

Indukcija poliploidije u matice *Apis mellifera*

Merkaš, Davor

Undergraduate thesis / Završni 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:217:126500>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Davor Merkaš

Indukcija poliploidije u matice *Apis mellifera*

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Davor Merkaš

Induction of polyploidy in *Apis mellifera* queen bee

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa biologije na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom **prof. dr. sc. Damjana Franjevića** i komentorstvom **dr.sc Josipa Skeje**.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Završni rad

Indukcija poliploidije u matice *Apis mellifera*

Davor Merkaš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Mehanizmi evolucije genoma zanimljiva su tematika kojom se unutar biologije bavi molekularna evolucija, a osobito je među mehanizmima evolucije zanimljiv fenomen poliploidije, neobičnog adaptacijskog mehanizma koji se očituje u preživljavanju stanica s povećanim brojem kromosoma nego što je to slučaj kod predačke vrste/populacije. Poliploidija je poznata kod mnogih eukariota i prokariota, a može biti obilježje svih stanica ili samo određenih tkiva. Od pojave kod ranjenog tkiva i onoga koje je pod značajnim stresom, metabolički aktivnih tkiva i gigantskih udova do modifikacije pripadnika eusocijalnih zajednica; poliploidija ima značajnu ulogu u razvoju, adaptaciji i specijaciji organizama. Filogenetički gledano, mnogo je češća kod biljaka nego kod životinja, a jednako je tako i kod biljaka mnogo bolje istražena nego kod životinja. Primjeri utjecaja poliploidije na brzu specijaciju i regulaciju ploidnosti potomstva kod kukaca temeljna su hipoteza ovog istraživanja. U ovom radu za cilj imam umjetno inducirati tetraploidiju u matice medonosne pčele (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) koja bi možda mogla partenogenetski stvarati radilice, a oplodnjom triploide. Osim teoretskog istraživanja proveo sam nekoliko pokusa na ličinkama i jajima medonosne pčele, mrava i paličnjaka, gdje sam stanice tretirao citostatikom kolhicinom. Svo potomstvo pčela, tretirano ili ne, je bilo ubijeno od strane radilica. Rad s pčelama je bio tehnički iznimno zahtjevan te za dobivanje rezultata potrebna je upotreba metoda uzgoja bez prisutnosti radilica. Tretirano potomstvo mrava i paličnjaka je dalo žive jedinke koji ne pokazuju morfološke razlike od kontrola. Iz provedenog istraživanja možemo zaključiti da indukcija poliploidije u medonosnih pčela nije moguća izvan laboratorijskih uvjeta zbog tehničkih prepreka.

Ključne riječi: poliploidija, kolhicin, endoreplikacija, kukci

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof.dr.sc. Damjan Franjević

Komentor: dr.sc. Josip Skejo

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Bachelor thesis

Induction of polyploidy in *Apis mellifera* queen bee

Davor Merkaš

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Mechanisms of genome evolution are an interesting subject that is dealt with within biology by molecular evolution, especially interesting mechanisms of evolution is the phenomenon of polyploidy, an unusual adaptation mechanism that manifests itself in the survival of cells with an increased number of chromosomes compared to the case in the ancestral species/population. Polyploidy is known in many eukaryotes and prokaryotes, and it can be a feature of all cells or only certain tissues. From the appearance in wounded tissue and that which is under significant stress, to metabolically active tissues and gigantic limbs, and through the modification of members of eusocial communities; polyploidy plays a significant role in the development, adaptation and speciation of organisms. Phylogenetically, it is much more common in plants than in animals, and it is also much better studied in plants than in animals. Examples of the influence of polyploidy on rapid speciation and regulation of offspring ploidy in insects are the basic hypothesis of this research. In this work, I aim to artificially induce tetraploidy in queens of the honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758), which might be able to parthenogenetically create workers, and triploids by fertilization. In addition to theoretical research, I conducted several experiments on the larvae and eggs of honey bees, ants and phasmids, where I treated the cells with the cytostatic colchicine. All bee offspring, treated or not, were killed by the workers. Working with bees was technically extremely demanding, and in order to obtain results, it was necessary to use breeding methods without the presence of workers. Treated progeny of ants and phasmids produced live individuals that did not show morphological differences from controls. From the conducted research, we can conclude that the induction of polyploidy in honey bees is not possible outside of laboratory conditions due to technical obstacles.

Keywords: polyploidy, colchicine, endoreplication, insects

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof.dr.sc. Damjan Franjević

Comentor: dr.sc. Josip Skejo

Sadržaj

Uvod	1
Materijali i metode	3
Literaturni pregled.....	3
Dizajn istraživanja.....	3
Uzgoj matica pčela	4
Plan tretiranja.....	4
Doze i tretiranje.....	5
Uzgoj tretiranih jedinki.....	6
Tretiranje jaja i ličinki mrava	6
Tretiranje jaja paličnjaka	8
Testiranje poliploidije.....	10
Rezultati	11
Tretiranje pčela	11
Tretiranje mrava.....	11
Tretiranje paličnjaka.....	13
Rasprava	15
Teoretski osvrt na poliploidiju kao prilagodbu, adaptaciju.....	15
Osvrt na praktični dio istraživanja	20
Zaključak	23
Zahvale	24
Literatura	25
Životopis	28

Uvod

Kroz evoluciju živog svijeta može se zamijetiti mnoštvo intrigantnih genskih, morfoloških i fizioloških prilagodbi (adaptacija) organizama koje im omogućuju život u nišama koje zauzimaju (Futuyma i sur. 1988.). Mehanizmi koji utječu na evoluciju naposljetku rezultiraju genotipom i fenotipom najboljim za preživljavanje nekog organizma, a među mehanizmima evolucije genoma jedan od zanimljivih zasigurno je i poliploidija (Futuyma i sur. 1988.).

Poliploidija je definirana kao pojava prisustva višestrukog broja kromosoma u jezgrama eukariotskih stanica ili citoplazmi prokariota, a predstavljala je značajnu prilagodbu u tijeku evolucije mnogih svojiti organizama (Skejo 2022.). Primjerice, samo kod biljaka, multiplikacija broja kromosoma iznad uobičajenog diploidnog stanja smatra se jednim od najznačajnijih mehanizama evolucije i specijacije (Thompson i Lumaret 1992). Osim postanka čitavih skupina biljaka putem poliploidije od predačkog diploida, danas mnoge biljke hibridiziraju i hibridizirajući poliploidiziraju pa ima slučajeva da od istih roditeljskih vrsta nastane nekoliko potomačkih vrsta različite veličine genoma (Husband, 2000 prema Levin 1983; Thompson i Lumaret 1992). Pojava poliploidije unutar vrste dovodi do reproduktivne izolacije poliploidnog soja od predačke biljke. Novonastale poliploidne biljke sadrže mnoge duplikacije kromosoma što olakšava opstanak korisnih mutacija bez, značajnog ispoljavanja opasnih (Kerr i Silveira, 1972). Osim utjecaja na genetiku biljke poliploidija utječe i na ekologiju biljke. Primjerice, poliploidni sojevi zauzimaju novu ekološku nišu i imaju sasvim novu interakciju s oprašivačima, što je još jedna posljedica poliploidije kao važnog faktora specijacije (Thompson i sur. 2008).

Poliploidija je rijetka u životinjskom carstvu (Eumetazoa) i većinom je prisutna među beskralježnjacima. Kod kralježnjaka (Vertebrata), najučestalija je među vodozemcima gdje čak postoji jedna dodekaploidna ($12n$) vrsta žabe (Tymowska 1991). U nastanku poliploidije životinja, ključna stepenica kroz koju razvojni ciklus životinje mora proći je determinacija spola koja se temelji na spolnim kromosomima. Prisustvo više spolnih kromosoma otežava razvoj zdrave jedinke (Muller, 1925). U životinjskom carstvu determinacija spola očituje se na više načina, a među njima postoji i determinacija na bazi broja kromosoma, prisutna u nekoliko redova kukaca (razred Insecta), i upravo ona daje dobru predispoziciju (predadaptaciju) za razvoj stabilne poliploidije (Kerr i Silveira, 1972).

Poliploidija se smatra jednim od glavnih mehanizama evolucije roda *Apis* Linnaeus, 1758 (Culliney i sur. 1983; Zeuner 1951). Unutar cijelog reda Opnokrilaca (Hymenoptera) smatra se da 65% pripadnika sadrži neki oblik poliploidije ili vuče svoje podrijetlo iz događaja koji uključuje poliploidiju (Culliney i sur. 1983). Među dokazima koji pokazuju prisutnost poliploidije u normalnoj fiziologiji kukaca, su primjeri poliploidnog tkiva visoke metaboličke aktivnosti u pčele *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 . Tkiva poput Malpigijevih cjevčica, ganglija, mozga, tkiva žalca, nogu i letnih mišića pokazuju višu poliploidiju od ostatka tijela (Rangel et al., 2015). U haploidnih mužjaka bumbara *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758), u tkivima čeljusti i nogu otkrivena je diploidija izazvana endoreplikacijom, što omogućuje veličinu i funkciju kao u diploidne ženke (Ren i sur. 2020; Aron i sur., 2005). Osim u nekim tkivima, poliploidija je prisutna kroz čitavu socijalnu strukturu polimorfne vrste mrava *Solenopsis invicta* Buren, 1972, gdje postoji razlika u broju kromosoma ovisno o kasti i ulozi u koloniji (Ren i sur. 2020; Scholes i sur., 2013).

Automiktična partenogeneza poznata je pojava u pčele (*Apis mellifera*), gdje dolazi do poliploidizacije kroz postmejotičko povećanje broja kromosoma haploidnog jajeta što uzrokuje stvaranje diploidnog potomka ženskog spola (Tucker 1958). Pojava prirodno prisutne potpune multiplikacije kromosoma daje prostora za daljnje istraživanje fenomena poliploidije u životinjskom carstvu. Unutar ovog istraživanja istražiti ću tematiku poliploidije u kukaca i osvrnuti se na njezine mehanizme i uloge u specijaciji.

Opći cilj ovoga rada je teoretski proučiti potencijalne načine indukcije poliploidije čitavog organizama u kukaca, a glavni je modelni organizam istraživanja matica medonosne pčele *Apis mellifera*. Polazim s hipotezom da je korištenjem citostatika (poput kolhicina koji prolazno utječe na inhibiciju diobenog vretena) moguće uzrokovati multiplikaciju broja kromosoma u ličinačkom stadiju pčele koja bi rezultirala tetraploidnom, fertilnom jedinkom. Tetraploidna bi jedinka partenogenezom stvarala diploidne radilice, a oplodnjom haploidnim trutovima davala bi pak triploidno potomstvo. Provjera ove zanimljive hipoteze otvara vrata mnogim drugim istraživanjima u području genetike, biotehnologije i agronomije.

