-odstotne ocetne kisline
- 3 µl Bind silan

> Založna raztopina etidijevega bromida s koncentracijo 10 µg/ml

3.1.6Aparature

- centrifuga (Sigma)

- ciklični termostat GeneAMP PCR system1400 (Perkin Elmer)
- vodna kopel
- napajalnik visoke napetosti, uporabljen za agarozno gelsko elektroforezo
- kadičke za agarozno gelsko elektroforezo
- modeli za agarozne gele
- aparat za fluorescenčno detekcijo fragmentov DNA Amesham Pharmacia Biotech
- ALFexpress II in pripadajoča programska oprema (ALFwinSoftware)
- detekcijski sistem za slikanje agaroznih gelov BioRad (ZDA)

3.2 METODE

3. 2. 1Izolacija genomske DNA

Iz vzorcev tkiv smo izolirali genomsko DNA po metodi CTAB, ki jo je opisal Winnepenninckx in sodelavci (1993). Od vzorčenega tkiva smo odrezali košček tkiva velikosti 3 x 3 mm in nato koščke tkiv hitro osušili na zraku, da je izparel etanol. Osušene koščke tkiva smo dali v epice s 300 μl 2xCTAB ter dodali 2 μl proteinaze K (založna raztopina 20 mg/ml). Sledila je 60-minutna inkubacija v vodni kopeli pri 65 °C ali dokler se tkivo ni razgradilo. Po končani inkubaciji smo dodali kloroform ter nastalo mešanico centrifugirali 5 minut na 4 °C pri 14000 g. Vodno fazo smo previdno prenesli v novo epico in dodali 96-odstotni etanol v volumnu dvakratne prenešene vodne faze. Mešanico smo pustili na ledu od 15 minut do ene ure. Nato smo centrifugirali pri 4 °C in 14000 rpm. Nastalo usedlino smo sprali v 250 μl 70-odstotnega etanola in centrifugirali 1 minuto pri 4 °C in 14000 rpm. Etanol smo odstranili in DNA posušili na zraku ter jo raztopili v 50 μl pufra TE.

3. 2. 2Optimizacija verižne reakcije s polimerazo

Namen optimizacije je bil optimizirati pogoje PCR za specifično pomnoževanje alelov na petih mikrosatelitnih lokusih. Velikosti pomnoženih alelov so osnova za izračun osnovnih parametrov (H_o , H_e , PIC, r), ki opredeljujejo mikrosatelitne lokuse. Prvotna reakcijska mešanica s končnim volumnom 20 µl je vsebovala:

- 0,6 enote *Taq*-polimeraze
- 2 μl 10-krat koncentriranega pufra
- 2 mM MgCl₂
- 0,4 mM dNTP
- 0,25 µM vodilni oligonukleotid
- 0,25 µM povratni oligonukleotid
- 5 μl DNA
- deionizirana in sterilna voda do volumna 20 μl

Med optimizacijo smo za vsak mikrosatelitni lokus posebej spreminjali temperaturni profil in koncentracijska razmerja posameznih sestavin.

Temperatura prileganja začetnega oligonukleotida je odvisna od njegove dolžine in deleža baz citozina in gvanina, ki ju vsebuje. Velikost vseh začetnih oligonukleotidov je bila v

razponu 18 do 20 bp (glej tabelo 1, poglavje 3.1.2). Za izračun talilne temperature (T_m) začetnih oligonukleotidov smo uporabili naslednjo enačbo (1):

$$T_m = 4 \circ C \times (G+C) + 2 \circ C \times (A+T) \qquad \dots (1)$$

Temperatura prileganja (T_a) je 5 °C pod izračunano talilno temperaturo (T_m) začetnega oligonukleotida in nam je predstavljala izhodišče za optimizacijo verižne reakcije s polimerazo. Izhajali smo iz začetnega temperaturnega profila:

- začetna denaturacija: 94 °C 2 minuti
- denaturacija: 94 °C 1 minuta
- prileganje: 55 °C 30 sekund
 20 ciklov
- podaljševanje: 72 °C 1 minuta
- podaljšana polimerizacija: 72 °C 5 minut

Pri tistih mikrosatelitnih lokusih, kjer nismo uspeli določiti temperature prileganja in pridobiti specifičnega produkta, smo uporabili »touch down« PCR profil:

- začetna denaturacija: 94 °C 2 minuti
- denaturacija: 94 °C 1 minuta
- prileganje: 65–55 °C 30 sekund > 10 ciklov
- podaljševanje: 72 °C 1 minuta
- denaturacija: 94 °C 1 minuta
- prileganje: 55 °C 30 sekund > 25 ciklov
- podaljševanje: 72 °C 1 minuta
- podaljšana polimerizacija: 72 °C 5 minut

3. 2. 3Elektroforetsko ločevanje genomske DNA in PCR produktov

3. 2. 3. 1Priprava agaroznih gelov in elektroforeza

Agarozni gel smo pripravili tako, da smo stehtano količino agaroze zmešali z 1-kratnim TAE pufrom in jo raztopili v pufru s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Za ločevanje genomske DNA smo uporabljali 1,2-odstotni agarozni gel in za ločevanje PCR produktov 2-odstotni agarozni gel. Ko je nastala bistra raztopina, smo jo ohladili na približno 50 °C ter dodali etidijev bromid (3 µl založne raztopine etidijevega bromida na 100 ml gela). Gel smo vlili v model in počakali, da se ohladi. Vzorce smo zmešali z nanašalnim pufrom in vnesli v žepke na agaroznem gelu. Poleg vzorcev smo na agarozni gel vnesli velikostni standard z znano velikostjo DNA fragmentov. Sledilo je ločevanje vzorcev. Vzorce genomske DNA smo ločevali v električnem polju z napetostjo 7 V/cm, PCR produkte pa

pri 5 V/cm. Po končani elektroforezi smo gele pregledali na transiluminatorju pri valovni dolžini 360 nm ter posneli fotografije z detekcijskim sistemom BioRad (ZDA).

Z agarozno elektroforezo genomske DNA smo ocenili kvaliteto in količino nanešene genomske DNA. Pri ločevanju PCR produktov pa smo pridobili podatke o okvirni velikosti in količini pomnoženih fragmentov.

3.2.3.2 Priprava aparature in ločevanje produktov PCR na poliakrilamidnem gelu

Velikosti produktov PCR smo določili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo na aparatu ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska). Gelska kaseta je sestavljena iz dveh steklenih plošč; termo plošče in steklene plošče. Obe plošči smo dobro očistili z destilirano vodo in alkoholom ter obrisali s papirjem brez dlačic. Na osušeni plošči smo nanesli raztopino Bind Silane. Premazali smo zgornjih 5 cm steklene plošče s 400 µl Bind Silana in zgornjih 2-3 cm termoplošče z 200 µl Bind Silana. Plošče smo nato nežno obrisali s papirjem, prepojenim z destilirano vodo. Za pripravo 0,5 mm debelega gela smo vzeli 0,5 mm debel glavniček in 0,5 mm debela vmesnika. Nato smo spojili stekleno ploščo na termo ploščo s kovinskimi ščipalkami in med obe plošči vlili gel. Uporabili smo 8-odstotni poliakrilamidni gel ReproGel High Resolution (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska). Gel je polimeriziral pod UV lučjo (REPROSet, Amersham Pharmacia Biotech) v desetih minutah. Plošči s polimeriziranim gelom smo nato vstavili v aparat ALFexpress II in v posodici na obeh straneh gela nalili 1-kratni TBE pufer ter priključili obtok vode za enakomerno segrevanje plošč.

PCR produkte, označene s fluorescentnim barvilom (Cy5), smo pred nanosom na gel denaturirali pri 90 °C za 3 minute in jih takoj nato prenesli na led. Pred nanosom vzorcev v žepke gela, smo vzorce obtežili in obarvali tako, da smo jih zmešali z nanašalnim pufrom, ki je vseboval modro barvilo in dimetilformamid. Nato smo vzorce nanesli v žepke gela. Največji volumen, ki ga lahko nanesemo v en žepek, je 10 µl. V prvi, 20. in 40. žepek smo nanesli zunanji standard (fragmenti DNA velikosti 50 do 500 bp, Amersham). Elektroforeza je potekala pod naslednjimi pogoji: napetost 1500 V, moč električnega toka 15 W, temperatura gela 55 °C in čas vzorčenja 1 s.

Med elektroforezo fluorescentno označeni fragmenti DNA potujejo v stezi po gelu glede na velikost. Laserski žarek potuje skozi steklen vmesnik in je usmerjen v gel pravokotno na smer potovanja označenih fragmentov. Laserski žarek zadene ob fluorescentno označeno DNA in vzbudi elektrone fluorescentne oznake. Svetlobo zaznajo fotodetektorji za stekleno

ploščo. Vsaka steza ima svoj fotodetektor. Signali fotodetektorjev se prenesejo v računalnik, kjer se prevedejo v elektroforegram.

Po končani elektroforezi smo rezultate fluorescentne detekcije prenesli v program AlleleLocator (Amersham Pharmacia, version 1.03) in izračunali velikost fragmentov DNA.

3. 2. 4Velikostna analiza ločenih produktov PCR s programom AlleleLocator 1.03

AlleleLocator, verzija 1.03, je programski paket, ki se uporablja za kvalitativne in kvantitativne analize fragmentov DNA, kot so mikrosateliti in minisateliti, skupaj s aparaturami znamke ALFexpress[™]. Program podpira različne možnosti velikostne analize in uporablja različne vrste standardov, kot so: zlati standardi, notranji in zunanji velikostni standardi.

S programom AlleleLocator 1.03 smo določili dolžine alelov na podlagi potovanja zunanjih standardov. Ker je program izpisal dolžine alelov z decimalnimi števili, smo zaokrožili velikost alelov na celo število. Dolžino alelov smo zaokrožili na večkratnik ponavljajočega se motiva.

3. 2. 5Izračun parametrov, ki opredeljujejo lastnosti mikrosatelitnih markerjev

V analizo je bilo vključenih 13 osebkov iz katerih smo izolirali DNA. Dolžine alelov, ki smo jih dobili v programu AlleleLocator 1.03, smo vnesli v računalniški program Cervus 3.0 (Kalinowski s sod., 2007) in izračunali opaženo in pričakovano heterozigotnost ter vrednost PIC.

