

Optimizacija izolacije zigotnih embrija uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) u svrhu istraživanja kvantitativne ekspresije gena

Demir, Tanita

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:483614>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Tanita Demir

Optimizacija izolacije zigotnih embrija uročnjaka
(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) u svrhu istraživanja
kvantitativne ekspresije gena

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za kulturu biljnog tkiva na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nataše Bauer i neposrednim vodstvom mag. biol. mol. Andreje Škiljaica. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojim roditeljima, sestri i bratu koji su uspjeli preživjeti cijeli period moga studiranja, što su uvijek bili tu i vjerovali u mene čak i kada ja nisam, pružajući mi neizmjernu podršku u svakom trenutku.

Zahvaljujem se ostatku obitelji na svim lijepim riječima koje su me gurale dalje. Posebno se zahvaljujem tetki Senki koja je uvijek spremna pomoći i pogurati me na iduću stepenicu.

Hvala svim prijateljima s kojima sam provela mnoge zabavne i nezaboravne trenutke koji su učinili cijelo moje studiranje puno ljepšim iskustvom. Hvala kolegici, a ponajviše prijateljici Luciji na svim situacijama i dugim razgovorima koji su me tješili i uveseljavali.

Veliko hvala svim članovima Laboratorija za kulturu biljnog tkiva, posebice mag. biol. mol. Mateji Jagić, mag. biol. mol. Tamari Vuk i mag. biol. mol. Mirti Tokić na svojoj pomoći, odgovorima i veseloj atmosferi u labosu.

Posebno zahvaljujem mag. biol. mol. Andreji Škiljaici na velikoj pomoći, bodrenju i strpljenju kada pokusi nisu funkcionirali te na svom znanju kojeg sam stekla tijekom rada u labosu i pisanja ovog rada.

Najviše zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Nataši Bauer koja je imala povjerenja u mene i omogućila mi da budem dio ovoga tima. Hvala na podršci, savjetima i uloženom trudu u hitnim situacijama. Veliko hvala na ovom cijelom iskustvu koje me naučilo kako se nositi s neuspjehom i nastaviti dalje unatoč svemu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Optimizacija izolacije zigotnih embrija uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) u svrhu istraživanja kvantitativne ekspresije gena

Tanita Demir

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Analize genske ekspresije u pojedinim embrionalnim stadijima daju uvid u genetske mehanizme i regulatorne mreže koji omogućuju potpuni razvoj embrija. Zbog točno određenog i predvidljivog razvoja tijekom embriogeneze, uročnjak (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) je idealan model u takvim istraživanjima. Brojne tehničke poteškoće povezane s izolacijom različitih stadija zigotnih embrija otežavaju analize ekspresije gena tijekom embriogeneze. Ovim radom uhodane su lako primjenjive metode izolacije pojedinih stadija embrija uročnjaka koje omogućuju izdvajanje velikog broja čistih embrija, oslobođenih od stanica majčinske biljke koje u ovakvom tipu istraživanja predstavljaju kontaminaciju. Uhodan je postupak mikromanipulacije zigotnih embrija, upotrebom invertnog mikroskopa s mikrodisektorom, koji omogućuje izdvajanje nekoliko razvojnih stadija embrija. Na različitim transgeničnim i mutantnim linijama uročnjaka provedena je metoda izolacije dovoljne količine mRNA za analize ekspresije gena u kotiledonarnim embrijima. Metodom reverzne transkripcije mRNA su prepisane u cDNA koja je korištena kao kalup za umnažanje u kvantitativnoj lančanoj reakciji polimeraze (qPCR), te je analizirana relativna ekspresija gena *CML41* i *FBW2* u kotiledonarnim embrijima. Provedeno istraživanje ukazuje da je za analizu genske ekspresije do 6 gena metodom qPCR potrebno izolirati ukupnu mRNA iz 70-tak kotiledonarnih embrija. Metode izolacije embrija i mRNA provedene u ovom radu pomoći će u planiranju eksperimenata transkriptomске analize embrija u budućim istraživanjima.

(53 stranice, 18 slika, 2 tablice, 101 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *Arabidopsis thaliana*, izolacija embrija, mikromanipulacija, izolacija mRNA, qPCR

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Nataša Bauer

Neposredni voditelj: mag. biol. mol. Andreja Škiljaica

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Nataša Bauer

izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

Rad prihvaćen: 17.02.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master thesis

Optimization of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. zygotic embryo isolation for subsequent use in quantitative gene expression analysis

Tanita Demir

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Gene expression analyses at individual embryonic stages give insight into genetic mechanisms and regulatory networks which enable completion of embryonic development. Due to its precise and predictable pattern of embryogenesis, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. represents an ideal model plant. Numerous technical difficulties of zygotic embryo isolation at different stages hinder gene expression analyses during embryogenesis. Here, easily applicable methods of *A. thaliana* embryo isolation were described, enabling separation of a large number of embryos clean from surrounding tissues. A micromanipulation procedure using inverted microscope with microdissector was optimized, enabling isolation of embryos at different developmental stages. Furthermore, a method of mRNA isolation from cotyledonary embryos of different transgenic and mutant lines in quantities sufficient for subsequent gene expression analysis was performed. Using reverse transcription method, equivalent quantities of mRNA were transcribed to cDNA, which was used as template for amplification in quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and relative gene expression levels of *CML41* and *FBW2* in cotyledonary embryos were analysed. This research shows that total mRNA isolated from 70 cotyledonary embryos is sufficient for quantitative gene expression analysis by qPCR of at least 6 genes. Embryo and mRNA isolation methods performed in this research will help in future planning of embryo transcriptome analyses.

(53 pages, 18 figures, 2 tables, 101 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, embryo isolation, micromanipulation, mRNA isolation, qPCR

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nataša Bauer

Assistant Supervisor: mag. biol. mol. Andreja Škiljaica

Reviewers: Assoc. Prof. Dr. Nataša Bauer

Assoc. Prof. Dr. Martina Šeruga Musić

Assoc. Prof. Dr. Željka Vidaković-Cifrek

Replacement reviewer: Assoc. Prof. Dr. Dunja Leljak-Levanić

Thesis accepted: February 17th, 2021.

Sadržaj

1 UVOD.....	1
1.1 Zigotna embriogeneza uročnjaka.....	1
1.1.1 Početak zigotne embriogeneze.....	1
1.1.2 Morfološki razvoj embrija.....	1
1.1.3 Asimetrična dioba stanica.....	3
1.2 Metode izolacije stanica, tkiva i razvojnih stadija embrija biljaka.....	5
1.2.1 Metode izolacije stanica gametofita i staničnih jezgri.....	5
1.2.2 Metode izolacije tkiva i cjelovitih embrija.....	6
1.3 Analiza genske ekspresije tijekom embrionalnog razvoja uročnjaka.....	8
1.3.1 Uloge gena <i>TIP41</i> , <i>CML41</i> i <i>FBW2</i>	9
1.4 Cilj istraživanja.....	11
2 MATERIJALI I METODE.....	12
2.1 Materijali.....	12
2.1.1 Biljni materijal.....	12
2.1.2 Pribor za izolaciju embrija.....	12
2.1.3 Puferi.....	12
2.1.3.1 Izolacijski pufer.....	12
2.1.3.2 TAE.....	12
2.1.4 Početnice za qPCR.....	13
2.1.5 DNA molekularni standard.....	13
2.2 Metode.....	13
2.2.1 Uvjeti uzgoja biljaka.....	13
2.2.2 Odabir komuški.....	13
2.2.3 Površinska sterilizacija komuški.....	15
2.2.4 Izolacija zigotnih embrija.....	16
2.2.4.1 Izolacija embrija u predglobularnim stadijima.....	16
2.2.4.2 Izolacija embrija u globularnom, srcolikom i torpedo stadiju.....	17
2.2.4.3 Izolacija embrija u kotiledonarnom stadiju.....	17
2.2.5 Mikromanipulacija zigotnim embrijima upotrebom invertnog mikroskopa s mikrodisektorom.....	18
2.2.5.1 Priprema staklenih kapilara i predmetnica za mikromanipulaciju.....	18
2.2.5.2 Mikromanipulacija zigotnim embrijima.....	19
2.2.5.3 Mjere opreza tijekom mikromanipulacije.....	21
2.2.5.4 Mikromanipulacija zigotnim embrijima za potrebe analize ekspresije gena.....	21

2.2.6 Analiza relativne ekspresije gena u kotiledonarnim embrijima	22
2.2.6.1 Izolacija ukupne mRNA.....	22
2.2.6.2 Reverzna transkripcija.....	22
2.2.6.3 Metoda qPCR.....	23
2.2.6.4 Agarozna gel elektroforeza	23
2.2.6.5 Analiza rezultata metode qPCR	24
3 REZULTATI.....	25
3.1 Izolacija zigotnih embrija uročnjaka.....	25
3.1.1 Izolacija embrija u predglobularnim stadijima	25
3.1.2 Izolacija embrija u globularnom i scolikom stadiju.....	26
3.1.3 Izolacija embrija u torpedo stadiju.....	27
3.1.4 Izolacija embrija u kotiledonarnom stadiju.....	29
3.2 Mikromanipulacija zigotnim embrijima	30
3.3 Analiza relativne ekspresije gena <i>CML1</i> i <i>FBW2</i> u kotiledonarnim embrijima različitih linija uročnjaka <i>A. thaliana</i>	30
3.3.1 Potvrda specifičnog umnažanja fragmenata.....	32
3.3.2 Uspješnost provedbe reakcije qPCR i relativna ekspresija gena <i>CML1</i> i <i>FBW2</i>	33
4 RASPRAVA	35
5 ZAKLJUČAK	43
6 LITERATURA	44
ŽIVOTOPIS.....	i

1 UVOD

1.1 Zigotna embriogeneza uročnjaka

1.1.1 Početak zigotne embriogeneze

Embriogeneza predstavlja prvu fazu razvoja novog biljnog organizma. Dijelovi biljke koji omogućuju početak embriogenog razvoja kritosjemenjača uključuju ženski gametofit, odnosno embrionsku vreću i spermalne stanice koje čine dio muškog gametofita. Embrionska vreća ili megagametofit sastoji se od sedam stanica, uključujući dvije sinergide i jajnu stanicu na mikropilarnom polu, središnju stanicu s dvije jezgre i tri antipodalne stanice na kalazalnom polu (Yadegari i Drews, 2004). Početak razvoja embrija obilježen je procesom dvostruke oplodnje u kojem dolazi do spajanja jedne spermalne i jajne stanice te druge spermalne stanice i središnje stanice s dvije jezgre. Na taj način, nastaju diploidna zigota koja predstavlja početnu točku daljnjeg razvoja embrija i triploidni endosperm koji služi za zaštitu i prehranu razvijajućeg embrija (Scott i sur., 2008). Određenim uzorkom staničnih dioba i diferencijacije dolazi do morfogeneze i sazrijevanja nastale jednostanične zigote, što omogućuje potpuni razvoj zrelog embrija (Park i Harada, 2008).

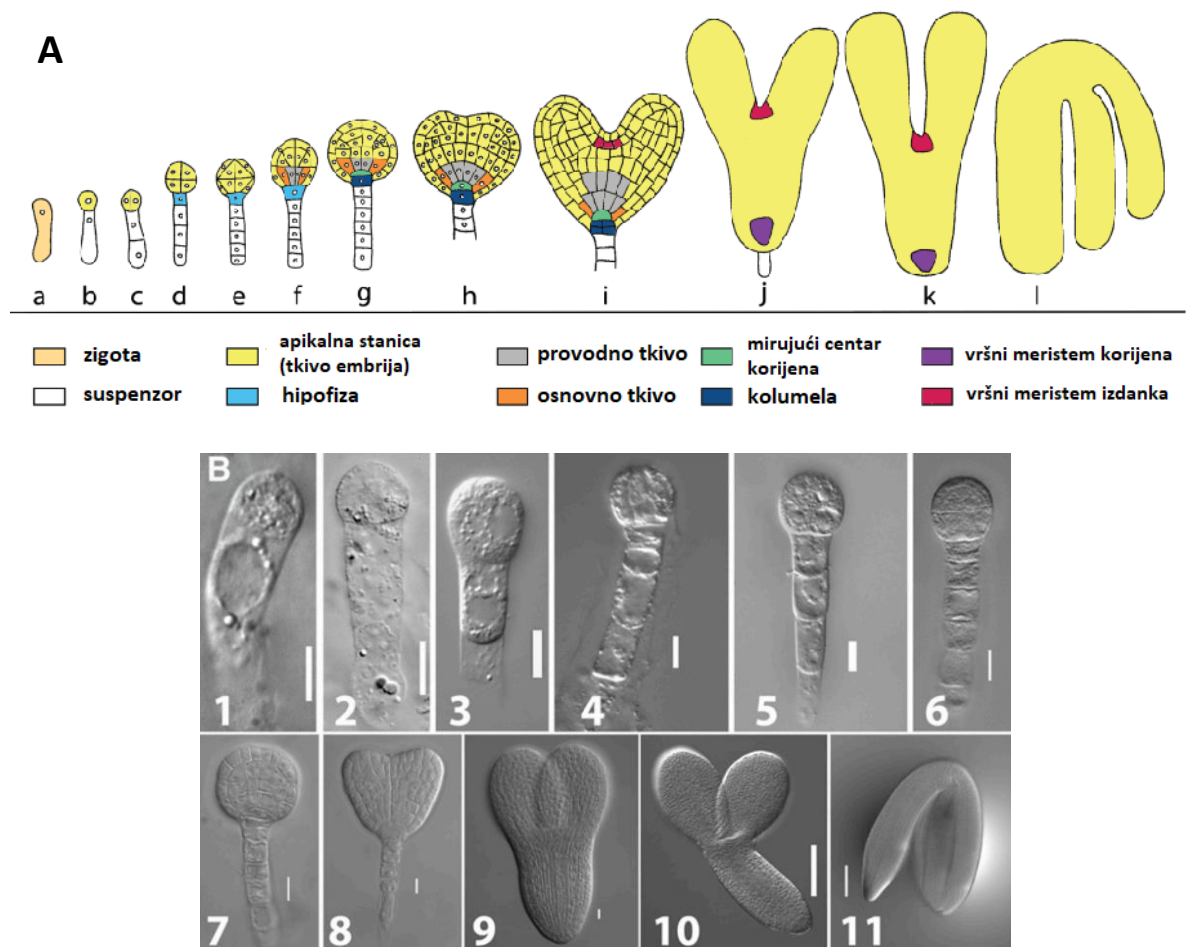
1.1.2 Morfološki razvoj embrija

Kod većine cvjetnjača, slijed uzastopnih staničnih dioba koji dovodi do nastanka embrija ne odvija se prema određenom obrascu, što onemogućuje definiranje točne razlike između pojedinih tkiva tijekom razvoja. Za razliku od toga, već prva zigotna dioba biljaka iz porodice *Brassicaceae*, kojoj pripada i uročnjak *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, označava vidljivu granicu između embrionalnog i okolnog tkiva (Bayer i sur., 2017). Uspostava polarnosti jedan je od temeljnih procesa koji omogućuje uređenje plana tijela uročnjaka, a započinje odmah nakon oplodnje kada se jezgra zigote pomiče od središnjeg dijela prema kalazalnom polu stanice (Brukhin i Morozova, 2011). Daljnja elongacija zigote (**Slika 1A, a i 1B, 1**) i njena prva asimetrična dioba dovode do nastanka manje apikalne stanice, čija dioba omogućuje nastanak embrija, i bazalne stanice s vakuolom koja dovodi do razvoja suspenzora i hipofize (**Slika 1A, b i 1B, 2**) (Baroux i sur., 2016).

Prolaskom apikalne stanice kroz dvije longitudinalne i jednu transverzalnu diobu, formira se osmostanični proembrij (**Slika 1A, d i 1B, 5**). Stanice navedenog embrija podjelu nastavljaju periklinalno, odnosno diobama koje su paralelne s površinom. Opisani proces dovodi do nastanka dermatogenog stadija embrija u kojem su jasno definirani protoderm iz

kojeg se kasnije razvija epiderma i unutarnja tkiva koja su preteča osnovnog i provodnog tkiva (**Slika 1A, e i 1B, 6**) (Park i Harada, 2008). Antiklinalne diobe protodermalnih stanica i periklinalne diobe stanica unutarnjeg tkiva omogućuju razvoj globularnog embrija (**Slika 1A, f, g i 1B, 7**). Daljnje antiklinalne diobe stanica protoderma dovode do nastanka kotiledona, čime se radijalna simetrija globularnog stadija zamjenjuje bilateralnom simetrijom srcolikog stadija embrija (**Slika 1A, h, i, j i 1B, 8**). Rast kotiledona nastavlja se diferencijacijom vršnog meristema izdanka, dok se iz donjeg dijela embrija razvijaju hipokotil i meristem korijena (Brukhin i Morozova, 2011). Razvoj kotiledona te vršnog meristema izdanka i korijena završeni su do stadija torpeda (**Slika 1A, k i 1B, 9**), dok kotiledonarni stadij (**Slika 1A, l i 1B, 10, 11**) predstavlja potpuno razvijeni embrij koji je spreman za klijanje (Abrahamsson, 2016).

Transverzalne diobe bazalne stanice dovode do stvaranja suspensora, strukture koja je pričvršćena za majčinsko tkivo, a ima ulogu u opskrbi embrija hranjivim tvarima, stvaranju određenih regulatora rasta (Yeung i Meinke, 1993), kao i učvršćivanju embrija u mikropilarnoj šupljini sjemenog zametka. Zreli suspensor uročnjaka sastoji se od osam stanica, pri čemu važnu ulogu ima hipofiza, najgornja stanica spomenute strukture. Asimetričnom diobom hipofize tijekom razvoja kasnog globularnog stadija dolazi do nastanka male stanice u obliku leće i veće bazalne stanice (**Slika 1A, g i 1B, 7**). Nastale stanice omogućuju razvoj mirujućeg centra korijena i matičnih stanica kolumele, što je nužno za stvaranje vršnog meristema korijena (Radoeva i Weijers, 2014).