Materijali i metode

Literaturni pregled

Korištena je literatura u kojoj se mogu pronaći definicije i ostale informacije o prirodnoj i induciranoj pojavi poliploidije u živom svijetu, a pregledani radovi se pretežito fokusiraju na biljke ili tumore (Thompson i Lumaret 1992; Fox i Duronio, 2013), a manji broj radova je vezan uz poliploidiju kod kukaca. (npr. Tucker 1958., Ren i sur. 2020.). Levin (1983) te Thompson i Lumaret (1992) govore o poliploidiji u biljnom svijetu kao čestoj pojavi i važnom mehanizmu specijacije. Kerr i Silveira (1972) opisuju koristi poliploidije na preživljavanje, tj. selekciju korisnih mutacija. Muller (1925) govori o poteškoćama nastanka i preživljavanja poliploidije kod životinja zbog mehanizma determinacije spola. Tucker (1958) te Ren i sur. (2020) daju mnoge primjere poliploidije među kukcima, specifično primjere kod medonosne pčele (*A. mellifera*) i njezinih srodnika (Apiidae). Nisu pronađeni radovi koji se bave indukcijom poliploidije u kukaca, pa je ovaj završni rad jedan od prvih radova koji zadire u tu tematiku. Nakon istraživanja relevantne literature o poliploidiji osmišljen je plan provedbe eksperimenta.

Dizajn istraživanja

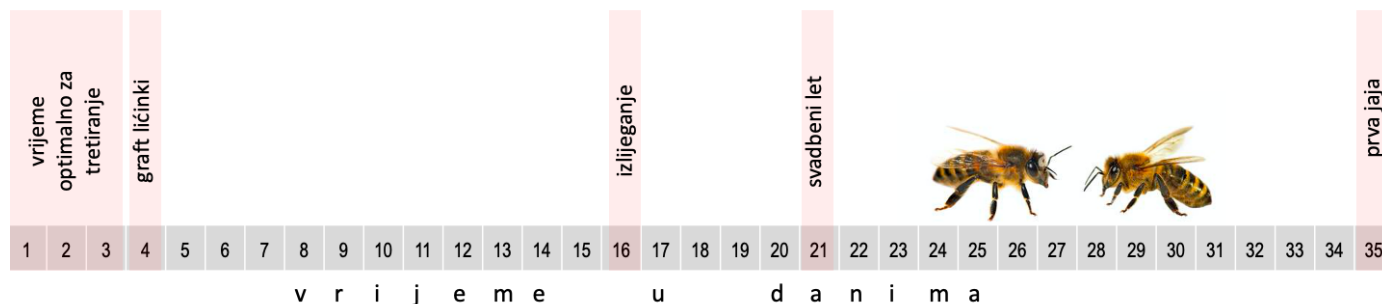
Protokol ovog eksperimenta osmislio sam prilagodbom opće metode uzgoja matice pčela (Johnstone 2008). U eksperimentu sam uzgajao matice medonosne pčele *A. mellifera* koje sam tretirao citostatikom kolhicinom u fazama dok su ličinke i/ili u fazi jajeta uz parametre koje sam odredio po veličini kapljica i vremenu tretiranja. Nakon tretiranja citostatikom, matice su uzgajane te su daljnje laboratorijske zabilješke detaljno vođene. Uz ličinke i jaja pčela, kao kontrolne skupine uzeta su i jaja mrava roda *Lasius* Fabricius, 1804 i vijetnamskih paličnjaka *Medauroidea extradentata* (Brunner von Wattenwyl, 1907). Naposljetku je načinjen test na poliploidiju kako bi se provjerili ishodi tretiranja.

Uzgoj matica pčela

Za uzgoj matica medonosne pčele *Apis mellifera* postoji nekoliko metoda (Johnstone 2008). Metoda koju sam koristio obuhvaćala je uzgoj matica u košnici iz koje je izdvojena originalna matica te svi okviri s potomstvom. U košnici preostanu jedino radilice svih dobi te okviri sa skladištima meda i peludi. Takvoj košnici se zatvaraju vratašca za pčele i radilice provedu 24h bez matice što potiče njihov instinkt za stvaranjem nove matice iz prisutnih jaja. Nakon 24h u košnicu se stavlja okvir s jajima iz košnice u kojoj živi roj pčela odabranih svojstava. Budući da su radilice provele cijeli dan bez matice instinkt za stvaranje nove matice je jak te će u kratkom roku početi uzgajati matice iz jaja s umetnutog okvira. Kroz period od 16 dana na umetnutom okviru pojavljuju se posebno građene ćelije u kojima se nalaze matice. Za uzgoj matica potrebna je stalna prisutnost uzgajivača jer čim se izlegu, mlade kraljice ubijaju konkurenciju čak i u njihovim kukuljicama. Da bi se to izbjeglo u kompleksnijim istraživanjima koriste se posebni uzgojni okviri koji odvajaju matice u zasebne kaveziće iz kojih se ne mogu međusobno ubiti. U ovom istraživanju odlučio sam ne koristiti takve metode jer zahtijevaju više opreme koju pčelari nisu mogli ponuditi. Nakon izlijevanja nova matica zauzima svoje mjesto u roju te pet dana nakon izlijeće iz košnice na svadbeni let gdje se pari s trutovima na visini od oko 25 metara. Oplođena matica čuva spermu nekoliko mužjaka u posebnoj vrećici (sjemeno spremište, *receptaculum seminis*) u abdomenu te ga koristi za oplodnju kroz cijeli svoj život. Prva jaja se mogu očekivati već 20 dana nakon izlijevanja matice.

Plan tretiranja

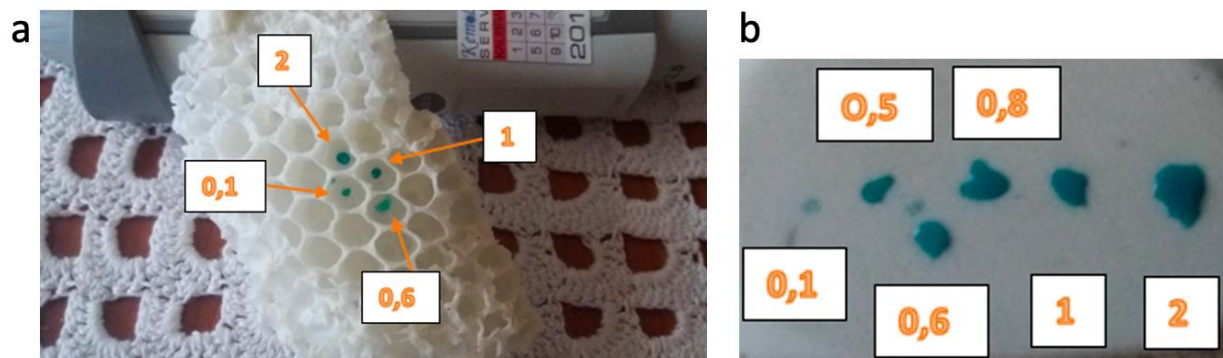
Vrlo je važno odrediti točno vrijeme tretiranja jaja i ličinki pčela radi lakšeg praćenja promjena i osiguravanja indukcije poliploidije u ranim fazama. Prva faza uzgoja matice inače obuhvaća graft (presađivanje ličinki iz ćelija na okviru u poseban okvir za uzgoj matica), ali u ovom istraživanju taj dio metodologije nije rađen, već su jaja i ličinke bila tretirana na odabranom okviru koji sam zatim umetnuo u košnicu. Ostale faze obuhvaćaju rast jaja u ličinku koja se savija u slovo C prije ulaska u fazu kukuljice i zatvaranja ćelije s voskom od strane radilica dadilja. Odlučio sam se tretirati jaja i ličinke koje još nisu dostigle savijanje tijela skroz do oblika slova C, što podrazumijeva vrijeme tretiranja između prvog i četvrtog dana. Smatrao sam da tretiranje u tom razdoblju daje najveće šanse za utjecanje kolhicina na indukciju poliploidije u razvijajućem organizmu (Slika 1.). Tretiran je jedan okvir iz košnice koja je bila bez kraljice 24h. Okvir je uzet iz košnice i tretiran u zatvorenom prostoru uz svjetlo lupe, za presađivanje ličinki. Okvir se nalazio izvan košnice 40 minuta na sobnoj temperaturi.



Slika 1. Vremenska linija uzgoja matice medonosnih pčela. Na osi su označeni bitni trenutci uzgoja. Brojke su izražene u danima pa opisani period opisuje 35 dana od jajeta iz kojeg će se matica izleći do prvih jaja te matice. Na prikazu je označeno optimalno vrijeme tretiranja. Iznad linije su bitni događaji u uzgoju matice. Jednostavna vremenska linija je u mjerilu.

Doze i tretiranje

Kolhicin sam dodavao u ćelije s mikropipetom 2 do 10 μL . Prilikom dodavanja, kapljica kolhicina bila je ispuštena direktno na jaja i ličinke da se osigura što veća površina za interakciju tkiva i kemikalije. Volumeni kapljica kolhicina koncentracije 1 M bili su određeni ovisno o veličini kapljice usporedno s procijenjenom veličinom jaja i ličinki. Nakon testiranja veličina kapljica na primjeru praznog pčelinjeg saća, odlučio sam se za volumene 0,5 μL , 1 μL i 2 μL . (Slika 2.)



Slika 2. Veličina kapljica. A) test za veličine kapljica u usporedbi s ćelijama i procijenjenom veličinom jaja i ličinki s upotrebom bojila za hranu i mikropipete 2 do 10 μL . B) test za veličinu kapljica na hidrofobnoj površini. Brojevi na slici su izraženi u mikrolitrima.