Opažena heterozigotnost (H_o) je delež heterozigotnih organizmov v vzorcu. Izračuna se z deljenjem števila heterozigotov za določen lokus s celotnim številom analiziranih osebkov (Freeland, 2005). Na opažen delež heterozigotnosti vpliva število analiziranih osebkov.

Pričakovana heterozigotnost (H_e) v populacijah z naključnim parjenjem predstavlja pričakovano frekvenco heterozigotov, če je populacija v Hardy-Weinbergovem ravnovesju. Izračunali smo jo po formuli (Nei, 1973):

$$He = 1 - \sum_{i=1}^{m} Xi^{2}$$

$$\dots (2)$$

pri čemer je X_i frekvenca alela, i in m pa število alelov, najdenih na tem lokusu. Pričakovana heterozigotnost (H_e) v našem primeru temelji na petih lokusih in je izračunana tudi za vsak lokus. Povprečna vrednost H_e vseh lokusov pa predstavlja diverziteto populacije. S primerjavo vrednosti H_e in H_o lahko določimo, ali je heterozigotnost znotraj populacije pomembno različna od pričakovane po Hardy-Weinbergovem ravnovesju.

Vrednost PIC ali informativno vrednost lokusa smo izračunali v programu Cervus po formuli (Botstein in sod., 1980):

kjer je p_i frekvenca *i*-tega alela in *n* število osebkov v proučevani populaciji.

Za preverjanje, kako se opažena heterozigotnost pri posameznih lokusih ujema s pričakovano heterozigotnostjo izračunano po Hardy-Weinbergovemu ravnovesju, smo uporabili Hardy-Weinbergov eksaktni test v programu Genepop 3.1 (Raymond in Rousset, 1995). Ničelna hipoteza, ki jo testiramo, je, da je zveza gamet naključna. Ocena verjetnosti ničelne hipoteze je bila izračunana z metodo Markovske verige v programu Genepop 3.1. Za tvorbo Markovskih verig smo uporabili naslednje vhodne vrednosti: vhodno število (1000), število serij (100), število ponovitev (1000).

Frekvence ničelnih alelov smo izračunali po formuli, ki upošteva pričakovano in opaženo heterizigotnost (Brookfield, 1996):

$$r = \frac{(He - Ho)}{(1 + He)}$$
 ...(4)

Frekvence ničelnih alelov so bile izračunane v tabeli Excell. Rezultati so prikazani v preglednici 2 v poglavju 4.2.

4 **REZULTATI**

4.1 IZOLACIJA GENOMSKE DNA

Meduzam morskega klobuka, ki smo jih ujeli v Tržaškem zalivu, smo odvzeli tkiva gonad. Vzorce smo shranili v 96-odstotnem etanolu. Iz vzorcev smo po metodi CTAB izolirali genomsko DNA. Slika 7 prikazuje izolirano genomsko DNA, ki smo jo ločili na agaroznem gelu, da smo dobili podatke o količini in kvaliteti. Koncentracija genomske DNA je pri vseh vzorcih nizka. Lise pod velikostjo 564 bp predstavljajo najverjetneje RNA, ki na PCR ponavadi nima posebnega vpliva. Nerazkosano genomsko DNA imajo vzorci 36, 46 in 55 ter komaj zaznavno vzorec 56. Pri vseh drugih vzorcih je genomska DNA močno razkosana ali pa jo je tako malo, da se je na agaroznem gelu ne vidi. Ker za pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov z reakcijo PCR ne potrebujemo velikih količin DNA in ker v času izdelave diplomske naloge nismo uspeli pridobiti svežih vzorcev smo se odločili, da delo kljub temu nadaljujemo. Izolirano genomsko DNA smo najprej redčili v razmerju 1:50 v sterilni dvakrat destilirani vodi. V PCR smo nato uporabili redčeno DNA.



Slika 7: Izolacija genomske DNA iz međuze *Rhizostoma pulmo* z metodo CTAB. Na prvi in zadnji stezi je naložen velikostni standard Lambda DNA/Hind III Marker, 2 (Fermentas). Na stezah 2 do 14 je naloženo 5 μl genomske DNA.

4. 2 OPTIMIZACIJA VERIŽNE REAKCIJE Z DNA-POLIMERAZO

Izbrani vzorci, na katerih smo optimizirali verižno reakcijo s *Taq* DNA-polimerazo, so označeni s številkami 3, 5, 12, 22, 25, 36, 38, 46, 48, 54, 55, 56 in 57. Za vsak lokus smo posebej optimizirali PCR pomnoževanje.

Za prvo pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov smo uporabili reakcijsko mešanico in temperaturni profil, opisan v poglavju 3.2.2. Pri vseh mikrosatelitnih lokusih smo najprej optimizirali temperaturni profil. Spreminjali smo temperaturo prileganja začetnih

oligonukleotidov v razponu od 50 °C do 65 °C. Izhodno temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov smo izbrali glede na izračunano talilno temperaturo začetnih oligonukleotidov (preglednica 2). Pri mikrosatelitih lokusih RHIZPUL MS1, RHIZPUL MS3, RHIZPUL MS4 in RHIZPUL MS5 v poskusnem pomnoževanju nismo mogli določiti točne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov, zato smo uporabili »touch down« PCR.

Lokus	Nukleotidno zaporedje začetnega oligonukleotida (5`→3`)	Izračunana T _m (°C)	Optimizirana T _a (°C)	Število PCR ciklov
DIUZDIU MC1	F: TCTGCGGGTATCCCTCATAC	62	65-55	10
KHIZPUL MIST	R: CTCGCCATCAGGAGTCTCA	60	55	35
DUIZDUI MS2	F: TCACGCTTCGCATACACTG	60	55	25
KHIZFUL MISZ	R: CTCGCCATCAGGAGTCTCA	60	55	55
DUIZDUI MS2	F: ACACAGTGGGACGTATGCAA	60	65-55	10
KHIZFUL MISS	R: GCTGGTTTGCGTTTGGTATT	58	50	35
DUIZDUI MSA	F: CTAATAGAAACTAATCTAGA	50	56-50	12
KHIZPUL MIS4	R: GTATGATTACGTGAAACGAT	54	50	35
DIUZDIU MS5	F: AGAGATGGAGGCGTGCAA	56	56-50	12
KHIZFUL M53	R: AGTTTGCGATGAAAATCGTG	56	50	35

Preglednica 2: Optimizirani temperaturni profili za pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov.

T_m-talilna temperatura

T_a - temperatura prileganja

Pri vseh lokusih so v produktu neoptimiziranih reakcij PCR prevladovali nespecifično pomnoženi fragmenti DNA, katerih dolžina je variirala okrog dolžine mikrosatelitnega lokusa, ali pa produkta ni bilo. Orientacijske vrednosti dolžine mikrosatelitnih lokusov so predstavljale dolžine kloniranih fragmentov DNA z mikrosatelitno ponovitvijo (glej preglednico 1). Po ločitvi na agaroznem gelu so bili nespecifično pomnoženi fragmenti DNA vidni kot razmazana lisa (slika 8). Z optimizacijo reakcije PCR smo zmanjšali količino nespecifičnega produkta in pomnožili specifični produkt.



Slika 8: Na agaroznem gelu ločeni produkti neoptimizirane reakcije PCR za mikrosatelitni lokus RHIZPUL MS1 pri vzorcih 3, 5, 12, 22, 25 in 36. Na prvi stezi je velikostni standard GeneRuler[™] 100bp DNA Ladder Plus (100-3000 bp, Fermentas).

4. 2. 10ptimizacija mikrosatelitne ponovitve na lokusu RHIZPUL MS1

Izračunana talilna temperatura vodilnega začetnega oligonukleotida za lokus RHIZPUL MS1 je bila 62 °C in povratnega začetnega oligonukleotida 60 °C. Za pomnoževanje smo uporabili različico PCR imenovano »touch down«. V prvih desetih ciklih PCR smo zniževali temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov od 65 °C do 55 °C in sicer za 1 °C na cikel. Optimiziran temperaturni profil za lokus RHIZPUL MS1 je bil:

- začetna denaturacija: 94 °C 2 minuti
- denaturacija: 94 °C 1 minuta
- prileganje: 65–55 °C 30 sekund 10 ciklov
- podaljševanje: 72 °C 1 minuta -
- denaturacija: 94 °C 1 minuta

- 35 ciklov
- prileganje. 55 °C 30 sekund podaljševanje: 72 °C 1 minuta
- podaljšana polimerizacija: 72 °C 5 minut

Pri optimizaciji reakcijske mešanice smo najprej zmanjšali koncentracijo MgCl₂ iz izhodne 2 mM na 1,5 mM. S tem smo zmanjšali količino nespecifično namnoženega produkta. Nato smo zmanjšali koncentracije dNTP-jev iz izhodne koncentracije 0,4 mM na 0,2 mM. Na gelu smo nato videli večjo količino specifičnih fragmentov ter manjšo količino kratkih nespecifičnih fragmentov. V naslednjem koraku smo še prepolovili koncentraciji obeh začetnih oligonukleotidov iz 0,25 µM na 0,125 µM. Pomnoženi fragmenti ločeni na agaroznem gelu so prikazani na slikah 9 in 10. Specifičen PCR produkt nam je uspelo pomnožiti v dvanajstih od trinajstih vzorcev. V vzorcih 55 in 57 je bila količina namnoženega produkta majhna in skoraj neopazna na agaroznem gelu. Kljub temu je količina zadostovala za ločitev na poliakrilamidnem gelu, ker ima le-ta večjo ločljivost od agaroznega gela. Končna optimizirana reakcijska mešanica z volumnom 20 µl je vsebovala:

- 0,6 enote *Taq*-polimeraze
- 2 μl 10-krat koncentriranega pufra
- 1,5 mM MgCl₂
- 0,2 mM dNTP
- 0,125 µM vodilnega začetnega oligonukleotida
- 0,125 μM povratnega začetnega oligonukleotida
- 5 μl DNA (izolirana DNA, redčena 1 : 50)
- deionizirana in sterilna voda do volumna 20 µl



Slika 9: Na agaroznem gelu ločeni produkti optimizirane reakcije PCR za mikrosatelitni lokus RHIZPUL MS1 pri vzorcih 3, 5, 12, 22, 25, 36, 38, 46 in 48. Na prvi in 11. stezi je velikostni standard GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder (100-1000 bp, Fermentas).



