

Učinkovitost somatske embriogeneze u mutantima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.) s narušenim mehanizmom metilacije DNA

Ivanić, Ariana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:550503>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ariana Ivanić

**Učinkovitost somatske embriogeneze u
mutantima uročnjaka
(*Arabidopsis thaliana* L.) s narušenim
mehanizmom metilacije DNA**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za razvojnu biologiju biljaka na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Dunje Leljak-Levanić te neposrednim voditeljstvom mag. biol. mol. Mateje Jagić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Dunji Leljak-Levanić na ukazanom povjerenju i velikoj pomoći pri pisanju ovog diplomskog rada.

Mnogo hvala Mateji Jagić na strpljivosti, trudu i pomoći pri praktičnoj izradi ovoga rada te dobroj atmosferi.

Na kraju bih se htjela zahvaliti obitelji i svim prijateljima koji su mi bili podrška tijekom studiranja.

Posebice se želim zahvaliti Jeleni na uzajamnoj moralnoj podršci i Mislavu ma podučavanju programiranja i što je uvijek vjerovao u mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Učinkovitost somatske embriogeneze u mutantima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.) s narušenim mehanizmom metilacije DNA

Ariana Ivanić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Somatska embriogeneza (SE) je proces kojim se iz somatske stanice biljke razvija somatski embrij te se naposljetku regenerira čitava biljka. U regulaciji embriogeneze ključnu ulogu ima mehanizam metilacije DNA koji regulira ekspresiju gena i održava stabilnost genoma. Za razliku od animalnih organizama, biljke sadržavaju robusnije mehanizme metilacije DNA te se u njihovom genomu može metilirati bilo koji citozin. Mehanizam metilacije DNA usmjeren malim molekulama RNA (engl. *RNA-directed DNA methylation*, RdDM) je mehanizam metilacije DNA *de novo* koji se specifično razvio u biljkama. Poznato je da mutanti za neku od komponenti mehanizma RdDM ispoljavaju aberantni fenotip u različitim stadijima reproduktivnog razvoja tijekom zigotne embriogeneze (ZE), koja dijeli puno sličnosti sa SE. U ovome radu istražena je povezanost mehanizma RdDM i embriogenog potencijala na modelu SE u uročnjaku. Pokazano je da potencijal za indukciju SE ovisi o funkcionalnosti mehanizma RdDM, a tijekom faze sazrijevanja somatskih embrija značaj RdDM-a opada. Ustanovljeno je kako je ekspresija gena povezanih s embriogenezom *LEC2*, *RIE1*, *MYB115* i *ECA1* pod utjecajem mehanizma RdDM. Analizom relativne ekspresije gena *LEC2* i *RIE1* pokazano je da je kontrola ekspresije *LEC2* ovisna o funkcionalnosti RdDM-a tijekom obje faze SE, dok kontrola ekspresije *RIE1* o funkcionalnosti RdDM-a ovisi samo tijekom sazrijevanja somatskih embrija.

(75 stranica, 8 tablica, 30 slika, 1 tablica u prilogu, 3 slike u prilogu, 89 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: mehanizam RdDM, regulacija SE, embriogeni potencijal, *LEC2*, *RIE1*

Voditelj: prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

Neposredni voditelj: Mateja Jagić, mag. biol. mol.

Ocjenitelji:

prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

prof. dr. sc. Biljana Balen

Rad prihvaćen: 10.02.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Somatic embryogenesis efficiency in DNA methylation mutants of *Arabidopsis thaliana* L.

Ariana Ivanić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Somatic embryogenesis (SE) is a process in which a somatic plant cell develops into a somatic embryo from which a whole plant can then be regenerated. Mechanism of DNA methylation has a fundamental role in embryogenesis regulation by means of regulating gene expression and maintaining genome stability. Unlike animals, plants possess more robust mechanisms of DNA methylation which can methylate virtually any cytosine in the genome. RNA-directed DNA methylation pathway (RdDM) is a mechanism of DNA methylation *de novo* specific for plants. Previous research has shown that RdDM mutants show aberrant phenotype in different stages of reproductive development during zygotic embryogenesis (ZE), a process which has many similarities with SE. Here an analysis of embryogenic potential and its dependence on a functional RdDM pathway using a model of SE in *Arabidopsis thaliana* was conducted. It was shown that the potential for induction of SE depended on a functional RdDM pathway while somatic embryo maturation was less dependent on it. It was also shown that expression of embryogenesis-related genes *LEC2*, *RIE1*, *MYB115* and *ECA1* is regulated by RdDM pathway. Analysis of relative gene expression of *LEC2* and *RIE1* was performed. Control of *LEC2* gene expression was dependent on a functional RdDM pathway during both phases of SE, while control of *RIE1* gene expression depended on RdDM pathway only during the maturation phase.

(75 pages, 8 tables, 30 figures, 1 supplemental table, 3 supplemental figures, 89 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: RdDM pathway, SE regulation, embryogenic potential, *LEC2*, *RIE1*

Supervisor: Prof. Dunja Leljak-Levanić

Assistant Supervisor: mag. biol. mol. Mateja Jagić

Reviewers:

Prof. Dunja Leljak-Levanić

Prof. Željka Vidaković-Cifrek

Prof. Biljana Balen

Thesis accepted: 10th of February, 2022

Sadržaj

1	UVOD	1
1.1	Somatska embriogeneza	1
1.1.1	Općenito	1
1.1.2	Indukcija zigotne i somatske embriogeneze.....	1
1.1.2.1	Zigotna embriogeneza.....	1
1.1.2.2	Somatska embriogeneza.....	2
1.1.3	Sazrijevanje embrija.....	5
1.2	Molekularni biljezi somatske embriogeneze	7
1.3	Metilacija DNA tijekom somatske embriogeneze	8
1.3.1	Metilacija DNA u biljaka	8
1.3.2	Put metilacije DNA usmjeren malim molekulama RNA	9
1.3.2.1	Transkripcija malih interferirajućih molekula RNA	9
1.3.2.2	Usmjeravanje metilaze DRM2 na ciljno mjesto u genomu.....	10
1.3.3	Uloga mehanizma RdDM u somatskoj embriogenezi.....	12
1.3.3.1	Metilacija DNA tijekom somatske embriogeneze	12
1.3.3.2	Geni potencijalno regulirani mehanizmom RdDM tijekom somatske embriogeneze	14
1.4	Cilj istraživanja.....	15
2	MATERIJALI I METODE.....	16
2.1	Materijali	16
2.1.1	Biljni materijal	16
2.1.2	Mediji za isključivanje sjemenki, indukciju somatske embriogeneze i poticanje somatskih embrija na razvoj.....	17
2.1.2.1	Medij za isključivanje sjemenki uročnjaka	17
2.1.2.2	Mediji za poticanje embriogeneze i sazrijevanje somatskih embrija.....	18
2.1.3	Pribor za izolaciju zigotnih embrija	19
2.1.4	Pufer za elektroforezu	19
2.1.5	Početnice za lančanu reakciju polimerazom	19
2.1.6	Početnice za kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom	19
2.1.7	Standardi za provjeru veličine umnoženog fragmenta DNA	20
2.1.8	Komercijalni paket za izolaciju mRNA	21
2.2	Metode	22
2.2.1	Sterilizacija i isključivanje sjemenki.....	22
2.2.2	Uvjeti uzgoja biljaka	22

2.2.3	Poticanje somatske embriogeneze i razvoj somatskih embrija	22
2.2.3.1	Odabir i površinska sterilizacija komuški	22
2.2.3.2	Izolacija početnog eksplantata	23
2.2.3.3	Indukcija somatske embriogeneze	23
2.2.3.4	Razvoj somatskih embrija	23
2.2.3.5	Analiza indukcije i sazrijevanja somatskih embrija	23
2.2.4	Selekcija gena biljega somatske embriogeneze potencijalno reguliranih metilacijom <i>de novo</i>	24
2.2.5	Analiza relativne ekspresije gena	25
2.2.5.1	Izolacija mRNA	25
2.2.5.2	Reverzna transkripcija izoliranih molekula mRNA	26
2.2.5.3	Provjera kontaminacije uzoraka komplementarne DNA ostacima genomske DNA	29
2.2.5.4	Analiza relativne ekspresije gena metodom qPCR	29
2.2.5.5	Agarozna gel elektroforeza	29
2.2.5.6	Obrada rezultata dobivenih metodom qPCR	30
2.2.5.7	Statistička obrada podataka	30
3	REZULTATI	31
3.1	Indukcija i sazrijevanje somatskih embrija	31
3.1.1	Potencijal indukcije somatske embriogeneze u ovisnosti o funkcionalnosti RdDM-a	31
3.1.2	Sazrijevanje somatskih embrija u ovisnosti o funkcionalnosti RdDM-a	34
3.1.2.1	Sazrijevanje somatskih embrija	34
3.1.2.2	Produktivnost somatske embriogeneze	37
3.2	Selekcija gena biljega	39
3.2.1	Selekcija gena pomoću ontološke baze podataka	39
3.2.2	Selekcija gena u ovisnosti o funkcionalnosti mehanizma RdDM	40
3.3	Uspješnost izolacije mRNA i reverzne transkripcije	43
3.3.1	Koncentracija i čistoća izolirane mRNA	43
3.3.2	Provjera čistoće komplementarne DNA nakon reverzne transkripcije	43
3.4	Analiza relativne ekspresije gena <i>LEC2</i> i <i>RIE1</i>	46
3.4.1	Relativna ekspresija gena <i>LEC2</i> tijekom indukcije somatske embriogeneze	46
3.4.2	Relativna ekspresija gena <i>LEC2</i> tijekom sazrijevanja somatskih embrija	49
3.4.3	Relativna ekspresija gena <i>RIE1</i> tijekom indukcije somatske embriogeneze	51
3.4.4	Relativna ekspresija gena <i>RIE1</i> tijekom sazrijevanja somatskih embrija	53
3.4.5	Potvrda uspješnosti umnažanja gena <i>LEC2</i> i <i>RIE1</i> nakon metode qPCR	56
4	RASPRAVA	59

4.1 Somatska embriogeneza i metilacija DNA.....	59
4.2 Geni <i>LEC2</i> , <i>RIE1</i> , <i>MYB115</i> i <i>ECA1</i> potencijalno su regulirani mehanizmom RdDM.....	60
4.3 Ovisnost ekspresije gena <i>LEC2</i> i <i>RIE1</i> o funkcionalnosti mehanizma RdDM.....	62
5 ZAKLJUČCI	65
6 LITERATURA.....	66
7 PRILOZI	I
ŽIVOTOPIS	V

1 Uvod

1.1 Somatska embriogeneza

1.1.1 Općenito

Embriogeneza je ključan razvojni proces koji predstavlja uspostavu nove sporofitne generacije nakon oplodnje jajne stanice jednom spermalnom stanicom muškog gametofita. Proces embriogeneze temelji se na molekularnim, staničnim i morfološkim događajima tijekom kojih iz jedne stanice nastaje zreli embrij. Ovaj proces najčešće se potiče u zigoti nakon dvostruke oplodnje (zigotna embriogeneza, ZE), no može se potaknuti i u somatskim stanicama (somatska embriogeneza, SE). SE definira se kao proces u kojemu se bipolarna struktura, nalik na zigotni embrij, razvija iz somatskih stanica matične biljke bez vaskularne povezanosti s originalnim tkivom, a može se potaknuti *in vitro* i *in vivo*. SE *in vivo* primijećena je u nekim biljnim vrstama, npr. u rodu *Kalanchoë*, a smatra se da se, kao i ostale strategije aseksualne embriogeneze, razvila tijekom evolucije kako bi biljke prevladale razne okolišne i genetske faktore koji sprječavaju oplodnju (Hand i sur., 2016). SE *in vitro* može se potaknuti primjenom raznih egzogenih čimbenika, a važna je zbog praktične primjene u biotehnologiji za komercijalnu proizvodnju biljaka, za oplemenjivanje, za genetsku modifikaciju embriogenih kultura i stvaranja banaka gena (Von Arnold i sur., 2002). Također, koristi se i za bazična istraživanja u području stanične diferencijacije, genske ekspresije i molekularne genetike biljaka kao i za daljnje proučavanje različitih aspekata SE (Loyola-Vargas i Ochoa-Alejo, 2016).

1.1.2 Indukcija zigotne i somatske embriogeneze

1.1.2.1 Zigotna embriogeneza

Osnovna razlika između ZE i SE je sama indukcija embriogenog razvoja. Jajna stanica jedna je od sedam stanica zrelog ženskog gametofita (**Slika 1.a**) predodređena za oplodnju. ZE otpočinje neposredno nakon oplodnje te se oplodnja smatra glavnim indukcijskim signalom (**Slika 1.b**). Nakon oplodnje, zigota uspostavlja autonoman potencijal za progresiju embriogeneze budući da su zigota i rani embriji izolirani od okoliša nakupljenom kalozom u staničnoj stijenci. Embriogeneza kod uročnjaka odvija se na stereotipiran način (Jurgens i sur., 1994). Prije prve diobe zigote, ona se polarizira i izdužuje duž apikalno-bazalne osi. Polarizacija se odnosi na asimetrični smještaj organela unutar stanice. U jajnoj stanici i zigoti, jezgra se nalazi na apikalnom (halazalnom) polu stanice, dok velika vakuola zauzima bazalni (mikropilarni) pol stanice. Kod uročnjaka, asimetričnom diobom zigota se podijeli na manju apikalnu stanicu i na veću, vakuoliziranu bazalnu stanicu (**Slika 1.c**). Na ovaj način uspostavlja se apikalno-

bazalna os polarnosti koja se dalje održava kroz život biljke (Jurgens i sur., 1994). Daljnjim diobama u različitim orijentacijama iz apikalne stanice razvija se proembrij, dok se transverzalnim diobama bazalne stanice razvija filamentozni suspenzor koji povezuje proembrij s majčinskim tkivom. Samo najgornja stanica suspenzora, hipofiza, postaje dio embrija, odnosno meristema korijena (Lau i sur., 2012). Kako se razvija embrij, tako se razgrađuje kaloza što omogućuje komunikaciju između endosperma, embrija i majčinskog tkiva (Leljak-Levanić i sur., 2015). Regulator rasta auksin je važna komponenta koja vodi uspostavu apikalno-bazalne osi. Ono što regulira razvoj osi je kombinacija učinka biosinteze auksina i njegova protoka kroz embrij posredovanog transporterima porodice PIN te preraspodjela u embriju. U uročnjaku, glavna indol-3-octene kiseline (engl. *indole-3-acetic acid*, IAA) koja je glavni oblik auksina, sintetizira se iz triptofana u dva koraka. Prvi korak je kataliziran enzimom TRYPTOPHANE AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1 (TAA1), a drugi korak je pod kontrolom porodice monooksigenaza YUCCA (YUC1-11) čija je ekspresija ovisna o metilaciji DNA (Forgione i sur., 2019). Ekspresija ovih gena neophodna je za sintezu auksina i uspostavu apikalno-bazalne osi (Zhao i sur., 2012).

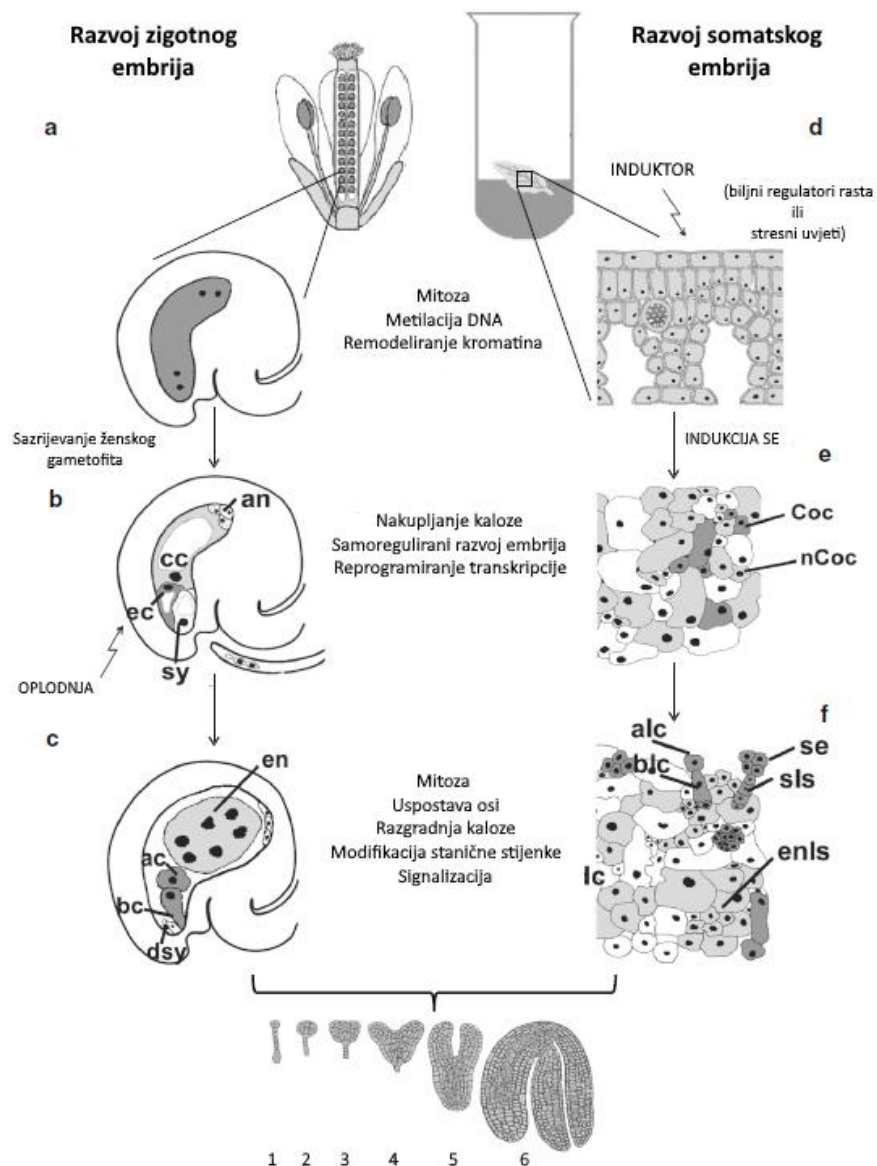
Aktivacija genoma zigote odvija se već nekoliko sati nakon oplodnje. U zigoti kukuruza (*Zea mays* L.) uočeni su transkripti očevoga genoma koji se poklapaju s vremenom dekondenzacije genoma četiri sata nakon oplodnje. Dekondenzacija očevog genoma nakon oplodnje preduvjet je za replikaciju i transkripciju (Scholten i sur., 2012). U duhanu (*Nicotiana tabacum* L.) majčini transkripti nisu dovoljni za elongaciju i diobu zigote, već ovaj proces zahtijeva zigotnu transkripciju *de novo* (Zhao i sur., 2011). U uročnjaku su detektirani geni čija ekspresija nije zabilježena u peludnim zrcima, ali se ekspimiraju u zigoti s očevih alela što jasno označava aktivaciju genoma zigote (Lau i sur., 2012). Očev genom općenito nije utišan u zigoti i ranom embriju iako tijekom rane embriogeneze dominiraju majčini transkripti, no postepeno se povećava doprinos transkripata očevog genoma. Dominacija majčinih transkripta u zigoti objašnjava se smanjenjem ekspresije gena s očevih alela pomoću malih nekodirajućih molekula RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) koje se transkribiraju s majčinog dijela genoma (Autran i sur., 2011).

1.1.2.2 Somatska embriogeneza

Somatska embriogeneza odvija se u dvije faze koje su kontrolirane različitim faktorima. Prva faza je indukcija u kojoj somatske stanice postaju kompetentne za razvoj embrija, a druga faza je sazrijevanje somatskih embrija u kojoj se novodiferencirane embrionske stanice razvijaju u embrij. Indukcija SE *in vitro* može se postići na dva načina. Jedan način je direktna SE gdje se embrij razvija direktno iz eksplantata, a drugi način je indirektna SE u kojoj se somatski embriji razvijaju iz nediferenciranog i neorganiziranog kalusnog tkiva (Hand i sur., 2016).

SE kao proces neovisan o oplodnji može biti potaknuta različitim vanjskim čimbenicima. Somatske stanice sadržavaju cjelovitu genetičku informaciju koja je potrebna da bi se regenerirala kompletna i funkcionalna biljka, ali na to moraju biti potaknute (**Slika 1.d**; Wójcikowska i Gaj, 2016). Indukcija SE stoga se sastoji od završetka trenutnog obrasca ekspresije gena u somatskim stanicama eksplantata i njene zamjene s obrascem embriogene ekspresije gena (Von Arnold i sur., 2002). Jednom kada su stanice kompetentne za embriogenezu, više im nije potreban egzogeni signal za razvoj u somatski embrij (**Slika 1.e**). U ranim stadijima SE, kompetentna stanica ili rani embrij su od okoliša izolirani slojem istaložene kaloze u staničnoj stijenci koja se razgrađuje kako embrij raste (Leljak-Levanić i sur., 2015). Produkti razgradnje kaloze djeluju kao signalne molekule koje omogućuju komunikaciju između različitih staničnih tipova i nakupina stanica. Stanične nakupine mogu stvarati strukture nalik endospermu, majčinskom tkivu, degenerirajućoj sinergidi i suspenzoru (**Slika 1.f**; Matthys-Rochon, 2005).

Upotreba auksina, samostalno ili u kombinaciji s drugim regulatorima rasta kao što su citokinini, te stresni uvjeti (ranjavanje, isušivanje, visoka koncentracija soli ili teških metala) mogu inducirati ekspresiju različitih gena koji modificiraju genetički program somatske stanice i reguliraju prijelaz između svakog stadija tijekom SE (Méndez-Hernández i sur., 2019). Većina gena koji reguliraju SE kodiraju za transkripcijske faktore, regulatore staničnog ciklusa, proteine uključene u biosintezu regulatora rasta te u proteine uključene u signalne puteve (Leljak-Levanić i sur., 2015).



Slika 1. Shematski prikaz indukcije i najranijih stadija zigotne (**a-c**) i somatske (**d-f**) embriogeneze sa crtežima morfoloških stadija embrija (**1-6**). U sredini sheme navedeni su biološki procesi zajednički za pojedini stadij SE i ZE. **a** – nezreli ženski gametofit, **b** – zreli ženski gametofit i polenova mješnica s dvije spermalne stanice u peludnoj mješnici neposredno prije oplodnje (**an** – antipodalna stanica, **cc** – centralna stanica, **ec** – jajna stanica, **sy** – sinergida), **c** – dvostanični proembrij i cenocitni endosperm (**ac** – apikalna stanica embrija, **bc** – bazalna stanica embrija, **dsy** – degenerirana sinergida, **en** – endosperm), **d** – primjena induktora SE na biljno tkivo eksplantata, **e** – indukcija SE (**Coc** – kompetentna stanica, **nCoc** – nekompetentna stanica), **f** – razvitak somatskog embrija iz kompetentne stanice (**alc** – stanica nalik na apikalnu, **blc** – stanica nalik na bazalnu, **enls** - struktura nalik na endosperm, **lc** – mrtve stanice, **se** – somatski embrij, **sls** – struktura nalik na suspensor. Preuzeto i prilagođeno prema Leljak-Levanić i sur. (2015).

Među biljnim regulatorima rasta, sintetski auksin 2,4-diklorofenoksiocetna kiselina (2,4-D) dokazan je kao najuspješniji induktor SE u mnogim biljnim vrstama. Uloga 2,4-D je uspostava gradijenta auksina koji je nužan za inicijaciju dediferencijacije i rediferencijacije somatskih stanica te kasnije za sazrijevanje somatskih embrija (Leljak-Levanić i sur., 2015). Konkretno, vremenska i prostorna distribucija auksina posreduje u važnim koracima tijekom uspostave obrazaca diobe u ranoj embriogenezi (Lau i sur., 2012). Dodatno, 2,4-D može imati direktno djelovanje kao auksin, ali je vjerojatnije da djeluje kao stresor modificirajući unutarstanični metabolizam IAA (Jin i sur., 2014). Unutarstanična koncentracija auksina i IAA imaju važnu ulogu u regulaciji transkripcije porodice transkripcijskih faktora ARF (engl. *Auxin Response Factors*) koji kontroliraju razvojne procese biljaka (Li i sur. 2016). Sve u svemu, egzogena primjena sintetskih auksina, kao 2,4-D, inducira nakupljanje endogenih auksina što je esencijalno za promjenu stanične sudbine prije početka embriogenog puta (Nic-Can i Loyola-Vargas, 2016). Kao rezultat, dolazi do intenzivnih promjena u transkriptomu biljne stanice. Značajan broj gena vezanih za sintezu auksina, transport, metabolizam, signalizaciju i odgovore na stres diferencijalno su eksprimirani tijekom SE (Leljak-Levanić i sur., 2015).

Efikasnost indukcije SE ovisi o vrsti eksplantata, vrsti medija koji se koristi za kulturu, genotipu donorske biljke i o fiziološkim uvjetima njenog rasta. Za najučinkovitiju indukciju SE u uročnjaku, nezreli zigotni embriji kultivirani na agaroznom mediju u kotiledonarnom stadiju rasta pokazali su se kao najboljim izborom eksplantata (Wójcikowska i Gaj, 2016).

1.1.3 Sazrijevanje embrija

Nakon indukcije i stvaranja embriogenih stanica, one nastavljaju proliferirati te tako formiraju proembriogenu masu stanica. Za proliferaciju proembriogenih stanica potreban je auksin, ali on ujedno djeluje i kao inhibitor daljnjeg razvoja u somatske embrije. Iz tog razloga se eksplantati nakon potaknute indukcije premještaju na medij koji ne sadrži sintetske auksine kako bi se stimuliralo sazrijevanje (Von Arnold i sur., 2002). Osim uklanjanja auksina, sazrijevanje somatskih embrija može se poboljšati dopunom medija s absicizinskom kiselinom (engl. *abscisic acid*, ABA) i polietilen glikolom (Méndez-Hernández i sur., 2019).

Po uzorcima stanične diobe i morfogenezi, razvoj somatskih i zigotnih embrija vrlo je sličan, od tzv. predglobularne faze, preko globularnog, srolikog, torpeda do kotiledonarnog stadija (Leljak-Levanić i sur., 2015). Najraniji stadiji ZE uročnjaka događaju se na predvidljiv i uređen način. Apikalna stanica dvjema longitudinalnima i jednom transverzalnom diobom formira osmostanični proembrij, dok se iz bazalne stanice transverzalnim diobama formira suspenzor (Jurgens i sur., 1994). Ovakva pravilnost nije opisana kod SE te je sličnost oba procesa temeljena od formiranja zigotnog dermatogena (somatski

predglobularni stadij) nadalje. Dermatogeni stadij embrija nastaje periklinalnom diobom svake od osam stanica u proembriju. U dermatogenom stadiju stanice su podijeljene na vanjski sloj (protoderma) i unutrašnji sloj iz kojeg će se razviti osnovno i provodno tkivo (Park i Harada, 2008). Daljnjim diobama unutrašnjeg sloja stanica razvija se rani globularni stadij embrija (**Slika 1.1**) koji je sferičnog oblika i spojen je preko suspensora za majčinsko tkivo. Daljnjim diobama sferični embrij se povećava (**Slika 1.2**). U kasnom globularnom stadiju dolazi do stvaranja primordija kotiledona na dva suprotna kraja na apikalnom dijelu čime globularni embrij poprima sroliki oblik (**Slika 1.3**). Mjesta inicijacije kotiledona koreliraju s akumulacijom auksina u protodermi, stoga se smatra da auksin direktno utječe na inicijaciju rasta kotiledona u globularnom stadiju (Benková i sur., 2003). Daljnjim rastom i izduživanjem kotiledona, globularni embrij prelazi u srolik stadij razvoja (**Slika 1.4**) te poprima bilateralnu simetriju. Izduženi kotiledoni, hipokotil i vrh korijena daju embriju oblik torpeda (**Slika 1.5**) koji se naposljetku razvija u završni kotiledonarni stadij (**Slika 1.6**; Lau i sur., 2012).

Tijekom faze sazrijevanja, embriji prolaze kroz razne morfološke i biokemijske promjene. Postoje razlike u sazrijevanju zigotnih i somatskih embrija. Zigotni embriji nakon kotiledonarnog stadija prelaze u fazu sazrijevanja tijekom koje dolazi do značajne sinteze skladišnih proteina te do pripreme embrija na isušivanje i dormanciju. Zreli zigotni embriji se isušuju te ulaze u period mirovanja sve do početka klijanja. Za razliku od toga, somatski embriji kontinuirano rastu i diferenciraju se bez perioda mirovanja i dehidracije (Zimmerman, 1993). Iako somatski embriji ne ulaze u period dormancije i ne dolazi do njihovog isušivanja, za njihovo pravilno sazrijevanje i dalje je potrebno nakupljanje molekula bogatih energijom (ugljikohidrati, lipidi i proteini) i akumulacija proteina karakterističnih za kasnu embriogenezu (engl. *late embryogenesis abundant*, LEA) (Zimmerman, 1993). Proteini LEA imaju važnu ulogu u zaštiti somatskih i zigotnih embrija od okolišnog stresa, poglavito od isušivanja (Hong-Bo i sur., 2005). Za fazu sazrijevanja zigotnih i somatskih embrija karakteristično je nakupljanje hormona ABA koji ima ključnu ulogu u sazrijevanju embrija, sintezi skladišnih molekula i proteina LEA te inicijaciji dormancije (Xiong i Zhu, 2003). Samo oni somatski embriji koji su priskrbili dovoljno energetske rezerve i koji su razvili toleranciju na isušivanje moći će se razviti u vijabilne odrasle jedinke (Hand i sur., 2016).

1.2 Molekularni biljezi somatske embriogeneze

Na razini genske ekspresije također postoji puno sličnosti između ZE i SE. Komparativnom analizom transkriptoma somatskih i zigotnih embrija u pamuku (*Gossypium hirsutum*, L.) pokazano je da procesi SE i ZE dijele više od 50% visoko eksprimiranih gena uključenih u embriogenezu, metilaciju DNA te odgovor na stres i hormone (Jin i sur., 2014). Slično preklapanje postoji i u uročnjaku, gdje se mnogi geni koji se eksprimiraju tijekom ZE, eksprimiraju i tijekom SE (Leljak-Levanić i sur., 2015), a uključuju gene vezane za razvoj te odgovore na hormone i stres (Gliwicka i sur., 2013).