Slika 1. Razvoj zigotnih embrija biljke uročnjak prikazan shematski (**A**) i izolirani zigotni embriji u različitim razvojnim stadijima analizirani pod svjetlosnim mikroskopom (**B**). (**A**) Slovicima su označeni pojedini razvojni stadiji zigotnih embrija, a boje označavaju pojedine stanice i tkiva. **a** – zigota, **b** – jednostanični stadij, **c** – dvostanični stadij, **d** – osmostanični stadij, **e** – dermatogeni stadij, **f** – rani globularni stadij, **g** – kasni globularni stadij, **h** – prijelazni stadij, **i** – rani srcoliki stadij, **j** – kasni srcoliki stadij, **k** – torpedo stadij, **l** – zreli kotiledonarni stadij. (**B**) Brojevima su označeni pojedini razvojni stadiji zigotnih embrija. **1** – zigota, **2** – jednostanični stadij, **3** – dvostanični stadij, **4** – četverostanični stadij, **5** – osmostanični stadij, **6** – dermatogeni stadij, **7** – globularni stadij, **8** – srcoliki stadij, **9** – torpedo stadij, **10** – savijeni kotiledonarni stadij, **11** – zreli kotiledonarni stadij. Skala = 10 μ m (B1 – B9), 100 μ m (B10 – B11). Preuzeto i prilagođeno prema Abrahamsson, 2016. i Xiang i sur., 2011.

1.1.3 Asimetrična dioba stanica

Unatoč jednostavnoj morfologiji embrija, veliki broj gena eksprimiranih u različitim stadijima ima važnu ulogu tijekom embriogeneze. S obzirom na to, poznato je da normalan razvoj embrija uročnjaka zahtijeva ekspresiju barem 4000 gena (Brukhin i Morozova, 2011). Izuzev oblika, razlika između apikalne i bazalne stanice uključuje diferencijalnu ekspresiju ključnih regulatornih gena (Park i Harada, 2008). Jedna od prvih selektivnih ekspresija koja se

može uočiti nakon prve diobe zigote uključuje gen *ARABIDOPSIS THALIANA MERISTEM LAYER1 (ATML1)* koji pripada obitelji skupine IV homeodomene s leucinskim zatvaračem (*eng. class IV homeodomain-leucine zipper gene family*). Spomenuti gen ima važnu ulogu tijekom kasnijeg razvoja L1 sloja vršnog meristema, a tijekom ranog embrionalnog razvoja eksprimira se u apikalnoj, ali ne i u bazalnoj stanici (Lu i sur., 1996). Također, geni koji pripadaju skupini *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN (WOX)* transkripcijskih faktora nužni su za stvaranje apikalno-bazalnog obrasca. Pri tome važnu ulogu imaju transkripti gena *WOX2* koji određuju sudbinu apikalne stanice, dok je selektivna ekspresija gena *WOX8* i *WOX9* potvrđena u bazalnoj stanici. Ekspresija gena *WOX8* u osmostaničnom stadiju embrija ograničena je na stanice suspenzora (Haecker i sur., 2004). Pravilna uspostava polarnosti zigote zahtijeva ekspresiju transkripcijskog faktora *WRKY2* koji direktnim vezanjem na regiju W-box unutar promotora gena *WOX8* i *WOX9* dovodi do aktivacije transkripcije navedenih gena. S obzirom da mutacije u genima *WRKY2*, *WOX8* i *WOX9* dovode do izostanka ekspresije *WOX2* u apikalnoj stanici, može se zaključiti da je funkcija spomenutih gena međusobno ovisna (Ueda i sur., 2011). Signalni put MAPK (*eng. mitogen-activated protein kinase*) također sudjeluje u određivanju identiteta bazalne stanice (Lukowitz i sur., 2004). Kinaza kinaze MAPK poznata pod nazivom YDA dio je signalnog puta YODA, a kodirana je genom *YDA*. Mutanti *yda* ukazuju na poremećaje u elongaciji zigote, što dovodi do simetrične diobe stanice te posljedično nemogućnosti razvoja suspenzora (Musielak i Bayer, 2014). S druge strane, stalna ekspresija navedene kinaze dovodi do stvaranja strukture koja se sastoji samo od stanica suspenzora, čime je onemogućen razvoj embrija. Navedeno ukazuje na to da je kinaza YDA važna za uspostavu polarnosti zigote i inhibiciju razvoja embrija iz bazalne stanice (Lukowitz i sur., 2004). Aktivacija kinaze YDA uključuje peptide koji pripadaju obitelji EMBRYO SURROUNDING FACTOR (ESF) (Costa i sur., 2014). Međutim, u porodici *Brassicaceae* otkriven je i dodatni put aktivacije pomoću proteina SHORT SUSPENSOR (SSP) koji se akumulira u zigoti, a translaciran je sa transkripata spermalnog podrijetla (Bayer i sur., 2009). Sporiji embrionalni razvoj uočen kod mutanta *ssp*, u kojem je insercijom T-DNA unutar gena *SSP* poremećena njegova funkcija, ukazuje na važnost postojanja dodatnog puta aktivacije kinaze YDA u svrhu brzog odvijanja životnog ciklusa uročnjaka (Babu i sur., 2013).

Mnogi razvojni procesi uključuju djelovanje različitih biljnih hormona koji sudjeluju u regulaciji aktivnosti populacija matičnih stanica i održavanju homeostaze biljaka (Terpstra i Heidstra, 2009). Nedavna istraživanja ukazuju na važnost jedinstvene i točno određene raspodjele auksina koji omogućuje diferencijaciju različitih tipova stanica tijekom razvoja

(Pillitteri i sur., 2016). Usmjereni prijenos auksina ovisi o različitim transporterima, uključujući transmembranske nosače PIN-FORMED (PIN) (Zhou i Luo, 2018). Stanice nastale prvom diobom zigote pokazuju različitu ekspresiju gena uključenih u transport i odgovor na auksin. Neposredno nakon asimetrične diobe, protein PIN7 smješten je na apikalnoj strani bazalne stanice, čime je osigurano izbacivanje auksina iz bazalne stanice. Nakon ulaska auksina i njegovog nakupljanja u apikalnoj stanici, aktivira se specifični odgovor koji određuje navedenu stanicu kao preteču proembrija. Tijekom kasnijeg razvoja, prijenos auksina preusmjerava se prema najgornjoj stanici suspenzora, što omogućuje nastanak hipofize. Navedeno ukazuje na to da polarni prijenos auksina, kao i selektivna ekspresija gena važnih za njegov transport imaju bitnu ulogu u određivanju apikalno-bazalne osi embrija (Friml i sur., 2003).

S obzirom na važnost prethodno opisanih procesa, potrebna je detaljnija analiza molekularnih mehanizama i regulatornih mreža koje omogućuju normalan razvoj tijekom rane embriogeneze uročnjaka. Razumijevanje takvih procesa zahtijeva upotrebu tehnika koje omogućuju analizu ekspresije gena specifičnih za pojedine stanice ili tkiva. U tu svrhu, nužan je razvoj metoda koje uključuju izolaciju specifičnih stanica i određenih stadija tijekom razvoja embrija (Gao i sur., 2019).

1.2 Metode izolacije stanica, tkiva i razvojnih stadija embrija biljaka

1.2.1 Metode izolacije stanica gametofita i staničnih jezgri

Postojeća znanja o muškom i ženskom gametofitu biljaka te analiza genske ekspresije pojedinih stanica gametofita i embrija imaju važnu ulogu u identifikaciji odrednica nužnih za specijalizaciju stanica tijekom razvoja. Preduvjet za opisana saznanja predstavlja pristup pojedinačnim stanicama gametofita i embrija (Englhart i sur., 2017). Iz tog razloga, razvijen je niz metoda izolacije vijabilnih stanica gametofita i jezgri određenog tipa stanica.

Jednostavna metoda izolacije spermalnih stanica azijske riže i kukuruza uključuje oslobađanje polenovih zrnaca iz prašnika upotrebom iglica. Tijekom inkubacije polenovih zrnaca u otopini manitola, dolazi do osmotskog šoka koji dovodi do puknuća zrnaca i oslobađanja spermalnih stanica (Uchiumi i sur., 2006; Kranz i sur., 1991). Unaprijeđenje opisanih metoda kod azijske riže i rajčice postignuto je filtriranjem dobivenih otopina spermalnih stanica i njihovim razdvajanjem u gradijentu gustoće (Khalequzzaman i Haq, 2005; Lu i sur., 2015). S druge strane, stanice ženskog gametofita okružene su velikom količinom

tkiva koje otežava njihovo proučavanje i manipulaciju (Kovacs i sur., 1994). S ciljem izolacije jajnih stanica azijske riže (Uchiumi i sur., 2006), kukuruza (Kranz i sur., 1991) i uročnjaka (Englhart i sur., 2017), okolno tkivo sjemenih zametaka uklanja se inkubacijom u otopini enzima za degradaciju, uključujući pektinaze, celulaze, hemicelulaze i pektolijaze. Nakon oslobađanja od tkiva sjemenog zametka, jajne stanice izoliraju se upotrebom staklenih kapilara pod invertnim mikroskopom.

Razvoj metoda izolacije pojedinih stanica i staničnih jezgri usmjerava se prema upotrebi transgeničnih linija čije modifikacije olakšavaju izolaciju željenih elemenata. Jedna od takvih je metoda izolacije živih antipodalnih stanica uročnjaka koje se mogu koristiti u svrhu analize transkriptoma. Nakon razgradnje tkiva sjemenog zametka enzimima, antipodalne stanice izoliraju se kapilarama na temelju morfologije, pri čemu je njihova identifikacija olakšana praćenjem signala zelenog fluorescentnog proteina (*eng.* green fluorescent protein, GFP) koji je ugrađen pod kontrolu promotora specifičnog za antipodalne stanice (Yu i sur., 2016). U posljednje vrijeme, detaljna analiza embriogeneze biljaka omogućena je izolacijom jezgri označenih u specifičnom tipu stanica (*eng.* isolation of nuclei tagged in specific cell types, INTACT). Na taj način, izolacija određenih jezgri transgeničnih biljaka provodi se upotrebom oznaka eksprimiranih na jezgrinim ovojnicama. Metodom INTACT moguće je izolirati jezgre središnje stanice embrionske vreće (Park i sur., 2016) te provesti analizu genske ekspresije embrija uročnjaka u ranim razvojnim fazama (Palovaara i sur., 2017).

1.2.2 Metode izolacije tkiva i cjelovitih embrija

Razvoj vaskularnih biljaka uključuje diferencijaciju različitih tkiva čija analiza omogućuje razumijevanje mnogih bioloških procesa. Složenost takvih višestaničnih organizama predstavlja prepreku tijekom analize specifičnih tkiva (Gautam i Sarkar, 2014). S ciljem prekida klijanja i očuvanja integriteta RNA, sjemenke ječma inkubiraju se u pripadajućoj otopini za fiksaciju, nakon čega se pojedina tkiva sjemenke i embrija izoliraju upotrebom skalpela i pincete (Betts i sur., 2017). Razvojem naprednih oblika mikroskopije omogućena je brza i precizna izolacija određenih skupina stanica ili tkiva, a jedna od opisanih metoda uključuje mikrodisekciju potpomognutu laserom (*eng.* laser assisted microdissection, LAM). Preduvjet za provođenje metode je pravilna priprema uzorka, što uključuje fiksaciju, procesiranje, ugradnju tkiva u vosak i rezanje na tanke slojeve. Nakon toga, tkiva pripremljenog uzorka izoliraju se upotrebom lasera pod mikroskopom (Gautam i Sarkar, 2014). Metoda LAM omogućila je analizu transkriptoma endosperma sjemenke i ranih stadija embrija

kukuruzna (Zhang i sur., 2018), kao i izolaciju određenih dijelova embrija uročnjaka u torpedo stadiju (Sakai i sur., 2018).

Velika količina okolnog tkiva i mala veličina embrija znatno otežavaju njihovu izolaciju kod različitih biljnih vrsta (Xiang i sur., 2011). Dobar primjer razvoja *in vitro* tehnika razmnožavanja predstavlja orhideja. Postojeća metoda multiplikacije podrazumijeva izolaciju nezrelih embrija orhideje i uključuje razgradnju tkiva sjemenog zametka upotrebom odgovarajuće mješavine enzima. Iz tako dobivene otopine, embriji se izoliraju filtriranjem, a njihov konačan broj odredi se upotrebom hemocitometra pod svjetlosnim mikroskopom (Aybeke, 2013). Brza izolacija velikog broja embrija kukuruza uključuje izrezivanje endosperma i embrija iz zrna klipova kukuruza upotrebom spatulice. Izolirano tkivo inkubira se u odgovarajućem volumenu izolacijskog pufera uz miješanje, čime se postiže odvajanje embrija od tkiva endosperma. Propuštanje dobivene otopine kroz sito s porama promjera 1,5 mm omogućuje odvajanje embrija od ostalog tkiva, pri čemu embriji prolaze kroz pore sita. Tako dobivena otopina profiltrira se korištenjem pora manjeg promjera, nakon čega izolirani embriji ostaju na površini sita (Zhong i sur., 2018).

Istraživanja morfogeneze embrija uključuju upotrebu različitih modelnih organizama, pri čemu je jedan od najznačajnijih uročnjak (Feng i Ma, 2017). Njegovi embriji smješteni su unutar sjemenih zametaka koji čine dio komuške, suhog ploda koji se razvija iz tučka, a sastoji se od dva dijela odvojenih septumom (Rollins, 1993). U svrhu karakterizacije određenih embrionalnih stadija uročnjaka, razvijena je metoda izolacije koja uključuje istiskivanje embrija iz sjemenih zametaka. Nakon rastvaranja komuške iglicama, sjemeni zamci inkubiraju se u otopini glicerola. Polaganjem pokrovnice nad otopinom zametaka i laganim pritiskom na pokrovnicu, dolazi do oslobađanja svih razvojnih stadija embrija (Feng i Ma, 2017). Odvajanje embrija od okolnog tkiva uspješno se provodi rezanjem sjemenih zametaka pomoću skalpela. Dva reza na mikropilarnom polu zametka omogućuju oslobađanje dijela tkiva s vezanim embrijem, nakon čega se cjeloviti embriji uročnjaka odvoje pažljivim izrezivanjem (Xiang i sur., 2011). Značajan doprinos kvantitativnim analizama genske ekspresije tijekom embrionalnog razvoja uročnjaka ostvaren je razvojem metode koja omogućuje izolaciju velike količine embrija u predglobularnim stadijima. U spomenutoj metodi, pristup razaranju okolnog tkiva uključuje mljevenje sjemenih zametaka tučkom, a embriji u različitim razvojnim stadijima izoliraju se upotrebom iglica pod invertiranim mikroskopom (Raissig i sur., 2013). Slično izolaciji embrija orhideje, tkivo sjemenih zametaka uročnjaka moguće je omekšati inkubacijom u otopini enzima za degradaciju. Nakon ispiranja

tkiva, različiti stadiji embrija izoliraju se pod invertnim mikroskopom pritiskanjem kalazalnog pola zametka i izrezivanjem embrija iz mikropilarnog pola (Zhou i sur., 2019).

1.3 Analiza genske ekspresije tijekom embrionalnog razvoja uročnjaka

Do danas su razvijene različite metode koje omogućuju identifikaciju gena ekspimiranih u pojedinim stadijima embrionalnog razvoja uročnjaka (Casson i sur., 2005). Jedna od takvih tehnika uključuje *in situ* hibridizaciju (*eng.* *in situ hybridization*, ISH) koja omogućuje preciznu lokalizaciju specifičnog fragmenta DNA ili RNA u stanicama. Metoda se temelji na hibridizaciji označene probe nukleinske kiseline s komplementarnom sekvencom u fiksiranim stanicama, a detekcija se provodi vizualizacijom hibridizirane probe kromogenim i fluorescentnim metodama. Analiza genske ekspresije opisanom tehnikom omogućena je upotrebom proba komplementarne RNA (*eng.* *complementary RNA*, cRNA) koje se dobivaju postupkom *in vitro* transkripcije s DNA klonirane u odgovarajući plazmid, a najčešće su označene dioksigeninom ili biotinom (Ying-Hsia i sur., 2019). Navedena metoda omogućila je analizu razlike u ekspresiji gena za proteine PIN (Friml i sur., 2003) i za transkripcijske faktore WOX (Haecker i sur., 2004) u pojedinim stanicama i regijama ranih embrionalnih stadija uročnjaka. Istovremena usporedba velikog broja transkripata između različitih uzoraka omogućena je razvojem metode RNA microarray koja uključuje upotrebu pločica s vezanim molekulama komplementarne DNA (*eng.* *complementary DNA*, cDNA) poznatih sekvenci. Molekule mRNA, izolirane iz uzoraka koji se uspoređuju, reverznom transkripcijom prevedu se u cDNA, pri čemu se molekule cDNA različitih uzoraka označe različitim fluorescentnim bojama. Nakon hibridizacije izoliranih molekula cDNA s molekulama koje su vezane na pločici, intenzitet fluorescencije pojedinih fluorofora omogućuje procjenu relativne količine transkripata u pojedinim uzorcima (Sealfon i Chu, 2011). Opisana metoda uspješno je primijenjena tijekom globalne analize genske ekspresije svih embrionalnih stadija uročnjaka (Xiang i sur., 2011). Potvrda valjanosti rezultata dobivenih analizom genske ekspresije tijekom embriogeneze gotovo uvijek uključuje upotrebu metode kvantitativne lančane reakcije polimeraze (*eng.* *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR). Spomenuta metoda dovodi do *in vitro* umnažanja DNA fragmenata, pri čemu vezanje interkalirajuće fluorescentne boje na sintetizirane dvolančane molekule DNA dovodi do oslobađanja fluorescencije. Iz tog razloga, kvantifikacija fragmenata od interesa može se pratiti u stvarnom vremenu. Visoka

osjetljivost i specifičnost, ponovljivost i fleksibilnost neke su od karakteristika koje su omogućile primjenu metode qPCR u svrhu detekcije malih količina mRNA (Pfaffl, 2006).