Uzgoj tretiranih jedinki

Nakon uzgoja matice, većina jedinki se trebala usmrtiti te su se uzorci trebali skladištiti u etanolu u zamrzivaču, za naknadnu provjeru poliploidije. Dio matice inače bi trebao biti preraspodijeljen u male košnice s nekoliko okvira i radilica iz početne košnice. Košnice se onda ostave otvorene i omogući se pokusnoj matici da se pari s trutovima. Kroz period od nekoliko mjeseci trebalo bi promatrati košnicu te sakupljati uzorke svog potomstva koje se izleglo iz jaja pokusne matice. Nakon dovoljno sakupljenih uzoraka i promatranog odnosa pokusne matice i potomstva te socijalnih uloga nastalog potomstva, roj pokusne matice bi se usmrtio etil acetatom te bi se uzorci skladištili u etanolu u zamrzivaču (Reiss i sur. 1995.) Pokusnoj matici i njenom potomstvu bi se provjerio broj kromosoma koristeći kasnije navedenu metodologiju.

Tretiranje jaja i ličinki mrava

Tretiranje jaja i ličinki mrava se odvijalo na drugačiji način od tretiranja potomstva pčela. Potomstvo mrava uzelo se iz uzgojnih epruveta u kojima su se nalazile kraljice mrava roda *Lasius*, uhvaćene nekoliko dana prije provođenja pokusa. Mravi su se uzgajali u posebno preuređenim plastičnim epruvetama s dijelom napunjenim vodom i dijelom za životni prostor mrava. Između dva prostora je vata preko koje jedinke mogu piti vodu i unutar koje mogu držati jaja i ličinke na određenoj vlazi. Epruveta se zatvorila drugom vatom preko koje jedinke mogu disati (Banks i sur. 1981.) (Slika 3.) Za pokus su se uzimale epruvete u kojima su se nalazile samo kraljica i jaja bez još izlegnutih radnika. Za svaku epruvetu sam odredio vremensku grupu tj. vrijeme koje će jaja iz te epruvete provesti potopljena u kolhicinu, te epruvetu koja će poslužiti kao kontrola. Jaja i ličinke su se uzimale iz epruveta i potapale u istoj razini kolhicina u jažicama (Slika 3.). Zbog sigurnosti da se jaja ne oštete koristio sam plastičnu iglu za presađivanje ličinki pčela (Slika 4.). Nakon stavljanja potomstva iz epruvete u jažicu s kolhicinom, nježno sam potopio jajašca u jažici da osiguram da se cijela površina nalazi pod kemikalijom. Nakon što određeno vrijeme prođe uklonio sam kolhicin iz jažice upotrebom kapaljke s plastičnim nastavkom za mikropipetu, kako bi osigurao da ne pokupim jajašca. Koristeći iglicu za presađivanje pokupio sam tretirana jaja i vratio ih kod kraljice u epruvetu, nakon čega sam epruvetu stavio u zamračeni prostor. Postupak sam ponovio za sve vremenske grupe. U svom eksperimentu sam koristio sedam vremenskih grupa i kontrolu. Odabrane vremenske grupe su 20, 30, 60, 90 i 120 sekundi te dvije grupe gdje su jaja stajala u kemikaliji dok ona nije isparila iz jažice na sobnoj temperature (00).



a



b

Slika 3. Improvizirane uzgojne tube i jažice za tretiranje. A) improvizirane uzgojne epruvete za uzgoj mrava. Epruveta se sastoji od dva dijela odvojena vatom. Prednji dio sadrži otvor epruvete zatvoren vatom te životni prostor za mrave između dvije vate. Drugi kraj epruvete služi kao spremnik za vodu, koju jedinke mogu piti preko srednje vate. B) Improvizirane jažice za tretiranje jaja mrava i paličnjaka izrađene od ostatka bombonijere. Kalup je plastičan s centralnim udubljenjem koje može držati hrpicu jaja prekrivenu kemikalijom.



Slika 4. Fotografija plastične iglice za presađivanje (graft) ličinki pčela, pri uzgoju novih matica. Iglica radi na sistemu žličice za sakupljanje jajašaca i ličinki s pomičnim dijelom koji radi na bazi opruge. Cijeli alat funkcionira poput kemijske olovke te omogućuje lakše uzimanje i ispuštanje jajašaca i ličinki.

Tretiranje jaja paličnjaka

Tretiranje jaja vijetnamskog paličnjaka (*Medauroidea extradentata*) provodilo se na sličan način kao i tretiranje mrava, s iznimkom vremena provedenog u kolhicinu za zasebne vremenske grupe. Kod paličnjaka je bilo šest vremenskih grupa i kontrola. Vremena tretiranja bila su: 5min, 10min, 20min, 30min, 1h, i sve dok kolhicin nije ispario sam iz jažice na sobnoj temperaturi. Periodi tretiranja su izraženi u minutama i duži su od onih za mrave, zbog većih jaja. Slično kao i kod mrava, jaja paličnjaka su uzeta iz terarija i stavljena u jažice s kolhicinom (Slika 5.) gdje su ostale određeni period, nakon čega je kolhicin uklonjen. Jaja različitih vremenskih grupa su prebačena iz jažica u odvojene uzgojne posudice. Uzgojna posudica sastavljena je od posudice za urin u kojoj se nalazio papir za zadržavanje vlage te mreža za sprječavanje izlaska izlegnutih jedinki (Slika 5.). Nakon stavljanja tretiranih jaja u uzgojnu posudicu jaja su stavljena na zasjenjeno mjesto uz redovito špricanje vodom radi održavanja vlage.



a



b

Slika 5. Jaja paličnjaka u jažicama i u uzgojnim posudicama. A) Improvizirane jažice s jajima vijetnamskog paličnjaka (*Medauroidea extradentata*) prije dodavanja kolhicina. Svaka jažica ima isti broj jaja koja će biti potopljena u istoj razini kolhicina u različitim periodima izraženima u minutama. B) Improvizirane uzgojne posudice za uzgoj paličnjaka iz tretiranih jaja. Posudice su izrađene od posudica za urin s papirom za zadržavanje vlage te mrežom koja sprječava bijeg izlegnutih jedinki (nije prikazana na fotografiji).

Testiranje poliploidije

Za dokazivanje poliploidije u izlegnutim jedinkama pčela, mrava i paličnjaka koristio sam nekoliko metoda. Prvi test je uključivao usporedbu morfologije tretiranih jedinki s jedinkama kontrola svake vrste, gdje bi obratio pažnju na udove, dijelove tijela, boju, epidermalne izrasline i veličinu. Poliploidi su redovito veći od diploida i haploida, a diploidi su veći od haploida, ali kada ovo i nije pravilo, postoje jasne razlike u morfologiji nekih organa (Landis, i sur. 2020). Osim morfoloških usporedbi trebali su se brojati kromosomi jedinki. Broj kromosoma sve tri vrste je poznat te abnormalnosti u broju kod tretiranih jedinki bi bio dokaz utjecaja kolhicina. Za brojanje kromosoma kukaca inače se koriste epidermalne stanice, najčešće epitela crijeva. Uzorak tkiva se tretira bojom za DNA koja učini kromosome vidljivijima i olakša brojanje pod mikroskopom. Osim brojanja kromosoma postoje i molekularne metode koje uključuju uporabu kromosom-specifičnih proba, koje se vežu za zasebne kromosome svaka duplikacija je vidljiva pod kasnijom elektroforezom uzorka (Keighren i sur. 1993). Za dokazivanje poliploidije u ovom završnom radu odlučio sam staviti fokus na usporedbu morfologija kontrola i tretiranih jedinki.

Rezultati

Tretiranje pčela

Tretiranje je bilo izuzetno tehnički zahtjevno iz nekoliko razloga: jaja i ličinke su izuzetno sitnih proporcija te uz svoju prozirnost teško su vidljiva pod određenim kutovima; hidrofobni vosak je otežavao spuštanje kapljice citostatika na dno ćelije u kojoj se nalazilo potomstvo; ograničeno vrijeme koje okvir smije provesti izvan košnice zbog regulacije vlage i temperature ograničilo je vrijeme rada mikropipetom; tijekom tretiranja okvira iz ćelija su se izlijegale mlade pčele. Okvir je tretiran trima dozama (0,5 μ L, 1 μ L i 2 μ L). Zbog tehničke zahtjevnosti tretiranja nisam uspio tretirati svo potomstvo. Na odabranom okviru jaja su se nalazila na površini oko 10 x 100 ćelija, od čega smatram da sam tretirao 80% ćelija. Nakon tretiranja okvir je vraćen u košnicu. Po tvrdnjama pčelara koji se brinu o košnici, promatranje jedan dan nakon tretiranja ukazalo je na to da su pčele prisutne u košnici pobile svo potomstvo okvira, dok promatranje tri dana nakon je potvrdilo sumnju. Naknadno tome pčelar je u košnicu vratio okvire s netretiranim potomstvom iz druge košnice da stvore novu kraljicu, što su pčele i učinile.