Slika 10: Na agaroznem gelu ločeni produkti optimizirane reakcije PCR za mikrosatelitni lokus RHIZPUL MS1 pri vzorcu 54 in produkti vzorcev 55 in 57, ki so pomnoženi pri istih pogojih. Na četrti stezi je velikostni standard GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder Plus (100–3000 bp, Fermentas).

4. 2. 2Optimizacija mikrosatelitne ponovitve na lokusu RHIZPUL MS2

Najprej smo optimizirali temperaturni profil. Izračunana temperatura taljenja obeh začetnih oligonukleotidov je bila 60 °C. PCR reakcijo smo začeli s temperaturo prileganja 55 °C in s 25 cikli pomnoževanja. Ker smo pomnožili premalo PCR produkta, smo povečali število ciklov na 35. Končni optimiziran temperaturni profil za lokus RHIZPUL MS2 je bil:

- začetna denaturacija: 94 °C 2 minuti
- denaturacija: 94 °C 1 minuta
- prileganje: 55 °C 1 minuta
 35 ciklov
- podaljševanje: 72 °C 1 minuta
- podaljšana polimerizacija: 72 °C 5 minut

Tudi pri pomnoževanju lokusa RHIZPUL MS2 smo zmanjšali izhodno koncentracijo $MgCl_2$ iz 2 mM na 1,5 mM. Zmanjšali smo tudi izhodno koncentracijo dNTP-jev iz 0,4 mM na 0,2 mM. S tem smo pridobili večjo količino specifičnega produkta in manjšo količino kratkih nespecifičnih fragmentov. V vseh vzorcih nam je uspelo pomnožiti specifičen PCR produkt, ki je prikazan na sliki 11. V vzorcih 3, 5, 55 in 57 je bila količina pomnoženega produkta majhna in skoraj neopazna na agaroznem gelu. Kljub temu je količina produkta zadostovala za ločitev na poliakrilamidnem gelu. Končna optimizirana reakcijska mešanica s končnim volumnom 20 μ l je vsebovala:

- 0,6 enote *Taq*-polimeraze
- 2 µl 10-krat koncentriranega pufra
- 1,5 mM MgCl₂
- 0,2 mM dNTP
- 0,25 μM vodilnega začetnega oligonukleotida
- 0,25 µM povratnega začetnega oligonukleotida
- 5 μl DNA (izolirana DNA, redčena 1 : 50)
- deionizirana in sterilna voda do volumna 20 μl

3 5 12 22 25 36 38 46 48 54 55 56 57 bp 3000 2000 1500-1200 1031 500 400 300 200^{-1} 100^{-1}

Slika 11: Na agaroznem gelu ločeni produkti optimizirane reakcije PCR za mikrosatelitni lokus RHIZPUL MS2 pri vzorcih 12, 22, 25, 36, 38, 46, 48, 54, 56 in manjša količina specifičnega produkta pri vzorcih 3, 5, 55 in 57. Na prvi in 15. stezi je velikostni standard GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder Plus (100–3000 bp, Fermentas).

4. 2. 3Optimizacija mikrosatelitne ponovitve na lokusu RHIZPUL MS3

Pri lokusu RHIZPUL MS3 smo najprej optimizirali temperaturni profil. Izračunana talilna temperatura vodilnega začetnega oligonukleotida za lokus RHIZPUL MS3 je bila 60 °C in povratnega začetnega oligonukleotida 58 °C. Za pomnoževanje smo uporabili »touch down« PCR. Postopno smo zniževali temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov v prvih desetih ciklih za 1 °C na cikel in sicer od 65 °C do 55 °C. Končni optimiziran temperaturni profil za lokus RHIZPUL MS3 je bil:

- začetna denaturacija: 94 °C 2 minuti
- denaturacija: 94 °C 1 minuta
- prileganje: 65-55 °C 30 sekund 10 ciklov
- podaljševanje: 72 °C 1 minuta
- denaturacija: 94 °C 1 minuta
- prileganje. 55 °C 30 sekund > 35 ciklov
- podaljševanje: 72 °C 1 minuta _____
- podaljšana polimerizacija: 72 °C 5 minut

Pri optimizaciji pomnoževanja lokusa RHIZPUL MS3 smo v reakcijski mešanici zmanjšali izhodno koncentracijo MgCl₂ iz 2 mM na 1,5 mM. Nato smo zmanjšali še koncentracijo dNTP-jev iz izhodne koncentracije 0,4 μ M na 0,2 μ M. V devetih vzorcih od trinajstih nam je uspelo pomnožiti specifičen produkt (slika 12). V vzorcih 3 in 25 je bila količina pomnoženega produkta majhna in je slabo oziroma ni vidna na sliki 11. Kljub temu je

količina zadostovala za ločitev na poliakrilamidem gelu. Končna optimizirana reakcijska mešanica s končnim volumnom 20 µl je vsebovala:

- 0,6 enote *Taq*-polimeraze
- 2 μl 10-krat koncentriranega pufra
- 1,5 mM MgCl₂
- 0,2 mM dNTP
- 0,25 μM vodilnega začetnega oligonukleotida
- 0,25 µM povratnega začetnega oligonukleotida
- 5 μl DNA (izolirana DNA, redčena 1 : 50)
- deionizirana in sterilna voda do volumna 20 μl



Slika 12: Na agaroznem gelu ločeni produkti optimiziranega PCR-a za mikrosatelitni lokus RHIZPUL MS3 pri vzorcih 5, 12, 22, 36, 38 in 48. Pri vzorcih 3 in 25 je pri istih pogojih PCR prišlo do slabšega pomnoževanja. Na prvi in 10. stezi je velikostni standard GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder (100–1000 bp, Fermentas).

4. 2. 4Optimizacija mikrosatelitne ponovitve na lokusu RHIZPUL MS4

Pri lokusu RHIZPUL MS4 smo najprej optimizirali temperaturni profil. Izračunana talilna temperatura vodilnega začetnega oligonukleotida za lokus RHIZPUL MS4 je bila 50 °C in povratnega začetnega oligonukleotida 54 °C. Za izhodno temperaturo prileganja začetnih nukleotidov smo izbrali 50 °C. V naslednjih reakcijah PCR smo zviševali temperaturo prileganja do 55 °C. Vendar nam ni uspelo pomnožiti specifičnega produkta. Pri optimizaciji začetnega temperaturnega profila nismo našli ugodne temperature prileganja, zato smo uporabili »touch down« PCR. Pri »touch down« PCR, s katerim smo zniževali temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov v prvih desetih ciklih od 56 °C do 46 °C za 1 °C na cikel, nismo mogli pomnožiti specifičnega PCR produkta. Nato smo uporabili »touch down« PCR, pri katerem smo zniževali temperaturo prileganja v prvih dvanajstih ciklih za 0,5 °C na cikel in sicer od 56 °C do 50 °C. Pri teh pogojih smo dobili specifični produkt. Končni optimiziran temperaturni profil za lokus MS4 je bil:

- začetna denaturacija: 94 °C 2 minuti
- denaturacija: 94 °C 1 minuta
- prileganje: 56–50 °C 30 sekund 12 ciklov
- podaljševanje: 72 °C 1 minuta
- denaturacija: 94 °C 1 minuta
- prileganje. 50 °C 30 sekund
- podaljševanje: 72 °C 1 minuta
- podaljšana polimerizacija: 72 °C 5 minut

Tudi pri optimizaciji reakcijske mešanice za lokus RHIZPUL MS4 smo najprej zmanjšali izhodno koncentracijo MgCl₂ iz 2 mM na 1,5 mM in nato še koncentracijo dNTP-jev iz 0,4 μ M na 0,2 μ M. S tem smo pridobili večjo količino specifičnega produkta in zmanjšali količino nespecifičnega produkta. Uspelo nam je pomnožiti specifičen PCR produkt v petih od trinajstih vzorcev. Na sliki 13 so prikazani produkti PCR iz vzorcev 12, 25 in 38. Produkti PCR iz vzorcev 48 in 54 niso bili vidni na agaroznem gelu, ker so se pomnožili v premajhni količini. Vendar pa smo vse pomnožene produkte iz vseh vzorcev prikazali na poliakrilamidnem gelu (priloga B in C). Končna optimizirana reakcijska mešanica s končnim volumnom 20 μ l je vsebovala:

35 ciklov

- 0,6 enote *Taq*-polimeraze
- 2 µl 10-krat koncentriranega pufra
- 1,5 mM MgCl₂
- 0,2 mM dNTP
- 0,25 μM vodilnega začetnega oligonukleotida

- 0,25 µM povratnega začetnega oligonukleotida
- 5 μl DNA (izolirana DNA, redčena 1 : 50)
- deionizirana in sterilna voda do volumna sterilna 20 μl

4. 2. 5Optimizacija mikrosatelitne ponovitve na lokusu RHIZPUL MS5

Najprej smo optimizirali temperaturni profil. Izračunana talilna temperatura začetnih oligonukleotidov za lokus RHIZPUL MS5 je bila 56 °C, zato smo za izhodno temperaturo prileganja začetnih nukleotidov izbrali 50 °C. V naslednjih reakcijah PCR smo zviševali temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov od 50 °C do 55 °C, vendar nismo pomnožili specifičnega produkta. Zato smo uporabili »touch down« PCR, s katerim nam je uspelo namnožiti specifičen produkt. Pri »touch down« PCR smo zniževali temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov v prvih dvanajstih ciklih od 56 °C do 50 °C za 0,5 °C na cikel. Končni optimiziran temperaturni profil za lokus MS5 je bil:

- začetna denaturacija: 94 °C 2 minuti
- denaturacija: 94 °C 1 minuta
- prileganje: 56–50 °C 30 sekund 12 ciklov
- podaljševanje: 72 °C 1 minuta
- denaturacija: 94 °C 1 minuta
- prileganje. 50 °C 30 sekund 3
- podaljševanje: 72 °C 1 minuta
- podaljšana polimerizacija: 72 °C 5 minut

Tudi pri lokusu RHIZPUL MS5 smo pri optimizaciji reakcijske mešanice najprej zmanjšali izhodno koncentracijo MgCl₂ iz 2 mM na 1,5 mM in izhodno koncentracijo dNTP-jev iz 0,4 μ M na 0,2 μ M. S tem smo pridobili večjo količino specifičnega produkta. V naslednjem koraku smo zmanjšali koncentracijo začetnih oligonukleotidov iz 0,25 μ M na 0,125 μ M. Rezultat pomnoževanja je viden na sliki 13. Pomnožili smo specifičen PCR produkt v desetih od trinajstih vzorcih. Produktov PCR iz vzorcev 54, 56 in 57 nismo prikazali na agaroznem gelu, ker smo specifičen produkt pri teh vzorcih pomnožili v premajhni količini. Vendar pa smo vse pomnožene produkte iz vzorcev prikazali na poliakrilamidnem gelu (priloga B). Končna optimizirana reakcijska mešanica s končnim volumnom 20 μ l je vsebovala:

- 0,6 enote *Taq*-polimeraze
- 2 µl 10-krat koncentriranega pufra
- 1,5 mM MgCl₂
- 0,2 mM dNTP

31

35 ciklov

- 0,125 μM vodilnega začetnega oligonukleotida
- 0,125 μM povratnega začetnega oligonukleotida
- 5 μl DNA (izolirana DNA, redčena 1 : 50)
- deionizirana in sterilna voda do volumna 20 μl



Slika 13: Na agaroznem gelu ločeni produkti optimiziranega PCR-a za mikrosatelitni lokus RHIZPUL MS4 in RHIZPUL MS 5 pri vzorcih 3, 12, 22, 25, 36, 38, 46 in 48. Na prvi, 5. in 13. stezi je velikostni standard GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder (100–1000 bp, Fermentas).