Istraživanje opisano u ovom radu provedeno je u svrhu razvoja metode kojom će se za potrebe projekta PHYTOMETHDEV (HRZZ IP-2016-06-6229), upotrebom metode qPCR, utvrđivati kvantitativna ekspresija gena tijekom embriogeneze uročnjaka. Pri tome, važnu ulogu ima upotreba različitih linija uročnjaka, uključujući transgenične linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (L003, L100 i L104) i gena *DMS3* (oeDMS3), liniju amiR-bpm s utišanom ekspresijom gena *AtBPM1, 4, 5 i 6* i mutantne linije s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) i *NRPE1* (*nrpe1-10*). U genomu uročnjaka, gen *BPM1* čini jednog od ukupno 6 gena skupine BTB/POZ-MATH, poznatih pod nazivom *BPM* (*AtBPM1-6*) (Weber i sur., 2005), koji kodiraju za najmanje 16 različitih proteina (Škiljaica i sur., 2019). Jedna od najvažnijih uloga proteina BPM odnosi se na njihovo sudjelovanje u označavanju ciljanih proteina ubikvitinom za proteosomalnu razgradnju (Pintard i sur., 2003; Weber i Hellmann, 2009; Lechner i sur., 2011; Chen i sur., 2013, 2015; Morimoto i sur., 2017; Julian i sur., 2019). Osim uloge proteina BPM u razgradnji proteina koja ovisi o ubikvitinu, postoji mogućnost da proteini BPM djeluju neovisno o ubikvitin E3 ligazi (Leljak Levanić i sur., 2012; Škiljaica i sur., 2019; Pali, 2020). U prilog tome, istraživanjima Miškec (2019) i Jagić i sur. (2020) utvrđena je interakcija proteina BPM1 uročnjaka s proteinom DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3 (*DMS3*). Protein *DMS3* sudjeluje u putu metilacije DNA posredovane malim molekulama RNA (*eng.* RNA-directed DNA methylation, RdDM) koji, uz pomoć malih interferirajućih RNA (siRNA), dovodi do epigenetskih modifikacija genoma biljaka, čime se regulira utišavanje pokretnih genetičkih elemenata (Kanno i sur., 2008). Presudnu ulogu u RdDM imaju dvije RNA polimeraze specifične za biljke, RNA polimeraza IV (Pol IV) i RNA polimeraza V (Pol V). Stabilizacija Pol V na kromatinu i regulacija njezine aktivnosti omogućena je kompleksom DDR, u čijem se sastavu nalazi protein *DMS3* (Zhong i sur., 2012). Epigenetičke promjene uzrokovane putem RdDM odražavaju se na ekspresiju gena. Metilacija gena može značajno utjecati na intenzitet (kvantitetu) ekspresije, kao i na kvalitetu sintetiziranog transkripta. Smatra se da RdDM ima značajnu ulogu u regulaciji genske ekspresije tijekom razvoja, ali i prilikom izloženosti biljaka stresnim uvjetima (Baev i sur., 2010; Popova i sur., 2013).

1.3.1 Uloge gena *TIP41*, *CML41* i *FBW2*

Preduvjet analizama ekspresije gena predstavlja odabir referentnih gena sa stabilnom ekspresijom u svim provedenim eksperimentalnim uvjetima. Takvi geni imaju važnu ulogu kao unutarnje kontrole u svrhu normalizacije dobivenih podataka (Remans i sur., 2014). Stalna

ekspresija gena *TIP41* u različitim tkivima tijekom različitih eksperimentalnih uvjeta omogućila je njegovu upotrebu kao endogene kontrole u mnogim istraživanjima (Czechowski i sur., 2005; Hong i sur., 2010). Neka od takvih istraživanja uključuju analizu genske ekspresije u uročnjaku izloženom različitim vrstama abiotičkog stresa, uključujući osmotski, solni (Czechowski i sur., 2005) i temperaturni stres (Škiljaica i sur., 2019). Stalna ekspresija gena *TIP41* u različitim tkivima uročnjaka (Czechowski i sur., 2005) predstavlja temelje za njegovu upotrebu tijekom analize genske ekspresije u pojedinim embrionalnim stadijima uročnjaka.

Kod uročnjaka je otkriveno 50 gena obitelji *CML* (eng. calmodulin-like), čija ekspresija dovodi do nastanka proteina koji, vezanjem Ca^{2+} , omogućuju specifičnost tijekom njegove signalizacije (McCormack i sur., 2005). Otkriveno je da povećanje koncentracije citosolnog Ca^{2+} uzrokuje zatvaranje plazmodezmija, što ukazuje na važnost signala Ca^{2+} u regulaciji prolaska tvari između stanica (Tilsner i sur., 2016). Protein *CML41* ima važnu ulogu u odgovoru biljke na biotički stres, u regulaciji senescencije i osjetljivosti korijena na količinu Ca^{2+} iz okoliša (Xu, 2013). Izlaganje uročnjaka imunogeničnom peptidu bakterijskog flagelina (*flg22*) uzrokuje povećanje ekspresije gena *CML41*, što dovodi do odlaganja kaloze na plazmodezmijama i posljedično, njihovog zatvaranja. Na taj način, potvrđena je važnost gena *CML41* u obrani biljke od bakterijskih patogena (Xu i sur., 2017). U regulaciji ekspresije spomenutog gena važnu ulogu ima put RdDM. Glavna mjesta djelovanja puta metilacije RdDM uključuju pokretne elemente (eng. *transposable elements*, TE) i ponavljajuće regije, što dovodi do inaktivacije njihove transkripcije (Baev i sur., 2010). S obzirom da promotor gena *CML41* sadrži inserciju TE u blizini početka mjesta transkripcije, istraživanjem Baev i sur. (2010) pokazano je da je ekspresija navedenog gena u uročnjaku regulirana metilacijom promotora koja ovisi o polimerazama PolIV i PolV.

Ekspresija gena *FBW2* (eng. F-BOX AND WD REPEAT DOMAIN-CONTAINING 2) dovodi do nastanka proteina s domenom F-BOX na N-terminalnom kraju. Kod uročnjaka, protein *FBW2* veže se na protein *AGO1* (eng. ARGONAUTE 1), koji je uključen u mehanizam transkripcijske represije ciljanih gena, i dovodi do njegove destabilizacije i razgradnje (Early i sur., 2010). Preliminarnim istraživanjem mogućih uloga proteina *BPM1*, otkriveno je da na regijama u okolici gena *FBW2* dolazi do vezanja proteina *BPM1* i *DMS3* (neobjavljeno), no kako proteini *BPM1* i *DMS3* utječu na ekspresiju gena *FBW2* za sada nije istraženo.

1.4 Cilj istraživanja

Analiza ekspresije gena tijekom embriogeneze zahtijeva uspješnu izolaciju embrija, pri čemu je važno paziti na to da se izolirano tkivo embrija odvoji od svih nečistoća i okolnog tkiva koje nije embriogenog porijekla. S obzirom na nesinkroniziranu embriogenezu uročnjaka i malu veličinu embrija, prepoznavanje i izdvajanje embrija u istom razvojnem stadiju predstavlja veliki izazov. Stoga je prvi cilj ovog istraživanja uhodavanje metode ručne izolacije različitih stadija embriogeneze uročnjaka upotrebom svjetlosnog mikroskopa i invertnog mikroskopa s mikrodisektorom. Drugi cilj ovog rada odnosi se na optimizaciju izolacije dovoljne količine glasničke RNA (mRNA) iz kotiledonarnih embrija kako bi se mogla provesti analiza ekspresije ciljanih gena. Konačni cilj je metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR) utvrditi ekspresiju gena *CML41* i *FBW2* u kotiledonarnim embrijima transgeničnih linija uročnjaka s izmijenjenom ekspresijom proteina BPM, DMS3 i PolV.

2 MATERIJALI I METODE

2.1 Materijali

2.1.1 Biljni materijal

U svrhu optimizacije izolacije zigotnih embrija i analize kvantitativne ekspresije gena korištene su biljke divljeg tipa uočnjaka (*Arabidopsis thaliana*), ekotip Columbia (Col-0). Također, korištene su četiri transgenične linije uočnjaka, L003, L100 i L104 s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (Škiljaica i sur., 2019) i linija *oeDMS3* s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (neobjavljeno). Uz to, korištena je linija *amiR-bpm* s utišanom ekspresijom gena *AtBPM1, 4, 5 i 6* (Lechner i sur., 2011) i dvije mutantne linije, linija *dms3-1* s mutiranim genom *DMS3* i linija *nrpe1-10* s nefunkcionalnom podjedinicom RNA polimeraze V (Kanno i sur., 2008).

2.1.2 Pribor za izolaciju embrija

U svrhu izolacije različitih stadija embrija, pripremljene su sterilne inzulinske šprice, pinceta sa zaobljenim vrhom, petrijeva zdjelica promjera 90 mm, pokrovnice dimenzija 18 x 18 mm, mikropruvete od 2 ml, plastični tučak tretiran 0,1 % dietiltiokarbonatom (DEPC) s ciljem uklanjanja RNaza te sito s porama od 100 μm (Celltrics, Sysmex). Sav korišteni pribor steriliziran je flambiranjem ili autoklaviranjem na 121 °C u vremenu od 18 min.

2.1.3 Pufferi

2.1.3.1 Izolacijski puffer

Za izolaciju embrija u predglobularnim stadijima, pripremljen je 5 \times izolacijski puffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂). Dobivena otopina sterilizirana je filtriranjem u sterilnim uvjetima laminara, uz korištenje šprice i filtera s porama promjera 0,22 μm . Iz spomenute otopine pripremljen je odgovarajući volumen 1 \times izolacijskog pufera koji je korišten za izolaciju embrija i mikromanipulaciju.

Za mikromanipulaciju u svrhu analize ekspresije gena pripremljen je odgovarajući volumen 1 \times izolacijskog pufera (100 – 500 μl) s dodatkom inhibitora RNaza (RiboLock RNase Inhibitor, Thermo Scientific) u konačnoj koncentraciji od 4 %.

2.1.3.2 TAE

Za pripremu agaroznih gelova i elektroforezu korišten je 1 \times TAE (Tris-HCl acetat etilendiamintetraoctena kiselina) (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0).

2.1.4 Početnice za qPCR

Početnice koje su korištene tijekom istraživanja te njihove sekvence i temperature taljenja T_m (eng. melting temperature) navedene su u **Tablici 1**. Opisane početnice korištene su u reakciji qPCR u svrhu analize relativne ekspresije gena *CML41* i *FBW2*, uz upotrebu referentnog gena *TIP41* kao endogene kontrole. Radne otopine početnica (10 μ M) pripremljene su od 100 μ M matičnih otopina početnica razrjeđivanjem s redestiliranom vodom (Mili-Q®) i skladištene su na -20 °C.

Tablica 1. Sekvence i temperature taljenja početnica korištenih u reakciji qPCR za umnažanje gena *TIP41*, *CML41* i *FBW2*.

naziv gena (oznaka gena)	ime početnice	nukleotidna sekvenca 5' – 3'	T_m / °C
<i>TIP41</i> (AT4G34270)	TIP41 F2	GCAGCACAATGGAAATTCAGG	58,39
	TIP41 R2	GCCTCAACCGTTTCTTTGTC	57,60
<i>CML41</i> (AT3G50770)	qCML41 FW	CTCAGACATTACTTCGGCTC	55,69
	qCML41 REV	GTCATCAATCCAACAAAGTCCT	56,61
<i>FBW2</i> (AT4G08980)	FBW2_1 FW	GATGCTTGAGATGTTGATCCC	56,74
	FBW2_1 REV	TTAAGTGAACCAGCATGTTGTG	57,43

2.1.5 DNA molekularni standard

U svrhu potvrde umnažanja željenih fragmenata u uzorcima nakon reakcije qPCR, korišten je molekularni biljeg GeneRuler 100 pb DNA ladder (assets.thermofisher.com/GeneRuler, Thermo Scientific).

2.2 Metode

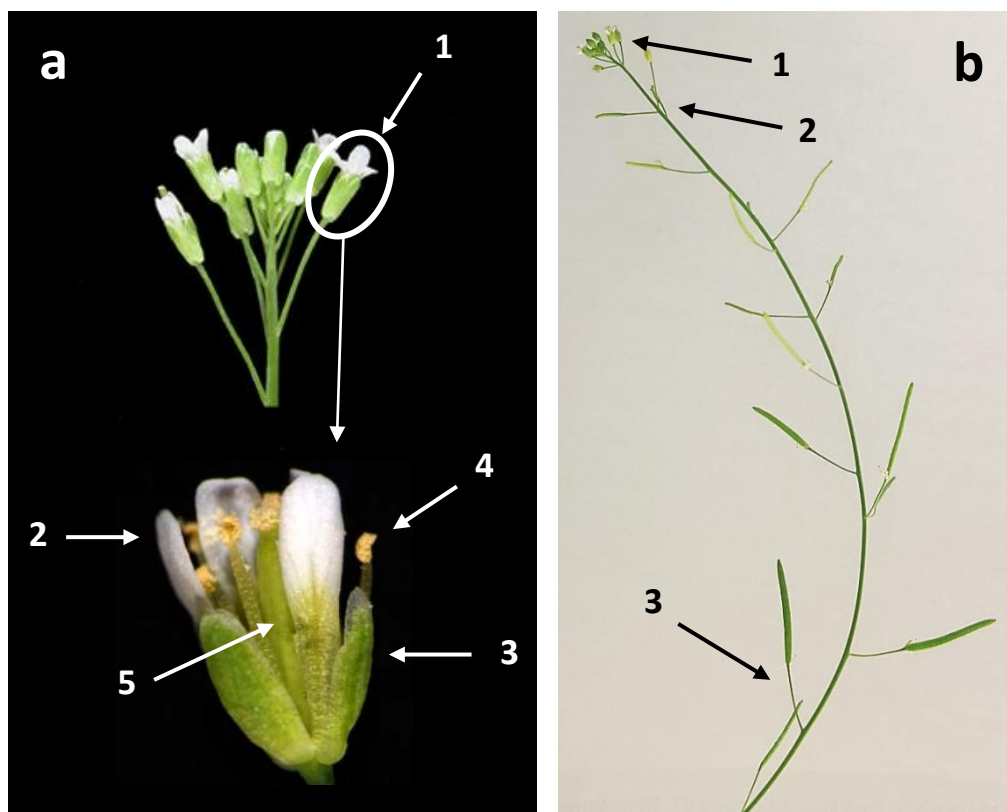
2.2.1 Uvjeti uzgoja biljaka

Korištene linije uročnjaka uzgajane su u komori za rast oko 3 mjeseca, na temperaturi od 21 °C, u uvjetima dugog dana (16 h svjetla i 8 h tame), pri 40 do 60 % vlažnosti zraka.

2.2.2 Odabir komuški

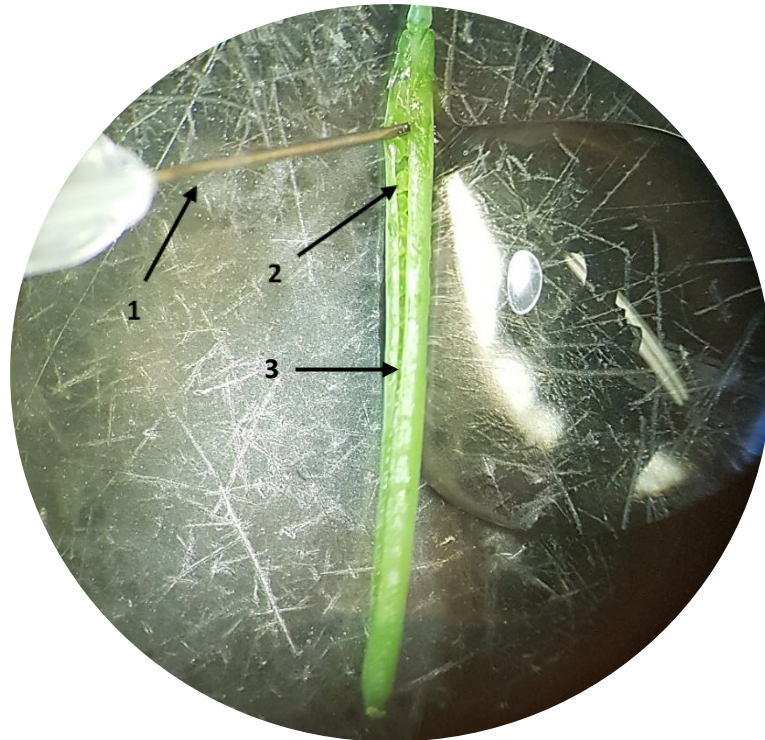
U svrhu određivanja stadija embrionalnog razvoja, analizirala sam sastav komuški različite veličine i položaja na cvjetnoj stapci. Uročnjak na vrhu cvjetne stapke stvara cvat sa cvjetnim pupovima različitog stadija razvoja (**Slika 2**). Do oplodnje jajne stanice najčešće

dolazi u trenutku otvaranja cvijeta. Nakon oplodnje, latice, lapovi i prašnici se suše, a od tučka nastaju komuške. Najmanje komuške koje su najbliže vrhu cvjetne stapke (**Slika 2b, 2**) sadrže najranije stadije embrija, dok najveće komuške smještene pri dnu cvjetne stapke (**Slika 2b, 3**) sadrže embrije u najkasnijim stadijima razvoja (Roeder i Yanofsky, 2006).



Slika 2. Cvat divljeg tipa uročnjaka s uvećanim prikazom cvijeta (**a**) i cvjetna stapka divljeg tipa uročnjaka starosti od ~ 3 mjeseca (**b**). Brojevima su prikazani dijelovi cvijeta i cvjetne stapke. (**a**) **1** – cvijet, **2** – cvjetna latica, **3** – cvjetni lap, **4** – prašnik, **5** – tučak. Preuzeto i prilagođeno prema serc.carleton.edu i Hepworth i sur., 2006. (**b**) **1** – cvat, **2** – položaj komuški s embrijima u najranijim stadijima, **3** – položaj komuški s embrijima u najkasnijim stadijima.

Kako bih utvrdila koji su embrionalni stadiji karakteristični za pojedinu veličinu i položaj komuški, uzorkovala sam po tri komuške divljeg tipa uročnjaka sa svakog položaja duž cvjetne stapke. Komuške sam pažljivo otvorila pod lupom (Etran) tako da sam upotrebom sterilnih iglica napravila rez duž septuma (**Slika 3, 3**). Oslobođene sjemene zametke usitnila sam sterilnim iglicama pod lupom, nakon čega sam dobivene uzorke analizirala pod svjetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss JENA, Promeatech). Na temelju embrionalnih stadija oslobođenih iz određenog tipa komuški, odredila sam točnu veličinu i položaj komuški koje sam u daljnjim postupcima koristila za izolaciju embrija u pojedinim stadijima.