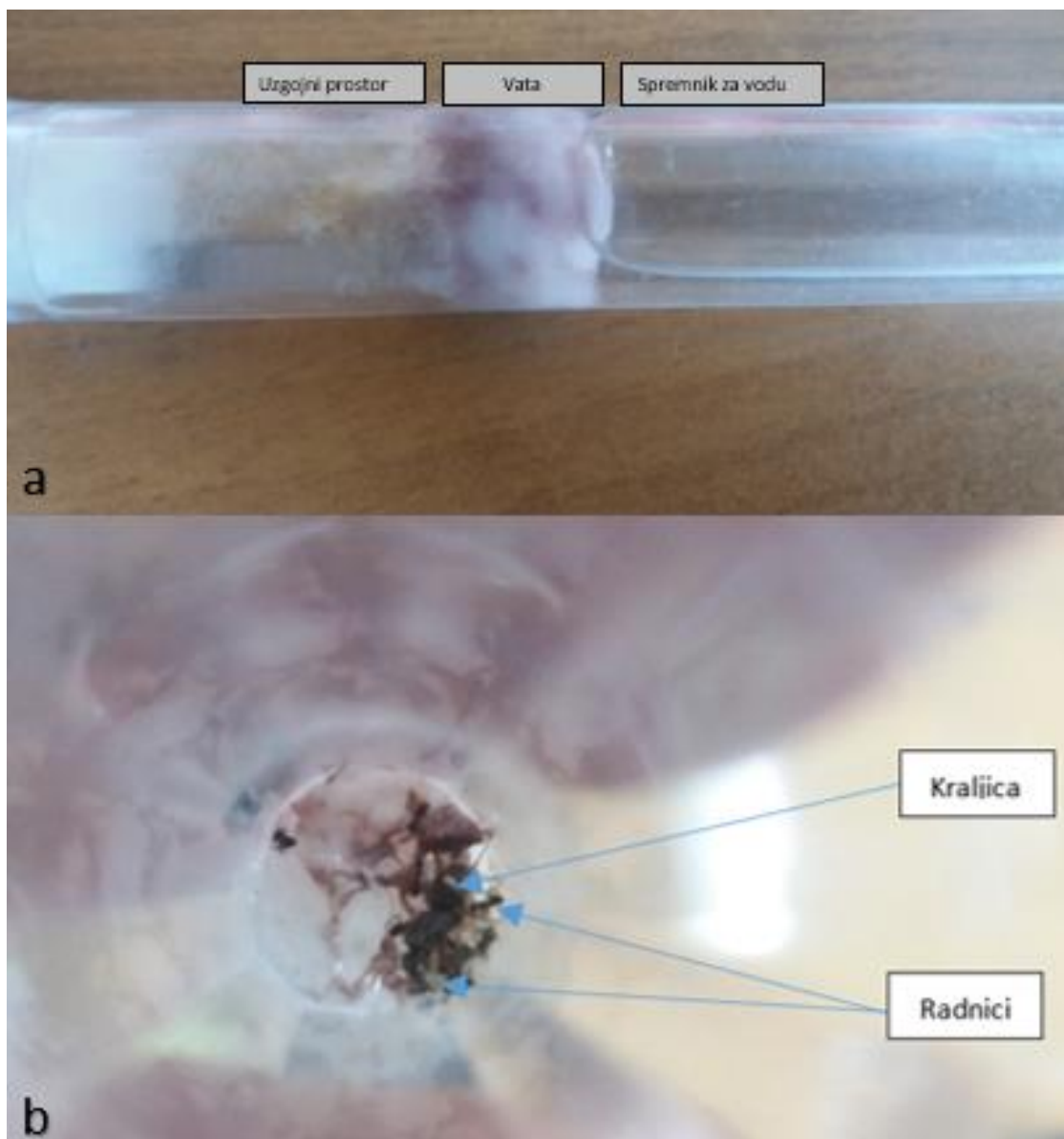
Tretiranje mrava

Od 7 tretiranih epruveta, svaka epruveta sadržavala je žive izlegnute jedinke bez abnormalnih pojava u njihovoj morfologiji (Tablica 1.). Dodatno kasnije tretiranje preostalih kontrola i promatranje ponašanja kraljice pokazalo je brigu za mlade nevezano o mirisu kemikalije. Jedinke su nakon kraćeg promatranja od 3 dana uzete iz epruvete i stavljene u etanol te u zamrzivač.

Tablica 1. Prikaz vremena koje su jaja provela u kolhicinu usporedno s postojanjem izlegnutih jedinki i njihovim morfologijama. Morfologije mrava su bile bazirane na sličnosti s kontrolom. Vrijeme provedeno u kolhicinu je izraženo u sekundama. Oznaka oo označava grupu jaja koja su stajala u jažici s kolhicinom sve dok kemikalija nije prirodno isparila na sobnoj temperaturi. Izlegnute jedinke su prisutne u svakoj grupi, što označava “+” u stupcu svake grupe.

Vrijeme u kolhicinu	kontrola	20 sec	30 sec	60 sec	90 sec	120 sec	oo	oo
Izlegnute jedinke	+	+	+	+	+	+	+	+
Morfologija	normalna	normalna	normalna	normalna	normalna	normalna	normalna	normalna

Prilikom vraćanja jaja iz jažica u epruvete, neke hrpice jaja su na sebi i dalje sadržavala omotač od kolhicina. Pri pregledu epruveta zamijetio sam postojanje ljubičastog obojenja vate za vodu u nekim epruvetama gdje su jaja doticala vatu. Na slici 6. se može primijetiti obojenje vate preko koje mravi piju vodu. Dodatna testiranja vate u reakciji s kolhicinom i reakciji kolhicina, vode i vate nisu dala nikakvo obojenje.



Slika 6. Tretirani mravi u improviziranim uzgojnim tubama. A) Epruvete za uzgoj mrava sa spremnikom za vodu (desno) i vatom s koje mravi piju vodu te koja odvaja dio za život (lijevo). Na vati se primijeti ljubičasto obojenje koje se proteže kroz epruvetu s tamnijim obojenjem na lijevoj strani s koje se nalaze tretirana jaja mrava. B) Uzgojna tube s ulaza, na vatu iza koje se nalazi spremnik s vodom. Vidi se kraljica mrava (veća jedinka) te manji radnici izlegnuti iz tretiranih jaja. Na fotografiji se može vidjeti ljubičasto obojene crte na vati, s koje jedinke piju vodu.

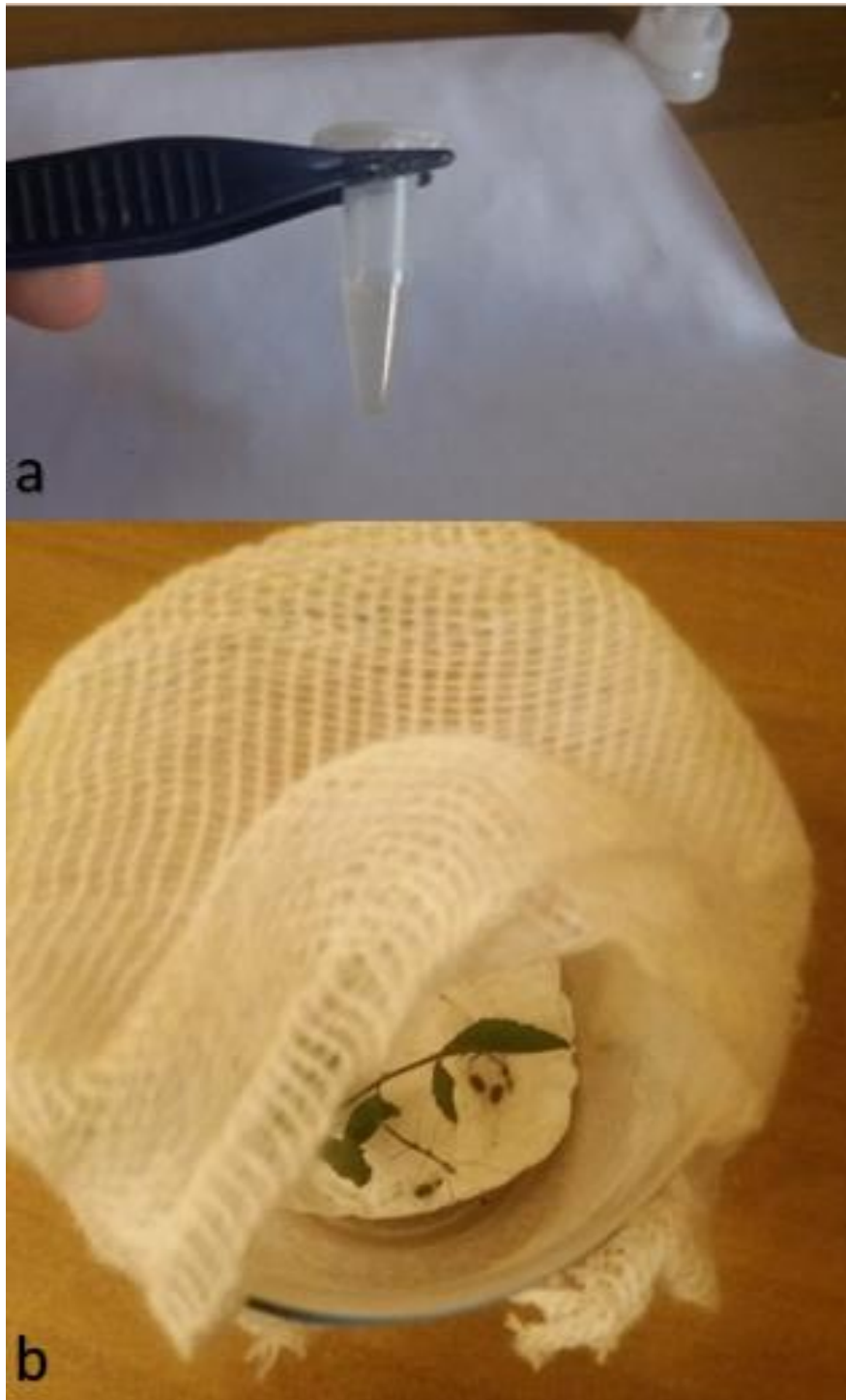
Tretiranje paličnjaka

Od 6 tretiranih grupa svaka je dala žive jedinke, bez razlika u morfologiji od kontrole (Tablica 2.).

Paličnjaci su krenuli izlaziti iz jajeta nakon mjesec i pol do dva mjeseca od tretiranja (Slika 7.). Svi uzorci paličnjaka su nakon izlaska iz jajeta i promatranja od nekoliko dana, pohranjeni u etanolu i stavljeni u zamrzivač. Prilikom tretiranja, primijetio sam da kolhicin vremenskih grupa koje su bile tretirane 30 minuta, 1h i dok kolhicin ne ispari (oo) (Tablica 2.; Slika 7.), poprima smeđu boju.

Tablica 2. Prikaz vremena koje su jaja provela u kolhicinu u usporedbi s postojanjem izlegnutih jedinki i razlikama u njihovim morfologijama od jedinki kontrole. Vrijeme provedeno u kolhicinu je izraženo u minutama. Oznaka oo označava grupu jaja koja su stajala u jažici s kolhicinom sve dok kemikalija nije prirodno isparila na sobnoj temperaturi. Izlegnute jedinke su prisutne u svakoj grupi, što označava "+" u stupcu svake grupe.

Vrijeme	kontrola	5min	10min	20min	30min	1h	oo
Izlegnute jedinke	+	+	+	+	+	+	+
Morfologija	normalna	normalna	normalna	normalna	normalna	normalna	normalna



Slika 7. Epruveta kolhicina s kojim su se tretirale 3 grupe jaja paličnjaka i uzgojna posudica za izlegnutim paličnjakom. A) Epruvetu s kolhicinom u kojem su stajali uzorci jaja paličnjaka 30 minuta, 1h i dok kolhicin ne ispari (oo). Tri tekućine su dobile smeđu boju te su na kraju pokusa pomiješane u jednu epruvetu. Na epruveti se vidi tamnije obojenje koje je nekarakteristično za inače prozirniju kemikaliju kolhicin. B) Paličnjak koji se izlegao iz tretiranih jaja u uzgojnoj posudi s hranom (lišće kupine), papirom natopljenim vodom za održavanje vlage te mrežom koja sprječava izlazak jedinki iz uzgojne posude. Paličnjaci su se izlijegali kroz tjedan dana, otprilike mjesec i pol do dva mjeseca nakon tretiranja kolhicinom. Morfologija ne pokazuje razlike od paličnjaka iz kontrole

Rasprava

Poliploidija je kao pojava, prisutna u biljnom i životinjskom svijetu preživjela kao adaptacija na mnoge unutarnje i vanjske faktore. Njezina pojava direktna je prilagodba mnogih životinjskih tkiva i organa na visoku metaboličku aktivnost, a kod mnogih biljnih tkiva prilagodba je na ranjavanje i stres. Poliploidija u mnogih eukariota sudjeluje u regulaciji razvoja potomstva (Tucker 1958) .