4.3 DOLOČANJE VELIKOSTI PCR PRODUKTOV NA POLIAKRILAMIDNEM GELU

Produkte optimiziranih reakcij PCR smo nanesli na 8-odstotni poliakrilamidni gel. Poliakrilamidni geli imajo visoko ločljivost, zato smo v žepke gela nanesli ustrezen volumen PCR produkta. Volumen nanešenih PCR produktov se je gibal od 3 µl do 10 µl. PCR produkte v vzorcih s številko 12 smo nanesli po 3 µl. PCR produkte, ki so se namnožili v manjši količini, kot je na primer količina PCR produktov v vzorcih 25 in 38, smo nanesli na gel po 5 µl. PCR produkte, ki so bili slabo vidni na agaroznem gelu pa smo nanesli v volumnu od 7 do 10 µl. Med slednje na primer spadajo PCR produkti v vzorcih 46, 55 in 57. Slike ločitve PCR produktov na poliakrilamidnem gelu so priložene v prilogi B in C. V preglednici 2 je prikazan končni rezultat ločitve fragmentov. Velikost fragmentov je izpisana v baznih parih (bp). Aleli, ki se niso pomnožili so označeni z 00. Velikosti fragmentov smo izračunali v programu AlleleLocator 1.03.

Vzorec	RHIZPUL MS1	RHIZPUL MS2	RHIZPUL MS3	RHIZPUL MS4	RHIZPUL MS5
3	194 198	297 297	399 399	*00 *00	400 405
5	212 214	297 297	387 399	*00 *00	*00 *00
12	156 184	295 295	396 396	372 390	337 365
22	158 158	295 295	396 396	*00 *00	*00 *00
25	190 226	295 295	396 405	345 367	335 340
36	156 188	295 297	399 432	*00 *00	370 390
38	222 222	289 297	396 414	359 380	375 375
46	192 192	297 297	*00 *00	*00 *00	360 365
48	158 190	297 297	399 438	*00 *00	343 400
54	188 188	293 293	399 411	322 322	385 390
55	190 190	297 297	*00 *00	*00 *00	*00 *00
56	*00 *00	285 295	*00 *00	352 387	360 372
57	158 158	297 297	*00 *00	*00 *00	394 400

Preglednica 3: Velikosti pomnoženih alelov pri 13 analiziranih vzorcih na petih mikrosatelitnih lokusih

*00 – alel, ki se ni pomnožil

4. 4 IZRAČUN PARAMETROV ZA OPREDELITEV MIKROSATELITNIH LOKUSOV

Velikosti alelov smo vnesli v računalniški program Cervus in izračunali opaženo in pričakovano heterozigotnost ter vrednosti PIC. Frekvenco ničelnih alelov smo izračunali v tabeli Excell. Rezultati so navedeni v preglednici 4. Izračunana opažena heterozigotnost se giblje od 0,3077 pri lokusu RHIZPUL MS2 do 0,9 pri lokusu RHIZPUL MS5. Lokusi RHIZPUL MS3, RHIZPUL MS4 in RHIZPUL MS5 imajo visoko izračunano opaženo heterozigotnost (0,66–0,9). Pri vseh lokusih je izračunana opažena heterozigotnost manjša od pričakovane heterozigotnosti. Največja razlika med obema nastopa pri lokusih RHIZPUL MS1 in RHIZPUL MS2, pri katerih je opažena heterozigotnost skoraj dvakrat

manjša od pričakovane heterozigotnosti. Najmanjši odklon opažene od pričakovane heterozigotnosti je pri lokusu RHIZPUL MS5.

Lokus	n	Na	razpon alelov (bp)	št. genotipov	H₀	He	Р	r	PIC
RHIZPUL MS1	13	13	156-226	11	0,500	0,942	0	0,306	0,895
RHIZPUL MS2	13	5	285-297	6	0,308	0,609	0,014	0,231	0,513
RHIZPUL MS3	13	8	387–438	8	0,667	0,804	0,426	0,120	0,726
RHIZPUL MS4	13	9	322-390	5	0,800	0,978	0,108	0,151	0,868
RHIZPUL MS5	13	14	335–405	10	0,900	0,963	0,406	0,059	0,909

n - število obravnavanih osebkov

N_a - dejansko število alelov

H_o- opažena heterozigotnost

H_e - pričakovana heterozigotnost

r - frekvenca ničelnih alelov

PIC - informativna vrednost lokusa

P- odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja

Testirali smo ali so aleli v Hardy-Weinbergovem ravnovesju. Najprej smo uporabili program Cervus, ki za izračun uporablja χ^2 test. Pri lokusu RHIZPUL MS1 smo dobili vrednost 0, pri lokusu RHIZPUL MS2 0,383, pri lokusu RHIZPUL MS3 0,989, pri lokusu RHIZPUL MS4 0,297 in pri lokusu RHIZPUL MS5 0,517. Ker je v programu Cervus omenjeno, da χ^2 test ni primeren za natančnejše izračune smo zato za natančnejši izračun uporabili Markovske verige v programu Genepop 3.1 pod pogoji opisanimi v poglavju 3. 2. 5. Dobljene rezultate smo vnesli v preglednico 4.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 IZOLACIJA GENOMSKE DNA

Morski klobuk (Rhizostoma pulmo) sodi med klobučnjaške meduze, ki imajo polipno in meduzno generacijo in je stalna vrsta v Sredozemskem morju. Zelo mu je podobna vrsta Rhizostoma octopus, ki naseljuje Atlantski ocean. V zadnjih letih so se međuze morskega klobuka množično pojavljale v Jadranskem morju. V zimskih mesecih so številne meduze morskega klobuka tudi onemogočile ribolov. Tolikšno pojavljanje meduz morskega klobuka nas je spodbudilo, da optimiziramo pomnoževanje s PCR že izoliranih mikrosatelitnih lokusov morskega klobuka. Glede na dostopne vire in podatke iz podatkovne baze GenBank so mikrosatelitni lokusi, ki smo jih optimizirali prvi mikrosatelitni označevalci izolirani iz morskega klobuka. Za optimizacijo pomnoževanja mikrosatelitnih lokusov smo uporabili 13 vzorcev, ki predstavljajo 13 osebkov. Naši vzorci so bili koščki gonad meduz morskega klobuka, ki so bili shranjeni v 96-odstotnem etanolu. Za izolacijo DNA smo uporabili metodo, ki vključuje CTAB (Winnepenninckx in sod., 1993). Izolirana DNA je bila slabe kvalitete, vendar smo kljub temu uspeli iz nje s PCR pomnožiti mikrosatelitne lokuse. Iz slike 7 v poglavju 4.1 je razvidno, da je bila pri vseh vzorcih koncentracija DNA izredno nizka. Koncentracijo DNA smo izmerili tudi s spektrofotometrom in smo jo lahko določili samo pri treh vzorcih, ki so imeli razmerje med absorbcijo pri valovnih dolžinah 260 (A_{260 nm}) in 280 nm (A_{280 nm}) 1,8±0,1. Pri vzorcu 5 smo izmerili izhodno koncentracijo DNA 88 ng/µl, pri vzorcu 22 178 ng/µl in pri vzorcu 56 675 μg/μl. Pri ostalih vzorcih je bilo razmerje A_{260 nm}/A_{280 nm} pod vrednostjo 1,7 kar kaže na kontaminacijo s proteini, ker imajo proteini vrh absorbcije pri 280 nm. Iz slike 7 je tudi razvidno, da je pri večini vzorcev genomska DNA razpadla na fragmente, kar je lahko posledica daljšega hranjenja vzorcev do izolacije DNA. Vzorci gonad morskega klobuka, ki so označeni s številkami 3, 5, 12, 22, 25, 36, 38, 46 in 48 so bili shranjeni v 96odstotnem etanolu tri mesece preden smo izolirali DNA. Vzorci 54, 55, 56 in 57 pa so bili shranjeni osem mesecev do izolacije DNA. Dawson in sod. (1998) so primerjali obstojnost DNA v vzorcih tkiv različnih morskih nevretenčarjev. Ugotovili so, da se je v 28 mesecih najbolj razgradila DNA meduze uhatega klobučnjaka. DNA so izolirali iz tkiva meduze uhatega klobučnjaka (Aurelia aurita), ki je bilo shranjeno v 70-odstotnem etanolu za 28 mesecev pri -13 °C. Izolirano DNA zaradi razpada na manjše fragmente niso mogli več uporabiti za PCR. Ugotovili so, da je najprimernejši način shranjevanja tkiva meduz uhatega klobučnjaka pri -80 °C. Predlagali so tudi alternativno metodo shranjevanja v raztopini dimetilsulfoksida nasičenega z natrijevim kloridom pri -13 °C do 28 mesecev, vendar je prisotna znatna razgradnja DNA.