Slika 3. Otvorena kumuška biljke uročnjak divljeg tipa pod povećanjem od 16×. **1** – sterilna iglica koja je omogućila pridržavanje kumuške tijekom otvaranja, **2** – sjemeni zametak unutar kumuške, **3** – rez duž septuma kumuške.

2.2.3 Površinska sterilizacija kumuški

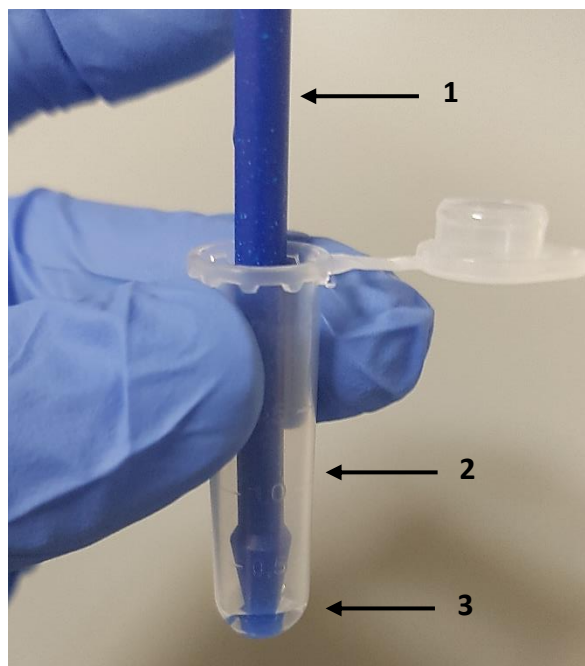
Površinska sterilizacija biljnog tkiva odnosi se na uklanjanje svih mikroorganizama s površine uzorkovanog tkiva. Sterilizacija kumuški provodi se u mikroepreveti, u sterilnim uvjetima laminara. Odmah nakon odstranjivanja s biljke, kumuške sam isprala s 1 ml 70 %-tnog etanola (1 min) te s 1 ml vodene otopine 1 % Izosana G (100 % natrij dikloroizocijanurat dihidrat, Pliva[®]) i 0,1 % mukazola s inkubacijom od 5 min, uz povremeno potresanje na sobnoj temperaturi (*eng.* room temperature, RT). Nakon uklanjanja otopine, kumuške sam isprala pet puta u 1 ml sterilne vode. Sterilizirane kumuške prenijela sam na filter papir kojeg sam namočila sterilnom vodom i do izolacije embrija kumuške sam inkubirala u petrijevoj zdjelici na RT. Preklapanjem filter papira preko položenih kumuški održavala sam njihovu vlažnost tijekom izolacije, pri čemu sam pazila da kumuške nisu namočene u vodi kako ne bi došlo do oštećenja tkiva.

2.2.4 Izolacija zigotnih embrija

Postupak izolacije zigotnih embrija podrazumijevao je oslobađanje sjemenih zametaka iz komuški, nakon čega je slijedilo izdvajanje embrija iz sjemenih zametaka i njihovo odvajanje od okolnog tkiva i nečistoća.

2.2.4.1 Izolacija embrija u predglobularnim stadijima

Za izolaciju embrija u predglobularnim stadijima, sterilne komuške odgovarajuće veličine otvorila sam pod lupom sterilnim iglicama. Izolaciju embrija provela sam prema protokolu Raissig i sur. (2013), uz nekoliko izmjena. Sjemene zametke iz svih 15 komuški iglicom sam prenijela u 20 μ l 1 \times izolacijskog pufera u sterilnoj mikropruveti od 2 ml postavljenoj na ledu. Tkivo skupljenih sjemenih zametaka samljela sam pritiskanjem uz lagane pokrete plastičnog tučka (**Slika 4**) sve dok se otopina nije zamutila. U svrhu ispiranja tučka i razrjeđivanja uzorka, dodala sam 300 μ l 1 \times izolacijskog pufera. Dobivenu otopinu centrifugirala sam 5 s na 5000 g pri RT (Eppendorf 5145 R), nakon čega sam talog resuspendirala u supernatantu četiri puta. Navedenu otopinu filtrirala sam kroz sito s porama promjera 100 μ m kojeg sam isprala s 200 μ l 1 \times izolacijskog pufera, tako da je konačni volumen uzorka iznosio 500 μ l. Cijeli postupak provela sam upotrebom sterilnog pribora u sterilnim uvjetima laminara. Embrije sam nadalje izolirala pod svjetlosnim mikroskopom i invertnim mikroskopom s mikrodisektorom prema postupku opisanom u odlomku 2.2.5.



Slika 4. Mljevenje tkiva plastičnim tučkom. **1** – plastični tučak, **2** – mikropruveta od 2 ml, **3** – uzorak sjemenih zametaka s embrijima u preglobularnoj razvojnoj fazi.

2.2.4.2 Izolacija embrija u globularnom, srcolikom i torpedo stadiju

S ciljem izolacije embrija u globularnom i srcolikom stadiju, sterilne komuške odgovarajuće veličine otvorila sam pod lupom sterilnim iglicama. Sjemene zametke svih komuški skupila sam u kap od 100 μ l sterilne vode te ih, koristeći sterilne iglice, potpuno usitnila. Dobivenu suspenziju propustila sam kroz sito s porama promjera 100 μ m. Površinu na kojoj sam prethodno usitnila sjemene zametke isprala sam s dodatnih 100 μ l vode kako bih skupila embrije koji su ostali vezani za podlogu te sam cijeli volumen vode propustila kroz sito. Sito sam isprala s dodatnih 100 μ l vode, tako da je konačni volumen uzorka iznosio 300 μ l. Daljnju analizu provela sam upotrebom svjetlosnog mikroskopa.

Postupak izolacije embrija u torpedo stadiju provela sam na sličan način, uz razliku u korištenim volumenima vode. Skupljanje sjemenih zametaka te ispiranje petrijeve zdjelice i sita s porama provela sam upotrebom 200 μ l vode, tako da je konačni volumen uzorka iznosio 600 μ l. Spomenuto povećanje volumena omogućilo je izolaciju embrija iz sjemenih zametaka većeg promjera u odnosu na prethodne.

2.2.4.3 Izolacija embrija u kotiledonarnom stadiju

U svrhu izolacije kotiledonarnih embrija, dvije sterilne komuške odgovarajuće veličine otvorila sam pod lupom sterilnim iglicama te sam sve sjemene zametke skupila u kapljicu od 40 μ l vode. Pokrovnicu sam sterilizirala provlačenjem kroz plamen te je postavila na kap vode sa sjemenim zamecima. Laganim pritiskom pincete na pokrovnicu istisnula sam zigotne embrije iz sjemenih zametaka. Nakon podizanja pokrovnice, isprala sam je s 500 μ l vode kako bih skupila embrije koji su ostali vezani na površini. Korištenjem sterilnih iglica, pod lupom sam u jedan dio kapi izdvojila 35 embrija te sam ih na taj način odvojila od oštećenog tkiva i ostalih nečistoća. Embrije sam pažljivo prenijela pipetom u sterilnu mikroeprevetu od 2 ml, pri čemu sam koristila nastavke za pipetu do 1000 μ l kako bih izbjegla oštećenja tkiva embrija. Cijeli postupak ponovila sam korištenjem dviju dodatnih komuški, tako da je konačni broj embrija u uzorku iznosio 70. Iz mikroeprevete s izdvojenim embrijima potpuno sam uklonila vodu korištenjem sterilne inzulinske šprice. Nakon toga, na uzorak sam dodala 50 μ l sterilne vode kako bih isprala izolirane embrije od mogućih nečistoća. Ponovno sam iz uzoraka uklonila cijeli volumen dodane vode te sam izolirane embrije smrznula u tekućem dušiku i pohranila ih na -80 °C do korištenja.

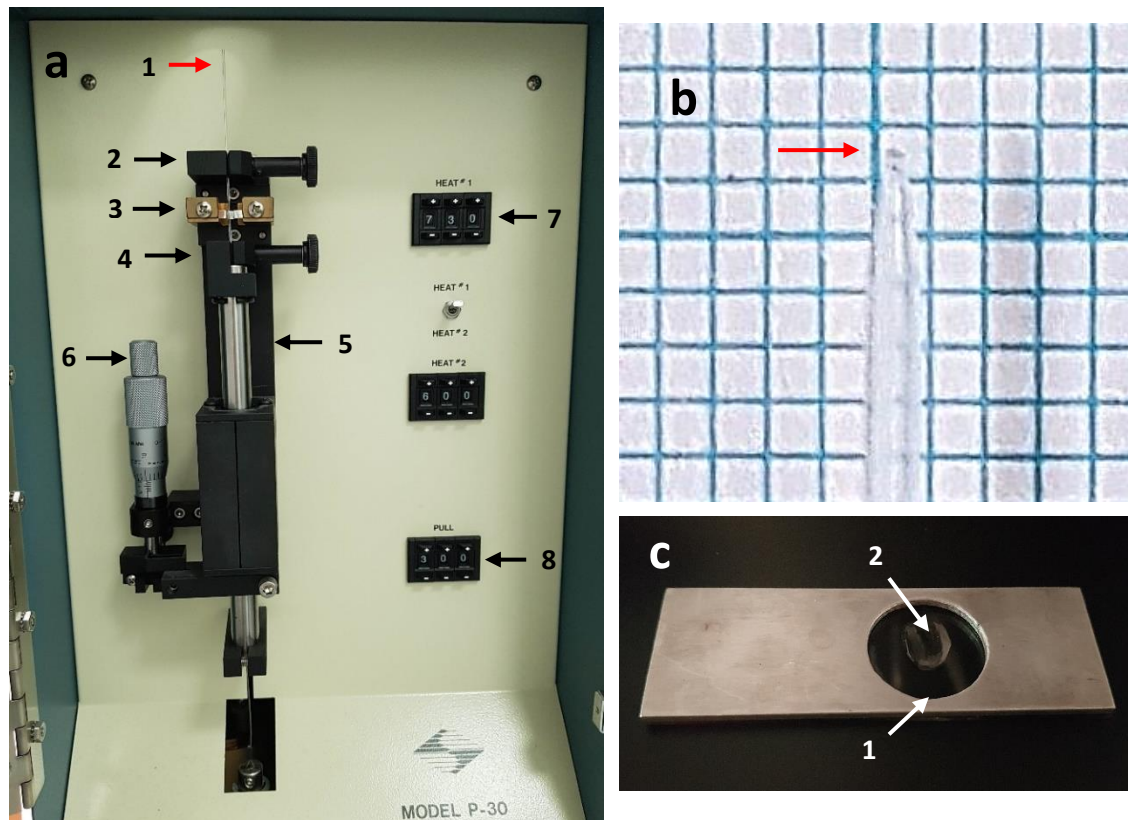
2.2.5 Mikromanipulacija zigotnim embrijima upotrebom invertnog mikroskopa s mikrodisektorom

Postupak mikromanipulacije uključivao je upotrebu prethodno pripremljenih uzoraka predglobularnih, globularnih, sročolikih i torpedo embrija koji su izolirani iz sjemenih zametaka i odvojeni od okolnog tkiva, a proveden je s ciljem izdvajanja embrija u točno određenim razvojnim stadijima.

2.2.5.1 Priprema staklenih kapilara i predmetnica za mikromanipulaciju

U svrhu mikromanipulacije embrijima, pripremila sam odgovarajuće staklene kapilare upotrebom vertikalnog potezača kapilara (Vertical Micropipette Puller, model P-30, Sutter Instrument) (**Slika 5, a**) na sljedeći način. Temperaturu taljenja kapilare namjestila sam na 730 °C, a jačinu povlačenja utega na 300. Gornji dio staklene cjevčice (Capillary Glass & Filaments, Sutter Instrument) pričvrstila sam na gornju stezaljku, a drugi dio staklene cjevčice na donju stezaljku. Zatvorila sam prednja vrata uređaja i pritisnula tipku „PULL“. Nakon zagrijavanja cjevčice do zadane temperature, donja stezaljka s pričvršćenim utegom pala je pod utjecajem gravitacije i pritom oblikovala vrh kapilare. Navedeni vrh kapilare skratila sam upotrebom žileta (**Slika 5, b**). Detaljan opis postupka i dijelova uređaja dostupan je u pripadajućem priručniku (www.sutter.com).

Mikromanipulacija zigotnim embrijima zahtijevala je pripremu posebnih predmetnica. Korištenjem vrućeg voska, čiste staklene pokrovnice zalijepila sam na metalne predmetnice s rupom u sredini. Na taj način, dobila sam metalne predmetnice koje su na sredini sadržavale bazenčić sa staklenim dnom (**Slika 5, c**).

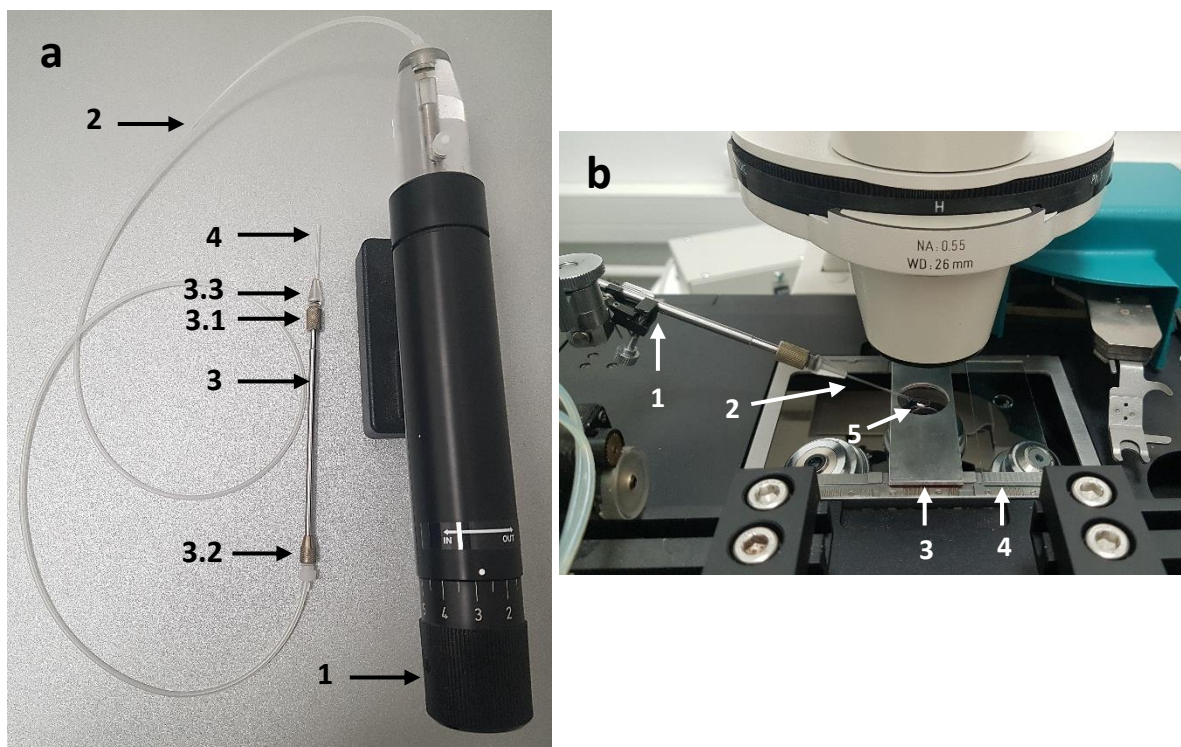


Slika 5. Vertikalni potežak kapilara (Vertical Micropipette Puller, model P-30, Sutter Instrument) s postavljenom staklenom cjevčicom (a), oblikovana staklena kapilara (b) i metalna predmetnica s bazenčićem staklenog dna (c). Brojevima su označeni dijelovi uređaja i pripremljene predmetnice. (a) **1** – staklena cjevčica postavljena na stezaljke uređaja, **2** – gornja stezaljka, **3** – kompleks s filamentom čije zagrijavanje omogućuje taljenje staklene cjevčice, **4** – donja stezaljka, **5** – klizač koji omogućuje spuštanje donje stezaljke i čija težina određuje silu povlačenja, **6** – vijak za određivanje promjera kapilare, **7** – prekidač za određivanje temperature taljenja staklene cjevčice, **8** – prekidač za određivanje sile povlačenja. (b) Crvenom strelicom prikazan je vrh kapilare dobiven nakon oblikovanja na uređaju i skraćivanja žiletom, promjera ~ 0,25 mm. (c) **1** – bazenčić sa staklenim dnom, **2** – kap od 50 µl uzorka.