Geni za koje se pokazalo da se eksprimiraju tijekom indukcije SE u različitim vrsta uključuju gene vezane uz stres, biljne regulatore rasta i transkripcijske faktore, a neki od njih su: *ABAINSENSITIVE 3 (ABI3)*, *AGAMOUS LIKE (AGL)*, *BABY BOOM (BBM)*, *FUSCA3 (FUS3)*, *LEAFY COTYLEDON (LEC)*, *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 (SERK1)*, *VIVIPAROUS1 (VPI)* i *WUSCHEL (WUS)* (Méndez-Hernández i sur., 2019).

Od svih gena čija se ekspresija povećava tijekom indukcije SE, a sudjeluju u regulaciji SE i ZE te razvoju embrija, najvažniji su geni porodice *LEC*. Oni kodiraju za transkripcijske faktore koji imaju važnu ulogu u održavanju i kontroliranju mnogih aspekata biljne embriogeneze (Kumar i Van Staden, 2017). U genomu uročnjaka sadržana su tri gena iz porodice *LEC* (*LEC1*, *LEC2* i *FUS3*), a svaki od njih eksprimira se isključivo u embriju (Hand i sur., 2016). *LEC2*, *FUS3* i *ABI3* pripadaju porodici transkripcijskih faktora s DNA-vezujućom domenom B3, dok *LEC1* pripada porodici transkripcijskih faktora s domenom HAP3 (Leljak-Levanić i sur., 2015). Geni *LEC1* i *LEC2* prvi su transkripcijski faktori za koje se pokazalo da njihova ektopična ekspresija u klijancima može inducirati SE. Ektopična postembrionska ekspresija *LEC1* u vegetativnim stanicama uročnjaka dovodi do stvaranja struktura nalik na somatske embrije (Lotan i sur., 1998). Ektopična ekspresija *LEC2* u klijancima dovoljna je za indukciju SE i formiranje somatskih embrija. Nakon aktivacije transkripcije *LEC2* u klijancima, dolazi do transkripcije gena *YUC2* i *YUC4* koji kodiraju za enzime uključene u biosintezu auksina. Ektopična ekspresija *LEC2* također dovodi do nakupljanja proteina, masti i ugljikohidrata u vegetativnim i reproduktivnim organima klijanaca što je karakteristično za fazu sazrijevanja embrija (Stone i sur., 2001). Geni *LEC1*, *LEC2* i *FUS3* također reguliraju ekspresiju gena *ABI3*. Ekspresija *ABI3* počinje u vrlo ranom stadiju embriogeneze te se nastavlja sve do kasnijih stadija kada kontrolira gensku ekspresiju gena *LEA*. Većina gena *LEA* u svojim promotorima sadržavaju sekvencu osjetljivu na auksin (engl. *Abscisic acid Response*, AbRe) te se njihova ekspresija stimulira apscizinskom kiselinom. U SE također slijedi značajna akumulacija apscizinske kiseline u embriogenim staničnim klasterima. Tijekom razvoja somatskih embrija, akumulacija transkriptata *LEA* služi kao molekularni biljeg SE (Leljak-Levanić i sur., 2015).

Još jedan protein važan za regulaciju SE i ZE koji može potaknuti indukciju SE je BBM. Protein BBM je transkripcijski faktor iz porodice APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF) i ključni je regulator stanične totipotencije. Njegova ekspresija uočena je u zigotnim embrijima uročnjaka u razvoju te ima konzerviranu ulogu u indukciji i održavanju razvoja embrija (Hand i sur., 2016). Važan je za ekspresiju setova gena kao što su *LEC1*, *LEC2*, *ABI3* i *FUS3* te zajedno s njima može inducirati SE (Méndez-Hernández i sur., 2019). Pokazano je da ektopična ekspresija gena *BBM* u uročnjaku dovodi do spontanog stvaranja somatskih embrija i struktura nalik na kotiledone u klijancima (Boutillier i sur., 2002).

1.3 Metilacija DNA tijekom somatske embriogeneze

1.3.1 Metilacija DNA u biljaka

Metilacija DNA konzerviran je epigenetički mehanizam kojime se regulira ekspresija gena i utišavaju mobilni elementi. Biljni genom obiluje ponavljajućom DNA među kojom se nalazi jako puno mobilnih elemenata koje je radi stabilnosti i održavanja integriteta genoma potrebno održavati u utišanom stanju. Nadalje, budući da su biljke sesilni organizmi, razvile su vrlo složen epigenetički sustav, uključujući robustan mehanizam metilacije DNA koji pridonosi velikoj plastičnosti fenotipa, što je važno za preživljavanje raznih okolišnih stresnih uvjeta (Pikaard i Scheid, 2014). Za razliku od animalnih organizama, u kojima se metilacija DNA odvija na slijedu CG, u biljaka se može metilirati bilo koji citozin u genomu, odnosno, mogu se metilirati citozini u sljedovima CG, CHG i CHH gdje je H bilo koji nukleotid osim G. Hoće li određeni citozin biti metilirani ili ne, ovisi o regulaciji metilazama održavateljskoga tipa, metiltransferazama *de novo* i DNA demetilazama (Zhang i sur., 2013)

Metilaza DNA METHYLTRANSFERASE 1 (MET1) funkcionalni je homolog metiltransferaze sisavaca *Dnmt1* (Pikaard i Scheid, 2014). Veže se za hemimetiliranu DNA te održava uzorak metilacije DNA na slijedu CG po uzoru na metilirani lanac tijekom replikacije DNA, stoga se još naziva i metiltransferazom održavateljskoga tipa. Kromometilaze CHROMOMETHYLASE 2 i 3 (CMT2 i CMT3) karakteristične su za biljke te se od drugih metiltransferaza razlikuju po prisustvu kromodomene koja im omogućuje prepoznavanje histonske oznake H3K9me2. CMT3 održava uzorak metilacije na slijedu CHG, a CMT2 na CHH (Kawashima i Berger, 2014). Biljni funkcionalni homolog metiltransferaza sisavaca *Dnmt3* su metiltransferaze rearanžiranih domena DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 1 i 2 (DRM1 i DRM2) koje metiliraju DNA u slijedu CHH te provode metilaciju *de novo* na sljedovima CG, CHG i CHH. Metilaze DRM1 i DRM2 imaju glavnu ulogu u mehanizmu metilacije DNA usmjerene malim molekulama RNA (engl. *RNA directed DNA Methylation pathway*, RdDM).

1.3.2 Put metilacije DNA usmjeren malim molekulama RNA

Put metilacije DNA usmjeren malim molekulama RNA (engl. *RNA-directed DNA methylation*, RdDM) mehanizam je metilacije DNA *de novo* koji se javlja isključivo u biljkama, a najbolje je opisan u kritosjemenjačama na modelu uročnjaka (Erdmann i Picard, 2020). Mehanizam RdDM djeluje na razini transkripcije te dovodi do utišavanja gena i ponavljajuće DNA, uključujući transpozone i retrotranspozone. Na taj se način održava integritet genoma i utječe na diferencijalnu ekspresiju gena. Mehanizam RdDM također ima ulogu u zaštiti od patogena, u unutar- i međustaničnoj komunikaciji, u uspostavi genomskog utiska i epialela te u paramutacijama (Matzke i Mosher, 2014). Ima važnu ulogu u reprodukciji i mejozi (Walker i sur., 2017), odgovoru na okolišni stres (Gutzat i Scheid, 2012) te u embriogenezi (Bouyer i sur., 2017).

Mehanizmom RdDM metilira se DNA *de novo* na bilo kojem citozinu u genomu što provode metiltransferaze DRM1 i DRM2 koje su na ciljno mjesto navođene malim molekulama siRNA. Iako mogu metilirati bilo koji citozin, najvažnije su u kontekstu metilacije nesimetričnih sljedova CHH te se njihova metilacija ne može održavati tijekom replikacije DNA, već se mora ponovno uspostaviti nakon svake stanične diobe (Pikaard i Scheid, 2014). Mehanizam RdDM može se funkcionalno podijeliti na dvije neovisne grane, ovisno o RNA polimerazi koja u njoj sudjeluje. Jedna grana odnosi se na sintezu molekula siRNA koje transkribira RNA polimeraza IV (RNA Pol IV), a druga grana odnosi se na transkripciju dugih nekodirajućih molekula RNA (engl. *long non-coding RNA*, lncRNA) RNA polimerazom V (RNA Pol V) (Zhang i sur., 2013). Spajanje ovih dviju neovisnih grana događa se u trenutku komplementarnog sparivanja molekula siRNA i lncRNA, na čijem mjestu dolazi do sklapanja kompleksa proteina koji omogućuje metilaciju DNA. Pojednostavljeni prikaz mehanizma RdDM prikazan je na **Slici 3**.

1.3.2.1 Transkripcija malih interferirajućih molekula RNA

Molekule siRNA transkribira RNA pol IV koja je, uz RNA pol V, biljno specifična polimeraza. Obje su evoluirale iz RNA polimeraze II (RNA Pol II). RNA polimeraze II, IV i V sastavljene su od 12 podjedinica od kojih su neke specifične, a neke zajedničke za sve tri polimeraze. Najveće podjedinice navedenih polimeraza su NRPB1 (RNA pol II), NRPE1 (RNA pol V) i NRPD1 (RNA pol IV). Podjedinice NRPE1 i NRPD1 razlikuju se od kanonske podjedinice NRPB1 po brojnim supstitucijama i delecijama konzerviranih aminokiselina u katalitičkom centru te po razlikama u sekvenci domene CTD (engl. *Carboxy-Terminal Domain*, CTD) koja služi kao domena za vezanje raznih jezgrenih faktora koji moduliraju transkripciju (Wierzbicki i sur., 2012).

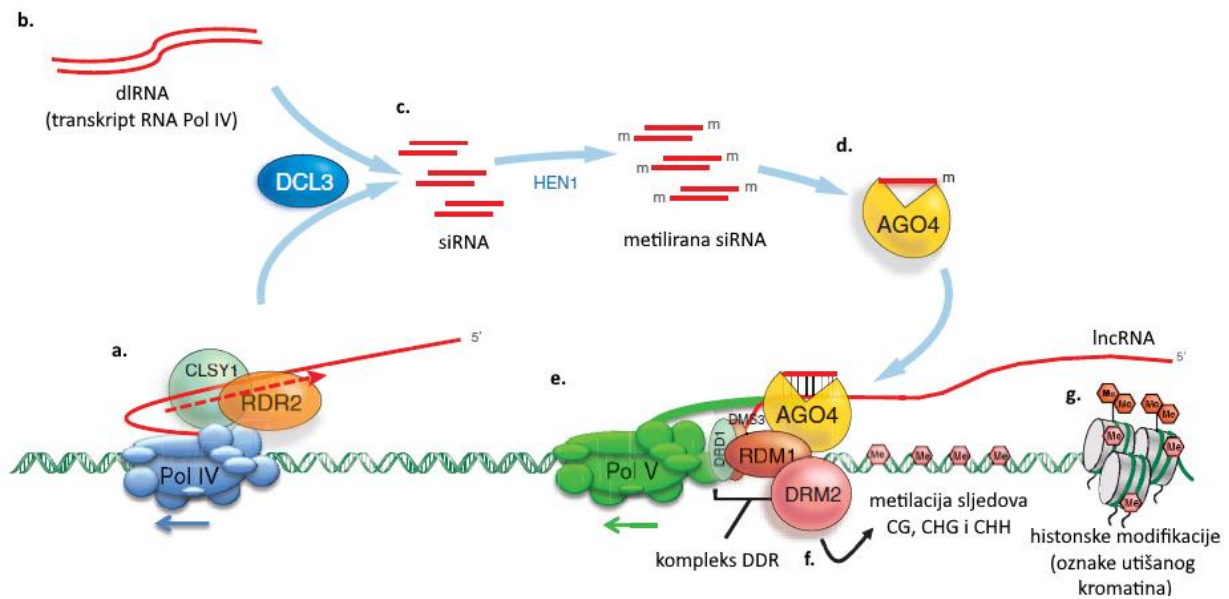
RNA Pol IV regrutira se na ciljne sekvence koje su prvenstveno transpozoni i druge ponavljajuće sekvence u genomu, no malo se zna o mehanizmu njezina pozicioniranja. Smatra se da ulogu u tome ima DNA TRANSCRIPTION FACTOR 1/SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1 (DTF1/SHH1). Protein DTF1/SHH1 sadrži homeodomena na N-terminusu, koja se veže za DNA, i histon-vezujuću domenu SAWADEE na C-terminusu koja je odgovorna za prepoznavanje i vezanje za određene histonske modifikacije. Stoga se smatra da RNA Pol IV prepoznaje ponavljajuće regije DNA s određenim histonskim modifikacijama (Zhang i sur., 2013).

Nakon što RNA Pol IV prepozna ciljnu sekvencu u genomu, slaže se proteinski kompleks koji omogućuje transkripciju malih molekula RNA (**Slika 2.a**). Za RNA pol IV veže se kompleks remodeliranja kromatina CLASSY1 (CLSY1), koji olakšava kretanje polimeraze duž DNA tijekom procesa transkripcije, i RNA DEPENDENT RNA POLYMERASE 2 (RDR2) koja, kako RNA pol IV transkribira jednolančanu molekulu RNA, pretvara istu u dvolančanu molekulu. Ribonukleaza DICER LIKE 3 (DCL3) cijepa dvolančanu malu RNA na molekule siRNA duljine 24 nukleotida sa 3'-OH slobodnim krajem (**Slika 2.b**) koji se potom metilira enzimom HUA ENHANCER 1 (HEN1) (**Slika 2.c**). Na taj način nastaje zrela siRNA koja zajedno s proteinom ARGONAUTE 4 (AGO4) čini efektorski kompleks puta RdDM (**Slika 2.d**). Funkciju AGO4 mogu obavljati i njemu srodni AGO6 i AGO9 (Matzke i Mosher, 2014).

1.3.2.2 Usmjeravanje metilaze DRM2 na ciljno mjesto u genomu

RNA pol V transkribira molekule lncRNA koje se komplementarno sparuju s malim siRNA (**Slika 2.e**). RNA pol V preferencijalno se veže za intergenske transpozone i ponavljajuću DNA koja se nalazi u promotorima, intronima ili egzonima gena. Njena regrutacija na genom potpomognuta je histonskim metiltransferazama SUVH2, SUV9 i SUVH2 koje se vežu za metiliranu DNA. Ključan kompleks u mehanizmu RdDM koji također interagira s RNA pol V je kompleks DDR koji je potreban za odmatanje dvolančane DNA i održavanje DNA u jednolančanom obliku pogodnom za transkripciju (Matzke i Mosher, 2014). Sastoji se od proteina DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1 (DRD1) koji ima ulogu u remodeliranju kromatina, proteina DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3 (DMS3) koji je srodan kohezinima te od malog, biljno specifičnog proteina RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1 (RDM1). Protein RDM1 ima ključnu ulogu u putu RdDM jer povezuje AGO4 i DRM2, stoga je ključan za regrutaciju DRM2 na ciljno mjesto. Osim sparivanja siRNA s lncRNA, stabilnost cijelog kompleksa na mjestu metilacije DNA dodatno je osigurana proteinskim interakcijama između proteina AGO4 i domene CTD RNA pol V. Na mjestu metilacije DNA metiltransferazom DRM2 (**Slika 2.f**) dolazi do uspostave heterokromatičnog stanja uklanjanjem oznaka aktivnog kromatina histonskim deacetilazama, demetilazama i protein ubikvitinazama te njihova zamjena

oznakama utišanog kromatina histonskim metiltransferazama SUVH2, SUV9 I SUVR2 koje metiliraju lizin na poziciji 9 u histonu H3 (H3K9me) (Matzke i Mosher, 2014). Dolazi do promjene u konformaciji kromatina i uspostavi utišanog stanja čime se onemogućava pristup transkripcijskoj mašineriji (**Slika 2.g**). Osim kanonskog mehanizma RdDM, postoje i nekanonski mehanizmi RdDM koji djelomično inkorporiraju komponente koje su inače uključene u mehanizam posttranslacijskog utišavanja gena (kao RNA polimeraza II), karakteristične tipove i veličine malih RNA i specifične faktore utišavanja (Matzke i Mosher, 2014)



Slika 2. Shematski prikaz metilacije DNA usmjerene malim molekulama RNA (mehanizam RdDM). Slovicima su označeni pojedini koraci RdDM-a. **a** – RNA polimeraza IV (Pol IV) transkribira jednolančane molekule RNA (jIRNA) koje služe kao kalup RNA ovisnoj RNA polimerazi 2 (RDR2), a kompleks remodeliranja kromatina CLASSY1 (CLSY1) olakšava kretanje Pol IV duž DNA tijekom transkripcije, **b** – nastale dvolančane molekule RNA (dIRNA) endonukleaza DICER LIKE 3 (DCL3) cijepa na male interferirajuće molekule RNA (siRNA) duljine 24 nukleotida, **c** - metilaza HUA ENHANCER 1 (HEN1) metilira siRNA, **d** – zrela siRNA stvara kompleks s proteinom ARGONAUTE 4 (AGO4), **e.** – kompleks AGO4-siRNA veže se za transkripte RNA polimeraze V (Pol V), čiju transkripciju omogućuje kompleks DDR (sastavljen od proteina DRD1, DMS3 i RDM1), **f** – metilaza *de novo* DRM2 interagira s proteinom RDM1 čime se pozicionira na mjesto transkripcije Pol V i metilira sljedove CG, CHG i CHH, **g** – na mjestima metilacije DNA modificiraju se histoni oznakama utišanog kromatina i uspostavlja se heterokromatično stanje. Preuzeto i prilagođeno prema Pikaard i Scheid (2014).

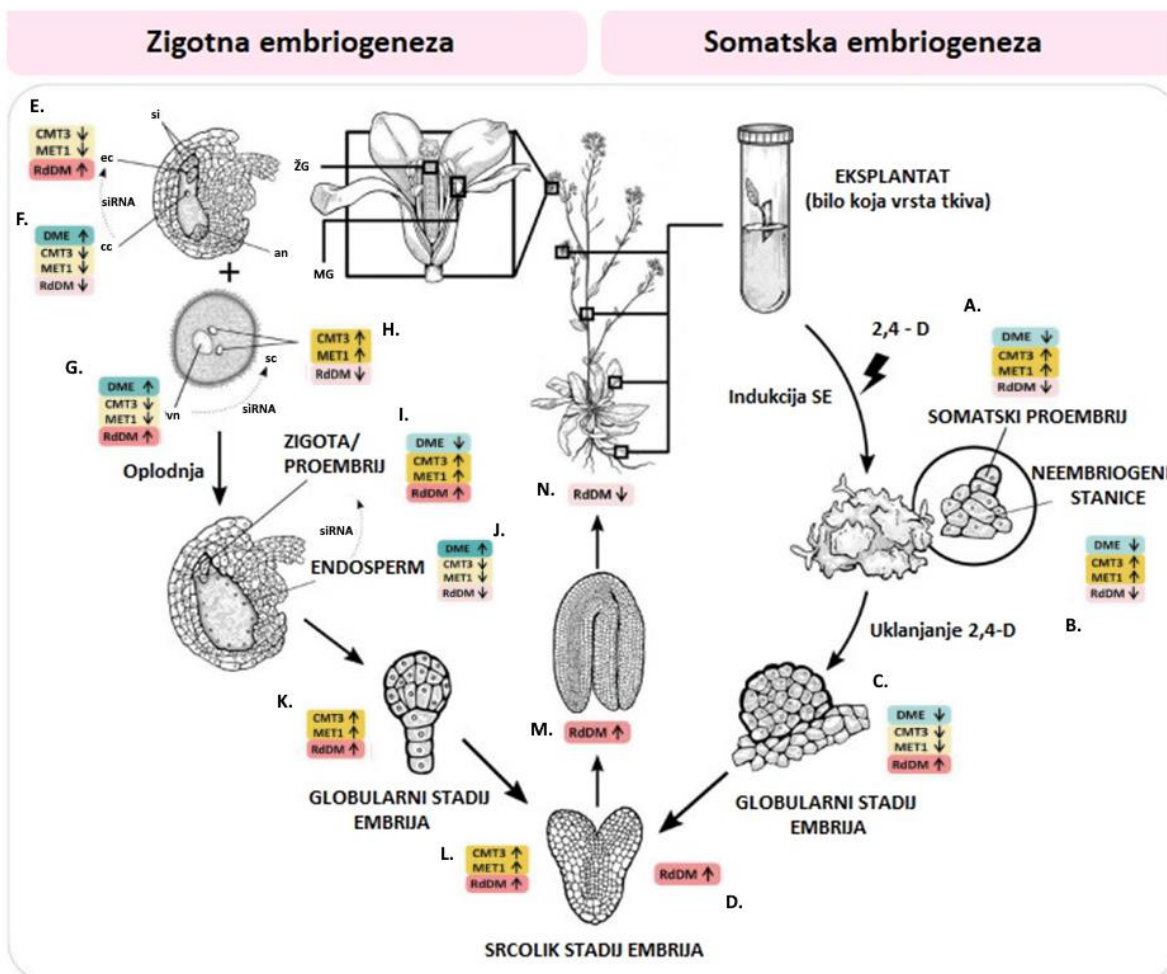
1.3.3 Uloga mehanizma RdDM u somatskoj embriogenezi

1.3.3.1 Metilacija DNA tijekom somatske embriogeneze

Brojni čimbenici utječu na embriogenezu biljaka, međutim, metilacija DNA ima fundamentalnu ulogu u staničnoj diferencijaciji, embriogenezi te kontroli biljnog rasta i razvoja općenito. Tijekom procesa dediferencijacije somatskih stanica, indukcije i razvoja SE dolazi do dinamičnih promjena u metilomu stanice. Tijekom dediferencijacije somatskih stanica, razina metiliranosti genoma manja je nego u okolnom neembriogenom i diferenciranom tkivu (Kumar i Van Staden, 2017). Ubrzo nakon toga dolazi do nagle hipermetilacije DNA tijekom indukcije SE što je u uročnjaku popraćeno povećanjem ekspresije *MET1* i *CMT3*, a smanjenjem ekspresije DNA demetilaze *DME*. Međutim, sveukupna razina metiliranosti genoma tijekom SE se smanjuje što ukazuje na kompleksnost mehanizama regulacije metilacije DNA (Grzybkowska i sur., 2018). Smatra se da je auksin povezan s ovim početnim valom hipermetilacije DNA na što najbolje upućuje prisutnost elementa AuxRE (engl. *Auxin Response Element*, AuxRE) u promotoru gena *CMT3* čime auksin direktno utječe na njegovu transkripciju (Wójcikowska i sur., 2020).

Ji i sur. (2019) uočili su da se na početku SE u soji *Glycine max* (L.) povećava razina metilacije na sljedovima CG, CHG i CHH, a najočitija je u kontekstu CHH u području transpozona što su povezali s primjenom auksina tijekom indukcijske faze. Uz to, dolazi do povećanja ekspresije gena za komponente mehanizma RdDM. Citozini koji su već prethodno bili metilirani na sljedovima CHG i CHH, dodatno se metiliraju tijekom SE mehanizmom RdDM te se utišavaju. Ova pojava uočena je i kod ZE tijekom kasnijih faza razvoja embrija uročnjaka te se smatra da je dodatno utišavanje transpozona mehanizmom RdDM mehanizam konzerviran tijekom embriogeneze u svrhu očuvanja integriteta genoma (Bouyer i sur., 2017).

Unatoč navedenom, vrlo malo se zna o specifičnostima uloga različitih mehanizama metilacije tijekom SE te se većina spoznaja preuzima iz eksperimenata ostvarenima na modelima zigotne embriogeneze. Vrlo važnu ulogu imaju znanja o diferencijalnoj ekspresiji različitih metilaza tijekom reproduktivnog razvoja koja ukazuju na dominantnu ulogu mehanizma RdDM tijekom sazrijevanja gametofita, oplodnje i rane embriogeneze te ponovne reaktivacije ostalih metilacijskih mehanizama tijekom sazrijevanja embrija (Jullien i sur., 2012). Sumirane spoznaje svega navedenog prikazane su na **Slici 3**.



Slika 3. Aktivnosti mehanizama metilacije DNA tijekom pojedinih stadija SE i ZE uročnjaka. **A** – povećana razina aktivnosti CMT3 i MET1, a smanjena razina aktivnosti demetilaze DME i mehanizma RdDM u somatskom proembriju, **B** – povećana razina aktivnosti CMT3 i MET1, a smanjena razina aktivnosti DME i RdDM, **C** – povećana razina aktivnosti mehanizma RdDM, a smanjenje svih ostalih mehanizama metilacije i demetilacije DNA u globularnom stadiju somatskog embrija, **D** – povećana aktivnost mehanizma RdDM u scolikom stadiju somatskog embrija, **E** – smanjena aktivnost CMT3 i MET1, a povećana aktivnost mehanizma RdDM u jajnoj stanici (**si** – sinergide, **ec** – jajna stanica, **cc** – centralna stanica, **an** – antipodalne stanice), **F** - povećana aktivnost DME, a smanjena aktivnost metilaza i mehanizma RdDM u centralnoj stanici, **G** – povećana aktivnost DME i mehanizma RdDM, a smanjena aktivnost metilaza CMT3 i MET1 u vegetativnoj jezgri (**vn** – vegetativna jezgra, **sc** – spermalne stanice), **H** – povećana aktivnost metilaza CMT3 i MET1, a smanjena aktivnost mehanizma RdDM u spermalnim stanicama, **I** – povećana aktivnost svih mehanizama metilacije, a smanjena aktivnost DME u zigoti i proembriju, **J** – povećana aktivnost demetilaze, a smanjena aktivnost svih mehanizama metilacije u endospermu, **K** – povećana aktivnost svih mehanizama metilacije u globularnom stadiju zigotnog embrija, **L** – povećana aktivnost svih mehanizama metilacije u scolikom stadiju zigotnog embrija, **M** – povećana aktivnost mehanizma RdDM u zreom embriju, **N** – smanjena aktivnost mehanizma RdDM u odrasloj biljci. Preuzeto i prilagođeno prema Markulin i sur. (2021).

1.3.3.2 Geni potencijalno regulirani mehanizmom RdDM tijekom somatske embriogeneze

Poznato je da mutanti za neku od komponenti mehanizma RdDM ispoljavaju aberantni fenotip u različitim stadijima reproduktivnog razvoja tijekom ZE (Forgione i sur., 2019). Zhong i sur. (2012) pokazali su da se RNA Pol V veže za promotore i da gubitak njene najveće podjedinice NRPE1 dovodi do povećane ekspresije gena koji su smješteni blizu veznog mjesta RNA Pol V. Što je vezno mjesto Pol V bliže početku transkripcije određenog gena, to će se gubitak njene funkcije jače odraziti na njegovu ekspresiju. Markulin i sur. (2021) selektirali su gene u kojima se RNA Pol V veže unutar 50 pb od mjesta početka transkripcije, odnosno one gene koji su najvjerojatnije regulirani mehanizmom RdDM, a koji su ujedno uključeni u reproduktivni razvoj uročnjaka. Time su odredili set od 22 gena među kojima se nalazi 6 gena koji pripadaju porodici *ECA1* (engl. *Early Culture Abundant 1*, ECA1) što je jedna od triju porodica koje kodiraju za male proteine bogate cisteinima koji se ekspimiraju tijekom reproduktivnog razvoja. U uročnjaku postoje 124 gena porodice *ECA1* koji su sudjeluju u procesu gametogeneze (Sprunck i sur., 2014). Najbolje opisani član porodice ECA1 je protein EGG CELL1 (EC1) kojeg luči jajna stanica te je odgovoran za aktivaciju spermalne stanice i dobivanje kompetencije za fuziju gameta (Sprunck i sur., 2012). Osim gena specifičnih za jajnu stanicu, značajan broj gena porodice *ECA1* ekspimirira se u sinergidama pod kontrolom transkripcijskog faktora MYB98 specifičnog za sinergide (Jones-Rhoades i sur., 2007). Gen potencijalno reguliran mehanizmom RdDM je i *RING-FINGER PROTEIN FOR EMBRYOGENESIS 1* (*RIE1*). RIE1 kodira za regulacijski protein s domenom cinkovih prstiju RING-H2 (engl. *Really Interesting New Gene*, RING) koji je esencijalan za razvoj sjemenki u uročnjaku. Mutacija *RIE1* letalna je u embrionalnoj fazi te uzrokuje zastoj u prijelazu iz globularnog u torpedo stadij (Xu i Li, 2003).

1.4 Cilj istraživanja

Na temelju hipoteze da metilacija posredovana mehanizmom RdDM ima ključnu ulogu u regulaciji SE, glavni cilj ovog istraživanja bio je istražiti povezanost mehanizma RdDM i embriogenog potencijala na modelu somatske embriogeneze. U sklopu hipoteze, drugi cilj istraživanja bio je utvrditi varira li ekspresija odabranih gena specifičnih za embriogenezu o funkcioniranju mehanizma RdDM te koliko je navedena povezanost ovisna o razvojnom stadiju somatskog embrija.

Cilj prvog dijela istraživanja bio je ispitivanje ovisnosti indukcije SE te razvoja i sazrijevanja somatskih embrija o funkcionalnosti mehanizma RdDM na temelju mjerenja potencijala indukcije SE i sazrijevanja embrija u različitim mutantima za mehanizam RdDM. Drugi dio temeljio se na selekciji seta gena esencijalnih za somatsku embriogenezu, a konačni cilj bio je analizirati relativnu ekspresiju najmanje dva selektirana gena u fazi indukcije i fazi sazrijevanja somatskog embrija u ovisnosti o funkcionalnosti mehanizma RdDM.