5.2 OPTIMIZACIJA VERIŽNE REAKCIJE Z DNA-POLIMERAZO

Pri optimizaciji PCR prihaja do variacij pogojev pomnoževanja, ki vodijo do zmanjšane količine PCR produkta ali do nespecifičnega produkta. Na uspešnost pomnoževanja PCR vplivajo sestavine in količinska razmerja med sestavinami v reakcijski mešanici, količina in kvaliteta matrične DNA ter temperaturni profil reakcije. V reakcijski mešanici morajo biti ustrezne koncentracije pufra, magnezijevih ionov (Mg²⁺), začetnih oligonukleotidov, dNTP-jev, *Taq*-polimeraze in matrične DNA (Innis in sod., 1999).

Najbolj primeren izbor za optimizacijo prvega parametra PCR je temperatura prileganja začetnih oligonukletidov, ker je optimalna temperatura prileganja predpogoj za zadostno pomnožitev tarčnega zaporedja in za zanesljive rezultate. Na temperaturo prileganja vplivata dolžina in zaporedje začetnega oligonukleotida zato se pogosto razlikujeta temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov. V primeru lokusa RHIZPUL MS2 imata začetna oligonukleotida enako talilno temperaturo, zato smo začetni temperaturni profil za lokus RHIZPUL MS2 brez težav optimizirali. Temperature prileganja izračunane po enačbi 1 (poglavje 3.2.2) ne ustrezajo vedno optimalni temperaturi prileganja v reakciji PCR. To ni v nasprotju s pričakovanji, ker je razvoj enačbe temeljil na hibridizacijskih poskusih, ki so potekali pri višji koncentraciji soli (1 M). Zato je izračunana temperatura prileganja le izhodiščna temperatura za optimizacijo temperaturnega profila (Zakaria, 2006). Pri optimizaciji temperaturnega profila za vse lokuse velja, da višja temperatura poveča specifičnost in hkrati zmanjša učinkovitost pomnoževanja, nižja temperatura pa zmanjša specifičnost pomnoževanja ter poveča količino produkta (Rychlik in sod., 1990). Pri lokusih RHIZPUL MS1, RHIZPUL MS3 in RHIZPUL MS4 so se razlikovale temperature taljenja obeh začetnih oligonukleotidov zato smo uporabili temperaturni profil »touch down«. S »touch down« PCR dosežemo večjo specifičnost pomnoževanja pri višjih temperaturah in se v večini primerov izognemo pomnoževanju regij s podobnimi zaporedji. V prvih ciklih se pomnožijo popolnoma homologna zaporedja, ki se v naslednjih ciklih pri nižji temperaturi pomnožujejo bolj učinkovito. Vsaka sprememba pri temperaturi taljenja med pravilnim in nepravilnim prileganjem daje dvakratno razliko v količini produkta na cikel, kar poveča razmerje med pravilnim in nepravilnim produktom (Innis in sod., 1999, Rychlik, 1990). Pri optimizaciji pomnoževanja 125 mikrosatelitnih lokusov pri koruzi so pri vseh uporabili »touch down« PCR (Ogliari in sod., 2000).

Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov se lahko spremeni s spremembo koncentracij sestavin reakcijske mešanice za PCR (Alka in sod., 2003, Rychlik in sod., 1990). Ioni Mg²⁺ se v verižni reakciji z DNA-polimerazo vežejo na matrično DNA, dNTP-

je in začetne oligonukleotide ter so potrebni v ustrezni prosti količini za delovanje *Taq*polimeraze. Koncentracija ionov Mg²⁺ vpliva na specifičnost produkta, prileganje začetnih oligonukleotidov, nastanek nezaželenih dimerov začetnih oligonukleotidov, temperaturo taljenja in encimsko specifičnost ter natančnost. Prebitek ionov Mg²⁺ povzroča nepravilne vgradnje nukleotidov pri sintezi nove DNA-verige in povečano nespecifično pomoževanje. Pri višjih koncentracijah MgCl₂ smo dobili večje količine nespecifičnega produkta, kar je bilo videti kot razmazana lisa pri ločevanju na agaroznem gelu. V reakcijski mešanici lahko pride do odstopanj v koncentraciji ionov Mg²⁺, ker magnezijeve raztopine tvorijo koncentracijski gradient pri zmrzovanju. Zato je potrebno pred uporabo založne raztopine MgCl₂ popolnoma odtaliti in premešati na vibracijskemu mešalniku (Zakaria, 2006).

Glavni vir fosfatnih skupin v reakciji so dNTP-ji, s katerimi tvorijo ioni Mg²⁺ reverzibilne komplekse. Vsaka sprememba koncentracije dNTP-jev vpliva na koncentracijo prostih ionov Mg²⁺. Koncentracija prostih ionov Mg²⁺ mora presegati celotno koncentracijo dNTP-jev za 0,5 mM do 3 mM (Innis in sod., 1999). Pri optimizaciji PCR smo znižali izhodne koncentracije dNTP-jev in začetnih oligonukleotidov ter v ekvimolarnem razmerju tudi koncentraciji ionov Mg²⁺. Koncentracijo začetnih oligonukleotidov smo zmanjšali pri optimizaciji dveh lokusov (RHIZPUL MS1, RHIZPUL MS5) iz 0,25 μM na 0,125 μM. Zaradi tega se je povečala specifičnost pomnoževanja in količina pomnoženih fragmentov. Zaradi visoke koncentracije začetnih oligonukleotidov se lahko le-ti nespecifično nalegajo in nastane nespecifični produkt. Pri previsoki koncentraciji lahko začetni oligonukleotidi tvorijo tudi dimere in se ne nalegajo na matrično DNA.

Izhodne koncentracije *Taq*-polimeraze, 0,6 U v 20 μl, nismo spreminjali. Večje koncentracije encima lahko povzročijo nespecifično pomnoževanje. Vpliv na reakcijo PCR ima tudi koncentracija in kvaliteta matrične DNA. Slika 7 v poglavju 4.1 prikazuje izolirano genomsko DNA, ki je razkosana. Razkosanost matrične DNA pomeni slabo izhodišče za optimizacijo. Pri izolirani genomski DNA vzorcev 12, 25, 38 in 54 so vidni fragmenti vseh velikostnih razredov. V teh vzorcih smo tudi pomnožili vseh pet mikrosatelitnih lokusov in dobili večje količine specifičnega produkta v primerjavi z ostalimi vzorci. Najslabše smo pomnožili mikrosatelitne lokuse v vzorcu številka 55. V tem vzorcu smo uspeli pomnožiti samo štiri alele v dveh mikrosatelitnih lokusih. Izolirano genomsko DNA smo za PCR redčili v razmerju 1:50 v sterilni destilirani vodi. Z redčenjem razredčimo tudi morebitne inhibitorje PCR, ki so lahko prisotni v izolirani DNA. Matrična DNA naj ne bi imela prisotne inhibitorje DNA-polimeraz. Pogosti inhibitorji so ostanki reagentov, ki se uporabljajo pri izolaciji nukleinskih kislin kot so soli,

proteaze, organske spojine in SDS (Zakaria, 2006). Teh težav je manj, če DNA izoliramo s komercialnimi kiti za izolacijo DNA (Smith in sod., 2003).

5. 3 POLIAKRILAMIDNA ELEKTROFOREZA

Namnožene fragmente DNA smo najprej ločili z elektroforezo na agaroznem gelu, da smo ugotovili, pri katerih pogojih PCR se aleli pomnožujejo. Pri lokusu RHIZPUL MS2 so se pomnožili aleli v vseh vzorcih za razliko od ostalih vzorcev. Največ alelov se nam ni pomnožilo pri lokusu RHIZPUL MS4 in sicer osem. Aleli, ki se ne pomnožijo so ničelni aleli. Vzroki so lahko razgrajena genomska DNA na mestu mikrosatelitnega lokusa, mutacije na mestu prileganja začetnih oligonukleotidov in neustrezni PCR pogoji, ki so onemogočili nadaljnjo verižno reakcijo s polimerazo (Selkoe in Toonen, 2006). Na poliakrilamidnem gelu smo določili velikosti pomnoženih fragmentov. Razlike v dolžinah alelov za nekaj baznih parov so lahko posledica mutacij v bočnih regijah, insercije ali delecije znotraj mikrosatelitnega motiva, ki je posledica zdrsa Taq-polimeraze na matrični DNA med pomnoževanjem ter razlik pri detekciji velikosti alelov na poliakrilamidnih gelih zaradi razlik v hitrosti potovanja fragmentov po gelu. Variabilnost alelov je lahko pogojena z zgradbo lokusa, zaradi česar so večje možnosti napak pri namnoževanju s PCR pri dinukleotidnih motivih (npr. nastanek »stutter bands«). Z uporabo zunanjih in internih standardov zagotovimo, da so napake pri določanju velikosti na poliakrilamidnem gelu čim manjše in tako je zagotovljena primerljivost med geli. Pri našem delu smo uporabili zunanje standarde. Na odstopanja v mobilnosti fragmentov pri elektroforezi vplivajo tudi struktura in bazno zaporedje mikrosatelita ter različne fluorescenčne oznake na fragmentih. Zaradi tega lahko enako veliki fragmenti potujejo po gelu različno hitro (Henry, 2001). Na agaroznih gelih (slika 9 in 12) so bili vidni tudi kratki fragmenti z velikostjo pod 100 bp. Še bolje so bili vidni kratki nespecifični fragmenti in začetni oligonukleotidi na poliakrilamidnem gelu (priloga B). Ločevanja pravih alelov niso ovirali, ker so bile velikosti le teh nad 100 bp.

Zanesljivost pomnoževanja mikrosatelitnih lokusov je osnovni pogoj za genotipizacijo, ki je podlaga populacijskim študijam. Zagotoviti zanesljivo pomnoževanje je še posebej pomembno v vzorcih, kjer je malo DNA in je le-ta pogosto razgrajena (vzorci iztrebkov, perja, muzejski vzorci, dlake, luske...). Zato je potrebno mikrosatelitne lokuse pomnožiti večkrat in primerjati rezultate genotipizacije. Če se rezultati ujemajo, potem je postopek genotipizacije zanesljiv in lokus lahko uporabljamo za nadaljne analize, v nasprotnem primeru je potrebno lokus, ki se nezanesljivo pomnožuje izločiti. Na tak način lahko

ugotovimo pomnoževanje lažnih alelov (angl. *false alleles*) in izpad alelov (angl. *allelic dropout*) (Broquet in Petit, 2004).