Poliploidija omogućuje veću plastičnost organizmima i time predstavlja uspješnu adaptaciju kod mnogih skupina kao jednostavno svojstvo, ali je ujedno i kompleksan mehanizam evolucije i specijacije (Ren i sur. 2020; Wigglesworth i sur. 1966).

Teoretski osvrt na poliploidiju kao prilagodbu, adaptaciju

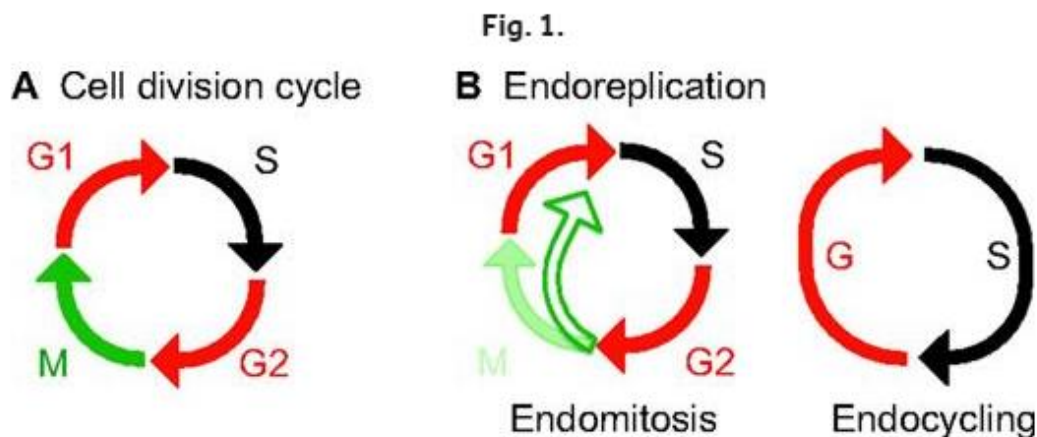
Kroz evoluciju živog svijeta, poliploidiju se može smatrati mehanizmom koji je omogućio mnoge brze adaptacije. Kod biljaka možemo vidjeti da nasumična poliploidija može kroz nekoliko generacija rezultirati specijacijom, tj. novom vrstom, jer dugoročno utječe na njezinu morfologiju i fiziologiju koje posredno dovodi i do reproduktivne izolacije od predačke populacije. Promjena interakcije s okolišem, a tako i s oprašivačima, omogućuje poliploidnoj biljci zauzimanje nove ekološke niše (Thompson i sur., 2008). Učinak poliploidije u ovakvom se primjeru može objasniti na nekoliko načina; moguć je utjecaj na vrijeme cvatnje ili na sastav proizvedenog nektara i morfologiju te privlačnost samih cvjetova oprašivačima. Koji god od učinaka imala, poliploidija kod primjera ove biljke postigla je ekološku specijaciju kroz samo nekoliko generacija, pa predstavlja i svojevrsan „bottleneck“, drift, u odnosu na predački populaciju.

Pojava poliploidije unutar vrste omogućuje organizmu prisutnost mutacija koje omogućuju preživljavanje i to paralelno s onima koje smanjuju fitness. Objašnjenje ovog mehanizma leži u količini dostupne DNA jer kod poliploidnog organizma za razliku od haploidnog i diploidnog postoje dodatne kopije svih kromosoma te pojava negativnih mutacija na jednom kromosomu ne utječe direktno na fitness organizma zbog postojanja mnogih zdravih kromosoma (Kerr i Silveira, 1972; Maciver i sur. 2016.).

Vojnici mrava *Solenopsis invicta* imaju različit broj kromosoma od radilica iako su nastali od iste kraljice (Ren i sur. 2020 prema Scholes i sur., 2013). Ovdje možemo govoriti i o metaboličkoj aktivnosti organizama ovih mrava gdje ovisno o ulozi koju obavljaju, različiti zadatci zahtijevaju različito ulaganje energije. Poliploidija bih mogla utjecati na jaču ekspresiju i sintezu proteina koji bi sudjelovali u pojačanom

metabolizmu takvih jedinki. Ovdje bih mogao dati usporedbu takvih mrava s metabolički aktivnijim tkivom u nekih vrsta poput kukca roda *Rhodnius* Stål 1859, kod kojih za vrijeme dužeg gladovanja (30 do 40 tjedana) masno tkivo pokazuje znakove fuzije stanica i poliploidije koje omogućuju održavanja prirodne metaboličke aktivnosti za vrijeme stresa (Wigglesworth i sur. 1966). Osim primjera za vrijeme stresa, metabolički aktivnija tkiva koja pokazuju poliploidiju mogu se pronaći i u prirodnim uvjetima u pčele *Apis mellifera* i bumbara *Bombus terrestris* gdje je primijećena poliploidija u tkivima letnih mišića, žalca, nogu te Malpighijevih cjevčica (Rangel et al., 2015; Ren i sur. 2020 prema Aron i sur., 2005). Neka metabolički aktivnija tkiva u pčele gube svojstvo poliploidije kako životinja stari pa je tako primijećen značajan pad u razini poliploidije u tkivima letnih mišića i nogama, no nije primijećen pad kod tkiva Malpighijevih cjevčica. Kod ovog metabolički aktivnog tkiva primijećen je (iako ne značajan) rast u poliploidiji kroz starenje (Rangel i sur. 2015). Rad Renglea i sur. (2015) nam daje uvid kako s padom upotrebe i aktivnost tih tkiva pada i razina poliploidije. Mogućnost unutrašnjih mehanizama da povećaju broj kromosoma omogućuje takvim stanicama da proizvode više enzima i drugih proteina što posredno tkivo čini aktivnijim. Također treba se osvrnuti na Tuckerov (1958) rad koji govori o pojavi automiktične partenogeneze u matice medonosne pčele, gdje dolazi do multiplikacije potpunog broja kromosoma u jajetu koje je haploidno. Takvo jaje je trebalo dati haploidnog truta, no zbog multiplikacije dat će žensku radilicu i to bez oplodnje. Pojava izlijeganja radilica u neoplođene matice dokazana je stvaranjem homozigotnih radilica od neoplođene heterozigotne matice. Ovakav mehanizam je vrlo sličan hipotezi za kojom sam se vodio u ovom istraživanju te njegova pojava nije rijetkost u uzgoju medonosnih pčela. Iako se čini kao korisna sposobnost matice, ne možemo tvrditi da je (pred)prilagodba samo za stvaranje kolonije pri nedostatku mužjaka jer nije primijećena uvijek u tim uvjetima. Ovaj primjer pokazuje ulogu poliploidije u regulaciji potomstva što je vrlo prikladan mehanizam kod organizama čiji spol se regulira brojem kromosoma.

Poliploidne stanice nastanu procesom endoreplikacije gdje dolazi do amplifikacije DNA bez da se stanice podijele. Takve stanice imaju važnu ulogu u fiziologiji tkiva, razvoju, starenju, reprodukciji i liječenju rana (Ren i sur. 2020). Proces endoreplikacije se može podijeliti na dva tipa: endociklus i endomitoza (Slika 8.). Kod endociklusa dolazi do ponavljajuće S faze gdje se replicira DNA, i G faze u kojoj se stanice pripremaju za ponovnu S fazu. Za razliku od endociklusa koji ne pokazuje znakove mitoze, endomitoza pokazuje abortivnu mitozu kod koje ne dolazi do citokineze, već stanice ulazu u ponovnu S fazu (Fox i Duronio, 2013). Nova istraživanja pokazuju kako i endociklus i endomitoza postoje u mušicama i sisavcima, te budući da je njihova prisutnost primijećena u istim tkivima, razlika se može smatrati nebitnom jer oba procesa dovode do poliploidije (Fox i Duronio, 2013 prema Ullah i sur., 2009; Unhavaithaya i Orr-Weaver, 2012).