2 Materijali i metode

2.1 Materijali

2.1.1 Biljni materijal

Za izolaciju zigotnih embrija, poticanje somatske embriogeneze i analizu relativne ekspresije gena korištene su biljke divljeg tipa uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.) ekotip Columbia (Col-0). Uz divlji tip, korištena je transgenična linija oeDMS3-GFP (Tamara Vuk i sur., neobjavljeno) karakterizirana prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* čiji je proteinski produkt fuzioniran sa zelenim fluorescentnim proteinom (engl. *Green Fluorescent Protein*, GFP). Također, upotrijebljene su četiri transgenične linije s mutacijom u nekoj od komponenti puta RdDM. To su linija *ago4-1t*, naručena iz baze NASC (The Nottingham Arabidopsis Stock Centre, donor: Steve Jacobsen), *nrpe1-10* s nefunkcionalnom velikom podjedinicom RNA polimeraze V i *dms3-1* s mutacijom u genu za protein DMS3 (Kanno i sur., 2008), zatim *nprdl-7* s nefunkcionalnom velikom podjedinicom RNA polimeraze IV (Smith i sur., 2007) te linija *drm1/drm2* s mutiranim metiltransferazama DRM1 i DRM2 (Henderson i Jacobsen, 2008).

2.1.2 Mediji za isključavanje sjemenki, indukciju somatske embriogeneze i poticanje somatskih embrija na razvoj

2.1.2.1 Medij za isključavanje sjemenki uročnjaka

Medij MSØ (Murashige i Skoog, 1962) (pH = 5,8) korišten je za isključavanje sjemenki uročnjaka. Sastav medija prikazan je u **Tablici 1**. Nakon pripreme, medij je autoklaviran 18 minuta na temperaturi od 121 °C pri tlaku od 1,5 bara.

Tablica 1. Sastav medija MSØ za isključavanje sjemenki. U lijevome stupcu navedene su sastavnice medija, a u desnome stupcu konačna masena koncentracija navedenih tvari u mg/L.

hranjiva podloga MSØ	masena koncentracija (mg/L)
MAKROELEMENTI	
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ x H ₂ O	755
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370
MIKROELEMENTI	
H ₃ BO ₃	6,2
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	16,9
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,6
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
ORGANSKE TVARI	
saharoza	20 000
mio-inozitol	100
glicin	2
nikotinska kiselina (vitamin B3)	0,5
piridoksin-HCl (vitamin B6)	0,5
tiamin-HCl (vitamin B1)	0,1
agar	8000

2.1.2.2 Mediji za poticanje embriogeneze i sazrijevanje somatskih embrija

Medij E5 (Gaj, 2011) s dodatkom 2,4-diklorofenoksiotene kiseline (E5 + 2,4-D), vrijednosti pH od 5,8, korišten je za poticanje somatske embriogeneze na eksplantatima. Medij istog sastava i vrijednosti pH, ali bez 2,4-D, označavan kao E5Ø bio je korišten za poticanje somatskih embrija na razvoj i sazrijevanje. Sastav oba medija prikazan je u **Tablici 2**. Mediji su autoklavirani 18 minuta na temperaturi od 121 °C pri tlaku od 1,5 bara.

Tablica 2. Sastav medija za indukciju SE (E5 + 2,4D) i sazrijevanje somatskih embrija (E5Ø). U lijevome stupcu navedene su sastavnice medija, a u desnome stupcu prikazana je konačna masena koncentracija navedenih tvari u mg/L.

komponente medija E5	masena koncentracija (mg/L)	
	E5 + 2,4-D	E5Ø
MAKROELEMENTI		
KNO ₃		2 500
CaCl ₂ x 2 H ₂ O		150
MgSO ₄ x 7 H ₂ O		250
(NH ₄) ₂ SO ₄		134
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O		170
MIKROELEMENTI		
H ₃ BO ₃		3
CoCl ₂ x 6 H ₂ O		0,025
KI		0,75
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O		0,25
CuSO ₄ x 5 H ₂ O		0,025
MnSO ₄ x H ₂ O		10
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O		2
FeSO ₄ x 7 H ₂ O		27,8
Na ₂ EDTA		37,3
ORGANSKI DODACI		
mio-inozitol		100
nikotinska kiselina (vitamin B3)		1
piridoksin – HCl (vitamin B6)		1
tiamin-HCl (vitamin B1)		10
saharoza		20 000
2,4-diklorofenoksiotena kiselina (2,4-D)	1,1	/
Phytigel™		3 500

2.1.3 Pribor za izolaciju zigotnih embrija

Za izolaciju zigotnih embrija iz zrelih komuški uročnjaka, korištene su sterilne inzulinske šprice, pinceta, Petrijeve zdjelice promjera 90 mm, pokrovnice dimenzija 18 x 18 mm, mikroeprovete od 2 ml te mikropipeta. Izolacija je provedena u sterilnim uvjetima u laminaru pomoću lupe (Carl Zeiss Jena, povećanje 10x).

2.1.4 Pufer za elektroforezu

Za provedbu elektroforeze i pripremu 1%-tnih i 2%-tnih agaroznih gelova, korišten je 1x pufer TAE (engl. *Tris-HCl Acetate Ethylenediaminetetraacetic acid*) (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH = 8,0).

2.1.5 Početnice za lančanu reakciju polimerazom

Za provjeru čistoće izolirane glasničke RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA) lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), odnosno kontaminacije genomskom DNA (gDNA), korištene su početnice za gen *ACT3* (**Tablica 3**).

Tablica 3. Oznaka gena, naziv početnice, nukleotidna sekvenca i temperatura taljenja (T_m) svake početnice te veličine umnoženog fragmenta komplementarne DNA (cDNA) i gDNA gena *ACT3* korištenog u reakciji PCR.

naziv gena (oznaka gena)	naziv početnice	nukleotidna sekvenca 5' → 3'	$T_m/^\circ\text{C}$	veličina fragmenta cDNA (pb)	veličina fragmenta gDNA (pb)
<i>ACT3</i>	ACT3_fw	GGCATCATACTTTCTACAATG	59	648	732
(AT3G53750)	ACT3_rev	CACCACTGAGCACAAT	59		

2.1.6 Početnice za kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom

Za potrebe analize relativne ekspresije gena kvantitativnim PCR-om (engl. *quantitative PCR*, qPCR), korištene su početnice čije su nukleotidne sekvence, temperature taljenja (engl. *melting temperature*, T_m), srednje efikasnosti i veličine umnoženih fragmenata navedene u **Tablici 4**. Sveukupna lista isprobanih početnica navedena je u **Prilogu I**. Navedene početnice koristile su se za relativnu analizu ekspresije gena *ECA1*, *LEC2*, *MYB115* i *RIE1*, odnosno referentnih gena *RHIP1* i *TIP41* koji su služili kao endogena kontrola. Matična otopina početnica pripremljena je resuspendiranjem liofiliziranog praha u 250 μl redestilirane vode (Mili-Q[®]) te je skladištena preko noći na +4 $^\circ\text{C}$. Idući dan u sterilnim uvjetima

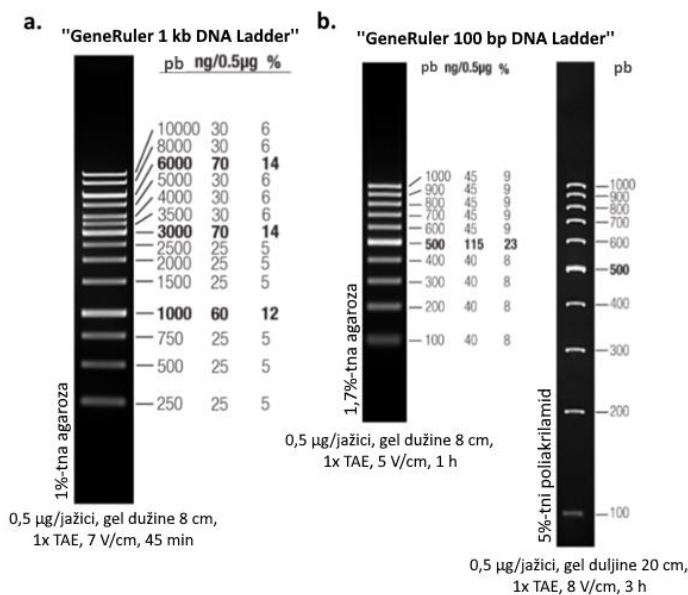
pripremljene su radne otopine početnica (10 μ M) razrijeđenjem matične otopine (100 μ M) u redestiliranoj vodi (Mili-Q®). Matične i radne otopine početnica skladištene su na -20 °C.

Tablica 4. Oznaka gena, naziv početnice, nukleotidne sekvence i temperature taljenja (T_m) setova početnica korištenih za umnažanje gena *LEC2* i *RIE1* te referentnih gena *RHIP1* i *TIP41* u reakciji qPCR.

naziv gena (oznaka gena)	naziv početnice	nukleotidna sekvencija 5' → 3'	T_m /°C	Srednja efikasnost početnica	veličina fragmenta cDNA (pb)	veličina fragmenta gDNA (pb)
<i>LEC2</i> (AT1G28300)	qLEC2_fw1 qLEC2_rev1	AGGGAAAGGAACCACTACGAA CAGTGGTGAGGTCATGAGAT	59,4 61,3	1,800	136	136
<i>RIE1</i> (AT2G01735)	qRIE1_fw2 qRIE1_rev2	TTTCCTGGCGATTGACGTCTTCT CCTCCGATACACCTTCCGTTCC	62,9 65,9	1,751	137	217
<i>RHIP1</i> (AT4G26410)	qRHIP1_fw1 qRHIP1_rev1	CTATTGGGATTGGTGTGCGCT AGAATTGTGCCTCTTCGCTC	58,4 58,4	1,806	105	237
<i>TIP41</i> (AT4G34270)	qTIP41_fw2 qTIP41_rev2	GCAGCACAATGGAAATTCAGG GCCTCAACCGTTTCTTTGTC	59,4 58,4	1,817	122	230

2.1.7 Standardi za provjeru veličine umnoženog fragmenta DNA

Za provjeru veličine fragmenta DNA korišten je molekularni biljeg "GeneRuler 1 kb DNA Ladder" (Thermo Scientific) (**Slika 4.a**). Za potvrdu prisutnosti umnoženih fragmenata nakon metode qPCR upotrijebljen je biljeg "GeneRuler 100 bp DNA Ladder" (Thermo Scientific) (**Slika 4.b**).



Slika 4. Molekulski standardi za provjeru veličine umnoženog fragmenta DNA. **a** – "Gene Ruler 1 kb" (Thermo Scientific), **b** - "GeneRuler 100 bp DNA Ladder" (Thermo Scientific).

2.1.8 Komercijalni paket za izolaciju mRNA

Za izolaciju mRNA iz tkiva induciranih zigotnih i zrelih somatskih embrija, korišten je komercijalni paket za izolaciju mRNA "Dynabeads™ mRNA DIRECT™ Micro Purification Kit" (Invitrogen) čije su komponente prikazane u **Tablici 5**.

Tablica 5. Komponente komercijalnog paketa "Dynabeads™ mRNA DIRECT™ Micro Purification", sastav komponenti i njihova množinska, odnosno masena koncentracija.

naziv komponente	koncentracija
Dynabeads® Oligo (dT)₂₅ (2 x 1 ml)	
Suspenzija magnetnih kuglica u fosfatnom puferu (engl. <i>Phosphate Buffer Solution</i> , PBS), pH = 7,4	5 mg/ml
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	4,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,4
NaN ₃	0,02%
Pufer za vezanje ili lizu (15 ml)	
Tris-Hcl, pH = 7,5	100 mM
LiCl	5000 mM
EDTA, pH = 8,0	10 mM
LiDS	1%
Ditiotreitol (DTT)	5 mM
Pufer za ispiranje A (30 ml)	
Tris-HCl, pH = 7,5	10 mM
LiCl	0,15 M
EDTA	1 mM
LiDS	0,1%
Pufer za ispiranje B (30 ml)	
Tris-HCl, pH = 7,5	10 mM
LiCl	0,15 M
EDTA	1 mM
Tris-HCl (15 ml)	
10 mM Tris-HCl, pH = 7,5	10 mM

2.2 Metode

2.2.1 Sterilizacija i isključavanje sjemenki

U svrhu sterilizacije, sjemenke sam inkubirala 1 minutu u 600 µl 70%-tnog etanola uz lagano miješanje. Supernatant sam uklonila pipetiranjem te potom 10 minuta inkubirala sjemenke na mješalici "DYNAL Sample Mixer" u 600 µl vodene otopine 1%-tnog Izosana G (100% natrij dikloroizocijanurat dihidrat, Pliva®) i 0,1%-tne otopine mukazola (Sigma™). Zatim sam u sterilnim uvjetima uklonila supernatant i sjemenke isprala 5 puta s destiliranom vodom. Nakon ispiranja, sjemenke sam pomoću mikropipete nasadila na podlogu MSØ (**Tablica 1**) te sam ih uzgajala 48 h na +4 °C (stratifikacija) kako bi se pojačala klijavost. Cijeli postupak sterilizacije i nasađivanja radila sam na sobnoj temperaturi.

2.2.2 Uvjeti uzgoja biljaka

Kako bi sjemenke proklijale, nakon stratifikacije sam ih 2 tjedna izlagala uvjetima kratkog dana (8 h svjetla i 16 h mraka) pri temperaturi od 22 °C i vlažnosti zraka 60% u fitotronu Kambič. Klijance sam presadila u mješavinu bijelog treseta i perlita (Stekmedium KLASMANN, Klasmann-Deilmann, GmbH). Presađene klijance uzgajala sam do odraslog, reproduktivnog stadija 6 tjedana u uvjetima dugog dana (16 h svjetla i 8 h mraka) pri temperaturi od 24 °C i vlažnosti zraka 50%.

2.2.3 Poticanje somatske embriogeneze i razvoj somatskih embrija

2.2.3.1 Odabir i površinska sterilizacija komuški

Biljke uročnjaka u stadiju cvatnje na vrhu cvjetne stapke razvijaju dvospolan cvijet iz čijeg se tučka razvija komuška unutar kojeg se nalaze sjemeni zametci s embrijima. Pri samom vrhu cvjetne stapke nalaze se zelene, tanje komuške s embrijima u ranijem stadiju razvoja, a pri dnu stapke nalaze se deblje komuške s embrijima u kasnijem stadiju razvoja. Kako komuška sazrijeva, poprima žutu boju i počinje se otvarati duž septuma (Roeder i Yanofsky, 2006). Za potrebe istraživanja odabrala sam zelene, deblje komuške, duljine oko 1 cm koje sadržavaju embrije u kotiledonarnom stadiju razvoja. Pincetom sam sakupila oko 15 komuški svake linije i stavila ih u sterilne mikroeprove od 1,5 ml. Nakon toga provela sam sterilizaciju komuški na identičan način kao i sterilizaciju sjemenki. Postupak je prethodno opisan u poglavlju 2.2.1.

2.2.3.2 Izolacija početnog eksplantata

Nakon sterilizacije, pincetom sam uzimala po jednu komušku i položila je u praznu Petrijevu zdjelicu te na nju dodala kap destilirane vode. Pomoću dvije iglice otvorila sam komušku duž septuma, izvadila sjemene zemetke i uklonila ostatke komuške. Potom sam položila pokrovnicu na sjemene zemetke te lagano pritisnula pincetom kako bi se embriji oslobodili. Izolaciju sam provodila u sterilnim uvjetima na sobnoj temperaturi.

2.2.3.3 Indukcija somatske embriogeneze

Kako bih inducirala SE u početnom eksplantatu, izolirane embrije nasadila sam pomoću mikropipete na indukcijsku podlogu E5 + 2,4-D (**Tablica 2**). Na svaku podlogu nasadila sam oko 30 zigotnih embrija, a sveukupno sam nasadila 60 embrija po liniji. Nasađivanje sam provodila u sterilnim uvjetima na sobnoj temperaturi. Petrijeve zdjelice s nasađenim embrijima zatvorila sam parafilmom i uzgajala u uvjetima dugog dana (16 h svjetlo, 8 h mrak) na 24 °C tijekom pet dana.

2.2.3.4 Razvoj somatskih embrija

Nakon pet dana na indukcijskoj podlozi, inducirane embrije sam pomoću sterilne iglice prebacila na podlogu bez 2,4-D, E5Ø (**Tablica 2**). Petrijeve zdjelice zatvorila sam parafilmom te uzgajala 10 dana u uvjetima dugog dana (16 h svjetlo, 8 h mrak) na 24 °C.

2.2.3.5 Analiza indukcije i sazrijevanja somatskih embrija

Peti dan nakon nasađivanja embrija na indukcijsku podlogu, odredila sam broj embrija koji razvijaju kalusno tkivo na bazi kotiledona što je bilo vidljivo kao mala, bjelkasta nakupina. Uspješnost indukcije (indukcijski potencijal) izražavala sam kao postotak takvih embrija u ukupnom broju eksplantata. Uz to sam odredila postotak embrija na kojima se embriogeno tkivo razvilo na adaksijalnoj ili na abaksijalnoj površini kotiledona. Eksperiment sam ponovila tri puta, a broj početnih eksplantata za svaku liniju u svakom eksperimentu bio je otprilike 60.

Makroskopski se faza sazrijevanja SE očituje po pojavi zelenih, listastih nakupina (radi se o embriogenim listićima, odnosno kotiledonima). Iz početnog embriogenog kalusa može se razviti samo jedan embrij ili nakupina od preko 20 somatskih embrija. Osim somatskih embrija, iz induciranog kalusnog tkiva mogu se razviti i biljni organi (organogeneza). Deseti dan nakon nasađivanja induciranih embrija na podlogu za sazrijevanje, utvrdila sam postotak eksplantata na kojima je došlo do razvoja somatskih embrija (potencijal sazrijevanja) te broj somatskih embrija po eksplantatu (produktivnost SE). Broj somatskih embrija po eksplantatu raspodijelila sam u sljedeće kategorije: 0, 1-5, 11-15, 16-20 i >20. Embrije iz faze indukcije i iz faze sazrijevanja SE fotografirala sam koristeći mikroskop Zeiss Stemi

2000-C s ugrađenom kamerom AxioCam ERc 5s, pod povećanjem 10x i koristeći program AxioVision LE. Nakon analize, uzorke sam pohranila na -80 °C.

2.2.4 Selekcija gena biljega somatske embriogeneze potencijalno reguliranih metilacijom *de novo*

U svrhu odabira gena biljega koji su povezani i sa SE i s mehanizmom RdDM, u ontološkoj bazi podataka (<https://www.ebi.ac.uk>) pretražila sam prema funkcionalnim anotacijama gene pridružene genskoj ontologiji „somatska embriogeneza“ (GO:0010262) u uročnjaku. Na taj način pronašla sam gene povezane s biološkim procesom somatske embriogeneze.

Navedene gene analizirala sam sa ciljem procjene učinka mehanizma RdDM na njihovu metilaciju. U tu svrhu koristila sam podatke objavljene u Markulin i sur. (2021) koji su temeljeni na kromatinskoj imunoprecipitaciji s antitijelom na podjedinicu polimeraze V (NRPE1), a indirektno ukazuju na vezanje podjedinice NRPE1 na genomske pozicije bliske prethodno odabranim genima.

Iz genomske baze podataka "EnsemblGenomes" (Howe i sur., 2021) preuzela sam anotirani genom uročnjaka TAIR10 (engl. *The Arabidopsis Information Resource*, TAIR) u formatu .gff3 (https://plants.ensembl.org/Arabidopsis_thaliana/Info/Index). Iz genomske baze podataka "Gene Expression Omnibus (GEO)" (Barret i sur., 2012), podržane od strane Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (engl. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI), preuzela sam eksperimentalne podatke o veznom mjestu NRPE1 na DNA u formatu .bw dobivene metodom ChIP-sekvenciranja (engl. *Chromatin ImmunoPrecipitation*, ChIP) autora Liu i sur. (2018) (oznaka pristupa: [GSM2667837](#), [GSM266838](#)) i Gallego-Bartolomé i sur. (2019) (oznaka pristupa: [GSM3553171](#)).

Preuzete podatke o anotiranom genomu uročnjaka i veznim mjestima NRPE1 na DNA učitala sam u programu *Integrative Genomics Viewer* (Robinson i sur., 2011). Na taj način vizualizirala sam točnu poziciju vezanja RNA Pol V u odnosu na gen.

2.2.5 Analiza relativne ekspresije gena

2.2.5.1 Izolacija mRNA

Za izolaciju mRNA iz embrija uročnjaka, koristila sam komercijalni paket "Dynabeads™ mRNA DIRECT™ Micro Purification Kit" (Thermo Fisher Scientific). Za svaki uzorak izolirala sam mRNA iz oko 30 embrija divljeg tipa i transgeničnih linija. Prvu izolaciju mRNA iz uzoraka somatskih embrija u fazi sazrijevanja provela sam prema uputama proizvođača (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/61021>). Zbog zaostale genomske DNA u izolatima, djelomično sam modificirala protokol te ga primjenjivala u daljnjim pokusima kako je opisano u nastavku. Tijekom izolacije mRNA koristila sam magnetne kuglice za koje su kovalentno vezane početnice komplementarne poliA repu molekula mRNA. Pomoću magnetne olovke PickPen (Bio-nobile), magnetne kuglice s vezanom mRNA prebacivala sam iz jednog komercijalnog pufera za ispiranje u drugi, prema uputama proizvođača. mRNA sam eluirala tako da sam dodala 10 µl Tris-HCl (10 mM) i inkubirala 2 min na 80 °C. U ovome koraku mRNA se otpušta s magnetnih kuglica u otopinu Tris-HCl. Kako nisam bila sigurna je li na magnetnim kuglicama možda ostalo vezane mRNA, magnetne kuglice prebacila sam u 100 µl otopine Tris-HCl (10 mM) te i njih koristila u daljnjem postupku. Paralelno sam provodila tretman DNazom I na eluiranoj mRNA u 10 µl otopine Tris-HCl i na mRNA za koju sam pretpostavila da je možda još uvijek vezana za magnetne kuglice. Pripremila sam reakcijsku smjesu za tretman DNazom I (**Tablica 6**). Tretman DNazom I na uzorcima mRNA vezanima za magnetne kuglice napravila sam u mikroeprijetama od 0,2 ml u koje sam otpipetirala po 10 µl reakcijske smjese te sam pomoću magnetne olovke premjestila kuglice iz 100 µl otopine Tris-HCl u reakcijsku smjesu s DNazom I.

Za tretman DNazom I u uzorcima eluirane mRNA u mikroeprijetama od 0,2 ml pomiješala sam 5 µl reakcijske smjese s DNazom i 5 µl otopine mRNA. U ovu reakcijsku smjesu dodala sam otopinu MgCl₂ jer se pozitivno nabijeni ioni Mg²⁺ vežu za negativno nabijenu fosfatnu okosnicu molekule RNA čime ju stabiliziraju kada se slobodna RNA nalazi u otopini. U obje varijante tretmana DNazom I dodala sam 20 U inhibitora RNaza "RiboLock" koji čuva mRNA od razgradnje tijekom tretmana.

Uzorke sam inkubirala 30 minuta na 37 °C uz konstantno miješanje u inkubatoru (Thermomixer5436, Eppendorf). Nakon inkubacije, dodala sam po 1 µl EDTA (25 mM) (Invitrogen) u reakcijske smjese. EDTA je helator metalnih iona te vezanjem Mg²⁺ štiti mRNA od raspada na povišenoj temperaturi. Nakon dodatka EDTA, uzorke sam inkubirala 10 minuta na 70 °C čime se inaktivira DNaza I. Cijeli postupak izolacije mRNA i tretmana DNazom I provodila sam sa sterilnim priborom tretiranim dietil pirokarbonatom (engl. *diethyl pyrocarbonate*, DEPC) koji inaktivira RNaze. Čistoću i množinsku

koncentraciju mRNA odredila sam spektrofotometrijski pomoću uređaja "NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer" (Thermo Fisher Scientific). Koncentraciju mRNA koja je bila vezana za magnetne kuglice nisam mogla izmjeriti. mRNA koja je eluirana u otopini Tris-HCl pohranjena je na -80 °C, a mRNA vezana za magnetne kuglice je sva prebačena u smjesu za reverznu transkripciju i konvertirana u komplementarnu DNA.

Tablica 6. Sastav reakcijske smjese za tretman DNazom I tijekom izolacije mRNA. S lijeva na desno: reagens, početna koncentracija, volumen za jednu reakciju (tretman mRNA na magnetskim kuglicama), volumen za jednu reakciju (DNazni tretman u otopini izolirane mRNA).

reagens	početna koncentracija	volumen u μl (mRNA na magnetnim kuglicama)	Volumen u μl (otopina mRNA)
DNazni pufer (Thermo Scientific)	10x	1	1
Dnaza I (Thermo Scientific)	2 U/ μL	1	1
RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific)	40 U/ μL	0,5	0,5
MgCl ₂ (Fermentas)	25 mM	/	0,2
Nuclease Free H ₂ O		7,5 (do 10 μl)	2,3 (do 10 μl)
otopina mRNA		/	5

2.2.5.2 Reverzna transkripcija izoliranih molekula mRNA

Za kvantitativnu analizu relativne ekspresije gena pomoću metode qPCR, potrebno je izoliranu mRNA prevesti u komplementarnu DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) metodom reverzne transkripcije. Kako bi se metodom qPCR dobili vjerodostojni rezultati, odnosno kako bi se ekspresija gena mogla uspoređivati između uzoraka, potrebno je u svakoj reakciji qPCR imati jednaku koncentraciju kalupa cDNA. To sam osigurala na način da sam ovisno o izmjerenoj koncentraciji mRNA u daljnje reakcije reverzne transkripcije dodavala po 37,8 ng mRNA po uzorku.

Reakciju reverzne transkripcije provodila sam u dva koraka za što sam koristila reakcijske smjese RT1 i RT2 (**Tablica 7**). Reakcijska smjesa RT1 razlikovala se po sastavu ovisno o tome provodi li se reverzna transkripcija mRNA vezane za magnetne kuglice ili otopine mRNA (**Tablica 7**). Prilikom tretmana DNazom I sam u otopinu mRNA dodavala EDTA koja veže ione Mg²⁺ kako bi se inaktivirala DNaza I. Za enzimatsku aktivnost reverzne transkriptaze potrebni su ioni Mg²⁺ kao kofaktori, stoga sam u smjesu RT1 morala dodati MgCl₂ kako bi smjesa sadržavala dovoljnu koncentraciju Mg²⁺ za aktivnost reverzne transkriptaze. Nadalje, u slučaju kada sam u reakciju reverzne transkripcije dodavala mRNA eluiranu u otopinu poznate koncentracije, dodala sam 37,8 ng mRNA po uzorku, a u slučaju kada sam

reverznu transkripciju provodila na mRNA vezanoj za magnetne kuglice, u smjesu sam pomoću magnetne olovke dodavala sve magnetne kuglice.

Reakciju reverzne transkripcije provodila sam tako da sam reakcijske smjese RT1 s magnetnim kuglicama i otopinom mRNA inkubirala 5 minuta na 65 °C kako bi se uklonile sekundarne strukture molekula RNA. Zatim sam smjesu ohladila na 4 °C tijekom 2 minute prilikom čega sam dodala 4 µl smjese RT2. Reakcijske smjese inkubirala sam 45 minuta na 42 °C pri čemu se mRNA reverznom transkripcijom prevodila u cDNA. Završni korak reakcije proveden je 15 minuta na 70 °C pri čemu se inaktivirala reverzna transkriptaza. Reverzna transkripcija provedena je pomoću uređaja "GeneAmp® PCR System 2700" (Applied Biosystems). Nakon završetka reakcije, uzorke cDNA razrijedila sam 5x u redestiliranoj vodi (Mili-Q®) kako bi se smanjila koncentracija enzima i soli dodanih zbog reakcije reverzne transkripcije. Razrijeđenu cDNA pohranila sam na +4 °C do upotrebe, a nerazrijeđenu na -80 °C.

Tablica 7. Sastav reakcijskih smjesa RT1 i RT2 za reverznu transkripciju. S lijeva na desno: reagens, početna koncentracija, volumen u μl (mRNA na magnetnim kuglicama), volumen u μl (mRNA u otopini Tris-HCl).

Reakcijska smjesa RT1			
reagens	početna koncentracija	volumen u μl (mRNA na magnetnim kuglicama)	volumen u μL (mRNA u otopini Tris-HCl)
oligo(dT)18 Primer (Thermo Scientific)	0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,4	0,4
smjesa deoksiribonukleotida (dNTP) (Thermo Scientific)	10 mM	0,4	0,4
MgCl ₂ (Fermentas)	25 mM	/	0,2
RNase Free H ₂ O (Thermo Scientific)	/	9,2	4
otopina mRNA	/	/	37,8 ng po uzorku
Ukupan volumen RT1		10	10
Reakcijska smjesa RT2			
Reaction buffer (Thermo Scientific)	2x		2,8
RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific)	40 U/ μl		0,5
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific)	40 U/ μl		0,2
RNase Free H ₂ O (Thermo Scientific)	/		0,5
Ukupan volumen RT2			4
Ukupan volumen RT1 + RT2			14

2.2.5.3 Provjera kontaminacije uzoraka komplementarne DNA ostacima genomske DNA

Provjeru čistoće dobivene cDNA, odnosno provjeru kontaminacije s genomskom DNA (gDNA), nakon reverzne transkripcije provodila sam metodom PCR upotrebom početnica za gen aktin (*ACT3*). Korištene početnice za gen *ACT3* vežu se za kalup DNA na način da obuhvaćaju intronsku regiju koja u cDNA izostaje te se na temelju veličine umnoženih fragmenata mogu razlikovati oni koji potječu iz genomske DNA, što ukazuje na kontaminaciju, od onih dobivenih na kalupu cDNA. Za jednu reakciju PCR koristila sam 12,5 µl 2x "EmeraldAmp MAX PCR Master Mix" (Takara Bio), 0,5 µl uzvodne početnice za *ACT3* (10 µM) (Macrogen), 0,5 µl nizvodne početnice za *ACT3* (10 µM) (Macrogen), 2 µl kalupa cDNA i redestiliranu vodu (Mili-Q®) do ukupnog volumena reakcije od 25 µl. Kao negativnu kontrolu sam umjesto kalupa cDNA dodala jednak volumen redestilirane vode. Program reakcije PCR sastojao se od početne denaturacije 3 minute na 98 °C, zatim 35 ciklusa razdvajanja početnica 10 sekundi na 98 °C, prijanjanja početnica 30 sekundi na 59 °C i elongacije jednu minutu na 72 °C. Program PCR završava završnom elongacijom na 72 °C u trajanju od 5 minuta. Reakciju PCR provela sam u uređaju "GeneAmp® PCR System 2700" (Applied Biosystems).