Najbolj polimorfen je bil lokus RHIZPUL MS5, pri katerem je bila opažena heterozigotnost 0,9, najmanj polimorfen pa lokus RHIZPUL MS2 z opaženo heterozigotnostjo 0,308. Opažena heterozigotnost je bila pri vseh lokusih manjša od pričakovane heterozigotnosti. Velika razlika med H_o in H_e je posledica velikega števila homozigotov. Vzroki za primankljaj heterozigotov so lahko: ničelni aleli, Wahlundov učinek, nenaključno parjenje in vezanost lokusa na gen, ki je pod selekcijskim pritiskom (Freeland, 2005, Jones in Ardren, 2003). V našem primeru je bilo sokrivo precenjeno število alelov na nekaterih lokusih. Veliko odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja nakazuje tudi na ničelne alele. Ničelni aleli so prisotni pri štirih lokusih od petih. Pri lokusu RHIZPUL MS3 nismo pomnožili alelov v štirih vzorcih od trinajstih vzorcev in pri lokusu RHIZPUL MS4 nismo pomnožili alelov v osmih vzorcih od trinajstih vzorcev. Ničelni aleli vplivajo na opaženo heterozigotnost na lokusih RHIZPUL MS3, RHIZPUL MS4 in RHIZPUL MS5. Lokusa RHIZPUL MS1 in RHIZPUL MS2 imata visoko frekvenco ničelnih alelov zaradi velikega števila homozigotov.

P-vrednost je najmanjša stopnja značilnosti pri kateri še zavrnemo ničelno hipotezo pri danih podatkih. Ob predpostavljenem pogoju, da mora za statistično pomembno odstopanje frekvenc alelov od Hardy-Weinbergovega ravnovesja biti P≤0,05, je iz naših rezultatov razvidno, da je odstopanje statistično pomembno pri lokusu RHIZPUL MS1 in RHIZPUL MS2.

Vrednost PIC je najnižja pri lokusu RHIZPUL MS2 (0,513). Vrednost PIC je splošna ocena informativnosti genetskega označevalca ne glede ali se označevalci dedujejo vezano (Botstein in sod., 1980). PIC je odvisen od števila alelov in frekvence vsakega alela na lokusu označevalca. Vrednost PIC=0 predstavlja alel, ki je enak v vseh preiskanih osebkih (njegova velikost se ne spreminja), medtem ko vrednost PIC=1 predstavlja največji možen polimorfizem (vsi aleli imajo različne velikosti). Vrednost PIC ostalih štirih lokusov je mnogo bolj visoka in je najvišja pri lokusu RHIZPUL MS5 (0,909). Visoka vrednost PIC dokazuje, da so naši optimizirani mikrosatelitni lokusi uporabni v genetskih študijah, ker so dovolj polimorfni. Ugotovljena variabilnost mikrosatelitnih lokusov daje možnost njihove uporabe v populacijskih študijih.

6 POVZETEK

Optimizirali smo pogoje verižne reakcije s Taq-polimerazo za pet mikrosatelitnih lokusov pri vrsti morski klobuk (Rhizostoma pulmo). Motivi mikrosatelitov so sestavljen iz di-, tri in tetranukleotidnih ponovitev. Iz 13 vzorcev smo najprej izolirali genomsko DNA. Nato smo optimizirali PCR pomnoževanje za vsak mikrosatelitni lokus posebej. Najprej smo optimizirali temperaturni profil PCR in nato koncentracijska razmerja posameznih sestavin v reakcijski mešanici za PCR. Pri štirih mikrosatelitnih lokusih smo uporabili »touch down« PCR profil. Na pomnoževanje lokusov je vplivala izolirana genomska DNA, ker smo jo izolirali v nizki koncentraciji in je bila tudi fragmentirana. Pomnožene mikrosatelitne lokuse smo ločili na poliakrilamidni elektroforezi na sekvenatorju ALFexpress II in določili dolžine alelov s programom AlleleLocator 1.03. Na lokusu RHIZPUL MS1 smo pomnožili 13 alelov, na lokusu RHIZPUL MS2 5 alelov, na lokusu RHIZPUL MS3 8 alelov, na lokusu RHIZPUL MS4 9 alelov in na lokusu RHIZPUL MS5 14 alelov. Velikosti namnoženih fragmentov DNA so se gibale pri lokusu RHIZPUL MS1 od 156 do 226 bp, pri lokusu RHIZPUL MS2 od 285 do 297 bp, pri lokusu RHIZPUL MS3 od 387 do 438 bp, pri lokusu RHIZPUL MS4 od 322 do 390 bp in pri lokusu RHIZPUL MS5 od 335 do 405 bp. Dobljene dolžine alelov smo vnesli v računalniški program Cervus za izračun dejanske in pričakovane heterozigotnosti, vrednosti PIC in ničelnih alelov. Pri vseh lokusih je bila izračunana opažena heterozigotnost manjša od pričakovane heterozigotnosti. Pri lokusih RHIZPUL MS1 in RHIZPUL MS2 je bila opažena heterozigotnost skoraj dvakrat manjša od pričakovane in oba lokusa tudi odstopata od Hardy-Weinbergovega ravnovesja. Frekvenca ničelnih alelov je bila zelo visoka pri lokusih RHIZPUL MS 1 (0,306) in RHIZPUL MS2 (0,231) ter zelo nizka pri lokusu RHIZPUL MS5 (0,059). Obravnavani mikrosatelitni lokusi so visoko polimorfni, kar kažejo izračunane vrednosti PIC in so primerni genetski označevalci za populacijske študije morskega klobuka.

7 VIRI

- Alka D., Sarin B. C., Mittar D., Sehajpal P. K. 2003. Optimization of 38 kDa based PCR assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical samples. Indian Journal of Tuberculosisi 50: 209-217.
- Arai M.N. 2001. Pelagic coelenterates and eutrophication: a review. Hydrobiologia 451 (Dev. Hydrobiol. 155). 69–87.
- 3. Balloux F., Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology 11: 155-165.
- Benović A., Ličić D., Onofri V. 2000. Does change in an Adriatic hydromedusea fauna indicate an early phase of marine ecosystem destruction. P.S.Z.N. Marine Ecology 21: 221–231.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics 1980; 32:314-331.
- 6. Brookfield F.F.Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozigote deficiency. Molecular Ecology 5: 453–455.
- 7. Broquet T., Petit E. 2004. Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics. Molecular Ecology 13: 3601-3608.
- 8. Chamberlain N.L., Driver E.D., Miesfeld R.L. 1994. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. Nucleic Acids Research, 22: 3181-3186.
- 9. Collins A.G. 2002. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. Journal of Evolutionary Biology 15: 418-432.
- Coughlan J.P., Seymour J., Cross T.F. 2005. Isolation and characterization of seven polymorphic microsatellite loci in the box jellyfish (*Chironex fleckeri*, Cubozoa, Cnidaria). Molecular Ecology Notes 6:1, 41–43.
- 11. Daskalov GM. 2002. Overfishing drives a trophic cascade in the Black Sea. Marine Ecology Progress Series 225: 53-63.

- Dawson M.N., Raskof, K.A., Jacobs D.K. 1998. Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses. Molecular Marine Biology and Biotehnology 7 (2): 145–152.
- 13. Dover G.A. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. Nature, 299: 111-117.
- 14. Ducklow H.W., Mitchell R. 1979. Composition of mucus released by coral reef coelenterates. Limnology and Oceanography 24: 706-714.
- 15. Ellegren H., Primmer C.R., Sheldon B. 1995. Microsatellite evolution: directionality or bias in locus selection? Nature Genetics, 11: 60-62.
- Estoup A., Angers B. 1998. Microsatellites and minisatelites for Molecular Ecology: Theoretical and Empirical Considerations. Advances in Molecular Ecology G.R. Carvalho (Ed.) IOS Press: 55–86.
- Melinek R., Moore P., Kessler E., Barkman M., Alicea S. T., Gonzales I., Taylor K., Drontle D., Hinden D., Kingston K., Thorson B. Evolution of microsatellites. 2002. WWLPT

www.woodrow.org/teachers/esi/2002/Biology/Projects/p3/evolution.htm (4.2.2008)

- 18. Freeland J.R. 2005. Molecular ecology. John Wiley & Sons, Ltd.
- FitzSimmons N.N., Moritz C., Moore S.S. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. Molecular Biology and Evolution, 12: 432-440.
- 20. GenBank Overview (17. 10. 2007), National Center for Biotechnology information U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/ (25. 10. 2007)
- 21. Gregory T.R. 2006. Animal Genome Size Database. http://www.genomesize.com. (26. 7.2007)
- 22. Greve W., Parsons T. R. 1977. Photosynthesis and fish production: Hypothetical effects of climatic change and pollution. Helgoland Marine Research 30: 666–672.

- Graham W. M., Pages F., Hamner W. M. 2001. A physical context for gelatinous zooplankton aggregations: a review. Hydrobiologia 451 (Dev. Hydrobiol. 155): 199–212.
- 24. Henry R.J. 2001. Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plants. CABI Publishing, United Kingdom, Wallingford: 325 str.
- 25. Holst S., Sötje I., Tiemann H. in Jarms G. 2007. Life cycle of the rhizostome jellyfish *Rhizostoma octopus* (L.) (*Scyphozoa, Rhizostomeae*), with studies on cnidocysts and statoliths. Marine Biology Vol. 151, 5: 1695–1710
- Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J.J. 1999. PCR Applications. Protocols for functional genomics. Academic Press, New York. pp. 303-304
- 27. ITIS (17.12.2007). http://www.itis.gov (23.1.2008)
- 28. Jarne P., Lagoda P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends in Ecology and Evolution 11: 424–429.
- 29. Jin L., Macaubas C., Hallmayer J., Kimura A., Mignot E. 1996. Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 75: 15285–15288.
- 30. Jones A. G., Ardren W. R.,2003. Methods of parentage analysis in natural populations. Molecular Ecology 12: 2511-2523.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology 16: 1099–1006.
- 32. Kimura M., Crow J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite populations. Genetics 49: 725-738.
- 33. Kimura M., Ohta T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75: 2868-2872.