2.2.5.2 Mikromanipulacija zgotnim embrijima

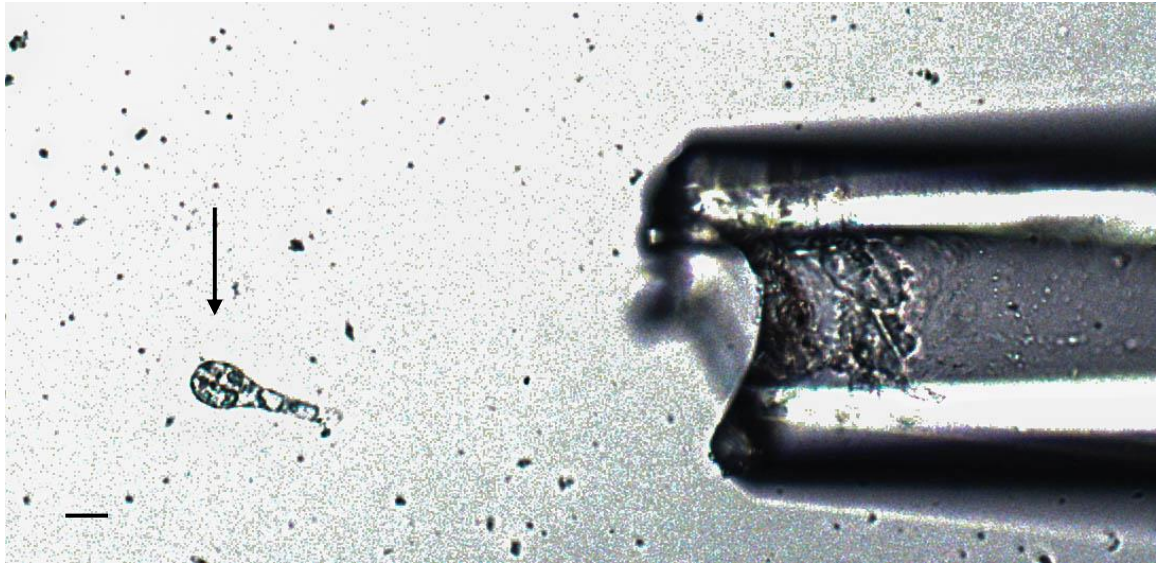
Embrije iz pripremljenih uzoraka izdvojila sam postupkom mikromanipulacije, uz upotrebu invertnog fluorescencijskog mikroskopa s mikrodisektorom (Axiovert 200M, Zeiss) koji je opremljen kamerom AxioCam MRc (Zeiss) i programom AxioVision verzija 4.5 (Zeiss). Prethodno pripremljenu staklenu kapilaru spojila sam na tanku cjevčicu povezanu s hidrauličnim mikroinjektorom (Eppendorf, CellTram, Oil) koji omogućuje ispuštanje, odnosno uvlačenje embrija (Slika 6, a). Kako ne bi došlo do isušivanja embrija, analizirala sam dio uzorka (50 µl). Uzorak sam prenijela na predmetnicu s bazenčićem koju sam postavila na postolje mikroskopa. S obzirom na to da korišteni mikroskop sadrži držač na kojeg se mogu

pričvrstiti do tri predmetna stakalca, na susjedno postolje postavila sam predmetnicu s 50 μl 1 \times izolacijskog pufera za ispiranje embrija. Kapilaru sam postavila na nosač kraj postolja mikroskopa, pri čemu je vrh kapilare bio uronjen u uzorak i namješten unutar vidnog polja (Slika 6, b).



Slika 6. Ručni hidraulični mikroinjektor (Eppendorf, CellTram, Oil) sa spojenom kapilarom (a) i postolje mikroskopa pripremljeno za analizu uzorka (b). Brojevima su označeni dijelovi uređaja. (a) 1 – pokretljivi dio za regulaciju dovoda i odvoda zraka, 2 – gumena cjevčica, 3 – metalna cjevčica s navojima (3.1 i 3.2) i plastičnim nastavkom (3.3) za postavljanje staklene kapilare, 4 – staklena kapilara. (b) 1 – nosač mikroskopa za postavljanje kapilare, 2 – kapilara povezana s mikroinjektorom i postavljena na nosač mikroskopa, 3 – metalna predmetnica s uzorkom, 4 – susjedna predmetnica s izolacijskim puferom za ispiranje embrija, 5 – vidno polje mikroskopa.

Tijekom pretraživanja iz uzorka sam kapilarom, u što manjem volumenu, skupila sve embrije (Slika 7). U svrhu dodatnog uklanjanja nečistoća, izolirane embrije kapilarom sam prenijela u kap od 50 μl 1 \times izolacijskog pufera na susjednoj predmetnici. Nakon toga, ponovno sam skupila sve embrije pazeći da nečistoće ostanu izvan kapilare. Ispiranje embrija ponovila sam dva puta, nakon čega sam izolirane embrije prenijela u sterilnu mikroepruvetu od 2 ml. Uzorak sam smrznula u tekućem dušiku i pohranila na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do upotrebe.



Slika 7. Postupak skupljanja embrija biljke uročnjak u predglobularnom stadiju metodom mikromanipulacije. Slika je prikazana pri povećanju od 100× upotrebom invertnog fluorescencijskog mikroskopa s mikrodisektorom (Axiovert 200M, Zeiss) pomoću programa AxioVision verzija 4.5 (Zeiss). Strelica pokazuje embrij u predglobularnom stadiju. Na slici je s desne strane prikazan vrh staklene kapilare kojom je provedeno skupljanje embrija. Skala = 15 μm.

2.2.5.3 Mjere opreza tijekom mikromanipulacije

U svrhu pravilnog rada invertnog mikroskopa s mikrodisektorom, dijelove uređaja potrebno je pripremiti na ispravan način. S obzirom na važnost hidrauličnog mikroinjektora koji omogućuje skupljanje embrija iz uzoraka, potrebno je pravilno zavrnuti navoje na metalnoj cjevčici (**Slika 6a, 3.1 i 3.2**). U suprotnome, nedostatak protoka zraka onemogućuje uvlačenje zraka te posljedično, izolaciju embrija. Zbog velike osjetljivosti staklenih kapilara, prije postavljanja iste potrebno je provjeriti gornji navoj i plastični nastavak (**Slika 6a, 3.1 i 3.3**) u kojima mogu zaostati komadići stakla i onemogućiti ispravan protok zraka.

S ciljem pravilnog rukovanja izoliranim embrijima, potrebno je brzo provođenje postupka mikromanipulacije. Iz tog razloga, skupljene i isprane embrije potrebno je u što kraćem roku smrznuti u tekućem dušiku kako ne bi došlo do isparavanja izolacijskog pufera i oštećenja tkiva embrija.

2.2.5.4 Mikromanipulacija zigotnim embrijima za potrebe analize ekspresije gena

Mikromanipulacija u svrhu analize ekspresije gena zahtijevala je provođenje dodatnih postupaka s ciljem uklanjanja RNaza. Predmetnicu s bazenčićem za analizu uzorka i postolje mikroskopa prebrisala sam otopinom za uklanjanje RNaza (RNaseZap™, Thermo Fisher Scientific). Navedenom otopinom prebrisala sam staklenu kapilaru za skupljanje embrija, a

njezinu unutrašnjost isprala sam upotrebom 10 μ l 1 \times izolacijskog pufera s dodatkom inhibitora RNaza. Navedeni pufer koristila sam za ispiranje embrija od nečistoća, nakon čega sam ih prenijela u mikroeprevetu od 2 ml koja je tretirana upotrebom DEPC s ciljem uklanjanja RNaza. Tijekom cijelog postupka mikromanipulacije često sam mijenjala rukavice kako bih spriječila kontaminaciju uzoraka vlastitim RNazama.

2.2.6 Analiza relativne ekspresije gena u kotiledonarnim embrijima

2.2.6.1 Izolacija ukupne mRNA

U svrhu izolacije ukupne glasničke RNA (*eng.* messenger RNA, mRNA) iz kotiledonarnih embrija uročnjaka koristila sam Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Thermo Fisher Scientific). Uzorak za izolaciju mRNA sadržavao je po 70 kotiledonarnih embrija za divlji tip uročnjaka i za linije uročnjaka s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (L003, L100 i L104), utišanom ekspresijom gena *AtBPM1, 4, 5, 6* (*amiR-bpm*), prekomjernom ekspresijom *DMS3* (*oeDMS3*), mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) i mutiranim genom *NRPE1* (*nrpe1-10*). Izolaciju sam provela prema uputama proizvođača i protokolu za izolaciju mRNA iz tkiva (assets.thermofisher.com/Dynabead), uz nekoliko dodatnih koraka. S ciljem što efikasnijeg razaranja tkiva tijekom pripreme lizata, mikroeprevete s uzorcima inkubirala sam u ledenoj kupelji u vremenu od 10 s, nakon čega je slijedilo razaranje tkiva tučkom uz naizmjenično uranjanje u tekući dušik. U svrhu maksimalnog prinosa mRNA, lizate sam nakon dodatka pufera za lizu promiješala uvlačeći ih 10 \times kroz nastavak pipete do 10 μ l. Ostale korake provela sam slijedeći protokol proizvođača. Konačno, ukupnu mRNA eluirala sam s magnetnih kuglica djelovanjem povišene temperature. Na dva kontrolna uzorka, od kojih je svaki sadržavao mRNA izoliranu iz 10 kotiledonarnih embrija divljeg tipa, odredila sam temperaturu koja omogućuje najveći prinos mRNA. Ukupnu mRNA eluirala sam uz inkubaciju uzoraka na 70 °C ili 80 °C tijekom 2 min. Cijeli postupak provela sam uz korištenje pribora koji je tretiran pomoću DEPC kako bi se izbjegla prisutnost RNaza. Koncentraciju i čistoću izolirane mRNA izmjerila sam spektrofotometrijski na uređaju NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

2.2.6.2 Reverzna transkripcija

Za dobivanje cDNA uz korištenje izolirane mRNA kao kalupa koristila sam metodu reverzne transkripcije. Za pravilno provođenje kvantitativne analize ekspresije gena potrebno je osigurati jednaku koncentraciju kalupa za qPCR u svim uzorcima koje analiziramo. S tim ciljem, za reakciju reverzne transkripcije koristi se točno određena, za sve uzorke koje želimo uspoređivati, jednaka masa mRNA. Reakcijska smjesa sadržavala je 36,75 ng mRNA, 2,86 μ M

otopinu početnice Oligo(dT)₁₈ Primer (Thermo Scientific), 0,29 mM smjesu deoksiribonukleotida (dNTP) i DEPC vodu do konačnog volumena od 10 µl. U svrhu uklanjanja mogućih sekundarnih struktura mRNA, pripremljene smjese inkubirala sam na 65 °C tijekom 5 min, nakon čega je slijedilo hlađenje na 4 °C u vremenu od 2 min. Tijekom hlađenja, u reakciju sam dodala 4 µl prethodno pripremljene reakcijske smjese koja se sastojala od 1× Reaction Buffer (Thermo Scientific), 20 U RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific), 40 U RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) i DEPC vode do konačnog volumena. Krajnji volumen reakcijske smjese za reverznu transkripciju bio je 14 µl te su u toj smjesi pri 42 °C tijekom 45 min sintetizirane cDNA molekule. Konačno, enzim reverzna transkriptaza je inaktiviran pri 70 °C u vremenu od 15 min. Opisane reakcije provedene su na uređaju GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems), a dobivene cDNA pohranila sam na 4 °C do korištenja.

2.2.6.3 Metoda qPCR

Metodu qPCR koristila sam za analizu relativne ekspresije gena *CML41* i *FBW2* u kotiledonarnim embrijima transgeničnih linija uročnjaka. Kontrolnom reakcijom odredila sam količinu kalupa cDNA koja je potrebna za provođenje reakcije qPCR navedenih gena. U tu svrhu, kao kalup sam koristila cDNA izoliranu iz kotiledonarnih embrija divljeg tipa, uz upotrebu početnica za gene *TIP41* i *FBW2*. Reakcijska smjesa sastojala se od 1× GoTaq® qPCR MasterMix (Promega), 0,2 µM uzvodne (FW) početnice specifične za pojedini gen, 0,2 µM nizvodne (REV) početnice specifične za pojedini gen, 1 µl (2,63 ng) ili 3 µl (7,88 ng) cDNA kao kalupa i DEPC vode do konačnog volumena od 10 µl. Za svaku reakcijsku smjesu pripremila sam dvije tehničke replike, a čistoću reakcijske smjese pripremljene za određeni par početnica provjerila sam kontrolom bez kalupa u kojoj sam umjesto cDNA dodala isti volumen DEPC vode. Program reakcije sastojao se od početne denaturacije pri 95 °C u vremenu od 5 min, nakon čega je slijedilo 40 ciklusa denaturacije na 95 °C tijekom 5 s te prijanjanja početnica i elongacije na 60 °C tijekom 10 s. Navedene reakcije provodila sam na uređaju Magnetic Induction Cycler (Mic) PCR Machine (Bio Molecular Systems).

2.2.6.4 Agarozna gel elektroforeza

Za potvrdu uspješnosti umnažanja željenih fragmenata DNA tijekom reakcije qPCR, uzorke sam analizirala agaroznom gel elektroforezom. Navedenu metodu provodila sam u kadići RunOne™ Electrophoresis Unit (Embi Tec) uz upotrebu 1× TAE pufera kojeg sam koristila i za pripremu 2 %-tnog agaroznog gela. S ciljem vizualizacije vrpce tijekom elektroforeze, neposredno prije nanošenja uzoraka na gel pomiješala sam 5 µl svakog uzorka s

1 μ l boje za nanošenje na gel (6 \times DNA Loading Dye, Thermo Scientific). Osim uzoraka, na gel sam nanijela 3 μ l molekularnog biljega GeneRuler 100 pb DNA ladder (Thermo Scientific). Elektroforeze sam provodila pri početnom naponu od 25 V u vremenu od \sim 5 min, a nakon toga pri naponu od 50 V u trajanju od \sim 30 min. U svrhu detekcije vrpce koristila sam otopinu etidij bromida (EtBr) koncentracije 10 ng/l, a gel sam vizualizirala UV svjetlom (Kodak EDAS 290, ekspozicija 2 s, 100% UV). Slike gelova dobila sam upotrebom digitalne kamere koristeći program Kodak 1D.

2.2.6.5 Analiza rezultata metode qPCR

Metodom qPCR za svaki je uzorak određena efikasnost parova početnica za korišteni gen i broj ciklusa umnažanja u kojem je fluorescentni signal zabilježen iznad pozadinske fluorescencije (vrijednost C_t). Dobivene podatke koristila sam za analizu relativne ekspresije gena *CML41* i *FBW2* u kotiledonarnim embrijima različitih linija uočnjaka u odnosu na divlji tip. Koristila sam metodu $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2006) uz *TIP41* kao endogenu kontrolu. Dobivene rezultate prikazala sam kao srednje vrijednosti dviju tehničkih replika s pripadajućim standardnim pogreškama.

3 REZULTATI

3.1 Izolacija zigotnih embrija uročnjaka

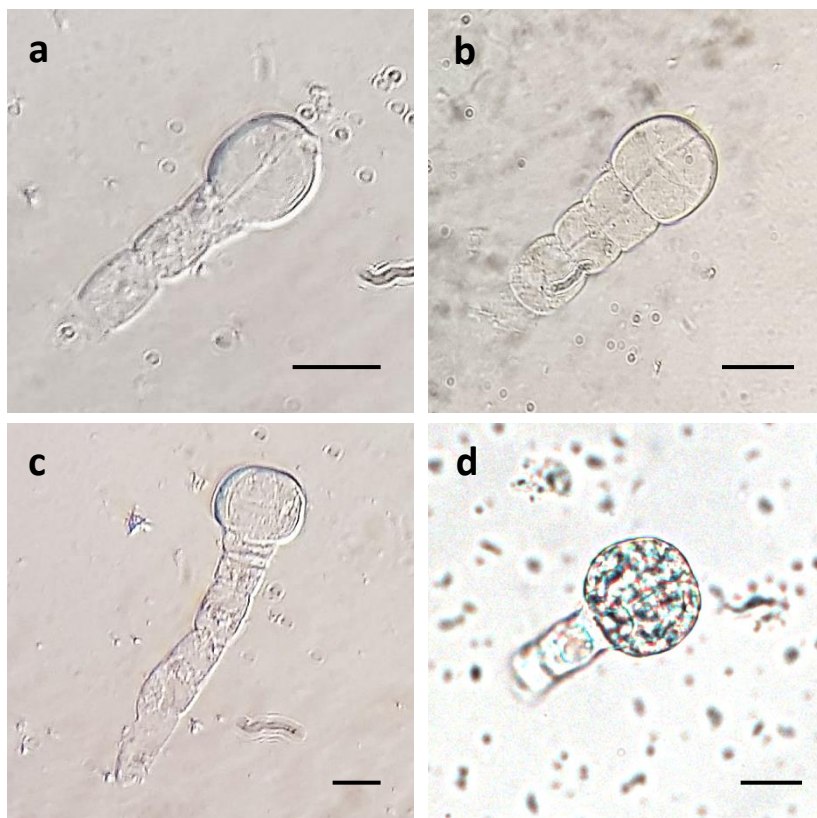
3.1.1 Izolacija embrija u predglobularnim stadijima

Analizom embrionalnih stadija karakterističnih za komuške različitih veličina i položaja duž cvjetne stapke divljeg tipa uročnjaka, određena je točna veličina i položaj komuški koje sadrže najveći broj embrija u predglobularnim stadijima. Za izolaciju embrija u predglobularnim stadijima, odabrano je 15 komuški prosječne duljine ~ 10 mm, svijetlo zelene boje i prosječne širine ~ 0,5 mm (**Slika 8**). Svaka od opisanih komuški smještena je na četvrtom položaju od položaja prve vidljive komuške na cvjetnoj stapci divljeg tipa uročnjaka.



Slika 8. Komuške divljeg tipa uročnjaka korištene za izolaciju embrija u predglobularnim stadijima.

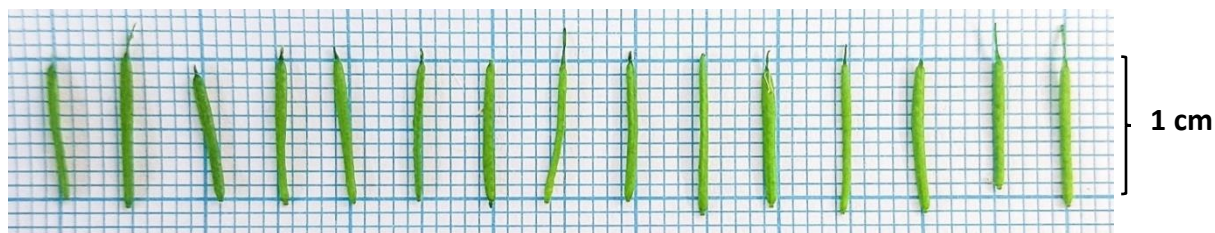
Izolacija embrija u predglobularnim stadijima provedena je uhodanom metodom ručne izolacije iz sjemenih zametaka opisanih komuški. Svaka od komuški sadržavala je sjemenne zametke s embrijima različitih stadija. Iz tog razloga, u dobivenom uzorku mogli su se pronaći embriji u nekoliko razvojnih faza, uključujući dvostanični (**Slika 9, a**) i osmostanični (**Slika 9, b**) stadij, stadij dermatogena (**Slika 9, c**) te rani globularni stadij (**Slika 9, d**). Jedan od ključnih koraka uhodane metode izolacije predstavlja razaranje okolnog tkiva plastičnim tučkom, pri čemu je važno paziti na to da je primijenjena sila dovoljno snažna da uništi tkivo sjemenih zametaka, ali ne dovede do zgnječenja tkiva embrija. Promatranjem uzorka pod svjetlosnim mikroskopom, određeno je da prosječni broj embrija u volumenu izolacijskog pufera od 50 μ l iznosi 13. Stoga, daljnjim postupkom mikromanipulacije iz pripremljenog uzorka teoretski je moguće izdvojiti ~ 130 predglobularnih embrija. Provedena metoda izolacije omogućila je dobivanje uzoraka velike čistoće, bez prisutnosti velikih komada tkiva koji otežavaju izdvajanje embrija i uzorak kontaminiraju neembrijskim ostacima. Cijeli postupak izolacije embrija trajao je ~ 3 h.