2.2.5.4 Analiza relativne ekspresije gena metodom qPCR

Za analizu relativne ekspresije gena *ECA1*, *LEC2*, *MYB115* i *RIE1* koristila sam metodu qPCR. Kao endogenu kontrolu koristila sam početnice za održavateljske gene *RHIP1* i *TIP41*. Reakcijska smjesa sastojala se od 5 µl 2x "GoTaq® qPCR MasterMix" (Promega), 0,2 µl uzvodne početnice za pojedini gen (10 µM) (Macrogen), 0,2 µl nizvodne početnice (10 µM) (Macrogen), 1 µl kalupa cDNA (0,54 ng) i redestilirane vode (Mili-Q®) do ukupnog reakcijskog volumena od 10 µl. Svi navedeni reagensi držani su na ledu. Za svaki uzorak radila sam po dvije tehničke replike, a kao negativnu kontrolu sam umjesto kalupa cDNA dodala 1 µl redestilirane vode. Program reakcije qPCR sastojao se od početne denaturacije od 5 minuta na 95 °C te 40 ciklusa denaturacije od 5 sekundi na 95 °C i prijanjanja početnica i elongacije od 10 sekundi na 60 °C. Reakciju qPCR provela sam u uređaju "Magnetic Induction Cycler (Mic) PCR Machine" (Bio Molecular Systems).

2.2.5.5 Agarozna gel elektroforeza

Za vizualizaciju umnoženih fragmenata nakon reakcije PCR ili qPCR, uzorke sam analizirala agaroznom gel elektroforezom. Pripremila sam 1%-tni (za PCR) ili 2%-tni (za qPCR) agarozni gel u puferu 1x TAE. Elektroforezu sam provodila prvo 5 minuta na 25 V kako bih bila sigurna da su uzorci povučeni u gel, a potom 30 minuta na 50 V kako bi se fragmenti na gelu dobro razvukli. Kao molekularni biljeg koristila sam 3 µl "GeneRuler 1 kb DNA Ladder" (Thermo Scientific). Na gel sam nanosila po 5 µl uzoraka koje sam prethodno pomiješala s 1 µl pufera za nanošenje 6x "DNA Loading Dye" (Thermo Scientific). Elektroforezu sam provodila u kadici "RunOne™ Electrophoresis Unit" (Embi Tec). Za

vizualizaciju umnoženih fragmenata, gel sam prvo inkubirala u otopini etidij bromida 5 minuta te ga potom izložila UV svjetlu (Kodak EDAS 290, ekspozicija 2 s, 100% UV), a fotografije sam dobila upotrebom implementirane digitalne kamere i programom KodakID.

2.2.5.6 Obrada rezultata dobivenih metodom qPCR

Upotrebom metode qPCR odredila sam vrijednosti graničnog ciklusa (engl. Cycle threshold, Ct), odnosno ciklusa u kojemu se može detektirati fluorescentni signal povrh pozadinske fluorescencije. Također sam odredila efikasnost parova početnica za svaki gen. Navedene vrijednosti koristila sam za analizu relativne ekspresije gena *LEC2* i *RIE1*, a rezultate sam izrazila vrijednostima ΔCt i $\Delta\Delta Ct$ uz korištenje održavateljskih gena *RHIP1* i *TIP41* kao endogene kontrole. Vrijednost ΔCt dobila sam normalizacijom gena od interesa na endogenu kontrolu te sam tako mogla usporediti ekspresije gena od interesa između dva razvojna stadija SE za divlji tip i sve transgenične linije. Vrijednost $\Delta\Delta Ct$ dobila sam normaliziranjem dobivenih vrijednosti ΔCt na divlji tip. Time sam dobila usporedbu između ekspresije gena od interesa u divljem tipu i u mutantnim linijama, odnosno dobila sam rezultat koji prikazuje relativan rast ili pad ekspresije gena u odnosu na divlji tip. Za potrebe izračuna vrijednosti ΔCt i $\Delta\Delta Ct$ sam od vrijednosti Ct dviju tehničkih replika uzela njihovu srednju vrijednost.

2.2.5.7 Statistička obrada podataka

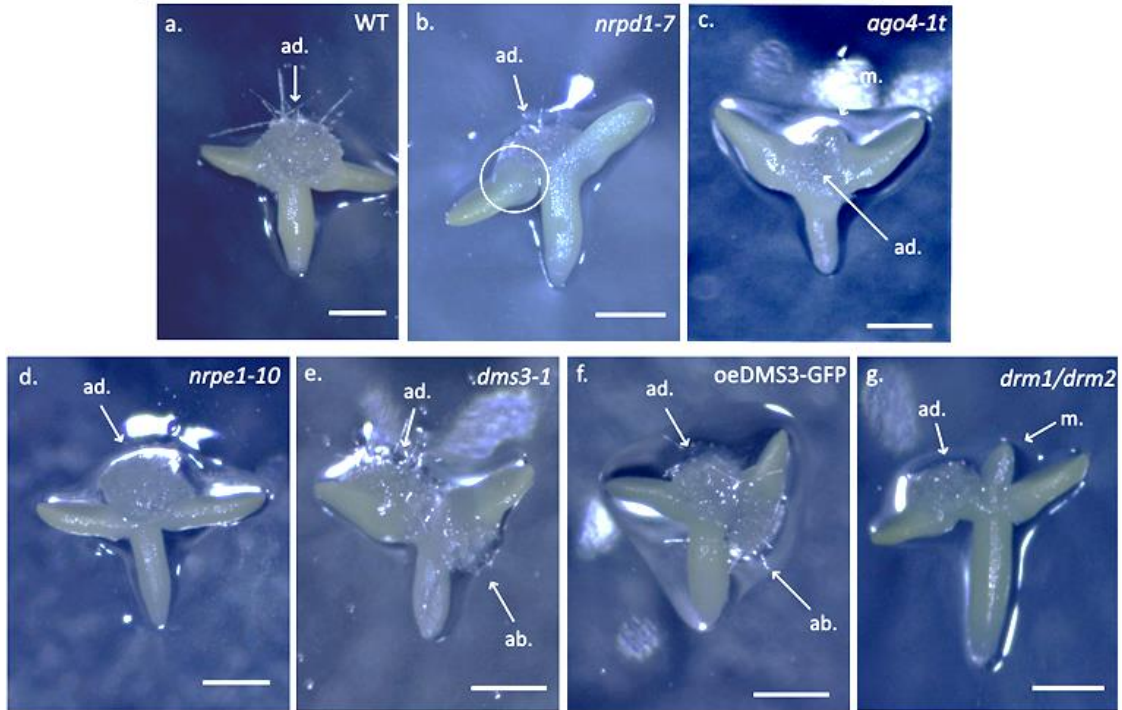
Podatke dobivene analizom indukcije i maturacije SE te podatke dobivene metodom qPCR statistički sam obradila koristeći program RStudio Team (2021). Usporedbu uzoraka provela sam upotrebom Studentovog T-testa pri čemu se vrijednosti smatraju međusobno statistički značajno različitimama ukoliko je p-vrijednost manja ili jednaka 0,05 ($p \leq 0,05$).

3 Rezultati

3.1 Indukcija i sazrijevanje somatskih embrija

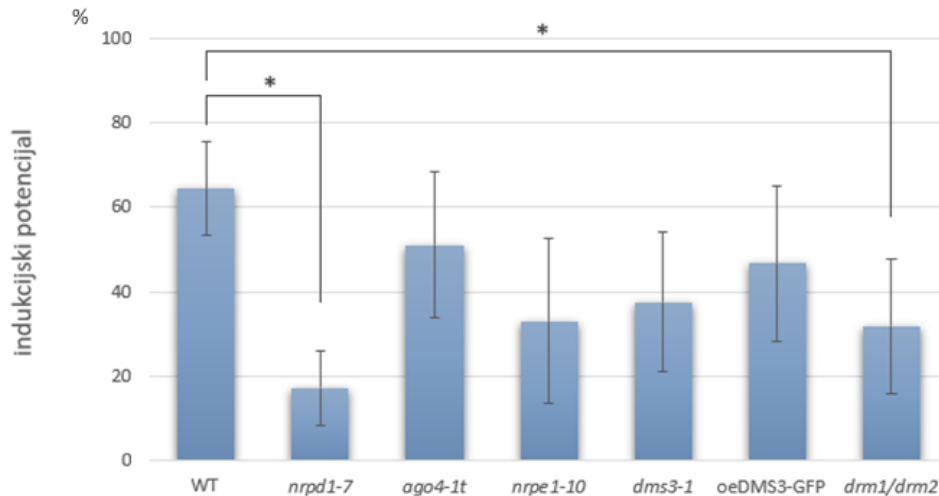
3.1.1 Potencijal indukcije somatske embriogeneze u ovisnosti o funkcionalnosti RdDM-a

Za indukciju SE, zigotni embriji divljeg tipa i mutanata za komponente mehanizma RdDM, nasađeni su na indukcijski medij E5 s dodatkom 2,4-D. Peti dan nakon nasađivanja na indukcijsku podlogu, na pojedinim embrijima došlo je do pojave malih, bijelih nakupina tkiva uz bazu kotiledona koje predstavljaju dediferencirano i neorganizirano kalusno tkivo iz kojeg se dalje mogu razviti somatski embriji (**Slika 5**). U određenom broju nasađenih embrija nije došlo do zamjetnih morfoloških promjena te nije primijećen razvoj embriogenog kalusnog tkiva, a kod nekih je došlo do propadanja tkiva, što se manifestiralo smanjenjem veličine embrija i propadanjem tkiva (nije prikazano). Na pojedinim embrijima je uz bazu kotiledona uočeno zadebljanje, odnosno bubrenje tkiva, koje također dovodi do stvaranja embriogenog kalusnog tkiva (**Slika 5.b**, zaokruženo). Prikazana pojava može se povezati uz razvoj tzv. kalusa rane budući da su kotiledonarni zigotni embriji linije *nrd1-7* bili krhke strukture te podložni lomljenju kotiledona tijekom eksperimentalne manipulacije. Na nekim eksplantatima zigotnih embrija se pak između dva kotiledona mogla uočiti aktivnost meristema (**Slike 5.c i 5.g**).



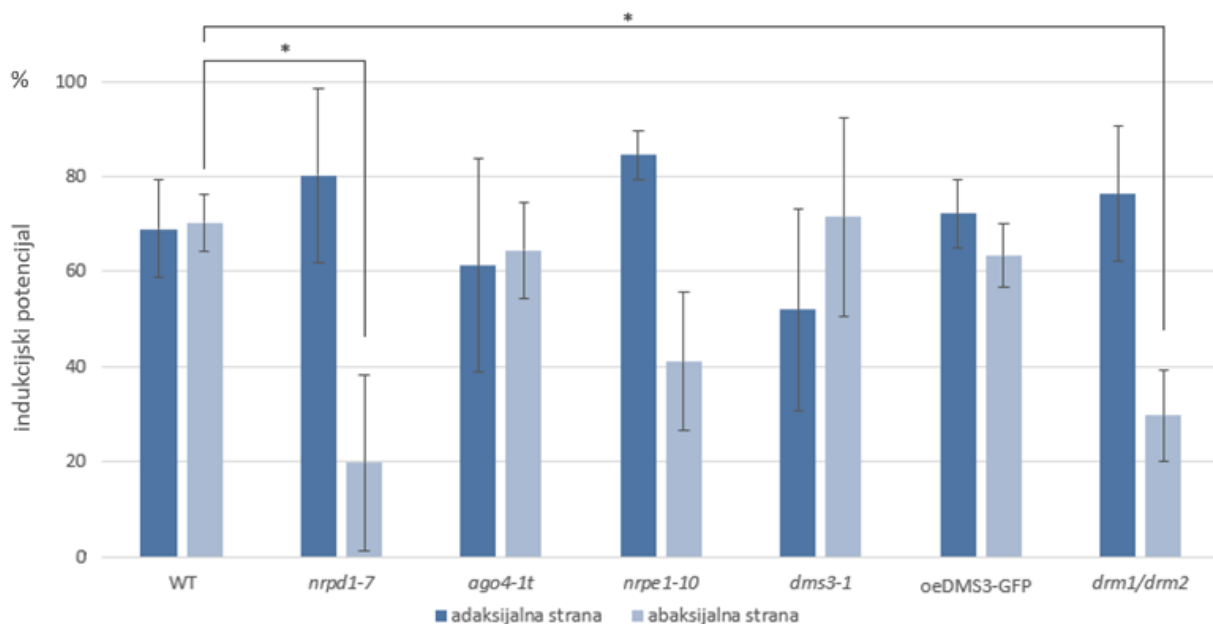
Slika 5. Indukcijska faza somatske embriogeneze u **a** – divljem tipu (WT), **b** – mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nprd1-7*), **c** – mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), **d** – mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), **e** – mutantu za funkcionalan protein DMS3 (*dms3-1*), **f** – transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno ekspimiran DMS3 (oeDMS3-GFP), **g** – mutantu za metilaze DRM1 i DRM2 (*drm1/drm2*). **ad** – indukcija embriogenog kalusnog tkiva s adaksijalne strane kotiledona, **ab** – indukcija embriogenog kalusnog tkiva s abaksijalne strane kotiledona, **m** – meristem, **zaokruženo** – inicijacija kalusa rane. Skala = 1 mm.

Indukcijski potencijal izražen je odnosom broja embrija u kojima je došlo do razvitka embriogenog kalusnog tkiva i ukupnog broja zigotnih embrija (početnih eksplantata) nasadenih na indukcijsku podlogu, a izražen je u postocima (**Slika 6**). Svi mutanti pokazivali su smanjeni indukcijski potencijal u odnosu na divlji tip. Divlji tip imao je najveći indukcijski potencijal (64%), slijedi ga mutant *ago4-1t* (51%), transgenična linija oeDMS3-GFP (47%) te mutanti *dms3-1* (38%) i *nrpe1-10* (33%). U odnosu na divlji tip, indukcijski potencijal bio je značajno smanjen u mutantima *drm1/drm2* (32%) i *nprd1-7* (17%).



Slika 6. Indukcijski potencijal (udio embrija u kojima je došlo do indukcije embriogenog kalusnog tkiva u ukupnom broju analiziranih embrija izražen u postotku) u divljem tipu (WT), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nrpd1-7*), mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), mutantu za DMS3 (*dms3-1*), transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno ekspimiran DMS3 (oeDMS3-GFP) te mutantu za metilaze DRM1 i DRM2 (*drm1/drm2*). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti dobivene u tri neovisna eksperimenta (u svakom 60 početnih eksplantata) s pripadajućim standardnim devijacijama. Zvezdicama (*) su označene statistički značajno različite vrijednosti (p-vrijednost $\leq 0,05$) dobivene pomoću T-testa (p-vrijednost WT – *nrpd1-7*: 0,005312; p-vrijednost WT – *drm1/drm2*: 0,05083).

Embriogeno kalusno tkivo razvilo se uz bazu s gornje (adaksijalne) ili s donje (abaksijalne) strane kotiledona (**Slike 5.e i 5.f**). Za svaku liniju, određen je postotak induciranih embrija kod kojih je došlo do indukcije s adaksijalne, odnosno s abaksijalne strane (**Slika 7**). Nije bilo značajne razlike u indukciji SE na adaksijalnoj strani u mutantima u odnosu na divlji tip. Međutim, u mutantima *nrpd1-7* i *drm1/drm2* bio je manji postotak indukcije SE s abaksijalne strane u usporedbi s divljim tipom tako da se sveukupno umanjeni induksijski potencijal ovih linija najvjerojatnije javio kao posljedica umanjene uspješnosti indukcije na abaksijalnoj strani.

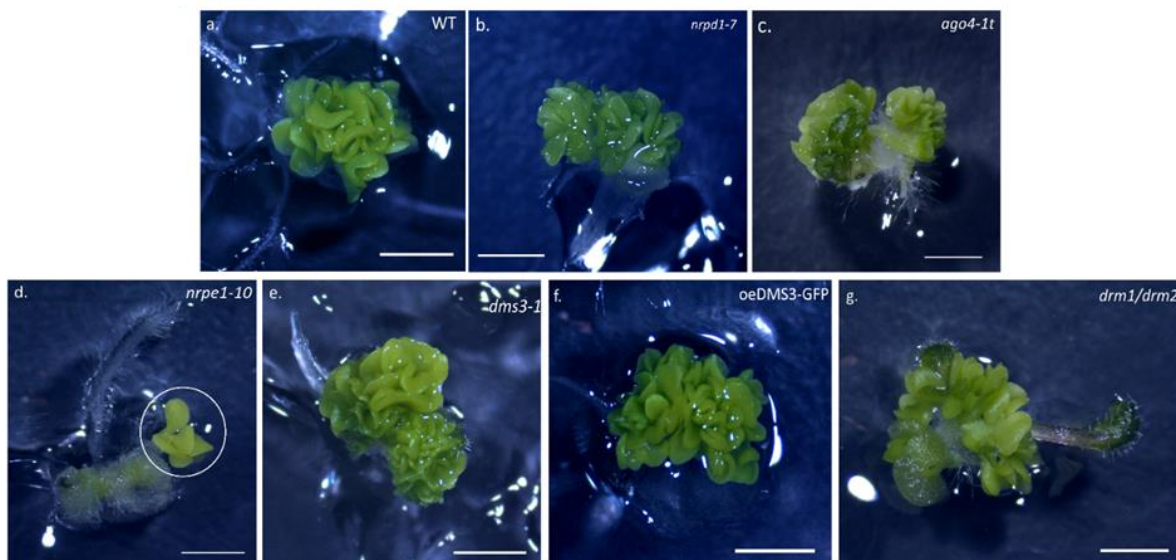


Slika 7. Udio induciranih embrija u kojima je do pojave embriogenog kalusa došlo s adaksijalne, odnosno abaksijalne strane kotiledona u divljem tipu (WT), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nrpd1-7*), mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), mutantu za DMS3 (*dms3-1*), transgencijskoj liniji u kojoj je prekomjerno eksprimiran DMS3 (oeDMS3-GFP) te mutantu za metilaze DRM1 i DRM2 (*drm1/drm2*). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti triju nezavisnih eksperimenata (sa 60 početnih eksplantata u svakom) s pripadajućim standardnim devijacijama. Zvezdicama (*) su označene vrijednosti koje su statistički značajno različite (p -vrijednost $\leq 0,05$) dobivene pomoću T-testa (abaksijalna strana WT - *nrpd1-7*: 0,03171; WT – *drm1/drm2*: 0,006212).

3.1.2 Sazrijevanje somatskih embrija u ovisnosti o funkcionalnosti RdDM-a

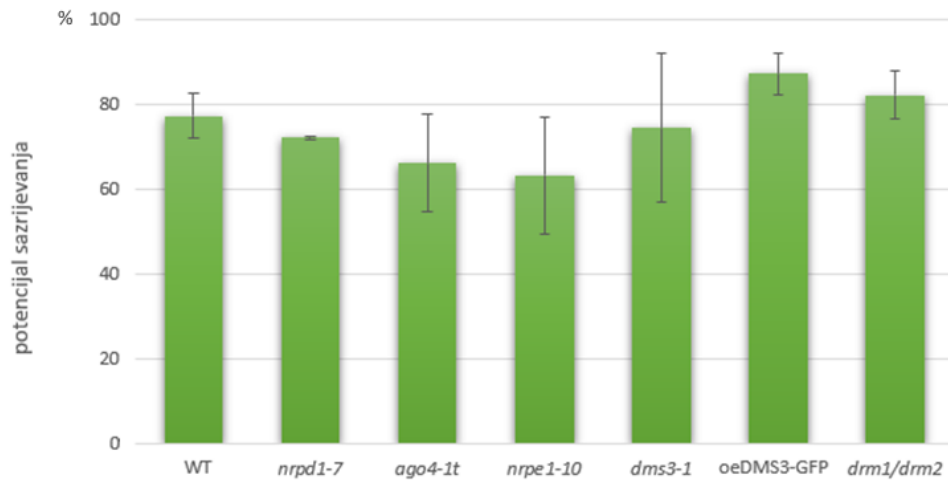
3.1.2.1 Sazrijevanje somatskih embrija

Nakon indukcije SE, inducirani embriji bili su preneseni na podlogu za sazrijevanje (E5 bez dodatka 2,4-D). Deseti dan nakon nasadivanja, iz embriogenog kalusnog tkiva u određenom broju eksplantata došlo je do sazrijevanja somatskih embrija i/ili do pojave drugih biljnih organa (organogeneza) (**Slika 8**). Somatski embriji su bipolarne strukture koje su u zreloj fazi prepoznatljive po zelenim kotiledonima. Na nekim eksplantatima došlo je isključivo do razvoja embrija, a na nekima su se uz somatske embrije razvili i korjenčići (**Slike 8.c i 8.g**). Potencijal sazrijevanja izražen je kao udio embrija na kojima je došlo do razvoja i sazrijevanja somatskih embrija u ukupnom broju induciranih embrija i izražen u postotku (**Slika 9**). Potencijal sazrijevanja visok je u svim linijama te se kreće u rasponu od 63% (linija *nrpe1-10*) do 87% (oeDMS3-GFP).



Slika 8. Uspješnost sazrijevanja somatskih embrija u **a** – divljem tipu (WT), **b** – mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nprd1-7*), **c** – mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), **d** – mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), **e** – mutantu za DMS3 (*dms3-1*), **f** – transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno ekspimiran DMS3 (oeDMS3-GFP), **g** – mutantu za metilaze DRM1 i DRM2 (*drm1/drm2*). Skala = 1 mm.

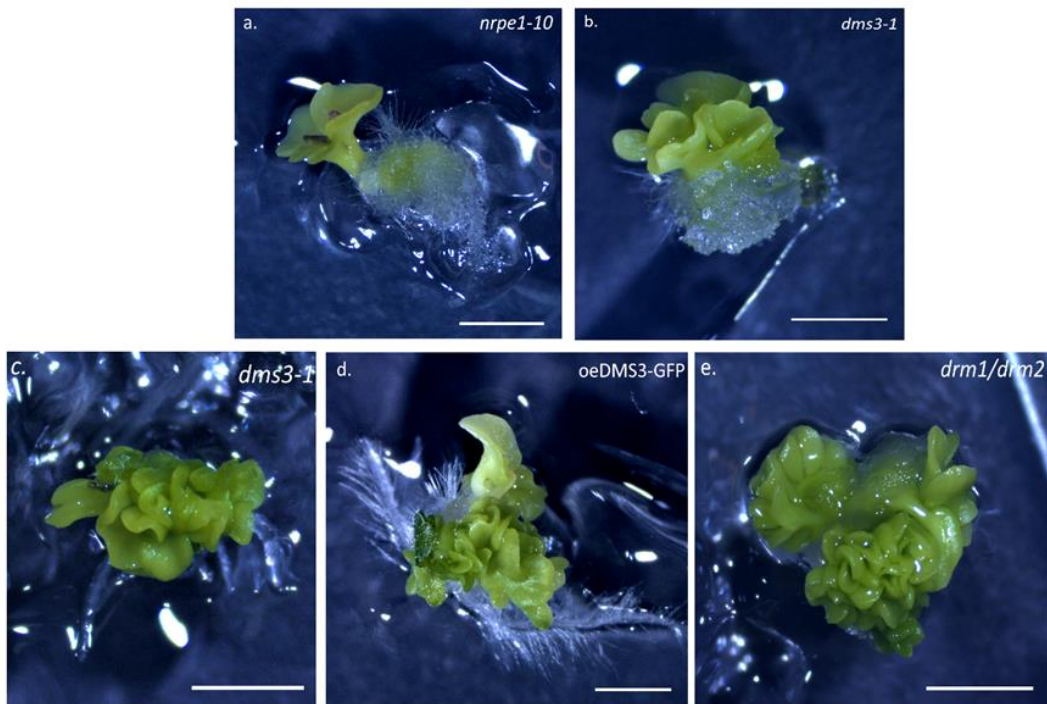
Potencijal sazrijevanja divljeg tipa iznosio je 83%. U usporedbi s divljim tipom nije bilo statistički značajne razlike niti u jednom mutantu. Međutim, u jednom od dva analizirana ponavljanja eksperimenta, potencijal sazrijevanja mutanta *nrpe1-10* iznosio je 47%, dok je potencijal sazrijevanja divljeg tipa iznosio 73% (**Prilog II**) što ipak predstavlja nezanemarivo umanjen potencijal za sazrijevanje vezano za aktivnost RNA Pol V. Prema tome, moguće je da najmanji potencijal sazrijevanja u usporedbi s divljim tipom i ostalim mutantima ima linija s nefunkcionalnom RNA Pol V (*nrpe1-10*) iako ta razlika nije bila statistički značajna kada su se u obzir uzela oba ponavljanja. Za donošenje takvog zaključka potrebno je uključiti veći broj ponavljanja eksperimenta.



Slika 9. Potencijal sazrijevanja (udio embrija kod kojih je došlo do sazrijevanja somatskih embrija u ukupnom broju induciranih eksplantata izražen u postotku) u u divljem tipu (WT), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nrpd1-7*), mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), mutantu za DMS3 (*dms3-1*), transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno eksprimiran DMS3 (oeDMS3-GFP) te mutantu za metilaze DRM1 i DRM2 (*drm1/drm2*). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti dva nezavisna eksperimenta (sa 60 početnih eksplantata) s pripadajućim standardnim devijacijama. Nema statistički značajnih razlika između linija.

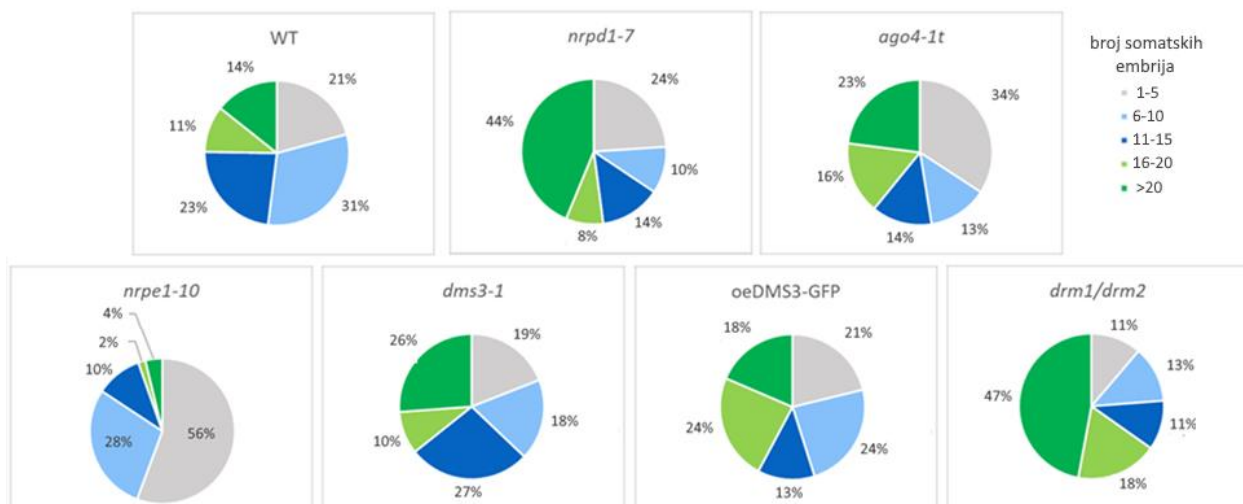
3.1.2.2 Produktivnost somatske embriogeneze

Deseti dan nakon nasađivanja induciranih embrija na podlogu za sazrijevanje, uz potencijal sazrijevanja određen je i broj razvijenih somatskih embrija po eksplantatu što je izražavano kao produktivnost SE. Broj razvijenih somatskih embrija po eksplantatu raspoređen je u sljedeće kategorije: 1-5, 6-10, 11-15, 16-20 i >20. Na **Slici 10** prikazani su eksplantati s razvijenim somatskim embrijima koji pripadaju pojedinoj kategoriji produktivnosti SE.



Slika 10. Produktivnost somatske embriogeneze. **a** – mutant *nrpe1-10* s razvijena tri somatska embrija (kategorija 1-5), **b** mutant *dms3-1* sa šest razvijenih somatskih embrija (kategorija 6-10), **c** – mutant *dms3-1* s otprilike 14 somatskih embrija (kategorija 11-15), **d** – transgenična linija oeDMS3-GFP s otprilike 19 razvijenih embrija (kategorija 16-20), **e** – mutant *drm1/drm2* s preko 20 razvijenih somatskih embrija po eksplantatu (kategorija >20). Duljina skale = 1 mm.

U usporedbi s divljim tipom, mutanti *ago4-1t*, *dms3-1* i transgenična linija oeDMS3-GFP nisu pokazivale značajnu razliku u produktivnosti SE (**Slika 11**). Međutim, mutanti s nefunkcionalnom RNA Pol IV (*nrpd1-7*) i nefunkcionalnim metilazama DRM1 i DRM2 (*drm1/drm2*) pokazivale su povećanu produktivnost SE što je u suprotnosti s najizraženijim opadanjem induksijskog potencijala u ovim mutantima. U navedenim linijama je na najvećem broju eksplantata došlo do razvoja više od 20 somatskih embrija, odnosno na 44% eksplantata u mutantu *nrpd1-7* i na 47% eksplantata u mutantu *drm1/drm2*. Najmanja produktivnost SE opažena je u mutantu s nefunkcionalnom RNA Pol V (linija *nrpe1-10*) u kojoj je preko pola eksplantata (56%) razvilo samo 1-5 somatskih embrija po eksplantatu (**Slika 11**). Ujedno je u istom mutantu u usporedbi s divljim tipom i ostalim mutantima najmanji broj eksplantata razvio je 16-20 somatskih embrija po eksplantatu (2%) ili više od 20 somatskih embrija po eksplantatu (4%). Navedeni rezultati impliciraju da produktivnost SE ovisi o funkcionalnosti mehanizma RdDM.