- 34. Levinson G., Gutman G.A. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. Molecular Biology and Evolution 4: 203-221.
- 35. Marques A.C., Collins A.G. 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. Invertebrate Biology 123 (1): 23–42
- 36. <u>Mayer A.G. 1910. Medusae of the World, III: the Scyphomedusae. Carnegie</u> <u>Institute, Washington.</u>
 - http://thescyphozoan.ucmerced.edu/tsPDF/Mayer1910/Mayer1910_0Cover.html (9. nov. 2007).
- 37. Mills C. E. 2001. Jellyfish blooms: are populations increasing globally in response to changing ocean conditions? Hydrobiologia 451: 55–68.
- 38. Morin P.A., Mahboubi P., Wedel S., Rogers J. 1998. Rapid screening and comparison of human microsatellite markers in baboons: allele size is conserved, but allele number is not. Genomics, 53: 12-20.
- 39. Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 70: 625–640.
- 40. Ogliari J. B., Boscariol R. L., Camargo L. E. A. 2000. Optimization of PCR amplification of maize microsatellite loci. Genetics and Molecular Biology 23 (2): 395-398.
- 41. Parsons T.R., Lalli C. M. 2002. Jellyfish population explosions: revisiting a hypothesis of possible causes. La Mer 40: 111–121.
- 42. Paspalev G. V., 1938. Über die Entwicklung von *Rhizostoma pulmo*. Agass. Arb. Biol. Meerest. Varna 7: 1–25.
- 43. Raymond M., Rousset F, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Heredity, 86: 248-249 http://genepop.curtin.edu.au/ (30.4.2008)
- 44. Rozen S., Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386

http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm (25.10.2007)

- 45. Rychlik W., Spencer W. J., Rhoads R. E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. Nucleic Acids Research 18: 6409-12.
- 46. Purcell J.E., Breitburg D.L., Decker M.B., Graham W.M., Youngbluth M.J., Raskoff K.A. 2001. Pelagic cnidarians and ctenophores in low dissolved oxygen environments: a review. In Rabalais, N.N. & R.E. Turner, (eds), Coastal Hypoxia: Consequences for living resurces and ecosystems. American Geophysical Union. Coastal and Estuarine Studies 58: 77–100.
- 47. Purcell J.E. 2005. Climate effects on formation of jellyfish and ctenophore blooms: a review. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 85: 461–476.
- 48. Purcell J.E., Shin-ichi Uye, Wen-Tseng Lo. 2007. Anthropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans: a review. Marine Ecology Progress Series 350: 153-174.
- 49. Ramšak A., Weldt S., Malej A. *Rhizostoma pulmo* microsatellite MS1 sequence.
 2005a. GenBank (15.6.2005) www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=73811116 (18.4.2008)
- 50. Ramšak A., Weldt S., Malej A. *Rhizostoma pulmo* microsatellite MS2 sequence. 2005b. GenBank (15.6.2005) www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=71082596 (18.4.2008)
- 51. Rico C., Rico I., Hewitt G. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. Proceedings of Royal Society of London B: Biological Sciences, 263: 549-557.
- Rubinsztein D. C., Amos W., Leggo J., Goodburn S., Jain S., Li S.H., Margolis R.L., Ross C.A., Ferguson-Smith M.A. 1995. Microsatellite evolution-Evidence for directionality and variation in rate between species. Nature Genetics, 10: 337-343.
- Rubinsztein D. C. 1999. Trinucleotide axpansion mutations cause diseases wich do not conform to classical Mendelian expectations. V: Microsatellites. Evolution and Applications. Goldstein D.B. in Schlötter C. (eds.). Oxford university press, Inc., New York: 80–86.

54. Russel F.S. 1970. The medusae of the British Isles. II - Pelagic Scyphozoa with a supplement to first volumne on hydromedusae. Cambridge University Press. Cambridge

http://www.mba.ac.uk/nmbl/publications/medusae_2/medusae_2.htm (9. nov. 2007)

- 55. Schlötterer C., Ritter R., Harr B., Brem G. 1998. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melagonaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. Molecular Biology and Evolution, 15: 1269–1274.
- 56. Schlötterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma 109: 365–371.
- 57. Selkoe A. K., Toonen R. J. 2006. Microsatellites for ecologist: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters, 9: 615-629.
- 58. Shanks A.L., Graham W.M. 1988. Chemical defense in a scyphomedusa. Marine Ecology Progress Series. 45: 81-86.
- 59. Smith G.P. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. Science, 191: 528-535.
- 60. Smith K., Diggle M.A., Clarke S.C. 2003. Comparison of Commercial DNA Extraction Kits for Extraction of Bacterial Genomic DNA from Whole-Blood Samples. Journal of clinical microbiology, 41: 2440–2443.
- 61. Sporočila za javnost. 2007. Morska biološka postaja (11. 10. 2007) http://projects.mbss.org/osj/index.html (2. 4. 2008)
- 62. Statistične informacije. Morsko ribištvo, Slovenija, februar 2004. 2004. 98: 1 str.
- 63. Statistične informacije. Morsko ribištvo, Slovenija, december 2004 in 2004. 2005.51: 6 str.
- 64. Viard F., Franck P., Dubois M.P., Estoup A., Jarne P. 1998. Variation of microsatellite size homoplasy across electromorphs, loci, and populations in three invertebrate species. Journal of Molecular Evolution 47: 42–51.
- 65. Weir B.S., Cockerham C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358–1370.

- 66. Weldt S., Ramšak A., Malej A. *Rhizostoma pulmo* microsatellite MS3 sequence.
 2005a. GenBank (26.5.2005) www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=71082594 (18.4.2008)
- 67. Weldt S., Ramšak A., Malej A. *Rhizostoma pulmo* microsatellite MS4 sequence. 2005b. GenBank (26.5.2005) www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=71082597 (18.4.2008)
- Weldt S., Ramšak A., Malej A. *Rhizostoma pulmo* microsatellite MS5 sequence. 2005c. GenBank (26.5.2005) www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=71082596 (18.4.2008)
- 69. Widmer C.L. 2005. Effects of temperature on growth of north-east Pacific moon jellyfish ephyrae, *Aurelia labiata* (Cnidaria: Scyphozoa). Journal of the Marine Biology Association of the UK 85: 569–573.
- 70. Winnepenninckx B., Backeljau T., De Wachter R. 1993. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. Trends in Genetics, 9: 407–407.
- 71. Wright S. 1951. The genetical structure of populations. Annals of Eugenics 15: 323–354.
- 72. You-Chun L., Korol A.B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. 2002. Microsatelites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology 11: 2453–2465.
- 73. Zakaria A. 2006. Optimization of PCR Conditions *in vitro* for Maximum Amplification of DNA from *Xanthomonas campestris* 13551. Journal of Applied Sciences Research 2 (3): 112-122.
- 74. Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology 11: 1–16.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Andreji Ramšak za spremljanje mojega dela, za strokovne nasvete pri praktičnem delu in napotke pri pisanju diplomske naloge.

Hvala mentorici prof. dr. Alenki Malej za mnenja in popravke.

Zahvaljujem se prof. dr. Trontlju za uporabo laboratorija na Katedri za zoologijo in za temeljit pregled diplomskega dela.

Hvala predsedniku prof. dr. Turku in recenzentu prof. dr. Trontlju za strokovno oceno diplomskega dela.

Prisrčna hvala staršema za zgled in finančno podporo. Hvala Sašu za potrpežljivost in spodbudo. Hvala Petru Pavletiču za lektoriranje diplomskega dela. Hvala Mihaeli za gostoljubna prenočišča ter hvala Mojci, Sonji, Nadi, Dariji in Moniki za spodbudne besede in dobro voljo.

Hvala vsem!