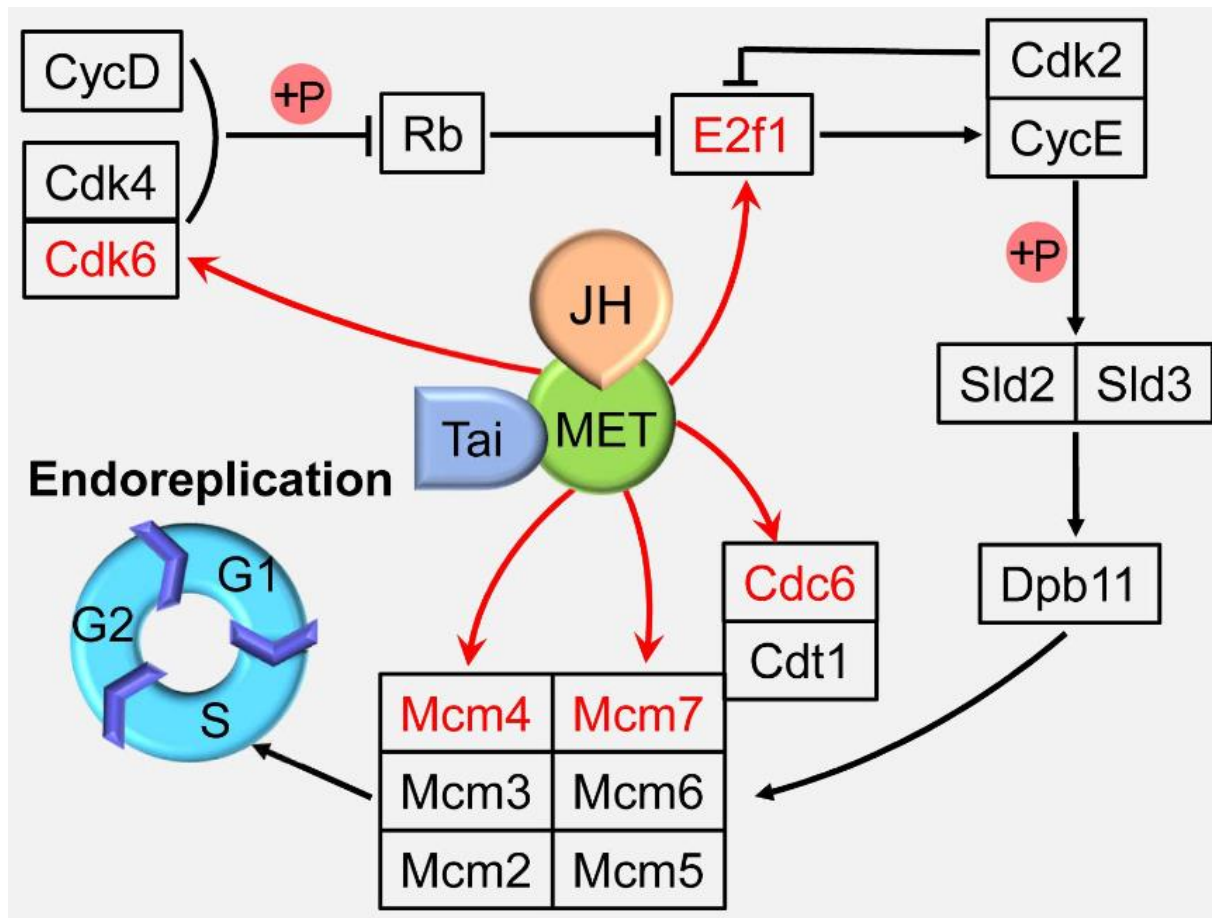


Slika 8. Prikaz usporedbe mitoze i dva tipa endoreplikacije: endociklusa i endomitoze, u obliku strelica koje prikazuju tijekom svakog procesa. Slika je preuzeta iz rada Fox i Duronio 2013. „Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease“. G1, S, G2 su faze interfaze dok mitozu je označena s slovom M. Pod A. vidimo prikaz mitoze s prirodnim prolaskom svih faza; B. kod endomitoze možemo vidjeti kako stanica preskače fazu mitoze i G1 fazu te nakon G2 faze ponovno ulazi u S fazu gdje dolazi do sinteze DNA molekule, usporedno s njom endociklus je sastavljen od repeticije S faze gdje nastaje DNA i G faze gdje se stanica priprema za ponovnu S fazu.

Kod vinskih mušica roda *Drosophila* Fallén 1823, diferencirane diploidne stanice epiderme i epitela probavnog trakta prilikom ranjavanja ulaze u endociklus i postaju poliploidne (Ren i sur. 2020). Ovakav odgovor na stres sličan je odgovoru masnog tkiva kod roda *Rhodnius* Stål 1859 u radu Wigglesworth i sur. (1966), gdje stanice postaju poliploidne jer tako povećavaju biosintezu makromolekula za preživljavanje i nošenje sa stresom. Doduše povećan broj kopija gena ne mora značiti i povećanu ekspresiju istih, zbog čega se hipoteza da poliploidija mora nužno dovesti do povećavanja biosinteze smatra prejednostavnom (Kim i sur., 2011; Fox i Duronio, 2013). Kod primjera roda *Drosophila* susrećemo se s indukcijom poliploidije ranjavanjem nazvanim WIP (wound-induced polyploidization) (Losick et al., 2016). Ovdje je moguće postaviti hipotezu da je izazvana poliploidija reakcija stanica oko rane koja bi omogućuje brže zarastanje i odgovor na moguću infekciju. Vinske mušice roda *Drosophila* su također primjer za endociklički nastanak dvaju tipova poliploidnih stanica ovisno o rasporedu kromosoma. Nastale stanice mogu sadržavati poliploidne kromosome tj. duplicirane verzije svih kromosoma diploidnih stanica ili politene kromosome gdje nije došlo do razdvajanja sestrinskih kromatida nakon multiplikacije te je takav „mega“ kromosom vidljiv u jezgri (Ren i sur. Prema Frawley i Orr-Weaver, 2015). Oba tipa stanica nastaju endociklusom te je moguć naknadni prijelaz između njih proučavan u stanicama jajnika mušica roda *Drosophila* (Bauer et al., 2012). Prilikom endociklusa u stanicama jajnika protein kondenzin II utječe na razdvajanje kromatida što

sprječava nastanaka politenih kromosoma. Frawley i Orr-Weaver (2015) te Stormo i Fox (2017) proučavali su politene kromosome, specijalni oblik poliploidnih kromosoma u kojima ne dolazi do duplikacije heterokromatinskih regija. Za razliku od politenih poliploidni kromosomi, iako zahtijevaju više energije, za razdvajanje i duplikaciju, praktični su zbog duplikacije svih gena u velikom broju.

Mehanizmi regulacije endoreplikacije su prisutni u diploidnim stanicama (Ren i sur. 2020). Aktivnošću hormona kukaca, ciklin-ovisnih kinaza, ciklina i enzima stanice reguliraju razvoj i okolišne faktore indukcijom endoreplikacije. Juvenilni hormon (JH) i 20-hidroksiekdison (20E) su dva dominantna hormona uključena u razvoj, metamorfozu, presvlačenje i reprodukciju kukaca. Istraživanja također pokazuju da imaju i značajnu ulogu u regulaciji endoreplikacije vežući se za jezgrene receptore čime induciraju ekspresiju gena za stanični ciklus (Slika 9.) (Fallon and Gerenday, 2010; Jindra et al., 2013). Iako je interakcija ova dva hormona međusobno slabo istražena, smatra se da mogu zajednički koordinirati dijeljenje stanica za vrijeme MES (mitotic-endcycle switch) procesa (Ren i sur. 2020). MES je proces promjene stanica određenih tkiva iz provođenja mitoze u provođenje endoreplikacije zbog indukcije nekog faktora. Faktori mogu biti unutrašnji faktori razvoja ili okolišni faktori poput primjera roda *Drosophila* čije stanice jajnika pokazuju značajan sadržaj politenih kromosoma nakon izlaganja niskim temperaturama i hranom bogatom proteinima (Mal'ceva et al., 1995). Ovdje bih se osvrnuo na poliploidiju kao pojavu koja omogućuje prolaznu adaptaciju na stresne uvjete, kroz regulaciju mitoze u endociklus (Ren i sur. 2020.)



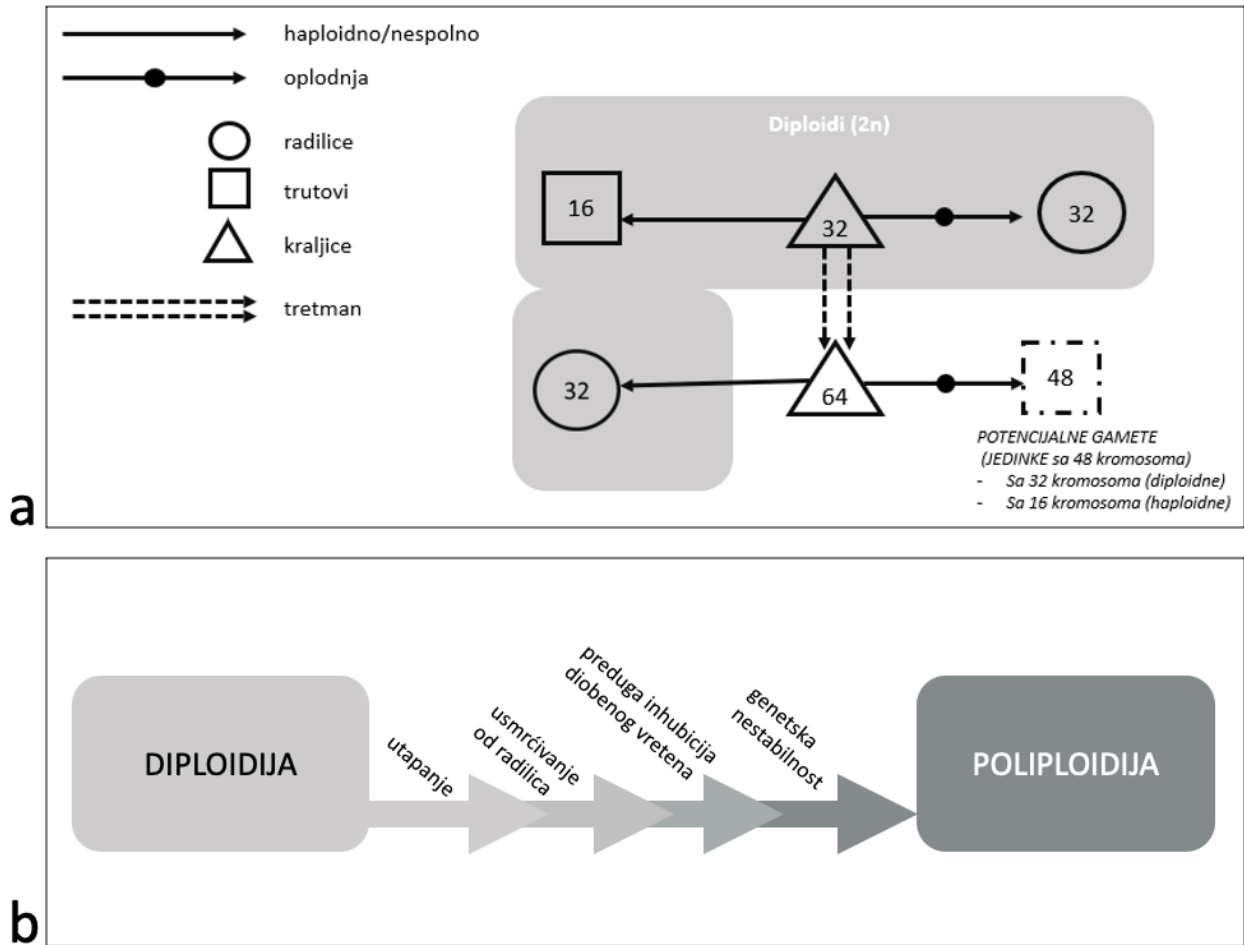
Slika 9. Prikaz mehanizma Juvenilnog hormona u regulaciji endociklusa stanica kukaca. U mehanizmu sudjeluju faktori prisutni i u diploidnom tkivu poput ciklin ovisnih kinaza, ciklina te enzima. JH-Met/Tai ligand-receptor kompleks direktno aktivira ekspresiju gena staničnog ciklusa uključujući i mikrokromosom-održavajuće proteine 4 i 7 (Mcm4 and 7), regulator staničnog dijeljenja 6 (Cdc6), ciklin ovisnu kinazu 6 (Cdk6), i adenovirus E2 factor-1 (E2f1) da regulira endoreplikaciju i staničnu poliploidiju. Me t (Methoprene-tolerant); Tai (Taiman); Cyc (cyclin); Cdk (Cyclin-dependent kinase); Rb (retinoblastoma); Cdt1, Cdc10 protein-dependent transcript 1; Mcm (minichromosome maintenance protein). Prikaz preuzet iz rada Ren i sur. 2020 Regulatory Mechanisms of Cell Polyploidy in Insects, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*