Slika 11. Produktivnost somatske embriogeneze u divljem tipu (WT), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nrpd1-7*), mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), mutantu za DMS3 (*dms3-1*), transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno ekspimiran DMS3 (oeDMS3-GFP) te mutantu za metilaze DRM1 i DRM2 (*drm1/drm2*). Sivom bojom označena je kategorija broja somatskih embrija 1-5, svjetlo plavom bojom kategorija 6-10, tamno plavom bojom kategorija 11-15, svjetlo zelenom bojom 16-20 te tamno zelenom bojom kategorija >20 somatskih embrija po eksplantatu. Postotak pored svake kategorije označava udio pojedine kategorije na eksplantatima na kojima je došlo do razvoja somatskih embrija.

3.2 Selekcija gena biljega

3.2.1 Selekcija gena pomoću ontološke baze podataka

Pretragom gena prema funkcionalnim anotacijama u ontološkoj bazi podataka „Gene Ontology“ koji su pridruženi genskoj ontologiji „somatska embriogeneza“ u uročnjaku, pronađeno je 13 gena koji su povezani s biološkim procesom somatske embriogeneze (Slika 12). Iako se kao rezultat navedene pretrage dobije lista od samo 13 gena, iz relevantne literature poznato je da postoji puno više gena vezanih za razvoj embrija, no istraživanja su uglavnom provedena na sustavu zigotne embriogeneze (Tian i sur., 2020). Tzafrir i sur. (2004) opisali su 250 *EMBRYO-DEFECTIVE (EMB)* gena koji su nužni za ispravan razvoj embrija uročnjaka, a najnovija literatura opisuje 510 gena *EMB* u uročnjaku (Meinke, 2019). Upravo zbog navedenoga, pri selekciji gena od interesa poslužila sam se i podacima opisanima u Markulin i sur. (2021) što je detaljno obrazloženo u sljedećem poglavlju.

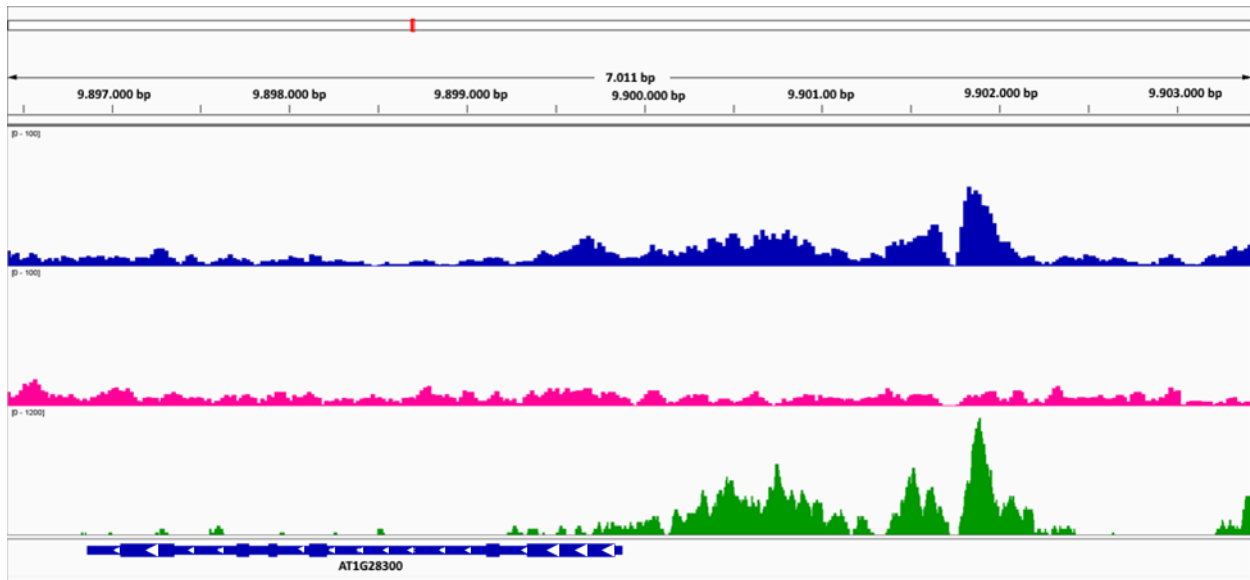
Gene Product	Symbol	Qualifier	GO Term
UniProtKB_Q1PDP9	MYB115	involved_in	GO:0010262 somatic embryogenesis
UniProtKB_Q1PFR7	LEC2	involved_in	GO:0010262 somatic embryogenesis
UniProtKB_Q38847	AGL15	involved_in	GO:0010262 somatic embryogenesis
UniProtKB_Q5XVH0	BHLH109	involved_in	GO:0010262 somatic embryogenesis
UniProtKB_Q945M9	NFYA9	involved_in	GO:0010262 somatic embryogenesis
UniProtKB_Q9LVJ7	NFYA6	involved_in	GO:0010262 somatic embryogenesis
UniProtKB_Q9LVW4	MYB118	involved_in	GO:0010262 somatic embryogenesis
UniProtKB_Q9LW31	FUS3	involved_in	GO:0010262 somatic embryogenesis
UniProtKB_Q9LXV5	NFYA1	involved_in	GO:0010262 somatic embryogenesis
UniProtKB_Q9M1R4	IAA30	involved_in	GO:0010262 somatic embryogenesis
UniProtKB_Q9M2U5	EP3	involved_in	GO:0010262 somatic embryogenesis
UniProtKB_Q9SFD8	NFYB9	involved_in	GO:0010262 somatic embryogenesis
UniProtKB_Q9SYH4	NFYA5	involved_in	GO:0010262 somatic embryogenesis

Slika 12. Rezultati pretrage baze podataka „Gene Ontology“ po funkcionalnoj anotaciji „somatska embriogeneza (GO:0010262). Stupci s lijeva na desno prikazuju: **Gene Product** - poveznicu na informaciju o genskom produktu u proteinskoj bazi podataka UniProtKB, **Symbol** – unikatan i službeni simbol gena, **Qualifier** - kvalifikator koji definira odnos između genskog produkta i pridružene genske ontologije „somatska embriogeneza“, **Go Term** – unikatan identifikator ontološke baze podataka koja označava određeni biološki proces, u ovom slučaju somatsku embriogenezu.

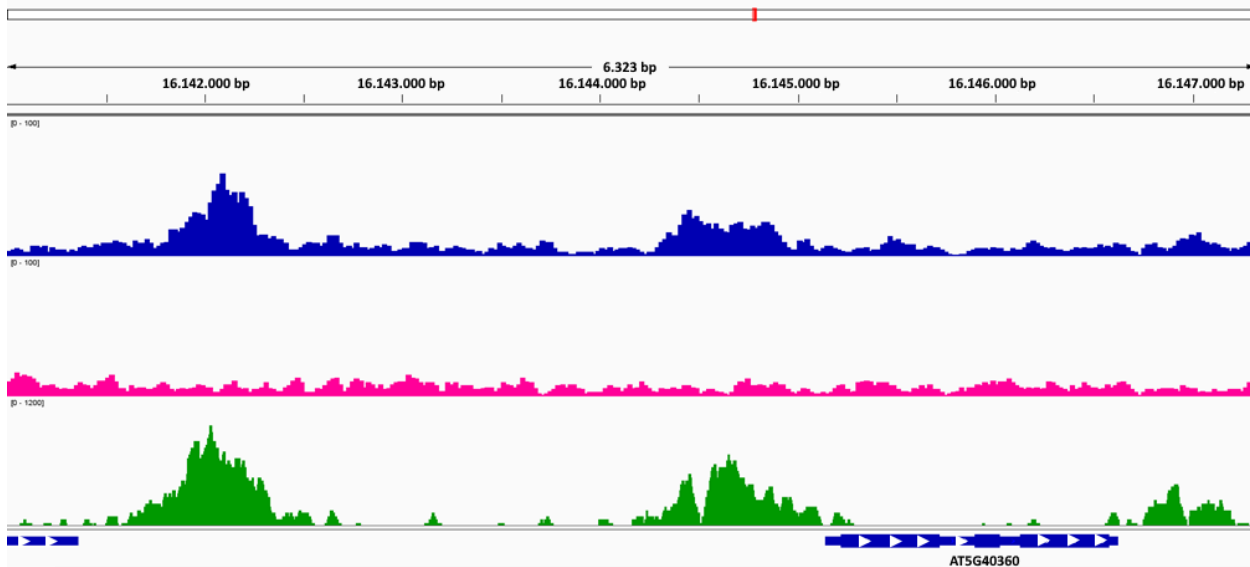
3.2.2 Selekcija gena u ovisnosti o funkcionalnosti mehanizma RdDM

Od selektiranih 13 gena koji su uključeni u proces SE, napravljena je selekcija onih gena čija ekspresija ovisi o funkcionalnosti mehanizma RdDM. U programu *Integrative Genomics Viewer* (IGV), vizualiziran je referentni genom uročnjaka i tri seta eksperimentalnih podataka dobivenih ChIP-sekvenciranjem s antitijelom na NRPE1 (**Slike 13, 14, 15 i 16**). Od 13 analiziranih gena, pozicija pika RNA Pol V, odnosno velike podjedinice NRPE1, bila je unutar 3000 pb od početka transkripcije gena *LEC2* i *MYB115* (**Slike 13 i 14**). U slučaju gena *LEC2*, pozicija pika NRPE1 bila je do oko 2000 pb od početka transkripcije gena, a nagomilavanje podjedinice NRPE1 doseže i samo mjesto početka transkripcije (**Slika 13**). Pozicija pika podjedinice NRPE1 nalazila se do oko 1000 pb uzvodno od početka transkripcije gena *MYB115* te također doseže mjesto početka transkripcije (**Slika 14**).

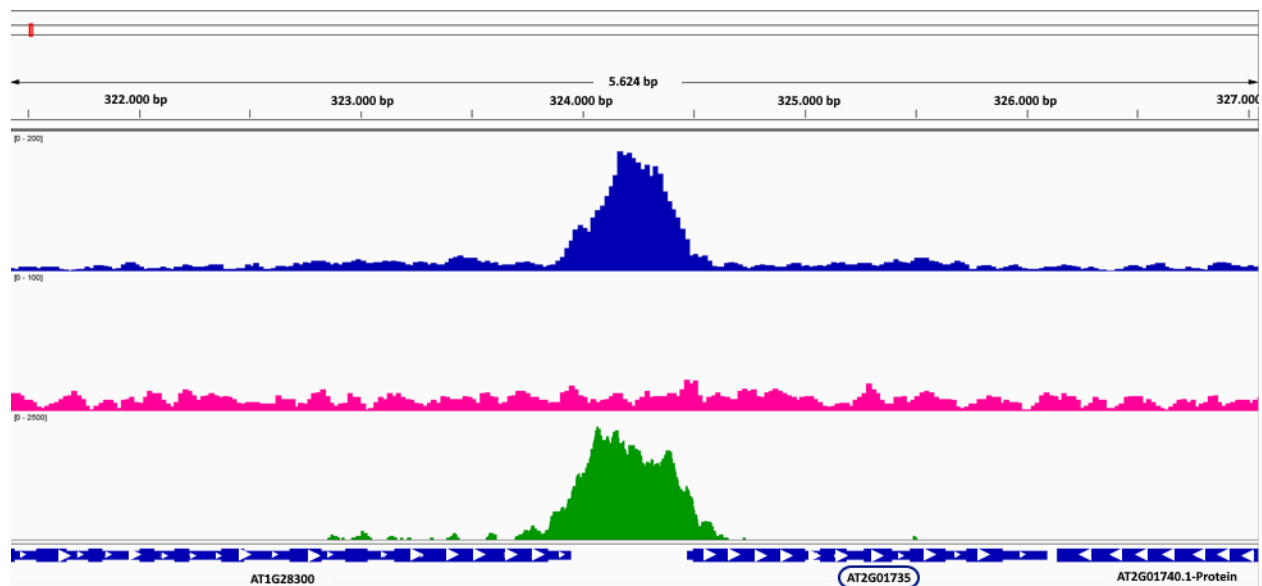
Markulin i sur. (2021) objavili su listu od 22 gena koja se na temelju literaturnih podataka povezuju s embriogenezom kod kojih je pozicija pika velike podjedinice RNA Pol V (NRPE1) smještena do 50 pb od početka transkripcije gena. Iz tih podataka odabrani su geni *RIE1* i *ECA1* kao geni koji su potencijalno regulirani mehanizmom RdDM, a koji ujedno imaju ulogu u razvoju embrija uročnjaka. U slučaju gena *RIE1*, pozicija pika NRPE1 nalazi se na samom početku transkripcije *RIE1* (**Slika 15**). Kod gena *ECA1*, pozicioniranje podjedinice NRPE1 preklapa se s mjestom početka transkripcije, ali i dužinom cijeloga gena. Geni *LEC2*, *MYB115*, *RIE1* i *ECA1* vjerojatno su regulirani mehanizmom RdDM budući da se RNA Pol V veže za promotore tih gena. Ujedno četiri gena imaju uloge u somatskoj embriogenezi te su na temelju toga odabrani za relativnu analizu ekspresije gena tijekom procesa SE.



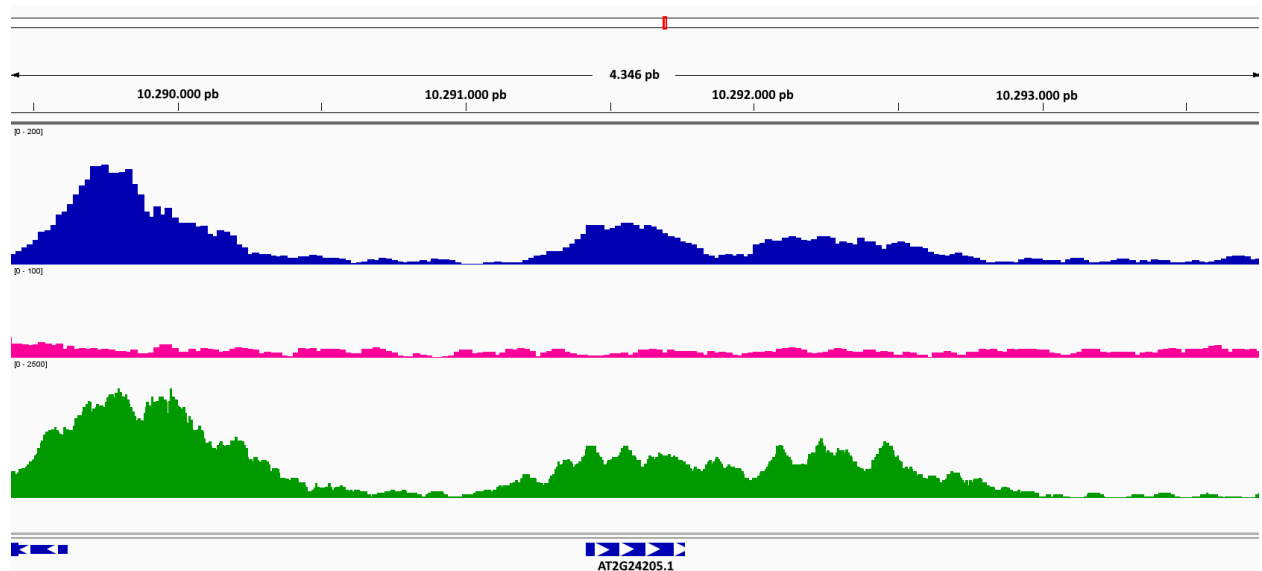
Slika 13. Prikaz anotiranog genoma uročnjaka s naglaskom na gen *LEC2* pod oznakom AT1G28300 vizualiziran u programu *Integrative Genomics Viewer* (IGV). Crvenom oznakom (I) označena je pozicija gena *LEC2* na kromosomu 1. Širina prikaza je 7 011 baznih parova (bp). Različitim bojama (plavo, ružičasto i zeleno) prikazani su eksperimentalni podaci o veznom mjestu NRPE1 na DNA dobiveni CHIP-sekvenciranjem. Na dnu fotografije prikazan je referentni genom uročnjaka i plavom bojom gen *LEC2* (AT1G28300). Bijele strelice prikazuju smjer transkripcije gena.



Slika 14. Prikaz anotiranog genoma uročnjaka s naglaskom na gen *MYB115* pod oznakom AT5G40360 vizualiziran u programu *Integrative Genomics Viewer* (IGV). Crvenom oznakom (I) označena je pozicija gena *MYB115* na kromosomu 5. Širina prikaza je 6 323 baznih parova (bp). Različitim bojama (plavo, ružičasto i zeleno) prikazani su eksperimentalni podaci o veznom mjestu NRPE1 na DNA dobiveni CHIP-sekvenciranjem. Na dnu fotografije prikazan je referentni genom uročnjaka i plavom bojom gen *MYB115* (AT5G40360). Bijele strelice prikazuju smjer transkripcije gena.



Slika 15. Prikaz anotiranog genoma uročnjaka s naglaskom na gen *RIE1* pod oznakom AT2G2G01735 vizualiziran u programu *Integrative Genomics Viewer* (IGV). Crvenom oznakom (I) označena je pozicija gena *RIE1* na kromosomu 2. Širina prikaza je 5 624 baznih parova (bp). Različitim bojama (plavo, ružičasto i zeleno) prikazani su eksperimentalni podaci o veznom mjestu NRPE1 na DNA dobiveni CHIP-sekvenciranjem. Na dnu fotografije prikazan je referentni genom uročnjaka i plavom bojom gen *RIE1* (AT1G28300; zaokruženo). Bijele strelice prikazuju smjer transkripcije gena.



Slika 16. Prikaz anotiranog genoma uročnjaka s naglaskom na gen *ECA1* pod oznakom AT2G24205.1 vizualiziran u programu *Integrative Genomics Viewer* (IGV). Crvenom oznakom (I) označena je pozicija gena *ECA1* na kromosomu 2. Širina prikaza je 4 346 baznih parova (bp). Različitim bojama (plavo, ružičasto i zeleno) prikazani su eksperimentalni podaci o veznom mjestu NRPE1 na DNA dobiveni CHIP-sekvenciranjem. Na dnu fotografije prikazan je referentni genom uročnjaka i plavom bojom gen *ECA1* (AT2G24205.1). Bijele strelice prikazuju smjer transkripcije gena.

3.3 Uspješnost izolacije mRNA i reverzne transkripcije

3.3.1 Koncentracija i čistoća izolirane mRNA

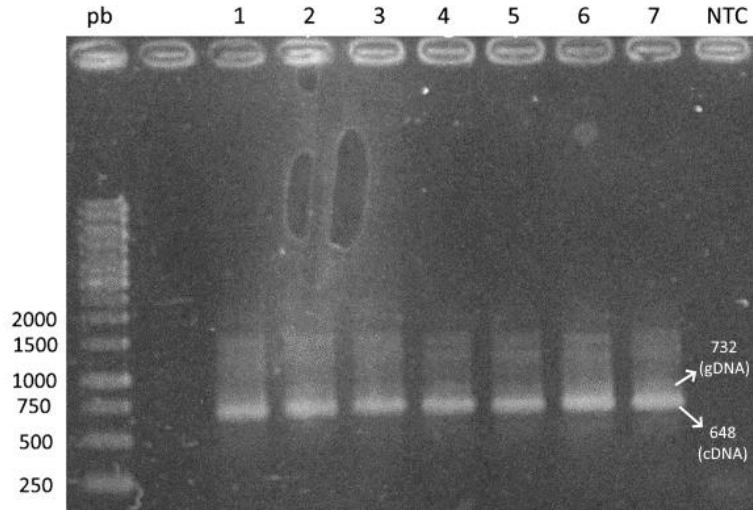
Prvi korak u analizi relativne ekspresije selektiranih gena *LEC2*, *MYB115*, *RIE1* i *ECA1* bila je izolacija mRNA iz uzoraka induciranih i zrelih embrija. U prvom provedenom eksperimentu, mRNA je bila izolirana bez izmjena protokola za izolaciju mRNA, odnosno prema uputama proizvođača. Koncentracija izoliranih molekula mRNA iz embrija u fazi sazrijevanja spomenutog eksperimenta prikazana je u **Tablici 8**. U uzorku izolirane mRNA linije divljeg tipa prisutna je kontaminacija što je vidljivo po vrijednostima omjerima A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} manjima od 2,0. U uzorku su vjerojatno bili prisutni proteini ili drugi reagensi koji se koriste tijekom izolacije mRNA, a apsorbiraju svjetlost pri 280 nm te soli i EDTA koji apsorbiraju pri valnoj duljini od 230 nm. U sastavu pufera za ispiranje A i B prisutna je EDTA (**Tablica 3**) koja apsorbira pri 230 nm koja je mogući uzrok kontaminacije. Moguće je da je kontaminacija s EDTA bila prisutna i u uzorcima linija *ago4-1t* i *nrpe1-10* čiji je omjer apsorbancije A_{260}/A_{230} iznosio 1, odnosno 1,49. Ostali uzorci izolirane mRNA bili su zadovoljavajuće čistoće.

Tablica 8. Masena koncentracija i čistoća mRNA dobivene iz somatskih embrija u fazi sazrijevanja. S lijeva na desno: naziv linije, masena koncentracija u ng/μl te omjeri apsorbancija A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} .

linija	masena koncentracija (ng/μl)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
divlji tip (WT)	8,8	1,71	0,69
<i>nrpd1-7</i>	8,2	2,43	3,18
<i>ago4-1t</i>	6,3	2,43	1
<i>nrpe1-10</i>	8,5	2,5	1,49
<i>dms3-1</i>	15,8	2,37	3,18
oeDMS3-GFP	10,6	2,39	4,25
<i>drm1/drm2</i>	7,4	2,55	4,05

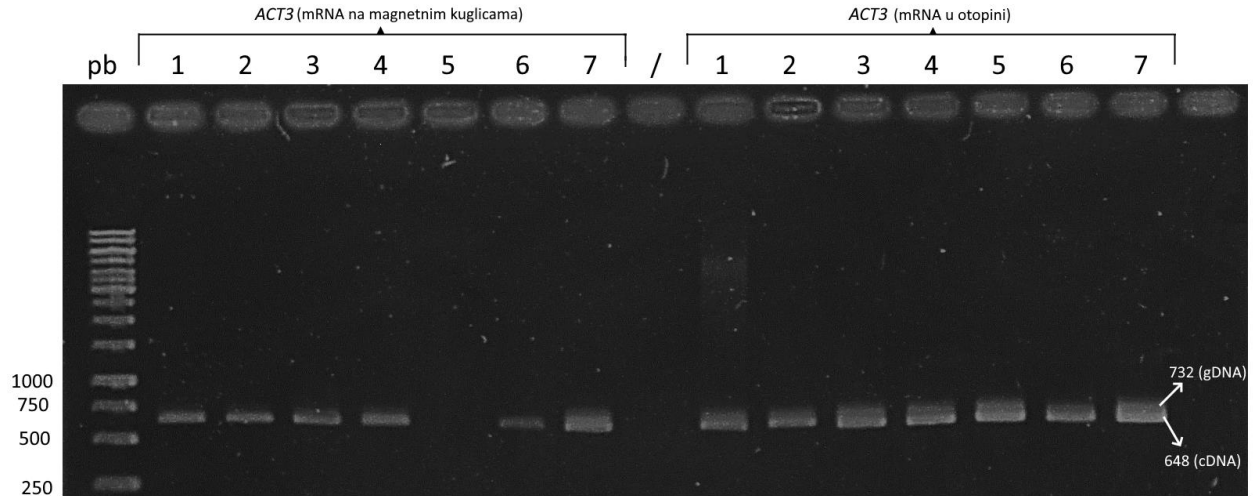
3.3.2 Provjera čistoće komplementarne DNA nakon reverzne transkripcije

U svrhu provjere kontaminacije izolirane mRNA s genomskom DNA, komplementarna DNA (cDNA) dobivena reverznom transkripcijom korištena je kao kalup u metodi PCR s početnicama za gen *ACT3* (**Slika 17**). Ukoliko se kao kalup za umnažanje koristi cDNA, umnoženi fragment je duljine 648 pb, a ukoliko je kalup gDNA, umnoženi fragment je duljine 732 pb. U svim uzorcima uspješno je umnožena željena cDNA što je bilo vidljivo po prisustvu vrpce na gelu u veličini od 648 pb. Međutim, u svim uzorcima bila je prisutna kontaminacija genomskom DNA što se očitovalo umnoženim fragmentom duljine 732 pb. Kontaminacija uzoraka genomskom DNA nije prihvatljiva pri provedbi analize relativne ekspresije gena.



Slika 17. Provjera prisutnosti genomske DNA u uzorcima komplementarne DNA. Umnoženi fragmenti DNA dobiveni su specifičnim umnažanjem gena *ACT3* metodom PCR koristeći kao kalup uzorke cDNA dobivene reverznom transkripcijom mRNA iz somatskih embrija u fazi sazrijevanja. Strelicama je prikazana veličina umnoženih fragmenata u pb (648 i 732 pb). Brojevima su označeni uzorci pojedinih linija. **pb** – molekularni biljeg ‘GeneRuler 1 kb DNA Ladder’ s označenim veličinama fragmenta pored vrpce, **1** – divlji tip (WT), **2** – linija *nrd1-7*, **3** – linija *oeDMS3-GFP*, **4** – linija *ago4-1t*, **5** – linija *nrpe1-10*, **6** – linija *drm1/drm2*, **7** – linija *dms3-1*, NTC – negativna kontrola.

Kako bi se iz uzoraka izolirane mRNA uklonila genomska DNA i ostaci EDTA, modificirala sam protokol za izolaciju mRNA u koracima vezanima uz tretman DNazom I. Nakon izolacije, proveden je tretman DNazom I na molekulama mRNA vezanima za magnetne kuglice i na molekulama mRNA eluiranim s magnetnih kuglica. U oba slučaja provedena je reverzna transkripcija. Nakon reakcije reverzne transkripcije provedena je metoda PCR korištenjem početnica za *ACT3* te su uzorci analizirani agaroznom gel elektroforezom (**Slika 18**). Uzorci linija divljeg tipa i mutanata *ago4-1t*, *nrpe1-10* i *nrd1-7* na kojima je mRNA bila vezana za magnetne kuglice nisu sadržavali gDNA što je bilo vidljivo po odsutnosti vrpce veličine 732 pb na gelu. Zbog navedenog sam u reakciju qPCR za analizu relativne ekspresije gena koristila cDNA dobivenu reverznom transkripcijom mRNA vezanom za kuglice.



Slika 18. Provjera uspješnosti reakcije reverzne transkripcije i čistoće cDNA. Umnoženi fragmenti DNA dobiveni su specifičnim umnažanjem gena *ACT3* metodom PCR koristeći kao kalup uzorke cDNA dobivene reverznom transkripcijom mRNA iz somatskih embrija u fazi sazrijevanja. Strelicama je prikazana veličina umnoženih fragmenata u pb (648 i 732 pb). Brojevima su označeni uzorci pojedinih linija. **pb** – molekularni biljeg “GeneRuler 1 kb DNA Ladder” s označenim veličinama fragmenata pored vrpca, **1** – divlji tip (WT), **2** – linija *ago4-1t*, **3** – linija *nrpd1-10*, **4** – linija *nrpd1-7*, **5** – linija *dms3-1*, **6** – linija oeDMS3-GFP, **7** – linija *drm1/drm2*, **NTC** – negativna kontrola. U prikazanom eksperimentu, umnažanje nije bilo uspješno u uzorku linije *dms3-1* koji je sadržavao mRNA vezanu za magnetne kuglice.

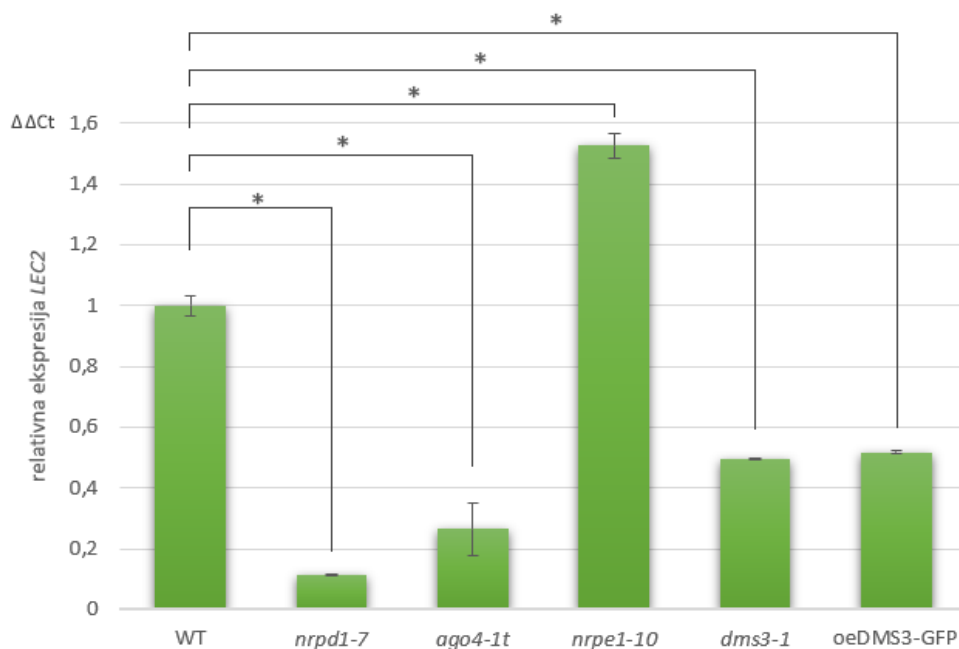
3.4 Analiza relativne ekspresije gena *LEC2* i *RIE1*

3.4.1 Relativna ekspresija gena *LEC2* tijekom indukcije somatske embriogeneze

Analizu relativne ekspresije gena uspješno sam provela na dva od četiri odabrana gena, na genima *LEC2* i *RIE1*. Naime, umnažanje gena *MYB115* i *ECA1* bilo je neuspješno unatoč korištenju po dva različita seta početnica po genu (*Prilog I*).