PRILOGE

PRILOGA A: Izpisi iz GenBank

Lokus RHIZPUL MS1

453 bp DNA linear INV 01-DEC-2005 LOCUS DO093644 DEFINITION Rhizostoma pulmo microsatellite MS1 sequence. ACCESSION DQ093644 VERSION DQ093644.1 GI:73811116 KEYWORDS . SOURCE Rhizostoma pulmo ORGANISM Rhizostoma pulmo Eukaryota; Metazoa; Cnidaria; Scyphozoa; Rhizostomeae; Rhizostomatidae; Rhizostoma. REFERENCE 1 (bases 1 to 453) AUTHORS Ramsak, A., Weldt, S. and Malej, A. TITLE Novel microsatellite markers from Rhizostoma pulmo JOURNAL Unpublished REFERENCE 2 (bases 1 to 453) AUTHORS Ramsak, A., Weldt, S. and Malej, A. TITLE Direct Submission JOURNAL Submitted (15-JUN-2005) Marine Biology Station, National Institute of Biology, Fornace 41, Piran SI-6330, Slovenia FEATURES Location/Qualifiers source 1..453 /organism="Rhizostoma pulmo" /mol type="genomic DNA" /db xref="taxon: 269554" /tissue type="gonad" /country="Slovenia" repeat region 1..453 /note="microsatellite MS1" /rpt type=tandem ORIGIN 1 GGACGGATAC AATAAGCATT TGGTGCACAK ACCGACATC CTCATACGTT 61 ATGTCATGGC GCTCGAGAYT GABGTAAACA AGATATGAAA GCSACACACG CACGCACACA 121 CGCACGCACA CACGCACGCA CACACGCACG CACACGCA CGCACACG CACGCACAWA 181 CGCACGCACA CACGCACACA CACACGCACG AATAAGAATA GAATAATAAA TACTTGTCAG 241 AACTGC<mark>TGAG ACTCCTGATG GCGAG</mark>AGCAG CTTTCAATCT TTGCTTGACA TCCAAGTAAC 301 TTGAAGGTTC ATCAAACATG TAGCTACGTA AGAGTAAGAG ATAAGAGGAA ATTAGAAATA 361 TAAATGTGAC GTGATCCAAG ATACGCTGCG AGTWAAGGTT TAGTGACATA CTATGTAACG 421 TTGTAAGAGT GATAATAATA AGGGAACGGC GCT 11

```
LOCUS DQ093645
                    414 bp DNA linear INV 01-DEC-2005
DEFINITION Rhizostoma pulmo microsatellite MS2 sequence.
ACCESSION DQ093645
VERSION DQ093645.1 GI:73811117
KEYWORDS .
SOURCE Rhizostoma pulmo
ORGANISM Rhizostoma pulmo
   Eukaryota; Metazoa; Cnidaria; Scyphozoa; Rhizostomeae;
   Rhizostomatidae; Rhizostoma.
REFERENCE 1 (bases 1 to 414)
AUTHORS Ramsak, A., Weldt, S. and Malej, A.
 TITLE Novel microsatellite markers from Rhizostoma pulmo
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 414)
AUTHORS Ramsak, A., Weldt, S. and Malej, A.
 TITLE Direct Submission
  JOURNAL Submitted (15-JUN-2005) Marine Biology Station, National
Institute
  of Biology, Fornace 41, Piran SI-6330, Slovenia
FEATURES Location/Qualifiers
  source 1..414
      /organism="Rhizostoma pulmo"
      /mol type="genomic DNA"
      /db xref="taxon:<u>269554</u>"
      /tissue type="gonad"
      /country="Italy: Gulf of Trieste"
  repeat region 1..414
      /note="microsatellite MS2"
      /rpt type=tandem
ORIGIN
                                <mark>SCATACACT </mark>GCTGTAAAAA AGGGTTGAAA CAAATTGAAC
    1 CAATAAATCT ATT
  61 TGGCCTTACA CTAATAATAT ATTTAGA<mark>TGT GTGTGTGTGT GTTAGTGTGT GT</mark>CCCTTCCG
121 TGAGTATTAC CCCTTCCGTG AGTATTACCC CTTCTGTGAG TATTACCCCT TCCGTGAGTA
  181 TTACCCCTTC TGTGAGTATT ACCCCATCAT TTTTACTCAT TCTTCATAAA TAAAAAGTTT
  241 CTGTAAAGCC CATTCTACAA AACAAAGACA TATTTGATAA GTGGATATGC T<mark>C</mark>
  301 GGGTCAGGCC TGCCAGTATT GGTGTTCTTT GCTAGCCACA TAGTTTTGGT ACTCAGTGTT
  361 TCCTTAGTGA TTCTCAATTC GATGCTAACA GCTGCTACAA ATAATTGATA CAAT
11
```

```
LOCUS DQ075948
                  510 bp DNA linear INV 01-DEC-2005
DEFINITION Rhizostoma pulmo microsatellite MS3 sequence.
ACCESSION DQ075948
VERSION DQ075948.1 GI:71082594
KEYWORDS .
SOURCE Rhizostoma pulmo
ORGANISM Rhizostoma pulmo
  Eukaryota; Metazoa; Cnidaria; Scyphozoa; Rhizostomeae;
  Rhizostomatidae; Rhizostoma.
REFERENCE 1 (bases 1 to 510)
AUTHORS Ramsak, A., Weldt, S. and Malej, A.
 TITLE Novel microsatellite markers from Rhizostoma pulmo
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 510)
AUTHORS Weldt, S., Ramsak, A. and Malej, A.
 TITLE Direct Submission
  JOURNAL Submitted (26-MAY-2005) Marine Biology Station, National
Institute
  of Biology, Fornace 41, Piran SI-6330, Slovenia
FEATURES Location/Qualifiers
  source 1..510
     /organism="Rhizostoma pulmo"
      /mol type="genomic DNA"
      /isolation source="Adriatic Sea"
      /db xref="taxon:269554"
     /tissue type="gonad"
  repeat_region 1..510
      /note="microsatellite MS3"
      /rpt type=tandem
ORIGIN
                            TTTGGTATTG TTGTTGCTGA TGATGCTGCT GCAAGGCCTG
    1 TGAAGCTTG<mark>G (</mark>
   61 ATATTGACTA TACTTCTGTT TTTGGTCGTG TCCTGTTTGA TAATGTATTT GCTGCTGTTG
  121 CTGCTGCTGT TGCTGCTGCT GTTGCTGCTG TACTGATGGG TAATATTGAT TCTGCTCTTG
  181 GCGCTCCAAA GCCGGCGGGG GCGGGGGGAA GTCTTCTGGA GTTTTTGGGA GGGGCTGAGC
  241 ATTTGAGATG TTTGGAACAG CATATTCAGT ACTCTGACTA GCACCTGTAA AATTACTGCC
  301 ATATTGGGGT TGCATCGTGG GATTTCCAGG AGCAGGTATG CCAGATGCAT TACTCATTTC
  361 AAAACTGTTC TCGGGGGCTTA GAGTGGCGTT AGGCCTTGCA
                                                              TGTGT
TGCCG
  421 AGAAACCATG CCACATCCCA TCAGATTTGG TGGCGAAGAA ATTTTGCGGG TTGGAGGGGCC
  481 TACGACCTTT ACAGGGGACC CAGTTGGGCT
11
```

```
LOCUS DQ075951
                  379 bp DNA linear INV 01-DEC-2005
DEFINITION Rhizostoma pulmo microsatellite MS4 sequence.
ACCESSION DQ075951
VERSION DQ075951.1 GI:71082597
KEYWORDS .
SOURCE Rhizostoma pulmo
ORGANISM Rhizostoma pulmo
  Eukaryota; Metazoa; Cnidaria; Scyphozoa; Rhizostomeae;
  Rhizostomatidae; Rhizostoma.
REFERENCE 1 (bases 1 to 379)
AUTHORS Ramsak, A., Weldt, S. and Malej, A.
TITLE Novel microsatellite markers from Rhizostoma pulmo
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 379)
AUTHORS Weldt, S., Ramsak, A. and Malej, A.
TITLE Direct Submission
  JOURNAL Submitted (26-MAY-2005) Marine Biology Station, National
Institute
  of Biology, Fornace 41, Piran SI-6330, Slovenia
FEATURES Location/Qualifiers
  source 1..379
     /organism="Rhizostoma pulmo"
      /mol type="genomic DNA"
      /db xref="taxon:269554"
      /tissue type="gonad"
     /country="Slovenia"
  repeat region 1..379
     /note="microsatellite MS4"
      /rpt type=tandem
      /rpt unit seq="tacacac"
ORIGIN
   1 CCAA<mark>CTAATA G</mark>
                       <mark>ААТС ТАБА</mark>СТАААС ТАААСТАААС ТААААСТАСА СТАСАСАСТА
   61 CACACTACAC ACTACACACT ACACACTACA CACTACACAC CACACACTAC ACACTACACA
  121 CTACACACTA CACACTACAC ACTACACACT ACACACTACA CACTACACAC TACACACCAC
  241 ACTACACTAC ACTACACTAC ACTACACTAC ACTACACTAC ACTACACTAC ACTACACTAC
  301 <mark>ACACTACACT ACACTACACT ACACTACAC</mark>T AAGCGAAGAG AGGAAACTGA AGR<mark>ATCGT</mark>
  361 CACGTAATCA TACTTTCCG
11
```

```
LOCUS DQ075950
                  414 bp DNA linear INV 01-DEC-2005
DEFINITION Rhizostoma pulmo microsatellite MS5 sequence.
ACCESSION DQ075950
VERSION DQ075950.1 GI:71082596
KEYWORDS .
SOURCE Rhizostoma pulmo
ORGANISM Rhizostoma pulmo
  Eukaryota; Metazoa; Cnidaria; Scyphozoa; Rhizostomeae;
  Rhizostomatidae; Rhizostoma.
REFERENCE 1 (bases 1 to 414)
AUTHORS Ramsak, A., Weldt, S. and Malej, A.
TITLE Novel microsatellite markers from Rhizostoma pulmo
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 414)
AUTHORS Weldt, S., Ramsak, A. and Malej, A.
TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (26-MAY-2005) Marine Biology Station, National
Institute
  of Biology, Fornace 41, Piran SI-6330, Slovenia
FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..414
     /organism="Rhizostoma pulmo"
     /mol type="genomic DNA"
     /isolation source="Adriatic Sea"
     /db xref="taxon:269554"
     /tissue type="gonad"
 repeat_region 1..414
     /note="microsatellite MS5"
     /rpt type=tandem
ORIGIN
 1 TAATCAAACT ACAGGTCTTT ATTCGA<mark>AGAG ATGGAGGCGT GCAA</mark>GGTCCA TTACGGCCTC
 61 TTGCAATAAA AGATGTTCTT GAGCAAAAGT ACCAAAAGGT AAGAACCATT TCACAATCAA
241 GACTACATTA TACTACATTA TACTACATTA CACTACACTG CACTGCACTA CACTACAATA
301 САСТАСААТА САСТАСААТА САСТАСААТА САСТАСААТА САСТАСААТА САСТАСААТА
361 CATGCACAAT TTTGGCTATG GMACAGCTTC CACGATTTTC ATCGCAAACT CTAT
11
```



PRILOGA B1: Elektroforegram mikrosatelitov lokusov RHIZPUL MS1, RHIZPUL MS2, RHIZPUL MS3, RHIZPUL MS4 (»gel view«)

VZOTEC		ñ	w	12	3	25	36	38	46	48	54	55	57	ŝ	Ś	12	8	25	38	
Lokus	standard	ISW INAZH	ISW TO AZIH	HIZPUL MS1	HIZPUL MS1	ISW INAZIE	ISW TO AZH	ISW INAZH	ISW TO AZE	ISM JUT	ISM ID AZH	ISW INAZH	ISW TO AZH	HZPUL MS2	HIZPUL MS2	HIZPUL MS2	HZPUL MS2	HIZPUL MS2	HIZPUL MS2	standard
	ļ	8	8	8	8	R	RI	R	R	2	RI	RI	RI	- IZ	R	8	R	R	R	
																				& - + +
																				œ.
	1																			-
						ſ														4
														-	ě				-	œ
	Y													R	- Late		×	-	A A	<u></u> &
	ļ													-	6			-		+
	~		-			×		R												8
	€ €	M	M.			*	A	-	a	E	æ	ব								- & -
	a de la de l		6		R	-			-	R			R							a
	Ø.		}				}			,	2									Ø
	A.		J M	Ś	N		J.		N	Ĩ	Y	M	M	į		2	Į			101
						\leq	\leq	$\left\{ \right\}$		\leq		\leq	\leq					\leq		4

PRILOGA B2: Elektroforegram mikrosatelitov lokusov RHIZPUL MS1, RHIZPUL MS2 (»curve view«)











PRILOGA C1: Elektroforegram mikrosatelitov lokusov RHIZPUL MS3, RHIZPUL MS4 (»curve view«)