Slika 9. Predglobularni i rani globularni embriji uročnjaka divljeg tipa analizirani pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 400×. **a** – embrij u dvostaničnom stadiju, **b** – embrij u osmostaničnom stadiju, **c** – embrij u stadiju dermatogena, **d** – embrij u ranom globularnom stadiju. Skala = 10 μm.

3.1.2 Izolacija embrija u globularnom i srcolikom stadiju

Točna veličina i položaj komuški koje su pogodne za izolaciju embrija u globularnom i srcolikom stadiju određeni su analizom embrionalnih stadija karakterističnih za komuške različitih veličina i položaja duž cvjetne stapke divljeg tipa uročnjaka. U svrhu izolacije embrija u globularnom i srcolikom stadiju, odabrano je 15 komuški prosječne duljine ~ 10 mm i širine ~ 1 mm te tamnije zelene boje (**Slika 10**). Svaka od navedenih komuški smještena je na petom položaju od položaja prve vidljive komuške na cvjetnoj stapci divljeg tipa uročnjaka.



Slika 10. Komuške divljeg tipa uročnjaka korištene za izolaciju embrija u globularnom i srcolikom stadiju.

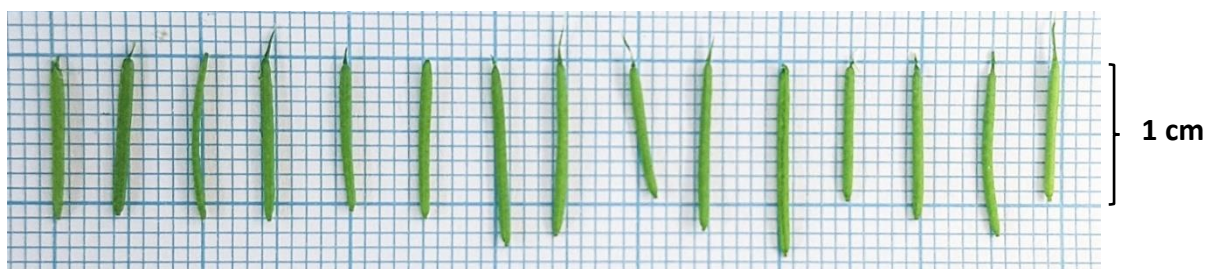
Embriji u globularnom i srcolikom stadiju izolirani su iz spomenutih komuški uhodanim postupkom ručne izolacije. U sjemenim zamecima komuški ovog tipa embriji su se nalazili u različitim globularnim i srcolikim fazama razvoja pa su embriji u globularnom (**Slika 11, a**) i srcolikom (**Slika 11, b**) stadiju dobiveni su u istom uzorku. Najvažniji korak izolacije uključuje potpuno usitnjavanje tkiva sjemenih zametaka iglicama, što omogućuje odvajanje embrija od okolnog tkiva. Analizom uzorka pod svjetlosnim mikroskopom, utvrđeno je da ukupan broj embrija koji je moguće izdvojiti daljnjim postupkom mikromanipulacije iz pripremljenog uzorka iznosi 72 u volumenu vode od 300 μ l. Od ukupnog broja embrija, 32 embrija pripadala su globularnom stadiju, a 40 embrija srcolikom stadiju. Promatranjem uzorka jasno su se mogli uočiti pojedini globularni i srcoliki stadiji embrija. Konačno filtriranje uzorka omogućilo je uklanjanje većih dijelova tkiva sjemenih zametaka, čime su dobiveni uzorci velike čistoće. Cijeli postupak proveden je u vremenu od ~ 3,5 h.



Slika 11. Embriji uročnjaka divljeg tipa analizirani pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 400 \times . **a** – embrij u kasnom globularnom stadiju, **b** – embrij u srcolikom stadiju. Skala = 20 μ m.

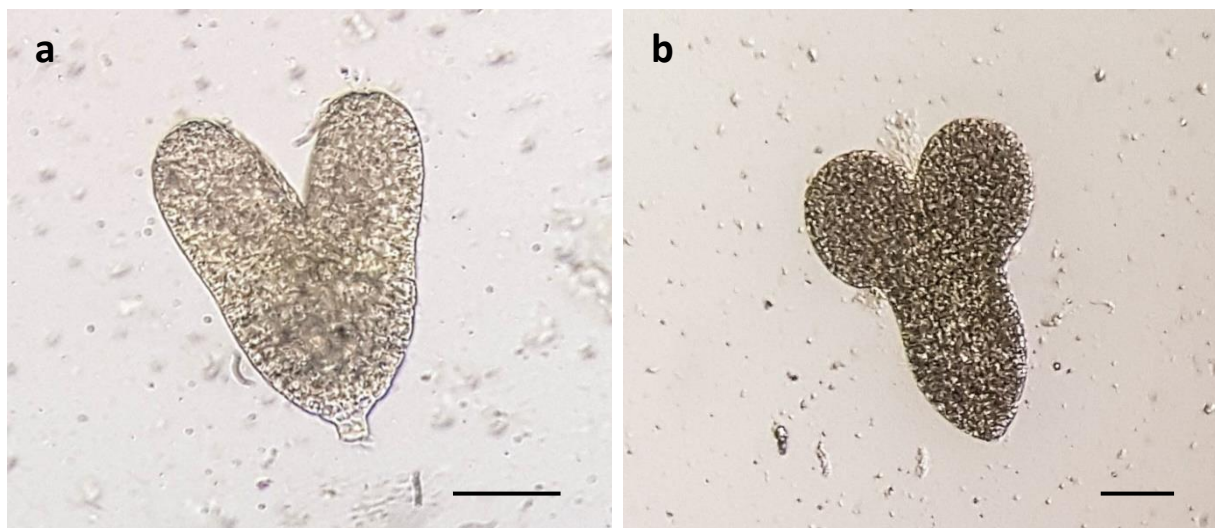
3.1.3 Izolacija embrija u torpedo stadiju

Analizom embrionalnih stadija koji se nalaze u komuškama različitih veličina i položaja duž cvjetne stapke divljeg tipa uročnjaka, određena je točna veličina i položaj komuški koje su pogodne za izolaciju embrija u torpedo stadiju. S ciljem izolacije embrija u spomenutom stadiju, odabrano je 15 komuški prosječne duljine ~ 11 mm, tamno zelene boje i prosječne širine ~ 1 mm (**Slika 12**). Svaka od opisanih komuški smještena je na šestom položaju od položaja prve vidljive komuške na cvjetnoj stapci divljeg tipa uročnjaka.



Slika 12. Komuške divljeg tipa uročnjaka korištene za izolaciju embrija u torpedu stadiju.

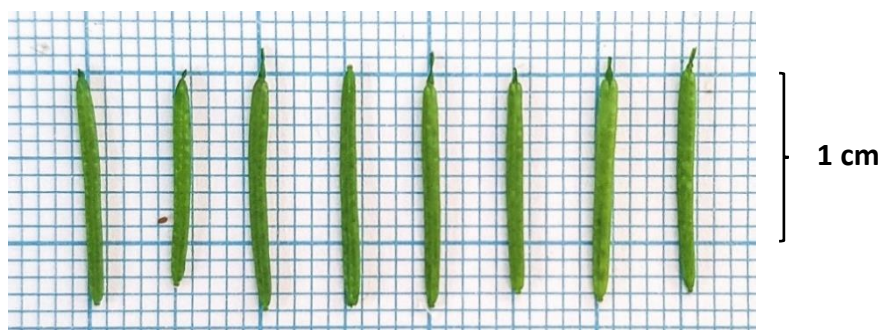
Izolacija embrija u torpedu stadiju provedena je optimiziranom metodom ručne izolacije iz sjemenih zametaka opisanih komuški. Svaka od komuški sadržavala je sjemene zametke s nekoliko različitih embrionalnih faza, zbog čega su se u uzorku mogli pronaći embriji u nekoliko razvojnih stadija. Važan korak izolacije koji uključuje razaranje tkiva sjemenih zametaka iglicama doveo je do oštećenja određenog broja embrija. Unatoč tome, analizom uzorka pod svjetlosnim mikroskopom pronađena su 142 cjelovita embrija u volumenu vode od 600 μ l koje je moguće izdvojiti daljnjim postupkom mikromanipulacije. U pripremljenom uzorku 98 embrija pripadalo je torpedu stadiju (**Slika 13, a**), 30 embrija srčolikom stadiju (**Slika 11, b**), a 14 embrija ranom kotiledonarnom stadiju (**Slika 13, b**). Filtriranje uzorka omogućilo je odvajanje embrija od većih dijelova okolnog tkiva, što je rezultiralo velikom čistoćom uzorka. Cijeli postupak zahtijevao je utrošak vremena od ~ 4 h.



Slika 13. Embriji uročnjaka divljeg tipa analizirani pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 400 \times . **a** – embrij u torpedu stadiju, **b** – embrij u ranom kotiledonarnom stadiju. Skala = 40 μ m.

3.1.4 Izolacija embrija u kotiledonarnom stadiju

Točna veličina i položaj komuški koje su pogodne za izolaciju embrija u kotiledonarnom stadiju određeni su analizom embrionalnih stadija koji se nalaze u komuškama različitih veličina i položaja duž cvjetne stapke divljeg tipa uročnjaka. U svrhu izolacije embrija u kotiledonarnom stadiju, odabrano je 8 komuški prosječne duljine ~ 13 mm, tamno zelene boje i prosječne širine ~ 1,5 mm (**Slika 14**). Svaka od navedenih komuški smještena je na donjem dijelu cvjetne stapke. Opisani postupak provela sam za divlji tip uročnjaka i za linije uročnjaka s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (L003, L100 i L104), utišanom ekspresijom gena *AtBPM1*, 4, 5, 6 (amiR-bpm), prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (oeDMS3), mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) i mutiranim genom *NRPE1* (*nrpe1-10*).



Slika 14. Komuške divljeg tipa uročnjaka korištene za izolaciju embrija u kotiledonarnom stadiju.

Izolacija embrija u kotiledonarnom stadiju provedena je uhodanom metodom ručne izolacije iz sjemenih zametaka četiriju opisanih komuški. Iznimno, zbog manje veličine komuški linije amiR-bpm i dvostruko manjeg broja sjemenih zametaka u odnosu na ostale linije, izolacija kotiledonarnih embrija navedenog mutanta provedena je iz sjemenih zametaka 8 komuški. Jedan od važnih koraka izolacije odnosi se na odabir optimalnog volumena vode u kojem se skupljaju sjemeni zameci, pri čemu odabrani volumen vode ovisi o površini korištene pokrovnice. Neodgovarajući volumen vode onemogućuje istiskivanje embrija iz sjemenih zametaka pritiskanjem pokrovnice na kap vode sa zamecima. Skupljanje istisnutih embrija u jedan dio kapi vode i njihovo odvajanje od okolnog tkiva upotrebom iglica (**Slika 15**), kao i konačno ispiranje embrija upotrebom inzulinske šprice osiguravaju dobivanje uzoraka velike čistoće. Cijeli postupak pripreme uzorka od 70 kotiledonarnih embrija proveden je u vremenu od ~ 40 min.



Slika 15. Skupina od 55 embrija uročnjaka divljeg tipa u kotiledonarnom stadiju koji su odvojeni od okolnog tkiva i izolirani pod lupom pri povećanju od 50×. Skala = 200 μm.

3.2 Mikromanipulacija zigotnim embrijima

Izdvajanje predglobularnih, globularnih, srololikih i torpedo embrija moguće je provesti postupkom mikromanipulacije upotrebom invertnog mikroskopa s mikrodisektorom. S obzirom na prosječnu veličinu embrija, određen je optimalni promjer staklene kapilare od 0,25 mm. Izdvajanjem skupljenih embrija u kap izolacijskog pufera na susjednoj predmetnici provedeno je ispiranje embrija koje je rezultiralo dobivanjem uzoraka velike čistoće. Dodatni postupci provedeni s ciljem uklanjanja RNaza koji uključuju upotrebu izolacijskog pufera s dodatkom inhibitora RNaza omogućuju pripremu uzoraka embrija za analizu ekspresije gena. Vrijeme potrebno za provođenje cijelog postupka ovisi o volumenu uzorka, pri čemu je prosječno vrijeme utrošeno za analizu 50 μl uzorka iznosilo ~ 15 min.

3.3 Analiza relativne ekspresije gena *CML41* i *FBW2* u kotiledonarnim embrijima različitih linija uročnjaka *A. thaliana*

Uhodanom metodom izolacije skupila sam po 70 kotiledonarnih embrija divljeg tipa uročnjaka te linija uročnjaka s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (L003, L100 i L104), utišanom ekspresijom gena *AtBPM1*, 4, 5, 6 (*amiR-bpm*), prekomjernom ekspresijom *DMS3* (*oeDMS3*), mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) i mutiranim genom *NRPE1* (*nrpe1-10*). Prvi korak analize ekspresije gena u kotiledonarnim embrijima uročnjaka uključivao je postupak

izolacije ukupne mRNA iz embrija. Važan korak izolacije uključivao je eluciju mRNA s magnetnih kuglica. Na dva kontrolna uzorka, od kojih je svaki sadržavao mRNA izoliranu iz 10 kotiledonarnih embrija divljeg tipa, određena je temperatura elucije koja omogućuje najveći prinos mRNA. Utvrđeno je da temperatura od 80 °C osigurava tri puta veći prinos mRNA u odnosu na temperaturu od 70 °C. Iz tog razloga, mRNA izolirana iz 70 kotiledonarnih embrija pojedinih linija uročnjaka eluirana je s magnetnih kuglica inkubacijom na 80 °C tijekom 2 min. Dobivene koncentracije mRNA uključivale su vrijednosti u rasponu 5,25 – 22,55 ng/μl, a točne količine mRNA i njihove čistoće izražene omjerima apsorbancija $A_{260/280}$ i $A_{260/230}$ su prikazani u **Tablici 2**. Kako bi se uskladile količine kalupa za reakciju qPCR, reverznom transkripcijom je za sve linije prepisano 36,75 ng mRNA u cDNA, u volumenu od 14 μl (2,63 ng/μl).

Tablica 2. Koncentracija mRNA izolirana iz 70 kotiledonarnih embrija divljeg tipa uročnjaka i linija uročnjaka s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (L003, L100 i L104), utišanom ekspresijom gena *AtBPM1*, 4, 5, 6 (amiR-bpm), prekomjernom ekspresijom *DMS3* (oeDMS3), mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) i mutiranim genom *NRPE1* (*nrpe1-10*) uz omjere $A_{260/280}$ i $A_{260/230}$ koji su dobiveni za pojedini uzorak.

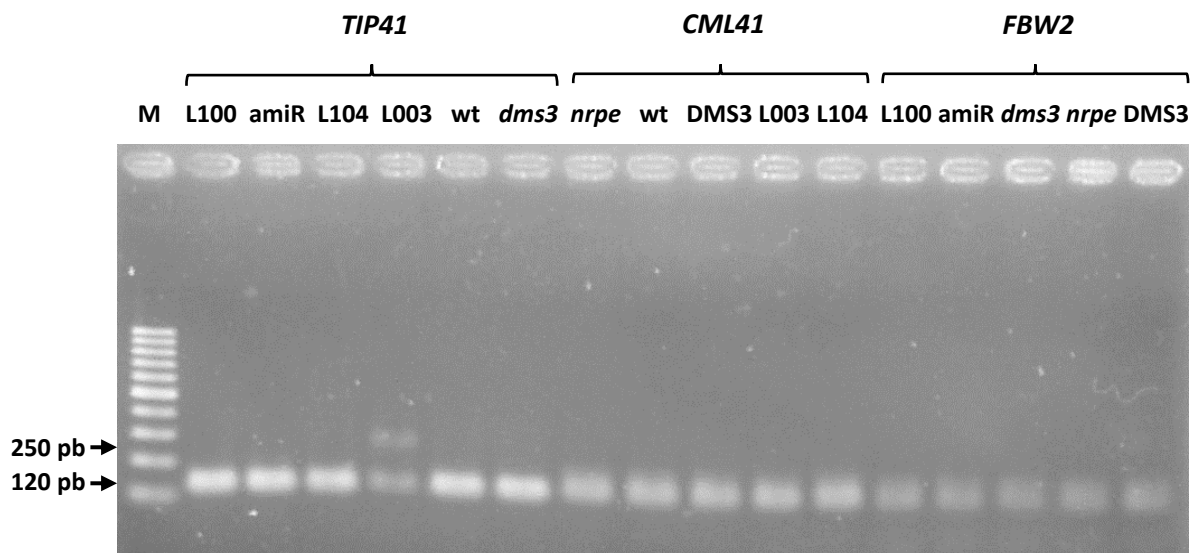
linija uročnjaka	koncentracija mRNA / (ng/μl)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
divlji tip	22,55	2,08	1,49
L003	6,4	2,21	0,935
L100	7,55	2,50	1,37
L104	16,95	1,99	1,03
amiR-bpm	5,25	2,49	1,15
oeDMS3	15,45	2,30	1,42
<i>dms3-1</i>	13,05	2,29	1,19
<i>nrpe1-10</i>	18,1	1,99	1,67

Relativna ekspresija gena *CML41* i *FBW2* u kotiledonarnim embrijima različitih transgeničnih linija i mutanata uročnjaka analizirana je metodom qPCR. U kontrolnoj reakciji, uz upotrebu 1 μl (2,63 ng) ili 3 μl (7,88 ng) cDNA izolirane iz kotiledonarnih embrija divljeg tipa i početnica za gene *TIP41* i *FBW2*, određena je količina kalupa cDNA koja je potrebna za

provođenje reakcije qPCR. Utvrđeno je da upotreba 3 μ l uzorka reverzne transkripcije u pojedinoj reakciji sprječava umnažanje fragmenata u reakciji qPCR. Međutim, uspješno umnažanje željenih fragmenata postignuto je upotrebom 1 μ l nerazrijeđene cDNA u svakoj reakcijskoj smjesi. Iz tog razloga, tijekom analize ekspresije gena *CML41* i *FBW2* u različitim linijama uročnjaka, kao kalup je korišten 1 μ l nerazrijeđene cDNA. Prosječne vrijednosti dobivenih efikasnosti parova početnica za gene *TIP41*, *CML41* i *FBW2* u svim provedenim reakcijama qPCR za sve korištene linije pri temperaturi od 60 °C iznosile su redom 71,84 %, 68,41 % i 57,21 %. Vrijednosti C_t za kontrolni gen *TIP41* dobivene su u rasponu vrijednosti 24 – 27 između svih analiziranih linija uročnjaka.