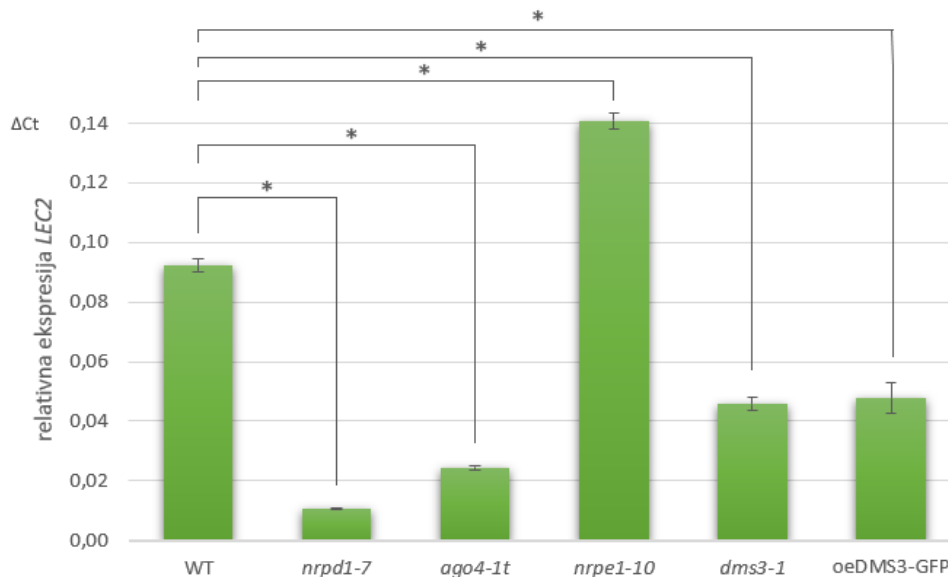
Zbog tehnički zahtjevne izolacije zigotnih embrija, njihove osjetljivosti (pogotovo u linija *nripd1-7* i *drm1/drm2*) te njihove male veličine, nije bilo moguće u svim eksperimentima prikupiti dovoljno materijala za uspješnu izolaciju mRNA. Iz tog razloga je transgenična linija *drm1/drm2* bila izostavljena iz analize ekspresije gena *LEC2* i *RIE1* u fazi indukcije SE te je analiza relativne ekspresije gena *LEC2* tijekom indukcije bila rađena na samo jednoj biološkoj replici. U fazi sazrijevanja somatskih embrija koju obilježava i povećanje biomase, navedeni problemi nisu postojali te su eksperimenti provedeni u svim linijama i u dvije biološke replike. Rezultati su izraženi vrijednošću $\Delta\Delta Ct$ u svrhu određivanja statističke značajnosti u odnosu na divlji tip, na temelju rezultata dviju bioloških replika (**Slika 19**), odnosno ΔCt u svrhu usporedbe s podacima dobivenima za ekspresiju gena u fazi sazrijevanja (**Slika 20**).

Tijekom indukcije SE, ekspresija gena *LEC2* je statistički značajno odstupala od divljeg tipa u svim mutantima mehanizma RdDM (**Slika 19**). U svima, osim u mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), ekspresija gena *LEC2* bila je značajno smanjena u odnosu na divlji tip što upućuje na to da je kontrola ekspresije gena *LEC2* tijekom indukcije SE ovisila o funkcionalnosti mehanizma RdDM. U mutantu s nefunkcionalnom RNA Pol V (*nrpe1-10*), došlo je do povećanja ekspresije gena *LEC2* u odnosu na divlji tip te u odnosu na ostale mutante mehanizma RdDM. Nadalje, ekspresija gena *LEC2* u liniji s nefunkcionalnim proteinom DMS3 (*dms3-1*) nije se značajno razlikovala u odnosu na transgeničnu liniju s prekomjerno eksprimiranim DMS3 (oeDMS3-GFP), ukazujući na to da količina proteina DMS3 nema esencijalnu ulogu.



Slika 19. Relativna ekspresija gena *LEC2* izražena vrijednošću $\Delta\Delta Ct$ tijekom faze indukcije SE u mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nrpd1-7*), mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), mutantu za DMS3 (*dms3-1*) te u transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno ekspimiran DMS3 (oeDMS3-GFP) u usporedbi s divljim tipom (WT). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti $\Delta\Delta Ct$ dobivene u jednom eksperimentu s pripadajućim standardnim devijacijama. Zvezdicama (*) su označene vrijednosti koje su statistički značajno različite (p -vrijednost $\leq 0,05$) za dvije biološke replike dobivene pomoću T-testa (WT – *nrpd1-7*: 0,016; WT – *ago4-1t*: 0,00911; WT – *nrpe1-10*: 0,00609; WT – *dms3-1*: 0,00412; WT – oeDMS3-GFP: 0,04098).

U svrhu usporedbe s rezultatima ekspresije tijekom sazrijevanja somatskih embrija, rezultati su prikazani bez normaliziranja dobivenih vrijednosti ΔCt na divlji tip, bazirani su na jednoj biološkoj replici i dvije tehničke replike (**Slika 20**) te je usporedba opisana u sklopu sljedećeg poglavlja.



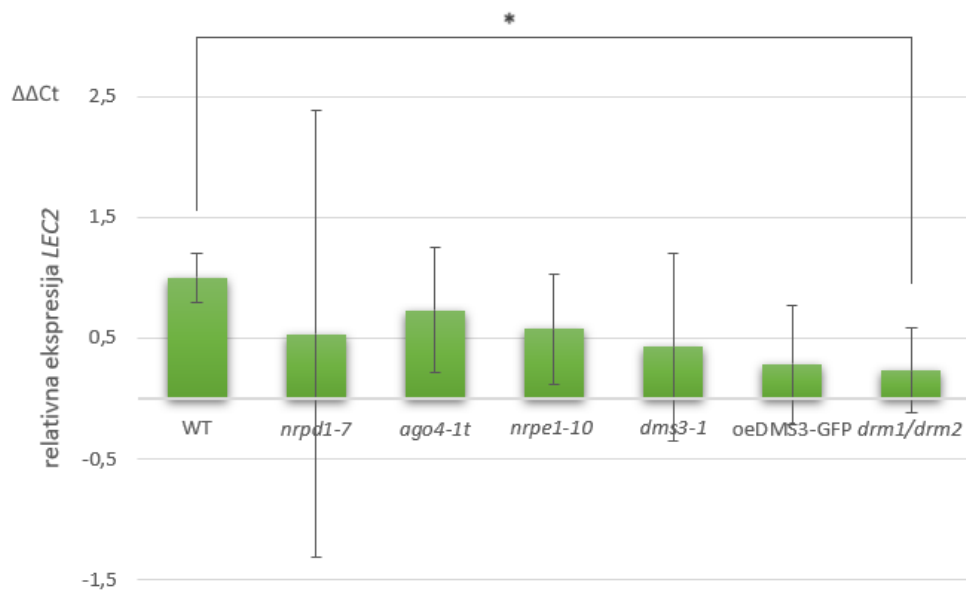
Slika 20. Relativna ekspresija gena *LEC2* izražena vrijednošću ΔCt tijekom faze indukcije SE u divljem tipu (WT), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nrpd1-7*), mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), mutantu za DMS3 (*dms3-1*) te u transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno ekspimiran DMS3 (oeDMS3-GFP). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti ΔCt dobivene u jednom eksperimentu s pripadajućim standardnim greškama za dvije tehničke replike. Zvezdicama (*) su označene vrijednosti koje su statistički značajno različite (p-vrijednost $\leq 0,05$) dobivene pomoću T-testa (WT – *nrpd1-7*: 0,016; WT – *ago4-1t*: 0,0091006; WT – *nrpe1-10*: 0,006091; WT – *dms3-1*: 0,004121; WT – oeDMS3-GFP: 0,04098).

3.4.2 Relativna ekspresija gena *LEC2* tijekom sazrijevanja somatskih embrija

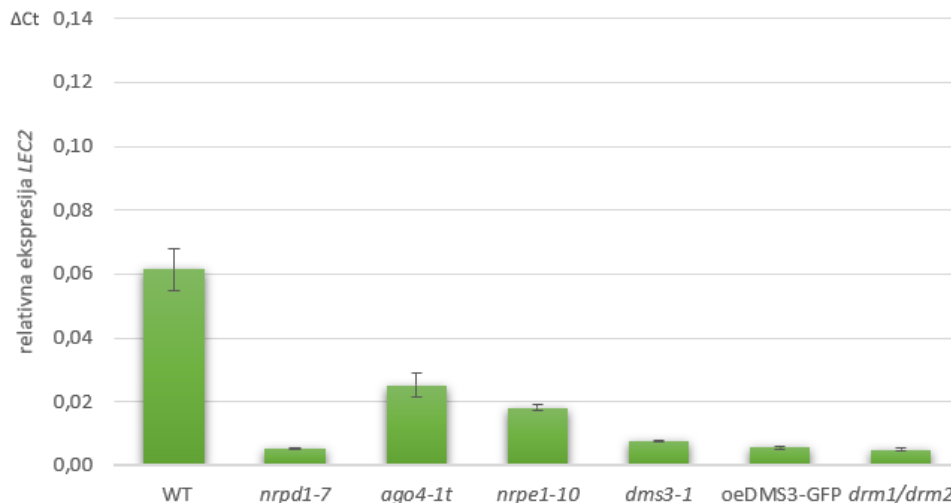
Provedena je analiza relativne ekspresije gena *LEC2* tijekom faze sazrijevanja somatskih embrija. Kako u ovom dijelu eksperimenta ne postoje ograničenja povezana s veličinom embrija ili osjetljivosti, a da bi se dobili statistički značajni podaci, bila su provedena dva ponavljanja eksperimenta, odnosno ekspresija je analizirana na dvije biološke replike. Kao i u prethodnom eksperimentu, relativna ekspresija gena izražena je vrijednošću $\Delta\Delta Ct$ za statističku analizu svake linije u odnosu na divlji tip (**Slika 21**), odnosno ΔCt sa ciljem usporedbe s ekspresijom u fazi indukcije (**Slika 22**).

Razina ekspresije *LEC2* bila je niža u svim mutantima u odnosu na divlji tip (**Slika 21**). Sličan obrazac ekspresije gena *LEC2* tijekom sazrijevanja somatskih embrija dobiven je i u ponovljenom eksperimentu (**Prilog II**), osim u liniji *nripd1-7* za koju su dobivene visoke vrijednosti ekspresije gena *LEC2*. Zbog tog odstupanja dobivene su velike standardne greške (**Slika 21**), stoga zaključujem da je statistički značajno smanjenje ekspresije *LEC2* u odnosu na divlji tip bilo nedvojbeno prisutno samo u liniji *drm1/drm2* (**Slika 21**) iako ostaje problem vezan uz podatke vezane za liniju *nripd1-7*.

Tijekom prijelaza iz faze indukcije u fazu formiranja zrelih embrija, u divljem tipu došlo je do blagog pada u ekspresiji *LEC2* (**Slike 20 i 22**). Pad u ekspresiji *LEC2* bio je prisutan i u mutantima vezanima za mehanizam RdDM koji je povezan s aktivnosti RNA Pol V (linije *nripe1-10*, *dms3-1*, *oeDMS3-GFP* i *drm1/drm2*). U mutantima vezanima za aktivnost RNA Pol IV, vezanje njenog transkripta na protein AGO4 (linije *nripd1-7* i *ago4-1t*) nije bilo niti pada niti povećanja ekspresije *LEC2* u odnosu na indukcijsku fazu. Globalno gledano, nefunkcionalnost mehanizma RdDM korelira sa sniženjem ekspresije gena *LEC2*, a umanjena ekspresija je i karakteristika sazrijevanja embrija.



Slika 21. Relativna ekspresija gena *LEC2* analizirana metodom $\Delta\Delta C_t$ tijekom faze sazrijevanja somatskih embrija u mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nrpd1-7*), mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), mutantu za DMS3 (*dms3-1*) te u transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno ekspimiran DMS3 (oeDMS3-GFP) u usporedbi s divljim tipom (WT). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti $\Delta\Delta C_t$ dva ponavljanja eksperimenta s pripadajućim standardnim devijacijama. Zvezdicom (*) su označene vrijednosti koje su statistički značajno različite (p -vrijednost $\leq 0,05$) za dvije biološke replike dobivene pomoću T-testa (WT – *drm1/drm2*: 0,02757).



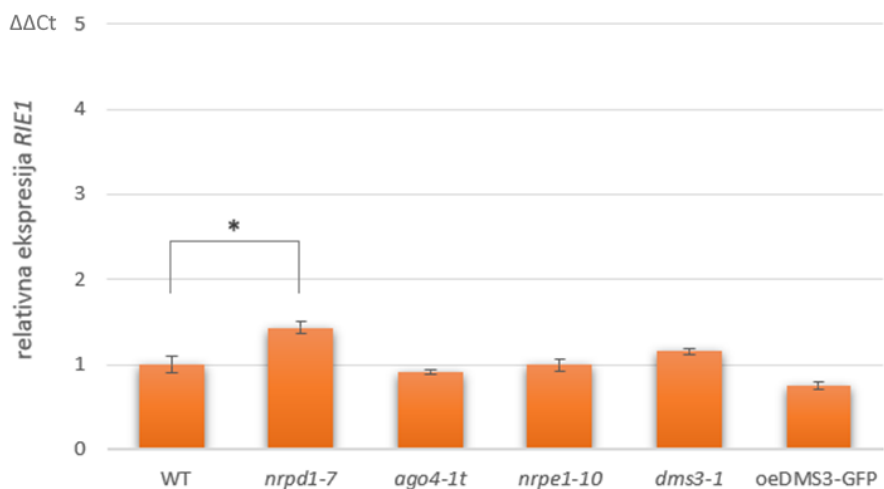
Slika 22. Relativna ekspresija gena *LEC2* izražena vrijednošću ΔC_t u fazi sazrijevanja somatskih embrija u divljem tipu (WT), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nrpd1-7*), mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), mutantu za DMS3 (*dms3-1*), transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno ekspimiran DMS3 (oeDMS3-GFP) te u mutantu za metilaze DRM1 i DRM2 (*drm1/drm2*). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti ΔC_t jednog ponavljanja eksperimenta s pripadajućim standardnim greškama za dvije tehničke replike. Nema statistički značajnih razlika između linija.

3.4.3 Relativna ekspresija gena *RIE1* tijekom indukcije somatske embriogeneze

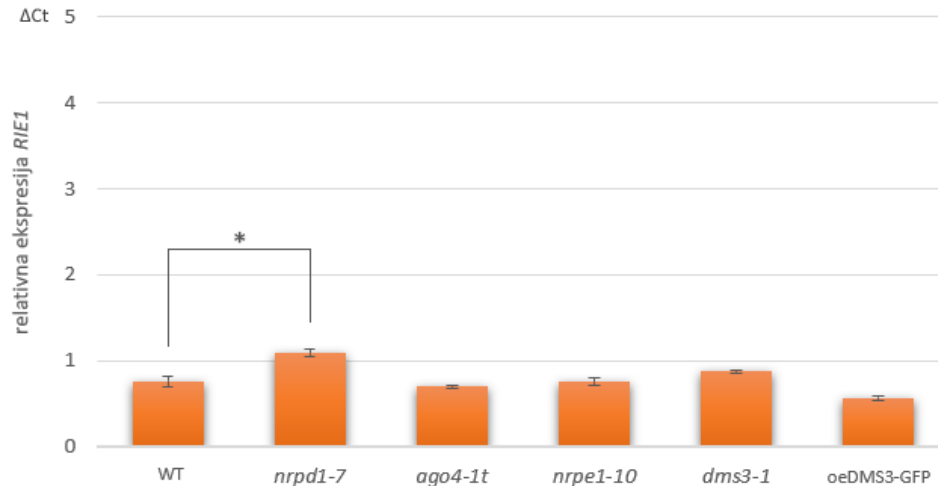
Relativna ekspresija gena *RIE1* u divljem tipu i mutantima uročnjaka tijekom faze indukcije SE analizirana je metodom qPCR te izražena vrijednostima $\Delta\Delta C_t$ i ΔC_t uz korištenje održavateljskih gena *RHIP1* i *TIP41* kao endogene kontrole (**Slike 23 i 24**). Kao i kod analize ekspresije gena *LEC2*, također je nedostajala linija *drm1/drm2* te je analiza ekspresije gena u indukcijskoj fazi bila napravljena na temelju samo jedne biološke replike zbog poteškoća s izolacijom dovoljnog broja zigotnih embrija.

U fazi indukcije SE, ekspresija *RIE1* nije se značajno razlikovala od ekspresije u divljem tipu uročnjaka s iznimkom u liniji *nrpd1-7* (**Slika 23**). Međutim, i u toj liniji je relativno povećanje ekspresije *RIE1* u odnosu na divlji tip bilo blago. Iako je za gen *RIE1* pokazano da je njegova ekspresija regulirana mehanizmom RdDM, u fazi indukcije SE kontrola ekspresije *RIE1* nije ovisila o mehanizmu RdDM. Iako nije statistički značajna, postoji razlika u razini ekspresije gena *RIE1* u mutantu s nefunkcionalnim proteinom DMS3 (linija *dms3-1*) i u transgeničnoj liniji s prekomjerno ekspimiranim proteinom DMS3 (linija oeDMS3-GFP). U liniji s nefunkcionalnim proteinom DMS3 došlo je do blagog povećanja

ekspresije gena *RIE1* u odnosu na onu u liniji s prekomjernom ekspresijom proteina DMS3. Navedena razlika u ekspresiji eventualno ukazuje na ulogu mehanizma RdDM u regulaciji ekspresije gena *RIE1* budući da je ekspresija manja u funkcionalnoj metilacijskoj mutanti *oeDMS3-GFP*. Unatoč tome, na temelju glavnine rezultata, nije pokazana povezanost mehanizma RdDM i ekspresije gena *RIE1* tijekom indukcije SE.



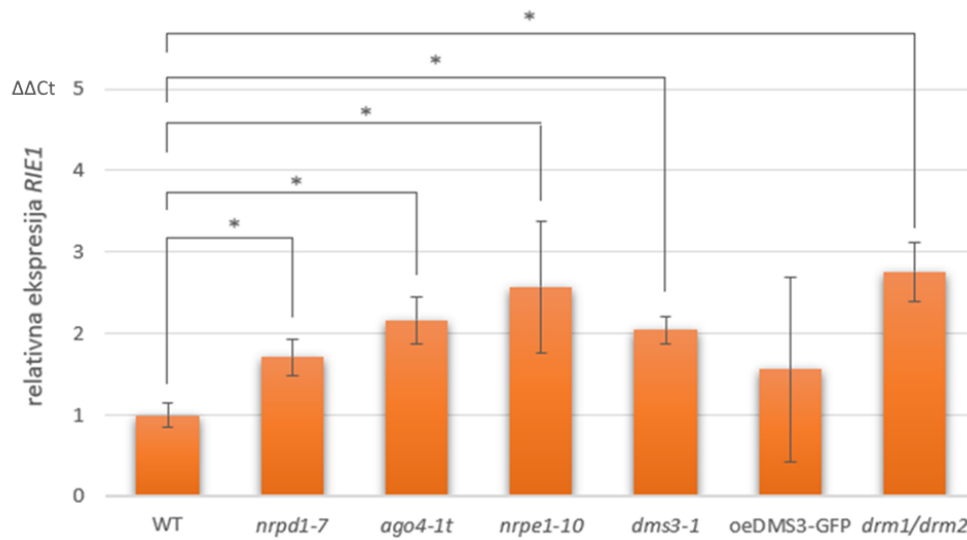
Slika 23. Relativna ekspresija gena *RIE1* analizirana metodom $\Delta\Delta Ct$ tijekom faze indukcije SE u mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nrpd1-7*), mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), mutantu za DMS3 (*dms3-1*) te u transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno ekspimiran DMS3 (*oeDMS3-GFP*) u usporedbi s divljim tipom (WT). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti $\Delta\Delta Ct$ s pripadajućim standardnim devijacijama u dva ponavljanja eksperimenta. Zvezdicom (*) je označena vrijednost koja je statistički značajno različita (p-vrijednost $\leq 0,05$) za dvije biološke replike dobivene T-testom (WT – *nrpd1-7*: 0,04983).



Slika 24. Relativna ekspresija gena *RIE1* izražena vrijednošću ΔCt tijekom faze indukcije SE u divljem tipu (WT), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nrpd1-7*), mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), mutantu za DMS3 (*dms3-1*) te u transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno ekspimiran DMS3 (oeDMS3-GFP). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti ΔCt dviju tehničkih replika u jednom ponavljanju eksperimenta s pripadajućim standardnim greškama. Zvezdicom (*) je označena vrijednost koja je statistički značajno različita (p -vrijednost $\leq 0,05$) za dvije tehničke replike dobivene T-testom (WT – *nrpd1-7*: 0,04983).

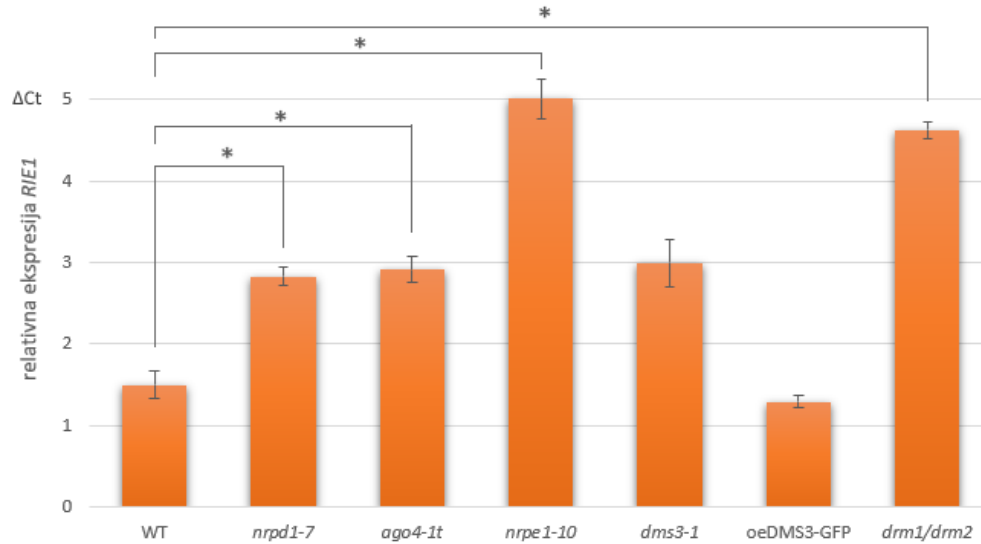
3.4.4 Relativna ekspresija gena *RIE1* tijekom sazrijevanja somatskih embrija

Provedena je analiza relativne ekspresije gena *RIE1* tijekom faze sazrijevanja somatskih embrija. Analiza ekspresije gena *RIE1* u jednoj biološkoj replici pokazala je slabu razinu ekspresije u svim linijama (**Prilog III**). Unatoč tome, kako bi se smanjila mogućnost neutemeljenih interpretacija kao statistički značajnih, tijekom statističke analize u obzir su bile uzete obje biološke replike (**Slika 25**). Tijekom faze sazrijevanja somatskih embrija, relativna ekspresija gena *RIE1* u odnosu na divlji tip bila je statistički značajno veća u svim mutantima osim u funkcionalnom metilacijskom mutantu oeDMS3-GFP (**Slika 25**). Ekspresija je bila najveća u mutantima s nefunkcionalnom RNA Pol V (linija *nrpe1-10*) te metiltransferazama DRM1 i DRM2 (linija *drm1/drm2*). Nefunkcionalnost mehanizma RdDM odražavala se na ekspresiju *RIE1* budući da je njegova ekspresija bila veća u nefunkcionalnim mutantima nego u divljem tipu, ukazujući na eventualan učinak gubitka metilacijske aktivnosti mehanizma RdDM na povećanu ekspresiju gena *RIE1*. U odnosu na nefunkcionalnog mutanta DMS3 (linija *dms3-1*), ekspresija *RIE1* u funkcionalnom metilacijskom mutantu DMS3 (linija oeDMS-GFP) bila je smanjena što upućuje na važnost proteina DMS3 tijekom regulacije metilacije, odnosno ekspresije gena *RIE1*. Štoviše, ekspresija u liniji oeDMS3-GFP nije se značajno razlikovala od divljeg tipa (**Slika 25**).



Slika 25. Relativna ekspresija gena *RIE1* analizirana metodom $\Delta\Delta C_t$ tijekom faze sazrijevanja somatskih embrija u mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nrpd1-7*), mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), mutantu za DMS3 (*dms3-1*) te u transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno ekspimiran DMS3 (oeDMS3-GFP) u usporedbi s divljim tipom (WT). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti $\Delta\Delta C_t$ dva ponavljanja eksperimenta s pripadajućim standardnim devijacijama. Zvezdicama (*) su označene vrijednosti koje su statistički značajno različite (p -vrijednost $\leq 0,05$) za dvije tehničke replike dobivene pomoću T-testa (WT – *nrpd1-7*: 0,00234; WT – *ago4-1t*: 0,00103; WT – *nrpe1-10*: 0,02432; WT – *dms3-1*: 0,00009; WT – *drm1/drm2*: 0,00084).

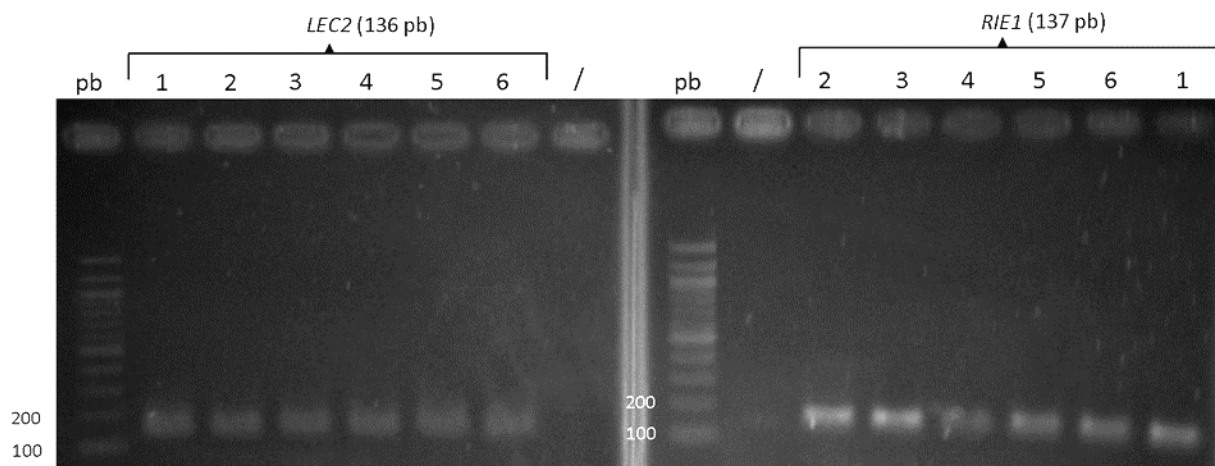
U usporedbi s fazom indukcije SE, ekspresija *RIE1* se povećala u fazi sazrijevanja u divljem tipu te u svim mutantima (Slike 24 i 26) što s jedne strane ukazuje na važnost ekspresije *RIE1* tijekom sazrijevanja somatskih embrija. S druge strane, rezultat ukazuje i na povezanost nefunkcionalnog mehanizma RdDM s povećanom ekspresijom gena *RIE1*. Povećanje ekspresije u fazi sazrijevanja u odnosu na indukcijsku fazu bilo je najveće u nefunkcionalnim mutantima mehanizma RdDM.



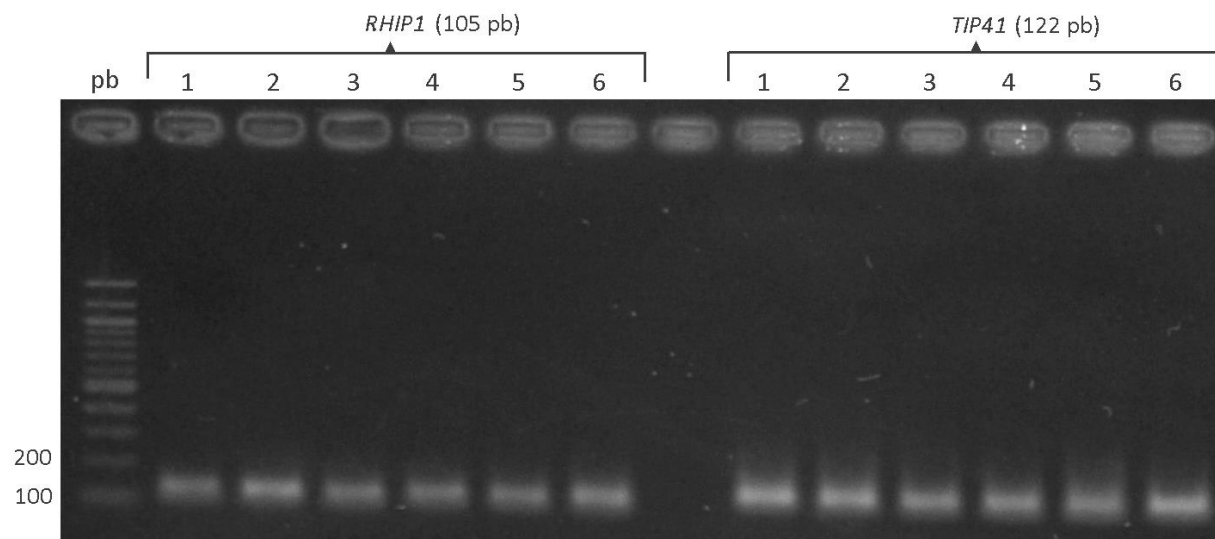
Slika 26. Relativna ekspresija gena *RIE1* u fazi sazrijevanja somatskih embrija u divljem tipu (WT), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nrpd1-7*), mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), mutantu za DMS3 (*dms3-1*), transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno ekspimiran DMS3 (oeDMS3-GFP) te u mutantu za metilaze DRM1 i DRM2 (*drm1/drm2*). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti ΔC_t jednog ponavljanja eksperimenta s pripadajućim standardnim greškama. Zvezdicama (*) su označene vrijednosti koje su statistički značajno različite (p -vrijednost $\leq 0,05$) za dvije tehničke replike dobivene pomoću T-testa (WT – *nrpd1-7*: 0,03325; WT – *ago4-1t*: 0,0257; WT – *nrpe1-10*: 0,0106; WT – *drm1/drm2*: 0,007998).