Osim svih pogodnosti koje poliploidija donosi u adaptaciji organizma na okoliš, važno je istaknuti i veliki broj problema koje može izazvati. Neregulirana poliploidija može imati značajan negativni utjecaj na plodnost i fitnes organizma jer može izazivati genetsku nestabilnost, abnormalnosti u fiziologiji i morfologiji stanica te malignost tkiva (Zhimulev, 1996; Van de Peer i sur., 2017; Fox i Duronio, 2013). Otkrivena je povezanost između endoreplikacije i razvoja i progresije tumora u sisavaca (Storchova i Pellman, 2004; Davoli i de Lange, 2011; Fox i Duronio, 2013; Coward i Harding, 2014). Fox i Duronio (2013) raspravljaju o povezanosti endoreplikacije i genetske nestabilnosti, gdje se pokazalo kako oba faktora naizmjenično potiču jedni druge. Stanice koje su genetski nestabilne potaknuti će endoreplikaciju koja će zauzvrat poticati genetsku nestabilnost, no u isto vrijeme sprječavat će daljnju mitozu takvih

stanica (Fox i Duronio. 2013). Fox i Duronio (2013) zaključuju da endoreplikacija, iako može biti štetna, predstavlja jedan od aspekata fenotipa diferenciranih stanica te u pravo vrijeme i do određene razine predstavlja esencijalni faktor rasta i morfogeneze u biljaka i životinja.

Osvrt na praktični dio istraživanja

Po svim navedenim obilježjima poliploidije kao prirodnog evolucijskog mehanizma i prilagodbe, u ovom istraživanju provjerio sam hipotezu je li i umjetna, kemijska indukcija poliploidije u cijelom organizmu moguća. Subjekt ovog istraživanja bila je matica medonosne pčele *Apis mellifera*, čiji je normalni uzgoj (Johnstone 2008) za potrebe istraživanja modificiran upotrebom citostatika kolhicina. Kolhicin je kemikalija koja utječe na mikrotubule diobenog vretena te sprječava citokinezu prilikom mitoze stanica, a utjecaj je prolazan te nakon isparavanja kemikalije, stanice koje su tada postale poliploidne mogu ponovno i takve ući u mitozu. Hipoteza je glasila da tretirajući ličinke i jaja ove medonosne pčele mogu se razviti tetraploidne jedinke. Ako se ista jaja uzgajaju kao matice, a razlika u nastanku radilice i matice je samo u prehrani ličinke (Johnstone 2008), smatram da će novonastala tetraploidna matica imati mogućnost partenogenetskog stvaranja potomstva tj. da će bez oplodnje stvarati diploidne radilice. U slučaju da se takva matica pari s mužjakom, koji mora biti haploidan, nastalo potomstvo bi predstavljalo triploidnu liniju za koju smatram da ne bi bila genetski stabilna (Slika 10.). Nastalo potomstvo tetraploidne matice bi prvobitno onda bile partenogenetski izlegnute radilice koje, iako imaju uobičajenih 32 kromosoma nazivam „pseudoradilicama“ (naziv predložen ovdje) zbog njihovog neuobičajenog podrijetla. Mogućnost stvaranja radilica bez oplodnje koje su još k tome i genetičke kopije same matice daje perspektive za stvaranje novih uzgojnih mjera i proučavanje genetike medonosnih pčela. U slučaju da je mehanizam stvaranja tetraploidne matice moguć, možemo predložiti novi način uzgoja matice koji uključuje uzgoj poliploidne kraljice iz roja s poželjnim svojstvima, te uzgoj njenog potomstva za nove matice kako bi se uspostavile nove kolonije. Budući da tetraploidna matica ne zahtijeva oplodnju te zbog toga ni pristup okolini, uzgoj bi bilo moguće potpuno prilagoditi laboratorijskim uvjetima te brže i efikasnije klonirati veliki broj matice koje će stvarati kopije odabranog roja. Za razliku od Tuckerovog (1958) rada i automiktične partenogeneze koja se pojavljuje nasumično, sve tetraploidne matice bi trebale imati mogućnost bez oplodnje stvarati radilice.



Slika 10. Skica teoretskog potomstva poliploidne 4n matice i prepreka u indukciji takve poliploidije. A) Teoretski prikaz govori kako matička koja je poliploidna (64 kromosoma) bi mogla partenogenezom tj. bez oplodnje stvarati diploidne jedinice koje bi po broju kromosoma bile jednake prirodnim radilicama medonosnih pčela, no zbog neuobičajenog nastanka ih nazivam "pseudoradilicama", u slučaju oplodnje gameta poliploidne matice (32 kromosoma) s gametama haploidnim trutom (16 kromosoma) nastaje 3n jedinka s 48 kromosoma koja bi vrlo vjerojatno uginula pri izlijevanju zbog nepravilnog broja kromosoma. B) Prikaz teoretskih prepreka u stvaranju tetraploidne matice. Prepreke su prikazane kao stepenice koje vode od diploidnog oblika jedinice u poliploidni oblika. Prve dvije stepenice su tehničke i govore o problemima koji se mogu susresti u pokusu te koji bi onemogućili dobivanje pozitivnih rezultata. Druge dvije su molekularnog karaktera i govore o pojavama koje se mogu desiti zbog efekta kemikalije s kojom se jaja i ličinke tretiraju.

U mojoj hipotezi sam predložio nekoliko mogućih stepenica koje trebam prijeći u stvaranju tetraploidne matice (Slika 10). Stepenice predstavljaju tehničke i molekularne probleme koje bi mogle spriječiti pozitivne rezultate ovog istraživanja (Slika 10.). Prve dvije stepenice uključuju tehničke probleme pri izvođenju pokusa koji bi ometali stvaranje poliploidije i uključuju utapanje ličinki i jaja u samoj kemikaliji te usmrćivanje tretiranog potomstva od strane radilica. Te stepenice sam zaobišao testiranjem veličine kapljica i njihovih volumena te odredio najbolje volumene. Kod rada s pčelama nisam uspio prijeći drugu tehničku prepreku, jer su radilice usmrtille cijeli okvir potomstva nezavano bilo ono tretirano ili ne. Da bi zaobišao tu prepreku tretirao sam jaja mrava roda *Lasius* koja su se nalazila u uzgojnoj tubi samo s kraljicom

bez radilica. Hipoteza je bila da sama kraljica mrava ne bi usmrtila svoje potomstvo već da takvu ulogu u koloniji, kao i kod pčela imaju radilice. Hipoteza nije odbačena s promatranjem kraljica mrava nekoliko replika kako se brinu o tretiranim jajima. Druge dvije prepreke su molekularnog karaktera te predstavljaju smrtnost tretiranog potomstva zbog preduge inhibicije diobenog vretena i smrtnost zbog genetske nestabilnosti nastalih jedinki.

Argumentirao bih da je druga prepreka (smrtnost zbog preduge inhibicije diobenog vretena) u ovom istraživanju uspješno pređena, jer postoje izlegnute jedinke iz jaja koja su stajala u kolhicinu dok isti nije ispario na sobnoj temperaturi. Budući da među tretiranim mravima vidimo žive jedinke (Tablica 1.) smatram da su radilice pčela usmrtilo tretirano potomstvo zbog instinkta za čišćenje i pronalaska strane tvari na potomstvu, a ne zbog smrtnosti izazvane od strane kolhicina. Zadnja stepenica je smrtnost zbog nestabilnosti genoma. Ova prepreka je teško uočljiva jer u parametrima mojih pokusa nisam pratio omjer tretiranog i izlegnutog potomstva. Kako bih provjerio ovu stepenicu bila bi mi potrebna molekularna istraživanja. Moguće je argumentirati kako, po dobivenim rezultatima ne mogu tvrditi da je kemikalija uopće utjecala na tretirano potomstvo mrava i paličnjaka.

Budući da sam u ovom istraživanju svoje rezultate temeljio samo na usporedbi morfologije (fenotipa) kontrole i tretiranog potomstva, ne mogu tvrditi da je kolhicin uspješno izazvao poliploidiju ili je li uopće utjecao na tretirana jaja. Iako je ovo istraživanje imalo za cilj teoretski proučiti moguće načine umjetne indukcije poliploidije čitavog organizma odlučio sam provesti neke od ovih pokusa da dobijem bolji dojam o realnosti ove hipoteze. Daljnja istraživanja bi uključivala provjeru poliploidije dobivenih mrava i paličnjaka, molekularnim metodama. Nakon provedenih istraživanja smatram da je za uspješno provođenje indukcije poliploidije u medonosnih pčela potrebna prilagodba metoda koja ne uključuje radilice. Prijedlog takve metode, iako tehnički iznimno zahtjevan, bio bi laboratorijski uzgoj nesporene matice koja apomiktičnom partenogenezom stvara jaja radilica koja se zatim tretiraju i uzgajaju kao tetraploidne kraljice.