3.3.1 Potvrda specifičnog umnažanja fragmenata

Za potvrdu uspješnosti specifičnog umnažanja fragmenata DNA, po završetku reakcije qPCR nasumično odabrane uzorke analizirala sam agaroznom gel elektroforezom. U svim analiziranim uzorcima uočena je vrpca od ~ 120 pb (**Slika 16**), što odgovara očekivanim duljinama fragmenata za gene *TIP41*, *CML41* i *FBW2* koji redom iznose 122 pb, 125 pb i 114 pb. Pritom, najveći intenzitet umnažanja uočen je za gen *TIP41*, nešto manji intenzitet za gen *CML41*, a najmanji za gen *FBW2*. Iznimku predstavlja uzorak L003 u kojem je vidljiva vrpca na visini od ~ 250 pb. S obzirom da početnice za gen *TIP41* omogućuju i nespecifično umnažanje fragmenta od 230 pb na kalupu genomske DNA, dobivena vrpca ukazuje na kontaminaciju uzorka mRNA genomskom DNA.



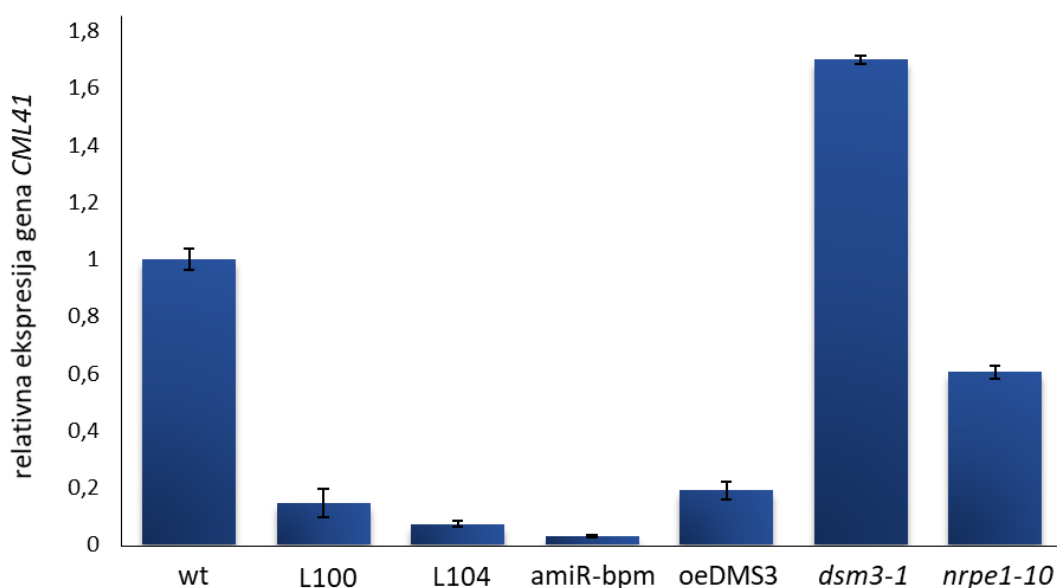
Slika 16. Fragmenti DNA umnoženi metodom qPCR uz upotrebu 1 μ l cDNA kao kalupa i parova početnica koje su specifične za gene *TIP41*, *CML41* i *FBW2* u kotiledonarnim embrijima divljeg tipa uročnjaka (wt), linija uročnjaka s pojačanom ekspresijom *BPM1* (L100, L104, L003), utišanim genima

AtBPM1, 4, 5, i 6 (amiR), pojačanom ekspresijom gena DMS3 (DMS3), mutiranim genom DMS3 (*dms3*) i mutiranim genom NRPE1 (*nrpe*). M - GeneRuler 100 pb DNA ladder.

3.3.2 Uspješnost provedbe reakcije qPCR i relativna ekspresija gena CML41 i FBW2

Relativna ekspresija gena *CML41* i *FBW2* u različitim transgeničnim linijama i mutantama uročnjaka analizirana je metodom $\Delta\Delta C_t$ uz upotrebu *TIP41* kao endogene kontrole (Slike 17, 18). S obzirom da prikazani stupci predstavljaju srednju vrijednost dviju tehničkih replika, pripadajuće standardne pogreške ukazuju na preciznost izvođenja same metode. Linija L003 izostavljena je iz analize zbog vrlo niske efikasnosti sva tri para početnica u uzorcima navedene linije, kao i zbog kontaminacije uzorka cDNA genomskom DNA.

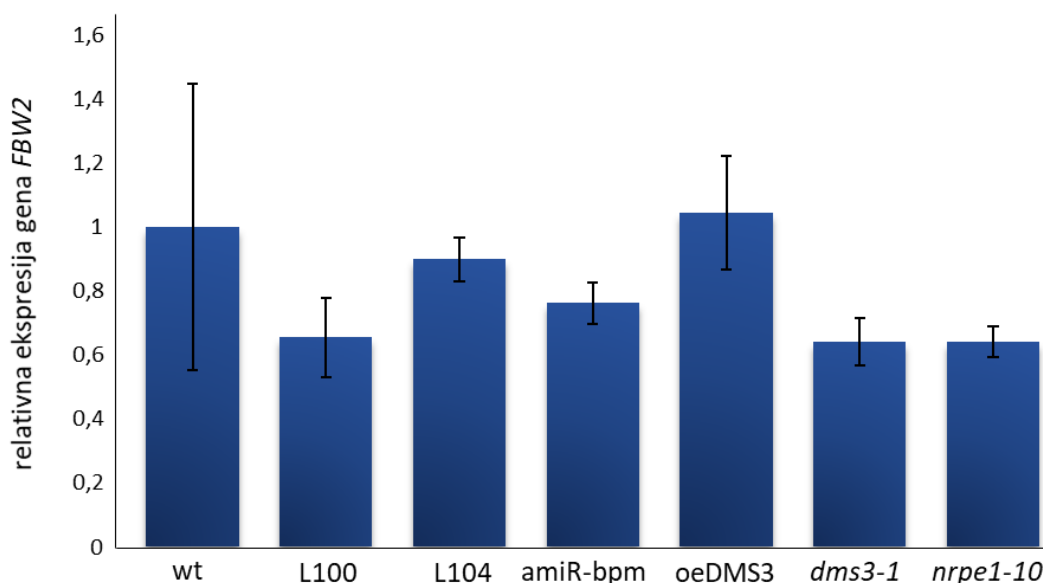
Analizom relativne ekspresije gena *CML41* u kotiledonarnim embrijima različitih linija uročnjaka (Slika 17), dobivene su male vrijednosti standardnih pogrešaka u svim analiziranim uzorcima. Takvi rezultati ukazuju na malu razliku u vrijednostima efikasnosti početnica i vrijednostima C_t koje su dobivene između dviju tehničkih replika uzoraka. Time je potvrđena velika preciznost tijekom pipetiranja u provedbi reakcije qPCR. Ekspresija gena *CML41* značajno je smanjena kod linija L100, L104, amiR-bpm i oeDMS3 u odnosu na divlji tip. Kod linije *dms3-1* može se uočiti tendencija povećanja ekspresije od 70 % za gen *CML41* u odnosu na divlji tip, dok se tendencija smanjenja ekspresije od 40 % za isti gen može zamijetiti kod linije *nrpe1-10* u odnosu na divlji tip.



Slika 17. Relativna ekspresija gena *CML41* u kotiledonarnim embrijima linija uročnjaka s pojačanom ekspresijom *BPM1* (L100, L104), utišanim genima *AtBPM1*, 4, 5, i 6 (amiR-bpm), pojačanom

ekspresijom gena *DMS3* (oeDMS3), mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) i mutiranim genom *NRPE1* (*nrpe1-10*) u odnosu na divlji tip (wt). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti dviju tehničkih replika s pripadajućim standardnim pogreškama.

Određivanjem relativne ekspresije gena *FBW2* u kotiledonarnim embrijima različitih linija uročnjaka (**Slika 18**), dobivene su velike varijacije između tehničkih replika. Rezultati ukazuju na veliku razliku u vrijednostima efikasnosti parova početnica i vrijednostima C_t između dviju tehničkih replika, što ukazuje na manju preciznost tijekom provedbe reakcije qPCR. Ekspresija gena *FBW2* ostala je nepromijenjena kod linija L104, amiR-bpm i oeDMS3 u odnosu na divlji tip. Tendencija smanjenja ekspresije gena *FBW2* od oko 40 % može se uočiti kod linija L100, *dms3-1* i *nrpe1-10* u odnosu na divlji tip.



Slika 18. Relativna ekspresija gena *FBW2* u kotiledonarnim embrijima linija uročnjaka s pojačanom ekspresijom *BPM1* (L100, L104), utišanim genima *AtBPM1*, 4, 5, i 6 (amiR-bpm), pojačanom ekspresijom gena *DMS3* (oeDMS3), mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) i mutiranim genom *NRPE1* (*nrpe1-10*) u odnosu na divlji tip (wt). Stupcima su prikazane srednje vrijednosti dviju tehničkih replika s pripadajućim standardnim pogreškama.

4 RASPRAVA

Embriogeneza vaskularnih biljaka odnosi se na proces uspostave plana tijela koji uključuje niz razvojnih događaja nužnih za rani vegetativni rast nakon klijanja. Uspostava polarnosti embrija i obrazaca razvoja, kao i diferencijacija različitih stanica, tkiva i organa neke su od karakteristika embriogeneze biljaka. Analiza ekspresije gena u različitim stadijima embrionalnog razvoja daje uvid u genetske mehanizme i metaboličke procese koji omogućuju nastanak zrelih embrija (Itoh i sur., 2016). Zbog precizno definiranog i predvidljivog razvoja, uročnjak je idealan model u takvim istraživanjima. Iz tog razloga, razvijene su metode koje omogućuju izolaciju embrija uročnjaka u pojedinim embrionalnim fazama (Florez-Rueda i sur., 2020). Međutim, mnoge tehničke poteškoće povezane s metodama izolacije ograničavaju izdvajanje čistih embrija i posljedično, kvalitetnu analizu genske ekspresije. Stoga, ovim radom nastojalo se uhodati metode koje će olakšati takve prepreke prilikom izolacije pojedinih stadija embrija uročnjaka i izolirati mRNA koja će količinom i čistoćom omogućiti analizu ekspresije gena metodom qPCR.

Vrlo rani embrionalni stadiji uročnjaka, koji uključuju sve embrije prije globularnog stadija, male su veličine i sadrže samo nekoliko stanica, zbog čega ih je jako teško analizirati i izdvojiti od tkiva sjemenog zametka (Feng i Ma, 2017). Do danas, poznato je nekoliko metoda izolacije predglobularnih embrija. Jedna od njih odnosi se na izrezivanje embrija iz mikropilarnog pola sjemenog zametka upotrebom iglica (Xiang i sur., 2011), što zahtijeva veliki utrošak vremena i preciznost izvođača. Također, nezadovoljavajućom metodom izdvajanja predglobularnih embrija pokazalo se pritiskanje površine sjemenih zametaka upotrebom pincete ili pokrovnice (Nawy i sur., 2010; Feng i Ma, 2017). Ovim istraživanjem potvrđeno je da primjena takve metode onemogućuje izolaciju velike količine embrija koja je potrebna u daljnjim analizama zbog toga što većina embrija ostane okružena i vezana na okolno majčinsko tkivo sjemenog zametka. Opisani tehnički problemi uklonjeni su istraživanjem Raissig i sur. (2013) u kojem temeljni princip izdvajanja embrija od okolnog tkiva uključuje mljevenje svih izdvojenih sjemenih zametaka tučkom. Bitan korak odnosi se i na filtriranje dobivene otopine, što je u tom istraživanju omogućilo izolaciju 25 – 40 embrija u vremenu od ~ 3 h. Takva metoda uspješno je primijenjena u svrhu sekvenciranja RNA (Autran i sur., 2011), analize metilacije DNA specifičnih gena (Wohrmann i sur., 2012) i analiza gena reportera (Raissig i sur., 2011). Modifikacijama metode Raissig i sur. (2013) u ovom je radu pokazano da je iz istog broja komuški koji je uključivao njih 15 oslobođeno ~ 130 embrija. Mogući uzrok

znatno veće količine izdvojenih embrija odnosi se na promjenu uvedenu tijekom filtriranja. Upotreba mrežice s porama četiri puta većeg promjera u odnosu izvorni protokol (Raissig i sur., 2013) omogućila je prolazak embrija, ali i manjih dijelova tkiva koje ih okružuje. S obzirom na to da je primijećeno da se embriji većinom zadržavaju u području okolnog tkiva, prolazak manjih komadića tkiva omogućio je filtriranje većeg broja embrija. Upotreba takvih uzoraka u daljnjim postupcima analize ne predstavlja problem s obzirom na kasnije izdvajanje i ispiranje embrija tijekom mikromanipulacije. Drugo moguće objašnjenje velikog broja izoliranih embrija uključuje količinu sile primijenjene tijekom mljevenja plastičnim tučkom. Jačina pritiska tučkom ovisi o izvođaču, što može dovesti do istiskivanja različitog broja embrija između uzoraka dobivenih istim protokolom.

Poznati su različiti pristupi izdvajanja globularnih, srololikih i torpedo embrija uročnjaka. Enzimatska metoda izolacije uključuje inkubaciju sjemenih zametaka u otopini enzima, što dovodi do razaranja okolnog tkiva i oslobađanja embrija (Aybeke i sur., 2013; Enghart i sur., 2017). Prednost metode odnosi se na jednostavnost njezine provedbe, a razlog slabije primjene uključuje mali broj izoliranih embrija. Velika količina ranih globularnih embrija dobivena je stiskanjem površine sjemenih zametaka (Slane i sur., 2014), što u ovom istraživanju nije omogućilo izolaciju zadovoljavajuće količine čistih embrija u globularnom, srololikom ni torpedo stadiju. Iznenađujuće, modificirana metoda Raissig i sur. (2013) koja se pokazala vrlo učinkovitom tijekom izolacije predglobularnih stadija nije omogućila izolaciju velike količine embrija niti u jednom od triju navedenih stadija. S obzirom na to da se moglo primijetiti da je većina oslobođenih embrija oštećena, moguća pretpostavka odnosi se na to da mljevenje sjemenih zametaka tučkom dovodi do razaranja tkiva globularnih, srololikih i torpedo embrija koji su veći u odnosu na embrije predglobularnih stadija. Međutim, učinkovitom metodom pokazalo se trganje sjemenih zametaka upotrebom iglica provedeno po uzoru na istraživanje Xiang i sur. (2011) koje je omogućilo izolaciju velikog broja embrija u svim stadijima embriogeneze uročnjaka (Gao i sur., 2019). Izmjena originalne metode u ovom istraživanju uključivala je nasumično i potpuno razaranje tkiva sjemenih zametaka pod lupom u odnosu na precizno izrezivanje mikropilarnog pola kod Xiang i sur. (2011). Opisana promjena olakšala je provedbu metode, čime je vrijeme potrebno za izolaciju embrija znatno skraćeno. Zbog veće količine tkiva torpedo embrija u odnosu na ostale stadije, nasumično razaranje sjemenih zametaka dovelo je do oštećenja malog broja embrija, što se pokazalo jedinim nedostatkom uvedene promjene. Unatoč tome, uhodana metoda s takvim razaranjem zametaka omogućuje izolaciju velike količine embrija u željenim stadijima. Kontaminacija

uzoraka embrija tkivom razorenih sjemenih zametaka predstavlja veliki problem prilikom daljnjih analiza. Važnost filtriranja koja je potvrđena tijekom izolacije embrija orhideje (Aybeke, 2013), kukuruza (Zhong i sur., 2018) i predglobularnih embrija uročnjaka u ovom radu razlog je upotrebe navedenog koraka prilikom izolacije globularnih, srcolikih i torpedo embrija. S obzirom na to da su embriji u opisanim stadijima promjera između 40 i 90 μm (Xiang i sur., 2011), njihovo uspješno odvajanje od okolnih nečistoća postignuto je filtriranjem kroz pore promjera 100 μm .

S obzirom na veličinu kotiledonarnih embrija, njihovo istiskivanje iz sjemenih zametaka omogućeno je laganim pritiskom pokrovnice na površinu sjemenih zametaka (Škiljaica, 2016). Primjenom opisane metode u ovom istraživanju izoliran je veliki broj čistih kotiledonarnih embrija. Umjesto prijenosa pojedinačnih embrija iglicom, uveden je korak skupljanja svih oslobođenih embrija u jedan dio kapi vode, nakon čega su skupljeni embriji izdvojeni upotrebom pipete. Takav postupak omogućio je znatno smanjenje vremena potrebnog za izolaciju embrija. Uz to, upotreba pokrovnice veće površine omogućuje istovremeno istiskivanje embrija iz većeg broja sjemenih zametaka, što znatno olakšava provedbu izolacije. Sjemeni zameci s embrijima kasnijih razvojnih faza sadrže gusti endosperm koji je povezan s embrijima, zbog čega postoji veća opasnost kontaminacije uzoraka embrija okolnim tkivom (Gao i sur., 2019). Uklanjanje mogućih nečistoća tijekom izolacije kotiledonarnih embrija u ovom istraživanju ostvareno je kombiniranjem metode izdvajanja embrija od nečistoća iglicama i konačnim ispiranjem skupljenih embrija upotrebom inzulinske šprice. Na taj način, moguće je dobiti uzorke embrija velike čistoće koji se mogu koristiti u daljnjim analizama genske ekspresije. S obzirom na različite fenotipske karakteristike pojedinih transgeničnih linija, uhodanu metodu izolacije kotiledonarnih embrija potrebno je optimizirati za svaku od njih. Jedan od primjera uključuje liniju amiR-bpm na kojoj se mogu uočiti poremećaji u razvoju cvijeta, uključujući pretjerano otvaranje cvjetova, razvoj kraćih prašnika, izbočeni ginecij i kratke komuške (Lechner i sur., 2011). Manja veličina komuški s duplo manjim brojem sjemenih zametaka u odnosu na ostale linije zahtijevala je uzorkovanje većeg broja komuški tijekom izolacije kotiledonarnih embrija linije amiR-bpm u ovom istraživanju.