3.4.5 Potvrda uspješnosti umnažanja gena *LEC2* i *RIE1* nakon metode qPCR

Nakon provedenog qPCR-a za gene *LEC2* i *RIE1* te održavateljske gene *RHIP1* i *TIP41*, provedena je agarozna gel elektroforeza na po jednoj nasumično odabranoj tehničkoj replici iz faze indukcije SE i faze sazrijevanja embrija, u svrhu dokazivanja prisutnosti jedinstvenog fragmenta očekivane veličine. U fazi indukcije SE u uzorcima svih korištenih linija bio je detektiran fragment DNA umnožen početnicama specifičnima za gene *LEC2* i *RIE1* (Slika 27). Duljine fragmenata umnoženih početnicama *LEC2* i *RIE1* su 136 pb, odnosno 137 pb. Na gelu su bile vidljive vrpce koje odgovaraju tim fragmentima DNA. U fazi indukcije SE, u uzorcima su također uspješno bili detektirani fragmenti DNA dobiveni umnažanjem održavateljskih gena *RHIP1* i *TIP41* koji su služili kao endogena kontrola u metodi qPCR (Slika 28). Pozicija vrpce nalazila se malo iznad pozicije od 100 pb što se slagalo s veličinom umnoženih fragmenata DNA. Veličina umnoženog gena *RHIP1* na kalupu cDNA je 105 pb, dok je veličina umnoženog gena *TIP41* 122 pb.

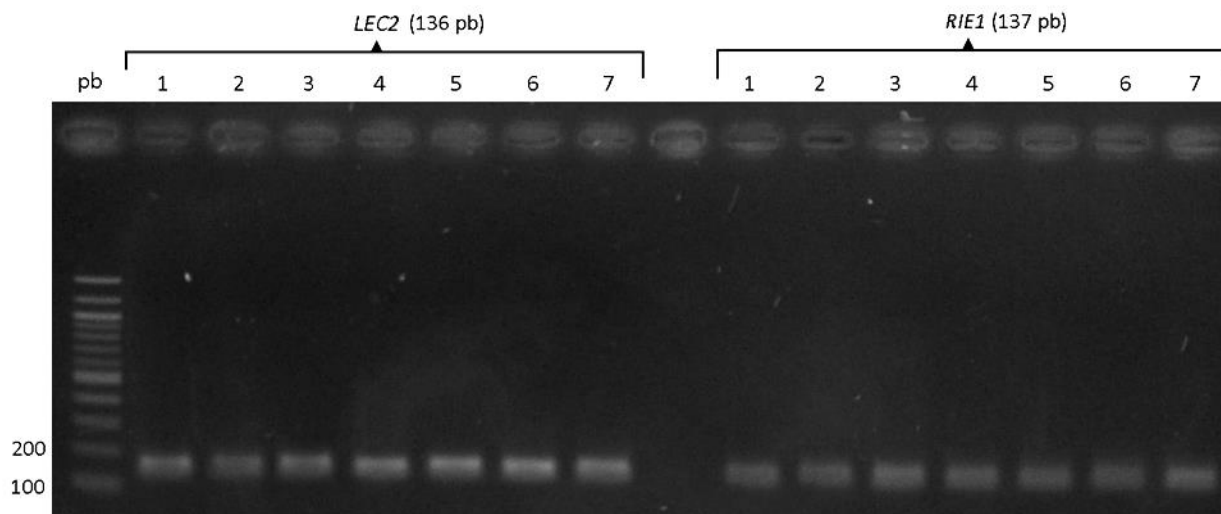


Slika 27. Fragmenti DNA dobiveni specifičnim umnažanjem gena *LEC2* i *RIE1* metodom qPCR koristeći kao kalup uzorke cDNA iz faze indukcije SE. Veličine umnoženih fragmenata prikazane su u zagradi pored naziva umnoženog gena. Brojevima su označeni uzorci pojedinih linija. **pb** – molekularni biljeg “GeneRuler 100 pb DNA Ladder” s označenim veličinama fragmenta pored vrpcei, **1** – divlji tip (WT), **2** – mutant *ago4-1t*, **3** – mutant *nprd1-7*, **4** – mutant *nrpe1-10*, **5** – mutant *dms3-1*, **6** – transgenična linija *oeDMS3-GFP*.

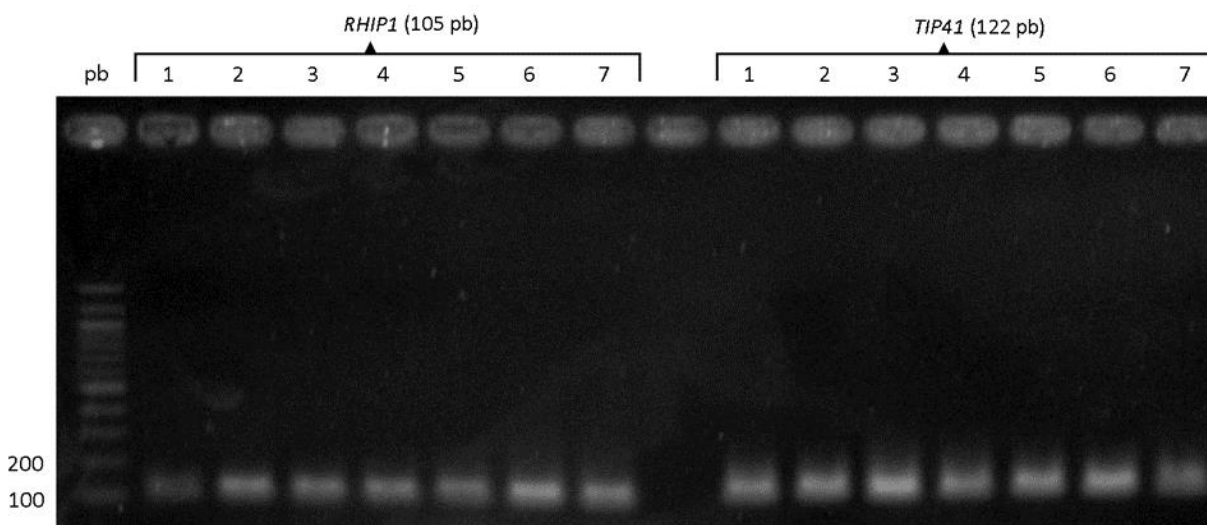


Slika 28. Fragmenti DNA dobiveni specifičnim umnažanjem gena *RHIP1* i *TIP41* metodom qPCR koristeći kao kalup uzorke cDNA iz faze indukcije SE. Veličine umnoženih fragmenata prikazane su u zagradi pored naziva umnoženog gena. Brojevima su označeni uzorci pojedinih linija. **pb** – molekularni biljeg “GeneRuler 100 pb DNA Ladder” s označenim veličinama fragmenta pored vrpca, **1** – divlji tip (WT), **2** – mutant *ago4-1t*, **3** – mutant *nprd1-7*, **4** – mutant *nrpe1-10*, **5** – mutant *dms3-1*, **6** – transgenična linija *oeDMS3-GFP*.

U uzorcima iz faze sazrijevanja somatskih embrija su se agaroznom gel elektroforezom uspješno detektirali fragmenti DNA specifično umnoženi početnicama za gene *LEC2* i *RIE1* (**Slika 29**) te za održavateljske gene *RHIP1* i *TIP41* koji su služili kao endogena kontrola u metodi qPCR (**Slika 30**). Kao i u uzorcima iz faze indukcije, pozicija vrpca na gelu odgovarala je očekivanim veličinama fragmenta.



Slika 29. Fragmenti DNA dobiveni specifičnim umnažanjem gena *LEC2* i *RIE1* metodom qPCR koristeći kao kalup uzorke cDNA iz faze sazrijevanja somatskih embrija. Veličine umnoženih fragmenata prikazane su u zagradi pored naziva umnoženog gena. Brojevima su označeni uzorci pojedinih linija. **pb** – molekularni biljeg “GeneRuler 100 pb DNA Ladder” s označenim veličinama fragmenta pored vrpca, **1** – divlji tip (WT), **2** – mutant *ago4-1t*, **3** – mutant *nprd1-7*, **4** – mutant *nrpe1-10*, **5** – mutant *dms3-1*, **6** – transgenična linija oeDMS3-GFP, **7** – mutant *drm1/drm2*



Slika 30. Fragmenti DNA dobiveni specifičnim umnažanjem održavateljskih gena *RHIP1* i *TIP41* metodom qPCR koristeći kao kalup uzorke cDNA iz faze sazrijevanja somatskih embrija. Veličine umnoženih fragmenata prikazane su u zagradi pored naziva umnoženog gena. Brojevima su označeni uzorci pojedinih linija. **pb** – molekularni biljeg “GeneRuler 100 pb DNA Ladder” s označenim veličinama fragmenta pored vrpca, **1** – divlji tip (WT), **2** – mutant *ago4-1t*, **3** – mutant *nprd1-7*, **4** – mutant *nrpe1-10*, **5** – mutant *dms3-1*, **6** – transgenična linija oeDMS3-GFP, **7** – mutant *drm1/drm2*.

4 Rasprava

4.1 Somatska embriogeneza i metilacija DNA

Iako su procesi zigotne i somatske embriogeneze s aspekta njihova ishodišta različiti, postoje brojni pokazatelji njihove sličnosti. Tako somatska stanica kompetentna za embriogenezu može imitirati zigotni obrazac diobe i dijeliti se asimetrično (Dodeman i sur., 1997), formirajući strukturu nalik na suspenzor i ishodište somatskog embrija (Leljak-Levanić i sur., 2015). Nadalje, embriogene kulture objedinjuju embriogene i neembriogene nakupine stanica (Matthys-Rochon, 2005) te u svakoj postoje, uz razvijajuće embrije, i stanične nakupine čija sudbina nije reproduktivna. Daljnji razvoj somatskih i zigotnih embrija temelji se na uzastopnom formiranju morfološki sličnih embriogenih stadija (Ikeda-Iwai i sur., 2003). Osim morfološke sličnosti, regulatorna uloga sličnih setova transkripcijskih faktora koji se eksprimiraju tijekom SE i ZE sugerira da su oba procesa regulirana sličnim genetičkim mehanizmima (Jin i sur., 2013; Gliwicka i sur., 2013; Leljak-Levanić i sur., 2015). Nadalje, postoje i brojni pokazatelji da je sličnost bazirana i na epigenetičkoj razini. Uzorci metilacije DNA u embriogenezi proučavani su u brojnim vrstama poput uročnjaka (Bouyer i sur., 2017; Ingouff i sur., 2017; Xiao i sur., 2006), soji (Ji i sur., 2019), repi (Chakraborty i sur., 2021) i pamuku (Guo i sur., 2020). Također, već je duže vrijeme poznato da je dinamika metilacije presudna za normalan reproduktivni razvoj te da u slučaju narušenih obrazaca metilacije ne dolazi do normalnog utemeljenja razvojnih osi, dinamike staničnih dioba i uspostave gradijenta auksina (Xiao i sur., 2006). Sve više novijih istraživanja ukazuje na značaj mehanizma RdDM kao dominantnog mehanizma kontrole metilacije DNA tijekom reproduktivnog razvoja i ZE (Jullien i Berger, 2010; Ibarra i sur., 2012; Bouyer i sur., 2017; Ingouff i sur., 2017; Han i sur., 2019).

Jedan od pristupa razjašnjavanja uloge metilacije DNA u embriogenezi jest analiza aktivnosti različitih metiltransferaza. Utvrđeno je da su dinamične promjene metilacije koje se događaju u zigoti ovisne o dostupnosti različitih DNA metiltransferaza. Jajnu stanicu karakterizira izrazito niska razina ekspresije gena *MET1* i *CMT3* te izrazito visoka razina ekspresije metiltransferaza klase DRM (DRM1 i DRM2), a i ostalih komponenti mehanizma RdDM (geni za proteine porodice ARGONAUTE, za RNA Pol IV, RNA Pol V te gen za protein DMS3) što ukazuje na značaj mehanizma RdDM (Jullien i sur., 2012). Nadalje, tijekom zigotne embriogeneze gubitak funkcije metiltransferaza DRM1 i DRM2, uključenih u RdDM, izaziva degeneraciju fenotipa u fazama vezanima uz inicijaciju embriogeneze (Markulin i sur., 2021).

Sukladno navedenim rezultatima na modelu zigotne embriogeneze, u ovome radu pokazala sam značaj mehanizma RdDM pri indukciji SE te sam pokazala da uloga mehanizma RdDM opada tijekom sazrijevanja embrija. Tijekom faze indukcije, indukcijski potencijal značajno je pao u mutantima s nefunkcionalnim RNA polimerazama IV i V te s nefunkcionalnim metiltransferazama DRM1 i DRM2. Navedeno sugerira da je regulacija metilacije DNA mehanizmom RdDM nužna za reprogramiranje obrasca ekspresije gena ishodišne diferencirane stanice u embriogenu stanicu. S druge strane, nefunkcionalnost metiltransferaza MET1 i CMT3 reflektira se na sam razvitak embrija (Jullien i sur., 2012). Tijekom sazrijevanja somatskog embrija i progresije SE, značaj mehanizma RdDM opadao je i u mome radu, što se očitivalo manjom produktivnosti SE i potencijalom sazrijevanja mutanata od divljeg tipa. Navedeno ukazuje da oba procesa, zigotna i somatska embriogeneza, dijele zajedničke epigenetičke mehanizme.

4.2 Geni *LEC2*, *RIE1*, *MYB115* i *ECA1* potencijalno su regulirani mehanizmom RdDM

Novija su istraživanja usmjerena prema identifikaciji gena specifičnog za kontrolu razvoja, uključujući embriogenezu, a čija je ekspresija ujedno regulirana metilacijom DNA. U tom smjeru su Grzybkowska i sur. (2018) pokazali da se učinci globalne demetilacije potaknute 5-azacitidinom u uročnjaku iskazuju vrlo specifično, a to je značajnim smanjenjem razine transkripata gena vezanih za SE, uključujući i *LEC2*, te smanjenim potencijalom za indukciju SE. Navedeno nedvojbeno sugerira značajnost provedbe analiza metilacije DNA i ekspresije na razini pojedinačnih regulatornih gena SE te na povezanost njihove regulacije s pojedinim metilacijskim mehanizmima. U svom sam radu odabrala četiri gena čija je funkcija tijekom embriogeneze opisana, a koji bi mogli biti regulirani metilacijskim mehanizmom RdDM. Kao referentnu bazu koristila sam ontološku bazu podataka koju sam pretražila prema funkcionalnim anotacijama gena genske ontologije “somatska embriogeneza” u uročnjaku. Na taj način pronašla sam gene povezane s biološkim procesom somatske embriogeneze. Neočekivano, radilo se samo o 13 gena. Budući da je prema relevantnoj literaturi poznato da postoji barem 510 gena *EMB* koji su uključeni u zigotnu embriogenezu u uročnjaku (Meinke, 2019), bilo je očekivano da će se pretragom gena koji su uključeni u somatsku embriogenezu u bazi podataka “Gene Ontology” identificirati veći broj gena. Stoga sam svoje pretraživanje proširila uključivši provjeru pozicioniranja RNA Pol V na genom te u odnosu na specifičan gen povezan s embriogenezom, a prema podacima preuzetima iz Markulin i sur. (2021). Pretraživanje gena koji bi mogli biti regulirani metilacijskim mehanizmom RdDM temeljila sam na pozicioniranju RNA Pol V u odnosu na mjesto početka transkripcije. Navedenom pretragom selektirala sam uz *LEC2* i *MYB115* gene *RIE1* i *ECA1* kod kojih je pozicioniranje RNA Pol V bilo unutar

50 pb od mjesta početka transkripcije. Prema radovima Zhong i sur. (2012) te Markulin i sur. (2021), takvi geni potencijalno su regulirani mehanizmom RdDM. U ovome radu odredila sam njihovu relativnu ekspresiju tijekom SE povezanu s funkcionalnosti mehanizma RdDM upotrebom mutanata za navedeni mehanizam. Relativnu ekspresiju gena *MYB115* i *ECA1* nisam uspjela odrediti zbog neuspješnosti umnažanja u reakciji qPCR. Mogući razlog za neuspješnost umnažanja gena *MYB115* je veličina produkta koji nastaje primjenom korištenih početnica te je moguće da je vrijeme elongacije bilo prekratko. U slučaju gena *ECA1*, moguće da je uzrok neuspješnog umnažanja bio nespecifično vezanje početnica za srodne gene, budući da je poznato da u genomu uročnjaka postoji 124 gena porodice *ECA1* (Sprunck i sur., 2014).

S ciljem ukazivanja na povezanost ekspresije s mehanizmom RdDM te združenim učincima metilacije i ekspresije na proces SE, u ovome radu, jedan od detaljno analiziranih gena bio je gen *RIE1*. Gen *RIE1* kodira za regulatorni protein koji sadrži domenu cinkovih prstiju RING-H2 i prvi puta je okarakteriziran u uročnjaku (Xu i Li, 2003.). Motivi koji vežu atom cinka jako variraju u strukturi, pa tako i u funkciji. Smatra se da se protein RIE1 pomoću domene RING-H2 veže za staničnu membranu te da je uključen u sustav ubikvitinacije koji je važan za regulaciju važnih staničnih procesa. Podaci o specifičnoj metilaciji ovoga gena ne postoje te je pozicioniranje metilacijskog kompleksa mehanizma RdDM jedini kriterij koji ukazuje na kontrolu njegove ekspresije mehanizmom RdDM.

Drugi analizirani gen bio je *LEC2*. U uročnjaku postoje tri gena iz porodice *LEC*, geni *LEC1*, *LEC2* i *FUS3*, koji se ekspimiraju isključivo u embriju (Lotan i sur.; 1998; Luerssen i sur., 1998; Stone i sur., 2001). Njihova ektopična ekspresija dovodi do toga da vegetativne stanice poprime karakteristike somatskih embrija, stoga je ova genska porodica povezana s procesom SE. Transkripcijski faktor *LEC2* potiče aktivnost gena *YUCCA2* i *YUCCA4* koji sudjeluju u biosintezi auksina (Stone i sur., 2008; Braybrook i sur., 2006; Wójcikowska i sur., 2013). Autori su pokazali da prekomjerna ekspresija *LEC2* može nadomjestiti potrebu kultiviranih eksplantata za egzogenim auksinom zbog povećane biosinteze auksina, dok mutant *lec2* pokazuje smanjeni embriogeni odgovor *in vitro* (Gaj i sur., 2005). Stoga je reducirana stopa indukcije SE, koju sam pokazala u ovome radu na transgeničnim biljkama s nefunkcionalnim mehanizmom RdDM, barem djelomično posljedica funkcioniranja mehanizma RdDM na kontrolu ekspresije gena *LEC2* tijekom indukcije SE. Nadalje, razlike u indukcijskom potencijalu koje su se utvrdile u ovome radu između adaksijalne i abaksijalne strane kotiledona u mutantima s nefunkcionalnom RNA Pol IV te metiltransferazama DRM1 i DRM2 mogle bi biti povezane s transportom auksina i pozicioniranjem auksinskog maksimuma na abaksijalnoj strani (Friml, 2003).

Dobiveni rezultat koji je ukazivao na vezu mehanizma RdDM i ekspresije gena *LEC2* zanimljiv je i sa stajališta pozicioniranja RNA Pol V na udaljenost do oko 3000 pb od mjesta početka transkripcije

LEC2 što predstavlja relativno veliku udaljenost koja navedeni gen ne bi kategorizirala kao gen koji je reguliran mehanizmom RdDM (Zhong i sur., 2012) što je diskutirano u sljedećem poglavlju.

4.3 Ovisnost ekspresije gena *LEC2* i *RIE1* o funkcionalnosti mehanizma RdDM

Eksperimentalni podaci dobiveni metodom ChiP-sekvenciranja upućuju na to da se RNA Pol V veže za DNA oko 3000 pb uzvodno od promotora gena *LEC2* te da vezno mjesto tek rubno dotiče mjesto početka transkripcije, tako da je gen *LEC2* tek potencijalno reguliran mehanizmom RdDM (Liu i sur., 2018; Gallego-Bartolomé i sur., 2019). Prema Zhong i sur. (2012), RNA Pol V veže se za promotore gena te gubitak njene najveće podjedinice NRPE1 dovodi do njene nefunkcionalnosti. Kada je RNA Pol V nefunkcionalna, učinak njenog gubitka na ekspresiju gena je povećanje ekspresije, a učinak je jači za one gene kod kojih se vezujuće mjesto RNA Pol V nalazi bliže mjestu početka transkripcije gena. Tijekom indukcije SE ekspresija gena *LEC2* bila je niža u svim mutantima mehanizma RdDM od one u divljem tipu s izuzetkom mutanta za veliku podjedinicu RNA Pol V što upućuje na to da je ekspresija gena *LEC2* pod kontrolom mehanizma metilacije RdDM. Prema gore navedenom, za očekivati je da će ekspresija gena *LEC2* u nefunkcionalnim mutantima mehanizma RdDM biti veća nego u divljem tipu budući da je mehanizam utišavanja gena narušen, no rezultati dobiveni u ovome radu pokazuju suprotno. Nefunkcionalnost mehanizma RdDM korelirala je s padom ekspresije gena *LEC2*, pogotovo tijekom faze indukcije, faze u kojoj *LEC2* ostvaruje svoju primarnu ulogu. Navedeno može biti uzrokovano samim pozicioniranjem RNA Pol V u odnosu na mjesto početka transkripcije gena *LEC2*, budući da samo pozicioniranje metilacijske mašinerije mehanizma RdDM regulira hoće li metilacija imati stimulativan ili inhibitoran učinak na ekspresiju gena (Zhong i sur., 2012). Nadalje, osim kanonskog oblika mehanizma RdDM, postoje i nekanonski oblici u kojima se pojedine komponente mehanizma mogu zamijeniti drugim proteinima i molekulama RNA koji obnašaju sličnu funkciju, kao što je primarno RNA polimeraza II (Cuerda-Gil i Slotkin, 2016).

Osim RNA pol IV, molekule siRNA uključene u mehanizam RdDM može transkribirati i RNA Pol II. RNA pol II transkribira nesavršeno sparane intramolekulske dvolančane molekule RNA koje formiraju strukturu ukosnice. Ribonukleaze DCL kompetiraju za ove dvolančane molekule RNA na hijerarhijski način što obično rezultira stvaranjem dva tipa malih molekula RNA. Jedan tip su molekule RNA duljine 21-22 nukleotida koje sudjeluju u mehanizmu posttranskripcijskog utišavanja gena, a drugi tip su molekule siRNA duljine 24 nukleotida (Henderson i sur., 2006). Intramolekulske dvolančane molekule RNA nastaju transkripcijom invertno ponavljajućih sekvenci DNA te nakon što se pocijepaju mogu djelovati u mehanizmu RdDM *in cis* na samom invertnom ponavljanju DNA ili *in trans* (Wu i sur., 2010).

Mehanizam transkripcije molekula siRNA pomoću RNA pol II mogao bi objasniti smanjenje razine ekspresije gena *LEC2* u liniji s nefunkcionalnom RNA pol IV (linija *nripd1-7*).

U kanonskom mehanizmu RdDM osim proteina AGO4 sudjeluju i proteini AGO6 i AGO9. Protein AGO6 je djelomično redundantan s AGO4 (Eun i sur., 2011), a AGO9 se specifično eksprimira u reproduktivnom tkivu (Olmedo-Monfil i sur., 2010). Sva tri navedena proteina pripadaju proteinskoj porodici ARGONAUTE za koju su karakteristične domene PAZ i MID pomoću kojih vežu molekule siRNA. U liniji s nefunkcionalnim AGO4, njegova funkcija mogla bi biti nadomještena proteinima AGO6 i/ili AGO9 zbog čega je razina ekspresije gena *LEC2* u mutantu *ago4-1t* smanjena u odnosu na divlji tip. Osim zamjene funkcije AGO4 srodnim proteinima AGO6 i AGO9, moguće je da u ovom mutantu djeluje nekanonski mehanizam RdDM posredovan proteinom NERD (engl. *Needed for RDR2-independent DNA methylation*). Protein NERD stupa u interakciju s AGO2, RNA Pol IV i RNA Pol V te kompleks NERD-AGO2 može zamijeniti ulogu AGO4 (Pontier i sur., 2012).

Regulacija ekspresije gena *LEC2* se osim mehanizmom RdDM može regulirati i drugim metilacijskim mehanizmima DNA. Dvostruki mutant *drm1/drm2* i mutant *cmt3* pokazuju slabo smanjenje u razini metilacije DNA, no u trostrukom mutantu *ddc (drm1/drm2/cmt3)* dolazi do značajnog smanjenja metilacije na asimetričnim sljedovima DNA što je znak redundancije ovih dviju metilaza (Cao i sur., 2003). Simetrični sljedovi CG mogu se metilirati održavateljskom metilazom MET1. Stoga u mutantu s nefunkcionalnim metilazama *de novo* DRM1 i DRM2 njihovu funkciju mogu djelomično zamijeniti druge metilaze, ponajviše CMT3.

Nadalje, metodom krioelektronske mikroskopije određena je struktura kompleksa DDR (Wongpalee i sur., 2019) te je ustanovljeno da je preduvjet za formiranje kompleksa DDR stvaranje homodimera RDM1. Protein RDM1 je neophodan za funkciju mehanizma RdDM budući da je on do sada jedini poznati protein koji direktno stupa u interakciju s metiltransferazom DRM2 i proteinom AGO4 čime povezuje dvije grane mehanizma RdDM i dovodi DRM2 na ciljno mjesto u genomu (Sasaki i sur., 2014). S dimernom jezgrom proteina RDM1 u interakciju stupaju dva dimera proteina DMS3 čineći stabilan kompleks koji je neophodan za dovođenje RNA Pol V na ciljno mjesto te za njenu procesivnost. U transgeničnoj liniji s prekomjernom ekspresijom DMS3 (*oeDMS3-GFP*) moguće je da dolazi do potrošnje proteina RDM1 jer se veže za prekomjernu količinu DMS3 u stanici te tako ne može više obnašati svoju funkciju dovođenja DRM2 na ciljno mjesto.

U indukcijskoj fazi SE u mutantu s nefunkcionalnom velikom podjedinicom RNA Pol V (linija *nripe1-10*) došlo je do povećanja ekspresije *LEC2*. RNA Pol V neophodna je za transkripciju molekula lncRNA koje se komplementarno sparuju s molekulama siRNA vezanima za AGO4. Protein RDM1

povezuje proteine AGO4 i DRM2 te tako regrutira metiltransferazu DRM2 na mjesto transkripcije lncRNA RNA polimerazom V, prilikom čega dolazi do metilacije DNA i uspostave heterokromatičnog stanja. Mutacija u velikoj podjedinici RNA Pol V dovodi do nemogućnosti vezanja RNA Pol V za DNA što konačno za posljedicu ima nemogućnost metiliranja DNA. RNA Pol V jedina je komponenta mehanizma RdDM uključena u ovo istraživanje čija se funkcija ne može nadomjestiti drugim komponentama što se slaže s dosadašnjom literaturom prema kojoj je poznato da je RNA Pol V potrebna za djelovanje svih nekanonskih mehanizama RdDM (Cuerda-Gil i Slotkin, 2016). Ovaj podatak objašnjava rezultat povećane ekspresije gena *LEC2* u mutantu s nefunkcionalnom velikom podjedinicom RNA Pol V. Nefunkcionalnost mehanizma RdDM se na kontrolu ekspresije gena *LEC2* značajnije odražavala tijekom indukcije SE, odnosno tijekom faze u kojoj navedeni gen ima esencijalnu ulogu (Stone i sur., 2001). Samo pozicioniranje RNA Pol V u odnosu na gen *LEC2* ostavlja otvorena pitanja o dominaciji mehanizma RdDM u kontroli metilacije i ekspresije gena *LEC2*.

Učinak mehanizma RdDM jači je za one gene kod kojih se vezujuće mjesto RNA Pol V nalazi bliže mjestu početka transkripcije (Zhong i sur., 2012). Jedan od njih je nedvojbeno gen *RIE1* kod kojeg je glavina pozicioniranja RNA Pol V do 50 pb udaljenosti od mjesta početka transkripcije, prekrivajući i samo mjesto početka transkripcije (Markulin i sur., 2021). Konstitutivno je eksprimiran u svim biljnim tkivima, no najočitiji fenotipski učinak mutacije ovoga gena vidljiv je tijekom embrionalnog razvoja. Mutacija u genu *RIE1* uzrokuje zastoj u prijelazu iz globularnog u torpedo stadij te je letalna za razvoj embrija što ukazuje na to da gen *RIE1* ima esencijalnu regulatornu ulogu tijekom faze sazrijevanja somatskog embrija (Xu i Li, 2003.). Osim povezanosti sa sazrijevanjem embrija, detaljniji podaci o funkciji gena *RIE1* u literaturi do danas nisu opisani. Rezultati koje sam dobila analizama ekspresije gena *RIE1* u skladu su s navedenom pretpostavkom da je ovaj gen kontroliran mehanizmom RdDM, budući da je ekspresija ovoga gena u nefunkcionalnim mutantima mehanizma RdDM uglavnom bila očekivano uvećana u odnosu na divlji tip. Posebno je zanimljivo da je učinak regulacije ekspresije gena *RIE1* mehanizmom RdDM bio značajniji tijekom faze sazrijevanja embrija. Naime, pokazano je da tijekom indukcije SE ekspresija gena *RIE1* ne ovisi statistički značajno o mehanizmu RdDM, no tijekom faze sazrijevanja dolazi do statistički značajnog povećanja njegove ekspresije i to u ovisnosti o funkcionalnosti mehanizma RdDM. Suprotne rezultate prema kojima je induksijska faza bila faza dominacije mehanizma RdDM, dobila sam na temelju analiza ekspresije gena *LEC2*. Gledajući zajedno, rezultati ukazuju na to da mehanizam RdDM potencijalno ima značajnu ulogu u kontroli ekspresije gena koji u pojedinoj fazi razvitka imaju značajnije uloge. U ovome radu to bi bio *LEC2* tijekom indukcije SE, a *RIE1* tijekom sazrijevanja embrija, no za donošenje takvog zaključka potrebno je u daljnjim istraživanjima obuhvatiti više gena čija je direktna povezanost s embriogenezom u literaturi dobro opisana. Odabir bi mogao biti temeljen na bazi gena *EMB* u kombinaciji s analizama pozicioniranja RNA Pol V.