Zaključak

U objavljenim istraživanjima ne postoji spomen indukcije poliploidije kod matice pčela, pa se ovaj završni seminarski rad može smatrati prvim objavljenim materijalom na ovu tematiku. Iako je kod opnokrilaca poliploidija prirodno prisutna, s njome nije jednostavno manipulirati. Zbog tehničkih poteškoća u tretiranju i radu s pčelama izvan laboratorijskih uvjeta ne mogu konačno zaključiti kako kolhicin utječe na jaja i ličinke medonosne pčele. Prema dobivenim rezultatima ipak mogu zaključiti da indukcija poliploidije u matica medonosne pčele *Apis mellifera* zasigurno nije moguća u prirodnim uvjetima. Ne mogu tvrditi ni da su ličinke pčela usmrćene zbog abnormalnosti nastalih kemikalijom ili jednostavno zbog prisustva strane kemikalije u košnici. Iz pokusa na mravima roda *Lasius* i vijetnamskim paličnjacima mogu zaključiti da tretiranje jaja ovih vrsta kolhicinom ne inhibira razvoj jaja i ne uzrokuje morfološke promjene na nastalom potomstvom. Ponovno, ne mogu tvrditi da sama kemikalija nije imala utjecaj na kromosomski sastav tretiranih jedinki, već samo da ekspresija novog sastava genoma možda nije vidljiva u samoj morfologiji. Ono što mogu tvrditi jest da je potomstvo pčela bilo usmrćeno od strane radilica, a ne zbog utjecaja kemikalije, jer potomstvo mrava koji su genetski vrlo slični pčelama nije pokazalo istovjetnu smrtnost nakon tretiranja. Iz rezultata ovog istraživanja, provedenog ukupno na tri vrste iz različitih skupina, ne mogu tvrditi da korištena kemikalija može uzrokovati poliploidiju, promatrajući samo morfologiju tretiranih jedinki i kontrole.

Zahvale

Ovim putem se zahvaljujem pro.dr.sc Damjanu Franjeviću i asistentu doc.dr.sc. Josipu Skeji na mentorstvu i ispravku ovog rada te pomoći i potpori za provođenje pokusa ovog istraživanja. Također se zahvaljujem doc.dr.sc. Saši Prđunu i pčelaru Oliveru Novoselu na pomoći oko praktičnog dijela istraživanja te dr.sc Petri Cvjetko na donaciji kolhicina.

Literatura

Banks, W.A., Lofgren, C.S., Jouvenaz, D.P., Stringer, C.E., Bishop, P.M., Williams, D.F., Wojcik, D.P. and Glancey, B.M., 1981. Techniques for collecting, rearing, and handling imported fire ants.

Coward, J. and Harding, A., 2014. Size does matter: why polyploid tumor cells are critical drug targets in the war on cancer. *Frontiers in oncology*, 4, p.123.

Culliney, T.W., 1983. Origin and evolutionary history of the honeybees *Apis*. *Bee World*, 64(1), pp.29-38.

Cunha, M.S., Cardoso, D.C., Cristiano, M.P., de Oliveira Campos, L.A. and Lopes, D.M., 2021. The Bee Chromosome database (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 52(2), pp.493-502.

Davoli, T. and de Lange, T., 2011. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annual review of cell and developmental biology*, 27(1), pp.585-610.

Domingues, A.M.T., Waldschmidt, A.M., Andrade, S.E., Andrade-Souza, V., Alves, R.M.D.O., Silva Junior, J.C.D. and Costa, M.A., 2005. Karyotype characterization of *Trigona fulviventris* Guérin, 1835 (Hymenoptera, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining: Report of a new chromosome number in the genus. *Genetics and Molecular Biology*, 28, pp.390-393.

Fallon, A.M. and Gerenday, A., 2010. Ecdysone and the cell cycle: investigations in a mosquito cell line. *Journal of insect physiology*, 56(10), pp.1396-1401.

Fox, D.T. and Duronio, R.J., 2013. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development*, 140(1), pp.3-12.

Futuyma, D.J. and Moreno, G., 1988. The evolution of ecological specialization. *Annual review of Ecology and Systematics*, pp.207-233.

Gilliam, M., TABER III, S. and Richardson, G.V., 1983. Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. *Apidologie*, 14(1), pp.29-39.

- Husband, B.C., 2000. Constraints on polyploid evolution: a test of the minority cytotype exclusion principle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1440), pp.217-223.
- Jindra, M., Palli, S.R. and Riddiford, L.M., 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annual review of entomology*, 58, pp.181-204.
- Johnstone, M., 2008. Rearing queen bees. Project Officer, Honey Bees, Richmond. State of New South Wales through NSW Department of Primary Industries.
- Keighren, M. and West, J.D., 1993. Analysis of cell ploidy in histological sections of mouse tissues by DNA-DNA in situ hybridization with digoxigenin-labelled probes. *The Histochemical journal*, 25(1), pp.30-44.
- Kerr, W.E. and da Silveira, Z.V., 1972. Karyotypic evolution of bees and corresponding taxonomic implications. *Evolution*, 26(2), pp.197-202.
- Kerr, W.E., 1974. Advances in cytology and genetics of bees. *Annual Review of Entomology*, 19(1), pp.253-268.
- Kim, J.C., Nordman, J., Xie, F., Kashevsky, H., Eng, T., Li, S., MacAlpine, D.M. and Orr-Weaver, T.L., 2011. Integrative analysis of gene amplification in *Drosophila* follicle cells: parameters of origin activation and repression. *Genes & development*, 25(13), pp.1384-1398.
- Landis, J.B., Kurti, A., Lawhorn, A.J., Litt, A. and McCarthy, E.W., 2020. Differential gene expression with an emphasis on floral organ size differences in natural and synthetic polyploids of *Nicotiana tabacum* (Solanaceae). *Genes*, 11(9), p.1097.
- Maciver, S.K., 2016. Asexual amoebae escape Muller's ratchet through polyploidy. *Trends in parasitology*, 32(11), pp.855-862.
- Mal'ceva, N.I., Gyurkovics, H. and Zhimulev, I.F., 1995. General characteristics of the polytene chromosomes from ovarian pseudonurse cells of the *Drosophila melanogaster* otu 11 and fs (2) B mutants. *Chromosome Research*, 3(3), pp.191-200.
- Muller, H.J., 1925. Why polyploidy is rarer in animals than in plants. *The American Naturalist*, 59(663), pp.346-353.

- Rangel, J., Strauss, K., Seedorf, K., Hjelman, C.E. and Johnston, J.S., 2015. Endopolyploidy changes with age-related polyethism in the honey bee, *Apis mellifera*. *PLoS One*, 10(4), p.e0122208.
- Reiss, R.A., Schwert, D.P. and Ashworth, A.C., 1995. Field preservation of Coleoptera for molecular genetic analyses. *Environmental Entomology*, 24(3), pp.716-719.
- Ren, D., Song, J., Ni, M., Kang, L. and Guo, W., 2020. Regulatory mechanisms of cell polyploidy in insects. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, p.361.
- Skejo, J. 2022. Reconstruction of the last eukaryotic common ancestor by cladistic and phylogenetic. Doctoral thesis.
- Storchova, Z. and Pellman, D., 2004. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(1), pp.45-54.
- Thompson, J.N. and Merg, K.F., 2008. Evolution of polyploidy and the diversification of plant–pollinator interactions. *Ecology*, 89(8), pp.2197-2206.
- Tucker, K.W., 1958. Automictic parthenogenesis in the honey bee. *Genetics*, 43(3), p.299.
- Tymowska, J. (1991). Polyploidy and cytogenetic variation in frogs of the genus *Xenopus*. *Amphibian cytogenetics and evolution*, 259, 297.
- Tymowska, J., 1991. Polyploidy and cytogenetic variation in frogs of the genus *Xenopus*. *Amphibian cytogenetics and evolution*, 259, p.297.
- Wigglesworth, V.B., 1966. Polyploidy and nuclear fusion. *Nature*, 212(5070), pp.1581-1581.
- Zeuner, F. E., 1951. A discussion of time-rates in evolution: time-rates in organic evolution. Blackwell Publishing Ltd. 162(2), 124-130).

Životopis

Nakon završene Osnovne škole Savski gaj, 2015. godine upisuje Agronomsku školu Zagreb, koju završava s jednim od najboljih uspjeha generacije. Za vrijeme školovanja sudjeluje na Erasmus projektu mobilnosti na dvotjednom programu "Primjene agrotehničkih mjera u vodstvu gospodarstva" u Padovi. Također za vrijeme srednje škole u srpnju 2017. sudjeluje na Ljetnoj školi znanosti u Požegi kao sudionik projekta Be(e) inspector, pod vodstvom Alexandra Kempf, CNRS Pariz. Naučena iskustva prezentira u studenom 2017. na konferenciji "Korak u nauku" u Istraživačkoj stanici Petnica, Srbija. U kolovozu 2018. godine ponovno sudjeluje na Ljetnom kampu kao sudionik projekta "Brain maps perception, not reality", pod vodstvom Celie Lorientte, ISC Marc Jeannerod. Nakon završene srednje škole 2019. godine upisuje Prirodoslovno-matematički fakultet, smjer biologija. Službeno postaje volonter društva za edukaciju van okvira (EVO) 2019. godine gdje provodi nekoliko radionica i predstavlja društvo na Otvorenim danima Instituta Ruđer Bošković. U kolovozu 2021. godine, u svojoj drugoj godini studija, postaje član Udruge studenata biologije-BIUS te se pridružuje sekciji za Opnokrilce na velikom terenu Udruge. Za vrijeme članstva, s voditeljima sekcije radi na prijedlogu za prvi hrvatski pčelarski park. U listopadu 2021. preuzima vodstvo sekcije za Opnokrilce, u kojoj u ožujku 2022. godine pokreće istraživačko-edukacijski projekt "Cvjetna družba" s ciljem proučavanja urbanizacije na populacije oprašivača. Za vrijeme obrazovanja aktivira se u studentskoj zajednici te u studenom 2021. godine postaje studentski predstavnik u Vijeću Biološkog odsjeka. Zbog aktivnosti u Udruzi BIUS, nagrađen je s izborom za člana Upravnog odbora Udruge u prosincu 2021. godine, s dužnosti voditelja Web-a te koordinatorom studentskog časopisa In Vivo. U svojem obrazovanju sudjeluje i organizira nekoliko projekata, od kojih je značajno sudjelovanje u projektu ProSPer (Provedba i unapređenje stručne prakse na PMF-u - ProSPer PMF) obavljajući praksu u Ministarstvu gospodarstva i održivog razvoja, Zavodu za zaštitu prirode i okoliša, pod mentorstvom dr.sc. Ana Ješovnik, kao sudionik na projektu "Cro Buzz Klima". Također sudjeluje u projektu društva za edukaciju van okvira u projektu "Korak u znanost" na izradi sistema radionica za provedbu u srednjim školama. Njegova aktivnost u studentskoj zajednici donosi mu poziciju predstavnika studenata biologije Hrvatske, u mreži studenata biologije Europe YEB (Young European biologist) u kolovozu 2022. godine.