5 Zaključci

Analizom induksijskog potencijala u mutantima za pojedinu komponentu mehanizma RdDM utvrđeno je kako se potencijal za indukciju SE smanjuje u mutantima s nefunkcionalnim RNA polimerazama IV i V te s nefunkcionalnim metiltransferazama DRM1 i DRM2. Navedeno ukazuje na nužnost mehanizma RdDM tijekom faze indukcije SE. Tijekom faze sazrijevanja somatskih embrija i progresije SE, opada značaj mehanizma RdDM što je vidljivo po tome što je potencijal sazrijevanja somatskih embrija i produktivnost SE bio umanjen samo u mutantu s nefunkcionalnom RNA Pol V.

Pretragom baze podataka "Gene Ontology" i provjerom pozicioniranja RNA Pol V, utvrđeno je da su geni povezani s embriogenezom *LEC2*, *RIE1*, *MYB115* i *ECA1* vjerojatno regulirani mehanizmom RdDM budući da se RNA Pol V veže za promotore navedenih gena ili u blizini njihovih promotora.

Kontrola ekspresije gena *LEC2* ovisna je o funkcionalnosti mehanizma RdDM tijekom faze indukcije SE te manje tijekom faze sazrijevanja somatskih embrija. Tijekom indukcije, ekspresija gena *LEC2* umanjena je u svim mutantima, osim u slučaju mutanta s nefunkcionalnom RNA Pol V, ukazujući na povezanost mehanizma RdDM, ekspresije gena *LEC2* i indukcije SE. Statistički značajno smanjenje ekspresije gena *LEC2* tijekom sazrijevanja SE u odnosu na divlji tip prisutno je samo u mutantu s nefunkcionalnim metiltransferazama DRM1 i DRM2. Navedeni rezultati ukazuju na to da se gubitak metilacije zbog nefunkcionalnosti mehanizma RdDM značajnije odražava na ekspresiju gena *LEC2* njenim umanjnjem tijekom indukcije SE. Tijekom prijelaza iz faze indukcije u fazu formiranja zrelih embrija, dolazi do dodatnog blagog pada u ekspresiji gena *LEC2* ukazujući na to da je umanjena ekspresija gena *LEC2* karakteristika sazrijevanja embrija te da nije nužno povezana s mehanizmom RdDM.

U fazi indukcije SE, kontrola ekspresije gena *RIE1* ne ovisi o mehanizmu RdDM, no nefunkcionalnost mehanizma RdDM odražava se na ekspresiju tijekom faze sazrijevanja somatskih embrija. Tijekom sazrijevanja somatskih embrija, ekspresija gena *RIE1* je povišena, pogotovo u linijama s nefunkcionalnim mehanizmom RdDM. Navedeno je u skladu s razvojnom ulogom gena *RIE1* tijekom sazrijevanja somatskih embrija.

6 Literatura

Autran, D., Baroux, C., Raissig, M. T., Lenormand, T., Wittig, M., Grob, S., ... & Grossniklaus, U. (2011). Maternal epigenetic pathways control parental contributions to Arabidopsis early embryogenesis. *Cell*, *145*(5), 707-719.

Barrett, T., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I. F., Tomashevsky, M., ... & Soboleva, A. (2012). NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic acids research*, *41*(D1), D991-D995.

Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., & Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, *115*(5), 591-602.

Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V. K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., ... & van Lookeren Campagne, M. M. (2002). Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell*, *14*(8), 1737-1749.

Bouyer, D., Kramdi, A., Kassam, M., Heese, M., Schnittger, A., Roudier, F., & Colot, V. (2017). DNA methylation dynamics during early plant life. *Genome biology*, *18*(1), 1-12.

Braybrook, S. A., Stone, S. L., Park, S., Bui, A. Q., Le, B. H., Fischer, R. L., ... & Harada, J. J. (2006). Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(9), 3468-3473.

Cao, X., Aufsatz, W., Zilberman, D., Mette, M. F., Huang, M. S., Matzke, M., & Jacobsen, S. E. (2003). Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Current biology*, *13*(24), 2212-2217.

Chakraborty, T., Kendall, T., Grover, J. W., & Mosher, R. A. (2021). Embryo CHH hypermethylation is mediated by RdDM and is autonomously directed in *Brassica rapa*. *Genome biology*, *22*(1), 1-14.

- Cuerda-Gil, D., & Slotkin, R. K. (2016). Non-canonical RNA-directed DNA methylation. *Nature plants*, 2(11), 1-8.
- Dodeman, V. L., Ducreux, G., & Kreis, M. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48(8), 1493-1509.
- Erdmann, R. M., & Picard, C. L. (2020). RNA-directed DNA methylation. *PLoS genetics*, 16(10), 1-31.
- Eun, C., Lorkovic, Z. J., Naumann, U., Long, Q., Havecker, E. R., Simon, S. A., ... & Matzke, M. (2011). AGO6 functions in RNA-mediated transcriptional gene silencing in shoot and root meristems in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 6(10), e25730.
- Forgione, I., Wołoszyńska, M., Pacenza, M., Chiappetta, A., Greco, M., Araniti, F., ... & Bruno, L. (2019). Hypomethylated *drm1 drm2 cmt3* mutant phenotype of *Arabidopsis thaliana* is related to auxin pathway impairment. *Plant Science*, 280, 383-396.
- Friml, J. (2003). Auxin transport—shaping the plant. *Current opinion in plant biology*, 6(1), 7-12.
- Gaj, M. D. (2011). Somatic embryogenesis and plant regeneration in the culture of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. immature zygotic embryos. U: Thorpe, T. A., & Yeung E. C. (ur.) *Plant Embryo Culture*. New York, Humana press, 257-265.
- Gaj, M. D., Zhang, S., Harada, J. J., & Lemaux, P. G. (2005). Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta*, 222(6), 977-988.
- Gallego-Bartolomé, J., Liu, W., Kuo, P. H., Feng, S., Ghoshal, B., Gardiner, J., ... & Jacobsen, S. E. (2019). Co-targeting RNA polymerases IV and V promotes efficient de novo DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*, 176(5), 1068-1082.
- Gliwicka, M., Nowak, K., Balazadeh, S., Mueller-Roeber, B., & Gaj, M. D. (2013). Extensive modulation of the transcription factor transcriptome during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plos one*, 8(7), e69261.

Grzybkowska, D., Morończyk, J., Wójcikowska, B., & Gaj, M. D. (2018). Azacitidine (5-AzaC)-treatment and mutations in DNA methylase genes affect embryogenic response and expression of the genes that are involved in somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulation*, 85(2), 243-256.

Guo, H., Fan, Y., Guo, H., Wu, J., Yu, X., Wei, J., ... & Zeng, F. (2020). Somatic embryogenesis critical initiation stage-specific mCHH hypomethylation reveals epigenetic basis underlying embryogenic redifferentiation in cotton. *Plant Biotechnology Journal*, 18(8), 1648.

Gutzat, R., & Scheid, O. M. (2012). Epigenetic responses to stress: triple defense? *Current opinion in plant biology*, 15(5), 568-573.

Han, Q., Bartels, A., Cheng, X., Meyer, A., An, Y. Q. C., Hsieh, T. F., & Xiao, W. (2019). Epigenetics regulates reproductive development in plants. *Plants*, 8(12), 564.

Hand, M. L., de Vries, S., & Koltunow, A. M. (2016). A comparison of in vitro and in vivo asexual embryogenesis. U: Germanà M. A., & Lambardi M. (ur.) *In vitro embryogenesis in higher plants*. New York, Humana Press, 3-23.

Henderson, I. R., & Jacobsen, S. E. (2008). Tandem repeats upstream of the *Arabidopsis* endogene SDC recruit non-CG DNA methylation and initiate siRNA spreading. *Genes & development*, 22(12), 1597-1606.

Henderson, I. R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B. C., Green, P. J., & Jacobsen, S. E. (2006). Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nature genetics*, 38(6), 721-725.

Hong-Bo, S., Zong-Suo, L., & Ming-An, S. (2005). LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 45(3-4), 131-135.

Howe, K. L., Achuthan, P., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., ... & Flicek, P. (2021). Ensembl 2021. *Nucleic acids research*, 49(D1), D884-D891.

Ibarra, C. A., Feng, X., Schoft, V. K., Hsieh, T. F., Uzawa, R., Rodrigues, J. A., ... & Zilberman, D. (2012). Active DNA demethylation in plant companion cells reinforces transposon methylation in gametes. *Science*, *337*(6100), 1360-1364.

Ikeda-Iwai, M., Umehara, M., Satoh, S., & Kamada, H. (2003). Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *34*(1), 107-114.

Ingouff, M., Selles, B., Michaud, C., Vu, T. M., Berger, F., Schorn, A. J., ... & Grimanelli, D. (2017). Live-cell analysis of DNA methylation during sexual reproduction in *Arabidopsis* reveals context and sex-specific dynamics controlled by noncanonical RdDM. *Genes & development*, *31*(1), 72-83.

Ji, L., Mathioni, S. M., Johnson, S., Tucker, D., Bewick, A. J., Do Kim, K., ... & Schmitz, R. J. (2019). Genome-wide reinforcement of DNA methylation occurs during somatic embryogenesis in soybean. *The Plant Cell*, *31*(10), 2315-2331.

Jin, F., Hu, L., Yuan, D., Xu, J., Gao, W., He, L., ... & Zhang, X. (2013). Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. *Plant Biotechnology Journal*, *12*(2), 161-173.

Jones-Rhoades, M. W., Borevitz, J. O., & Preuss, D. (2007). Genome-wide expression profiling of the *Arabidopsis* female gametophyte identifies families of small, secreted proteins. *PLoS genetics*, *3*(10), e171.

Jullien, P. E., & Berger, F. (2010). DNA methylation reprogramming during plant sexual reproduction? *Trends in genetics*, *26*(9), 394-399.

Jullien, P. E., Susaki, D., Yelagandula, R., Higashiyama, T., & Berger, F. (2012). DNA methylation dynamics during sexual reproduction in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, *22*(19), 1825-1830.

Jürgens, G., Ruiz, R. A. T., Laux, T., Mayer, U., & Berleth, T. (1994). Early events in apical-basal pattern formation in *Arabidopsis*. U: Coruzzi, G., & Puigdomènech P. (ur.) *Plant molecular biology*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 95-103.

- Kanno, T., Bucher, E., Daxinger, L., Huettel, B., Böhmendorfer, G., Gregor, W., ... & Matzke, A. J. (2008). A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. *Nature genetics*, *40*(5), 670-675.
- Kawashima, T., & Berger, F. (2014). Epigenetic reprogramming in plant sexual reproduction. *Nature Reviews Genetics*, *15*(9), 613-624.
- Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., & Zažímalová, E. (2009). The PINFORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome biology*, *10*(12), 1-11.
- Kumar, V., & Van Staden, J. (2017). New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. *Acta Physiologiae Plantarum*, *39*(9), 1-17.
- Lau, S., Slane, D., Herud, O., Kong, J., & Jürgens, G. (2012). Early embryogenesis in flowering plants: setting up the basic body pattern. *Annual review of plant biology*, *63*, 483-506.
- Leljak-Levanić, D., Mihaljević, S., & Bauer, N. (2015). Somatic and zygotic embryos share common developmental features at the onset of plant embryogenesis. *Acta physiologiae plantarum*, *37*(7), 1-14.
- Li, S. B., Xie, Z. Z., Hu, C. G., & Zhang, J. Z. (2016). A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Frontiers in plant science*, *47*(7), 1-7.
- Liu, W., Duttke, S. H., Hetzel, J., Groth, M., Feng, S., Gallego-Bartolome, J., ... & Jacobsen, S. E. (2018). RNA-directed DNA methylation involves co-transcriptional small-RNA-guided slicing of polymerase V transcripts in Arabidopsis. *Nature plants*, *4*(3), 181-188.
- Lotan, T., Ohto, M. A., Yee, K. M., West, M. A., Lo, R., Kwong, R. W., ... & Harada, J. J. (1998). Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, *93*(7), 1195-1205.
- Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2016). Somatic embryogenesis. An overview. U: Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (ur.) *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*. Switzerland, Springer International Publishing, 1-8.

Luerßen, H., Kirik, V., Herrmann, P., & Miséra, S. (1998). FUSCA3 encodes a protein with a conserved VP1/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *15*(6), 755-764.

Markulin, L., Škiljaica, A., Tokić, M., Jagić, M., Vuk, T., Bauer, N., & Levanić, D. L. (2021). Taking the Wheel—de novo DNA Methylation as a Driving Force of Plant Embryonic Development. *Frontiers in plant science*, *764999*(12), 1-17.

Matthys-Rochon, E. (2005). Secreted molecules and their role in embryo formation in plants: a min-review. *Acta Biologica Cracoviensia*, (47), 23-29.

Matzke, M. A., & Mosher, R. A. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics*, *15*(6), 394-408.

Meinke, D. W. (2020). Genome-wide identification of EMBRYO-DEFECTIVE (EMB) genes required for growth and development in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, *226*(2), 306-325.

Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., ... & Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in plant science*, *10*(77), 1-37.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, *15*(3), 473-497.

Nic-Can, G. I., & Loyola-Vargas, V. M. (2016). The role of the auxins during somatic embryogenesis. U: Loyola-Vargas, V.M. & Ochoa-Alejo, N. (ur.) *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*. Switzerland, Springer International Publishing, 171-182.

Olmedo-Monfil, V., Durán-Figueroa, N., Arteaga-Vázquez, M., Demesa-Arévalo, E., Autran, D., Grimanelli, D., ... & Vielle-Calzada, J. P. (2010). Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature*, *464*(7288), 628-632.

Park, S., & Harada, J. J. (2008). *Arabidopsis embryogenesis*. U: Suárez, M., & Bozhkov, P. V. (ur.) *Plant embryogenesis*. Totowa, Humana Press, 3-16.

Pelletier, J. M., Kwong, R. W., Park, S., Le, B. H., Baden, R., Cagliari, A., ... & Harada, J. J. (2017). LEC1 sequentially regulates the transcription of genes involved in diverse developmental processes during seed development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(32), E6710-E6719.

Pikaard, C. S., & Scheid, O. M. (2014). Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *6*(12), 1-31.

Pontier, D., Picart, C., Roudier, F., Garcia, D., Lahmy, S., Azevedo, J., ... & Lagrange, T. (2012). NERD, a plant-specific GW protein, defines an additional RNAi-dependent chromatin-based pathway in Arabidopsis. *Molecular cell*, *48*(1), 121-132.

Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir H., Winckler W., Guttman M., Lander E.S., Getz, G. & Mesirov J.P. (2011). Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotechnology*, *29*(1), 24–26.

Roeder, A. H., & Yanofsky, M. F. (2006). Fruit development in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, *4*, e0075.

RStudio Team (2021). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA

Sasaki, T., Lorković, Z. J., Liang, S. C., Matzke, A. J., & Matzke, M. (2014). The ability to form homodimers is essential for RDM1 to function in RNA-directed DNA methylation. *PLoS One*, *9*(2), e88190.

Scholten, S., Lörz, H., & Kranz, E. (2002). Paternal mRNA and protein synthesis coincides with male chromatin decondensation in maize zygotes. *The Plant Journal*, *32*(2), 221-231.

Smith, L. M., Pontes, O., Searle, I., Yelina, N., Yousafzai, F. K., Herr, A. J., ... & Baulcombe, D. C. (2007). An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *19*(5), 1507-1521.

Sprunck, S., Hackenberg, T., Enghart, M., & Vogler, F. (2014). Same same but different: sperm-activating EC1 and ECA1 gametogenesis-related family proteins. *Biochemical Society Transactions*, *42*(2), 401-407.

- Sprunck, S., Rademacher, S., Vogler, F., Gheyselinck, J., Grossniklaus, U., & Dresselhaus, T. (2012). Egg cell–secreted EC1 triggers sperm cell activation during double fertilization. *Science*, *338*(6110), 1093-1097.
- Stone, S. L., Braybrook, S. A., Paula, S. L., Kwong, L. W., Meuser, J., Pelletier, J., ... & Harada, J. J. (2008). Arabidopsis LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: implications for somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(8), 3151-3156.
- Stone, S. L., Kwong, L. W., Yee, K. M., Pelletier, J., Lepiniec, L., Fischer, R. L., ... & Harada, J. J. (2001). LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(20), 11806-11811.
- Tian, R., Paul, P., Joshi, S., & Perry, S. E. (2020). Genetic activity during early plant embryogenesis. *Biochemical Journal*, *477*(19), 3743-3767.
- Tzafrir, I., Pena-Muralla, R., Dickerman, A., Berg, M., Rogers, R., Hutchens, S., ... & Meinke, D. (2004). Identification of genes required for embryo development in Arabidopsis. *Plant physiology*, *135*(3), 1206-1220.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant cell, Tissue and Organ culture*, *69*(3), 233-249.
- Walker, J., Gao, H., Zhang, J., Aldridge, B., Vickers, M., Higgins, J. D., & Feng, X. (2018). Sexual-lineage-specific DNA methylation regulates meiosis in Arabidopsis. *Nature Genetics*, *50*(1), 130-137.
- Wierzbicki, A. T., Cocklin, R., Mayampurath, A., Lister, R., Rowley, M. J., Gregory, B. D., ... & Pikaard, C. S. (2012). Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the Arabidopsis epigenome. *Genes & development*, *26*(16), 1825-1836.
- Wongpalee, S. P., Liu, S., Gallego-Bartolomé, J., Leitner, A., Aebersold, R., Liu, W., ... & Jacobsen, S. E. (2019). CryoEM structures of Arabidopsis DDR complexes involved in RNA-directed DNA methylation. *Nature communications*, *10*(1), 1-12.

Wójcikowska, B., & Gaj, M. D. (2016). Somatic embryogenesis in Arabidopsis. U: Loyola-Vargas, V.M. & Ochoa-Alejo, N. (ur.) *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*. Switzerland, Springer International Publishing, 185-199.

Wójcikowska, B., Jaskóła, K., Gąsiorek, P., Meus, M., Nowak, K., & Gaj, M. D. (2013). LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) promotes embryogenic induction in somatic tissues of Arabidopsis, via YUCCA-mediated auxin biosynthesis. *Planta*, 238(3), 425-440.

Wójcikowska, B., Wójcik, A. M., & Gaj, M. D. (2020). Epigenetic regulation of auxin-induced somatic embryogenesis in plants. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2307.

Wu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Zhang, J., Ni, F., Liu, C., & Qi, Y. (2010). DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Molecular cell*, 38(3), 465-475.

Xiao, W., Custard, K. D., Brown, R. C., Lemmon, B. E., Harada, J. J., Goldberg, R. B., & Fischer, R. L. (2006). DNA methylation is critical for Arabidopsis embryogenesis and seed viability. *The Plant Cell*, 18(4), 805-814.

Xiong, L., & Zhu, J. K. (2003). Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant physiology*, 133(1), 29-36.
Xu, R., & Li, Q. Q. (2003). A RING-H2 zinc-finger protein gene RIE1 is essential for seed development in Arabidopsis. *Plant molecular biology*, 53(1), 37-50.

Zhao, Y. (2012). Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Molecular plant*, 5(2), 334-338.

Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The plant cell*, 5(10), 1411.

https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/annotations?goUsage=descendants&goUsageRelationships=is_a,part_of,occurs_in&goId=GO:0010262&taxonId=3702&taxonUsage=descendants (pristupljeno 29.12.2021.)

https://plants.ensembl.org/Arabidopsis_thaliana/Info/Index (pristupljeno 29.12.2021.)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (pristupljeno 29.12.2021.)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM2667837> (pristupljeno 29.12.2021.)

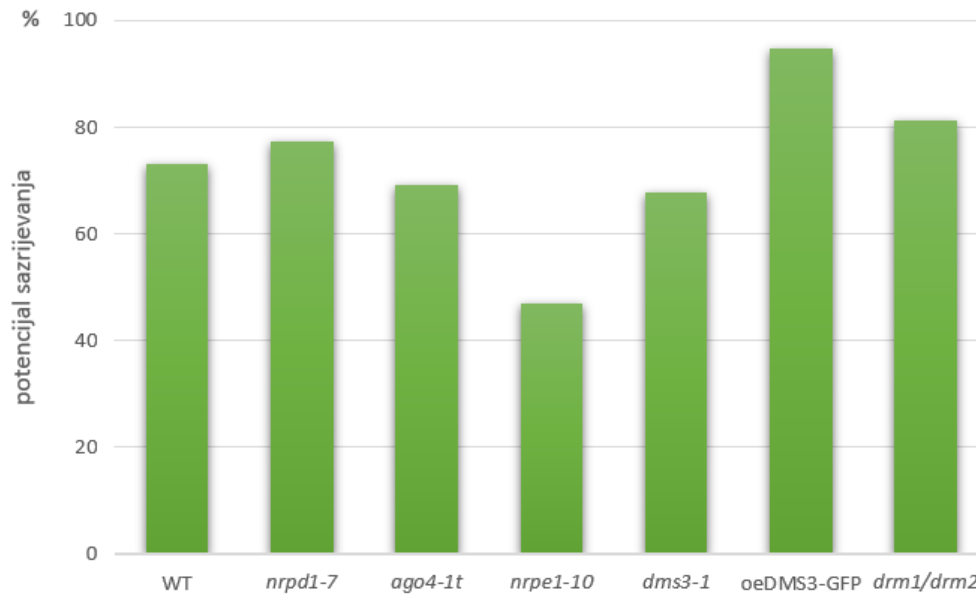
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM2667838> (pristupljeno 29.12.2021.)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM3553171> (pristupljeno 29.12.2021.)

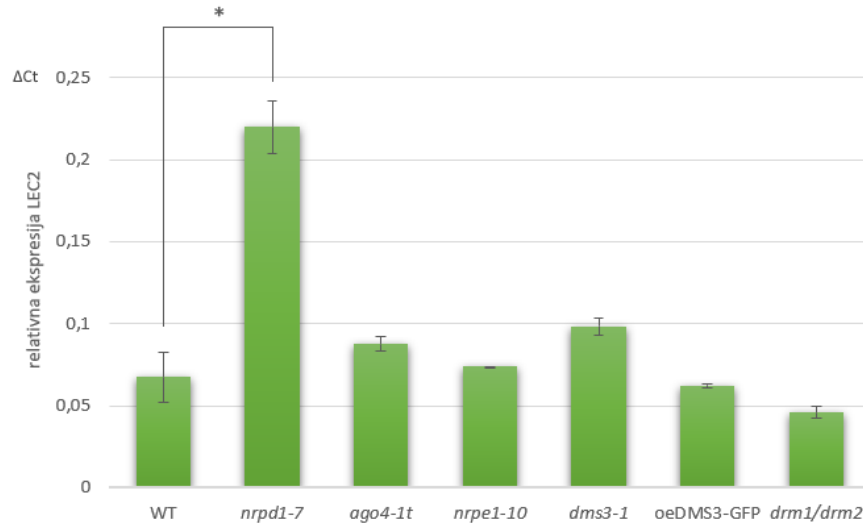
7 Prilozi

Prilog I. Oznaka gena, broj seta početnica, naziv početnica, nukleotidne sekvence, temperature taljenja (T_m), veličina fragmenta cDNA i veličina fragmenta gDNA u pb setova početnica korištenih za umnažanje gena *ECA1*, *LEC2*, *MYB115* i *RIE1* te referentnih gena *RHIP1* i *TIP41* u reakciji qPCR.

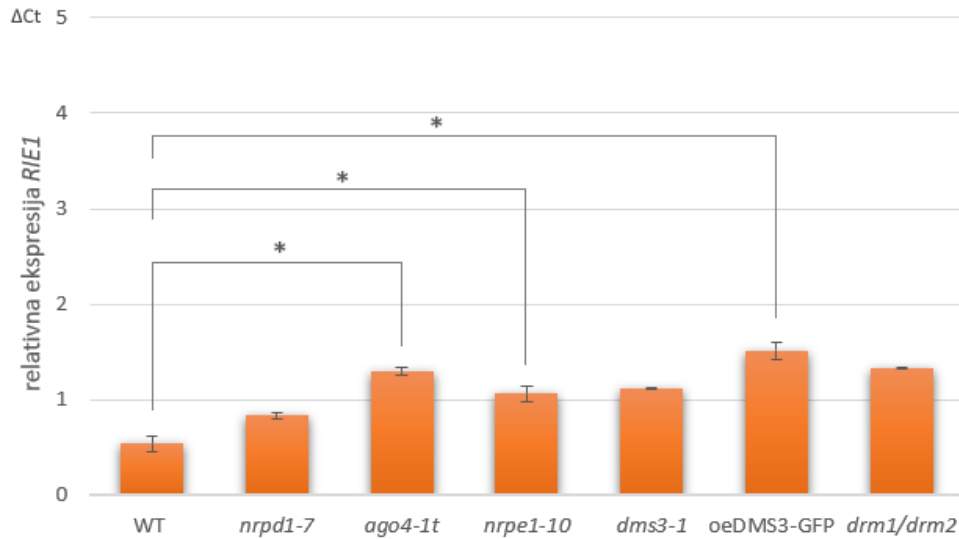
naziv gena (oznaka gena)	set početnica	naziv početnice	nukleotidna sekvenca 5' → 3'	$T_m/^\circ\text{C}$	veličina fragmenta cDNA (pb)	veličina fragmenta gDNA (pb)
<i>ECA1</i> (AT2G24205)	1	qECA1_fw1 qECA1_rev1	ACTTGAAAAAGAATCACACATCAGA TAGTGGATCCCTGCCTGATT	59,2 58,4	411	411
	2	qECA1_fw2 qECA1_rev2	ACCCGCTTCCATTCTGCGCT GCGGGCATCATGTGACCGAAT	63,3 63,3	142	142
<i>LEC2</i> (AT1G28300)	1	qLEC2_fw1 qLEC2_rev1	AGGGAAAGGAACCACTACGAA CAGTGGTGAGGTCCATGAGAT	59,4 61,3	136	136
<i>MYB115</i> (AT5G40360)	1	qMYB115_fw1 qMYB115_rev1	GCAAAGGGCAATGGACTCCTACTGA TCGGTCCATTTGTTGCCAACTATCT	67,4 64,2	232	512
	2	qMYB115_fw2 qMYB115_rev2	TGGACATCAATCGCAAAAAATGTTCC TCGGTCCATTTGTTGCCAACTATC	62,5 63,5	161	261
<i>RHIP1</i> (AT4G26410)	1	qRHIP1_fw1 qRHIP1_rev1	CTATTGGGATTGGTGTCGCT AGAATTGTGCCTCTTCGCTC	58,4 58,4	105	237
<i>RIE1</i> (AT4G26410)	1	qRIE1_fw1 qRIE1_rev1	TGCTCTCGAGGAGAGACGAA ACCGCTGACGCAAGAACTAA	60,5 58,4	96	96
	2	qRIE1_fw2 qRIE1_rev2	TTTCCTGGCGATTGACGTCTTCT CCTCCGATACACCTTCCGTTC	62,9 65,9	137	217
<i>TIP41</i> (AT4G34270)	1	qTIP41_fw1 qTIP41_rev1	GCAGCACAATGGAAATTCAGG GCCTCAACCGTTTCTTTGTC	59,4 58,4	122	230



Prilog II. Potencijal sazrijevanja (broj induciranih embrija kod kojih je došlo do razvoja somatskih embrija podijeljen s ukupnim brojem analiziranih embrija izražen u postotku) u u divljem tipu (WT), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nrpd1-7*), mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), mutantu za DMS3 (*dms3-1*), transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno eksprimiran DMS3 (oeDMS3-GFP) te mutantu za metilaze DRM1 i DRM2 (*drm1/drm2*). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti jednog eksperimenta (sa 60 početnih eksplantata).



Prilog III. Relativna ekspresija gena *LEC2* tijekom faze sazrijevanja somatskih embrija u divljem tipu (WT), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nrpd1-7*), mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), mutantu za DMS3 (*dms3-1*), u transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno eksprimiran DMS3 (oeDMS3-GFP) te u mutantu za metilaze DRM1 i DRM2 (*drm1/drm2*). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti ΔC_t jednog ponavljanja eksperimenta s pripadajućim standardnim greškama za dvije tehničke replike. Zvezdicom (*) je označena vrijednost koja je statistički značajno različita (p-vrijednost $\leq 0,05$) dobivene pomoću T-testa (WT – *nrpd1-7*: 0,02105).



Prilog IV. Relativna ekspresija gena *RIE1* tijekom faze sazrijevanja somatskih embrija u divljem tipu (WT), u mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol IV (*nrpd1-7*), mutantu za AGO4 (*ago4-1t*), mutantu za veliku podjedinicu RNA Pol V (*nrpe1-10*), mutantu za DMS3 (*dms3-1*), u transgeničnoj liniji u kojoj je prekomjerno ekspimiran DMS3 (oeDMS3-GFP) te u mutantu za metilaze DRM1 i DRM2 (*drm1/drm2*). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti ΔCt jednog ponavljanja eksperimenta s pripadajućim standardnim greškama za dvije tehničke replike. Zvezdicama (*) su označene vrijednosti koje su statistički značajno različite (p -vrijednost $\leq 0,05$), dobivene pomoću T-testa (WT – *ago4-1t*: 0,03297, WT – *nrpe1-10*: 0,04616, WT – oeDMS3-GFP: 0,01522).

Životopis

Rođena sam 12. lipnja 1996. godine u Zagrebu gdje sam pohađala osnovnu školu Savski Gaj od 2003. do 2011. godine. Srednjoškolsko obrazovanje stekla sam završetkom dvojezičnog programa na engleskom jeziku u IV. gimnaziji u Zagrebu 2015. godine. 2016. godine upisala sam Preddiplomski sveučilišni studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu kojeg sam završila 2019. godine stekavši zvanje sveučilišne prvostupnice biologije (univ. bacc. biol.). Iste godine upisala sam Diplomski sveučilišni studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Aktivno poznajem engleski jezik, samostalno se služim španjolskim jezikom te imam osnovno znanje francuskog jezika.