Izolacija embrija temeljena na vizualnom odabiru željenih embrionalnih stadija predstavlja jednu od prednosti metoda izolacije embrija koje su uhodane u ovom radu. Tijekom istraživanja, moglo se uočiti da su komuške korištene za izolaciju predglobularnih, globularnih, srcolikih i torpedo embrija sadržavale sjemene zametke s embrijima u nekoliko različitih

razvojnih stadija. Iz tog razloga, jedini način povećanja broja željenih embrionalnih stadija uključuje korištenje većeg broja komuški odgovarajuće veličine i položaja.

Postupak kvantifikacije genske ekspresije zahtijeva izolaciju i analizu određene količine čiste mRNA. U mnogim istraživanjima, ograničavajući faktor za analizu ekspresije gena je mala početna količina tkiva (Oñate-Sánchez i Vicente-Carbajosa, 2008). S obzirom da je tijekom embrionalnog razvoja uročnjaka eksprimirano barem 60 % genoma, u kotiledonarnim embrijima uročnjaka moguće je pronaći ~ 9000 različitih molekula mRNA (Belmonte i sur., 2013). Unatoč tome što kotiledonarni embriji uročnjaka sadrže veliki broj transkripata, njihova mala veličina predstavlja veliki izazov tijekom izolacije mRNA. Iz tog razloga, razvijena je metoda koja omogućuje istraživanje genske ekspresije iz male količine početnog materijala, a uključuje izolaciju mRNA upotrebom magnetnih kuglica s vezanim deoksitimidilatima (oligo(dT)₂₅), nakon čega se analiza ekspresije provodi metodom qPCR (Jost i sur., 2007). Opisana metoda omogućila je analizu transkriptoma u apikalnim, bazalnim (Zhou i sur., 2019) i antipodalnim stanicama (Yu i sur., 2016), kao i u ranim embrionalnim stadijima uročnjaka (Zhao i sur., 2019), te je korištena i u ovom radu za izolaciju mRNA iz kotiledonarnih embrija različitih linija uročnjaka. Korištenih 70 kotiledonarnih embrija odabrano je s ciljem maksimalnog prinosa mRNA, ali i prihvatljivog utroška vremena potrebnog za izolaciju tog broja embrija. Jedan od ključnih koraka izolacije mRNA predstavljala je priprema lizata uzorka koju je potrebno provesti brzo i učinkovito. S ciljem očuvanja integriteta RNA tijekom izolacije srcolikih i torpedo stadija uljane repice (*Brassica napus* (L.)), tkivo skupljenih embrija samljeveno je upotrebom tučka prije smrzavanja u tekućem dušiku (Siles i sur., 2020). Za razliku od toga, mljevenje tkiva embrija u ovom radu provedeno je nakon smrzavanja i naizmjeničnim uranjanjem u tekući dušik, uz upotrebu ledene kupelji koja je omogućila povećanje temperature uzorka. Time je smanjena kompaktnost tkiva, što je znatno olakšalo potpuno razaranje tkiva embrija tučkom. Preduvjet dodatku ekvivalentne količine mRNA svih uzoraka u reakciju reverzne transkripcije predstavljalo je mjerenje koncentracije dobivene mRNA. U tu svrhu, izolirana mRNA eluirana je s magnetnih kuglica, pri čemu je najveći prinos mRNA dobiven pri temperaturi elucije od 80 °C. Provedena metoda omogućila je izolaciju mRNA iz 8 uzoraka u vrlo kratkom vremenu od ~ 30 min, čime se znatno smanjuje vjerojatnost razgradnje mRNA u tkivu (Jost i sur., 2007).

Količina ukupne RNA koju je moguće izolirati iz 50 zrelih embrija uljane repice obuhvaća raspon od ~ 130 ng/μl do ~ 650 ng/μl (Siles i sur., 2020). Zreli embriji uljane repice su oko 1000 puta veći u odnosu na kotiledonarne embrije uročnjaka (Venglat i sur., 2013),

zbog čega se može reći da su količine mRNA dobivene iz 70 kotiledonarnih embrija uročnjaka u koncentracijama od ~ 5 ng/μl do ~ 20 ng/μl očekivane. Mogući uzrok različitih koncentracija izolirane mRNA između pojedinih uzoraka uključuje korak elucije mRNA s magnetnih kuglica, pri čemu postoji mogućnost da je u nekim uzorcima dio izolirane mRNA ostao vezan na magnetne kuglice. Efikasnija elucija mRNA u budućim istraživanjima mogla bi se postići dodatnim povećanjem temperature elucije ili produljenjem vremena inkubacije uzoraka na povišenoj temperaturi tijekom elucije. Na uspješnost daljnjih istraživanja genske ekspresije veliki utjecaj ima čistoća izolirane mRNA, pri čemu se omjeri $A_{260/280}$ i $A_{260/230}$ u vrijednosti ~ 2 očekuju u uzorcima velike čistoće (www.vhir.org). Vrijednost ~ 1,3 dobivena za omjer $A_{260/230}$ u uzorcima izolirane mRNA ukazuje na moguću prisutnost tvari koje apsorbiraju pri 230 nm, kojima pripadaju određeni ugljikohidrati (www.controltecnica.com). S obzirom da sve nukleinske kiseline, uključujući DNA i RNA, apsorbiraju pri valnoj duljini od 260 nm, primjena apsorbancija u svrhu mjerenja čistoće RNA onemogućuje određivanje moguće kontaminacije uzoraka genomskom DNA (worldwide.promega.com). Međutim, u svrhu detekcije mogućih kontaminacija u uzorcima, fragmente dobivene reakcijom qPCR moguće je analizirati metodom agarozne gel elektroforeze. Opisanom metodom uočeno je umnažanje fragmenta gena *TIP41* na kalupu genomске DNA u uzorku linije L003, što upućuje na moguće prisustvo fragmenata genoma u uzorcima cDNA. Potencijalni uzrok kontaminacije uzorka genomskom DNA odnosi se na predugo vrijeme inkubacije lizata navedenog uzorka i magnetnih kuglica tijekom izolacije mRNA, a kako bi se to izbjeglo u budućim istraživanjima, potrebno je skratiti vrijeme inkubacije s 5 min na 4 min.

Unatoč tome što je izolirana mRNA omogućila analizu genske ekspresije, dobivene čistoće mRNA u pojedinim uzorcima razlog su određenih odstupanja u rezultatima dobivenih metodom qPCR. Preporučena razlika u vrijednostima C_t između pojedinih uzoraka kod referentnog gena trebala bi uključivati vrijednosti manje od 1, što ukazuje na istu količinu kalupa dodanog u sve uzorke (Udvardi i sur., 2008). U ovom su istraživanju u sve reakcije qPCR dodane iste količine (volumeni) kalupa, a dobivena razlika ciklusa umnažanja između pojedinih uzoraka korištenog referentnog gena *TIP41* iznosila je 3. Poznato je da stabilna ekspresija gena *TIP41* u različitim razvojnim stadijima rajčice (Expósito-Rodríguez i sur., 2008) i u kasnijim embrionalnim stadijima uljane repice (Chen i sur., 2010) čini navedeni gen dobrim referentnim genom u analizi genske ekspresije tijekom embriogeneze navedenih vrsta. S obzirom na nedostatak takvih podataka za kotiledonarne embrije različitih transgeničnih linija i mutanata uročnjaka, moguće je da gen *TIP41* nije jednako eksprimiran u kotiledonarnim

embrijima svih navedenih linija, što bi moglo biti objašnjenje uočenih razlika u vrijednostima C_t između linija. Iz tog razloga, u budućim istraživanjima ekspresije gena u kotiledonarnim embrijima različitih linija uročnjaka bilo bi dobro istražiti kakva je stabilnost ekspresije drugih referentnih gena koji su već korišteni u analizama genske ekspresije tijekom embriogeneze uročnjaka. Jedan od primjera uključuje gene *EF1 α* , *TIN* (Palovaara i sur., 2017) i *ACTIN2* (Slane i sur., 2014) koji su korišteni tijekom analize ekspresije gena u ranijim embrionalnim stadijima uročnjaka. Također, moguće objašnjenje razlika u vrijednostima C_t za referentni gen između uzoraka je različita prisutnost tvari preostalih iz postupaka pročišćavanja mRNA i reverzne transkripcije koje su dovele do različite efikasnosti početnica (Pfaffl, 2006) između uzoraka. Uz to, prisutnost opisanih tvari mogući je uzrok različitih čistoća mRNA između pojedinih uzoraka. Mala čistoća uzorka L003 je, uz kontaminaciju spomenutog uzorka genomskom DNA, znatno smanjila efikasnost početnica i onemogućila analizu genske ekspresije u tom uzorku. Najveća efikasnost početnica od 71,84 % koja je dobivena u ovom radu manja je u odnosu na optimalne efikasnosti koje bi trebale uključivati vrijednosti veće od 90 % (Nolan i sur., 2013). Navedeno bi se moglo objasniti premalom količinom određenih komponenti reakcijske smjese, primjerice početnica i magnezijevih iona, što je moglo uzrokovati inhibiciju reakcije ([www.thermofisher.com/ LifeTech](http://www.thermofisher.com/LifeTech)). Osim toga, povećanje čistoće korištenih uzoraka mRNA ima pozitivan utjecaj na efikasnost umnažanja (Sreedharan i sur., 2018). S tim ciljem, kao kalup u reakcijskoj smjesi najčešće se koristi razrijeđeni uzorak cDNA (Jost i sur., 2007). Međutim, priprema takvog kalupa u ovom istraživanju bila je onemogućena zbog male količine izolirane mRNA, a moguće rješenje uključivalo bi izolaciju veće količine embrija te posljedično izolaciju veće količine mRNA. S ciljem dobivanja veće količine cDNA koja bi omogućila razrjeđivanje uzoraka, moguće rješenje uključuje i upotrebu drugačijih početnica u reakciji reverzne transkripcije. U tu svrhu, umjesto oligo(dT)₁₈ početnica moguće je koristiti nasumične heksamerne početnice koje bi mogle osigurati efikasniju sintezu cDNA. Prisutnost deoksiribonukleotida, početnica, soli i ostalih komponenti koje potječu iz reakcije reverzne transkripcije može dovesti do inhibicije tijekom umnažanja (Pfaffl, 2006), što je onemogućilo analizu genske ekspresije u svim uzorcima kada je za reakciju qPCR korišteno 3 μ l cDNA, za razliku od 1 μ l cDNA kojim je umnažanje fragmenata uspješno provedeno.

S obzirom na veliku osjetljivost metode qPCR, točnost dobivenih rezultata uvelike ovisi o preciznosti pipetiranja (Remans i sur., 2014). Nedosljednost u spomenutom postupku uzrok je različitih fluorescencijskih krivulja između tehničkih replika (Pfaffl, 2006). Prihvatljiva

razlika od 0,5 ciklusa umnažanja između tehničkih replika (genomique.irc.ca) uočena je tijekom analize ekspresije gena *CML41*. S druge strane, nedostatak preciznosti potvrđen u pojedinim uzorcima tijekom analize ekspresije gena *FBW2* ukazuje na to da male promjene u izvedbi metode od strane istog izvođača mogu rezultirati velikim promjenama u dobivenim podacima. Analiza ekspresije gena u ovom radu provedena je na jednom uzorku mRNA po liniji i dobivene rezultate je potrebno ponoviti upotrebom barem još dviju bioloških replika (nezavisnih eksperimenata) po liniji (Udvardi i sur., 2008) kako bi se moglo raspravljati o pouzdanosti i statističkom značenju razlika u ekspresiji gena među linijama.

Prema ovdje prikazanim preliminarnim rezultatima moguće je pretpostaviti važnost proteina BPM1 u regulaciji ekspresije gena *CML41* u kotiledonarnim embrijima. Dokazana interakcija proteina BPM1 i proteina DMS3 (Miškec, 2019; Jagić i sur., 2020) ukazuje na moguću uključenost proteina BPM1 u regulaciju ekspresije gena *CML41*. Tome u prilog, preliminarnim istraživanjem pokazano je da povećana količina proteina BPM1 dovodi do pojačane metilacije promotora za gen *CML41* (Vuk, neobjavljeni rezultati), što bi moglo biti objašnjenje smanjene ekspresije gena *CML41* u linijama s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* koja je pokazana u ovom istraživanju. S druge strane, smanjena ekspresija gena *CML41* uočena kod linije amiR-bpm s utišanim genima *AtBPM1*, 4, 5 i 6 može se objasniti mogućom promjenom u ekspresiji ili djelovanju proteina neutišanih gena *AtBPM2* i 3 u navedenoj liniji koji bi na taj način mogli nadomjestiti funkciju utišanih gena. Iz tog razloga, u budućim istraživanjima bilo bi dobro analizirati ekspresiju gena *CML41* u kotiledonarnim embrijima linije uročnjaka u kojoj je utišano svih šest gena *AtBPM1-6*. S obzirom da je ekspresija gena *CML41* regulirana metilacijom promotora koja ovisi o putu RdDM (Baev i sur., 2010), smanjenje ekspresije gena *CML41* u liniji s prekomjernom ekspresijom *DMS3* (oeDMS3) i povećanje ekspresije gena *CML41* u liniji s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) su očekivani. Zbog smanjenja metilacije na promotoru gena *CML41* u linijama s mutiranim podjedinicama polimeraza PolIV i PolV i posljedičnog povećanja ekspresije navedenog gena (Baev i sur., 2010), očekivalo bi se da će nefunkcionalnost PolV u ovom istraživanju također dovesti do povećanja ekspresije navedenog gena. Međutim, smanjenje ekspresije gena *CML41* dobiveno u liniji s nefunkcionalnom PolV moglo bi ukazivati na to da je metilacija gena *CML41* regulirana i drugim putem, neovisnim o PolV. Osim toga, vezanje proteina BPM1 i DMS3 na regiju u blizini gena *FBW2* (neobjavljeno) upućuje na važnost proteina BPM1 u regulaciji ekspresije navedenog gena. Međutim, zbog nedostatka druge biološke replike i statističke analize podataka, dobiveni rezultati samo predstavljaju osnovu za daljnja istraživanja koja će

omogućiti donošenje relevantnih zaključaka o ekspresiji gena *FBW2*. Točniju analizu ekspresije gena *FBW2* u budućim istraživanjima mogla bi, uz veću preciznost tijekom izvođenja metode qPCR i upotrebu većeg broja bioloških replika, omogućiti i upotreba većeg broja referentnih gena (Udvardi i sur., 2008; Bustin i sur., 2009) koji imaju jednaku ekspresiju u kotiledonarnim embrijima svih analiziranih linija uročnjaka. Prikazani preliminarni rezultati relativne ekspresije gena *CML41* i *FBW2* pokazuju da se uz pomoć optimiziranih metoda izolacije embrija opisanih u ovom radu dodatno trebaju unaprijediti metode za izolaciju veće količine i bolje kvalitete mRNA koje će u budućim istraživanjima omogućiti uspješnu kvantifikaciju ekspresije gena u embrijima.

5 ZAKLJUČAK

Metode ručne izolacije pojedinih embrionalnih stadija uročnjaka uspješno su uhodane. Problem koji uključuje potpuno odvajanje embrija od okolnog tkiva u slučaju izolacije predglobularnih embrija uspješno je riješen mljevenjem sjemenih zametaka plastičnim tučkom. Tijekom izolacije globularnih, srcolikih i torpedo stadija, navedeni problem riješen je trganjem tkiva zametaka iglicama, dok su kotiledonarni embriji uspješno izdvojeni pritiskanjem površine sjemenih zametaka pokrovnicom. Razvijene metode su lako primjenjive i omogućuju dobivanje uzoraka s velikim brojem čistih embrija u kratkom vremenu, upotrebom jednostavnog laboratorijskog pribora. Uhodani postupak mikromanipulacije uz upotrebu invertnog mikroskopa s mikrodisektorom omogućuje izdvajanje svih tipova embrija: predglobularnih, globularnih, srcolikih i torpedo stadija. Brzo izdvajanje embrija oslobođenih od RNaza prednosti su uhodane metode koje osiguravaju njezinu primjenu u daljnjim istraživanjima. Provedena metoda izolacije mRNA iz kotiledonarnih embrija uročnjaka omogućila je dobivanje količine mRNA dovoljne za analizu genske ekspresije do 6 gena. Smanjena čistoća mRNA u pojedinim uzorcima i manja preciznost u pipetiranju tijekom provedbe tehnike qPCR dovele su do odstupanja u vrijednostima efikasnosti početnica i vrijednostima C_t za referentni gen u odnosu na optimalne vrijednosti. Efikasnija metoda elucije mRNA s magnetnih kuglica nakon izolacije iz tkiva i upotreba drugačije metode reverzne transkripcije, koje bi u budućim istraživanjima mogle osigurati veći prinos cDNA, osigurat će dodatno poboljšanje analize ekspresije gena u embrijima uročnjaka. Analizom relativne ekspresije gena *CML41* i *FBW2* metodom RT-qPCR dobiven je uvid u moguću ekspresiju navedenih gena u kotiledonarnim embrijima različitih transgeničnih i mutantnih linija uročnjaka. Dobiveni rezultati idu u prilog pretpostavci o sudjelovanju proteina BPM1 u putu RdDM tijekom regulacije ekspresije gena *CML41*. Točniju analizu ekspresije gena u budućim istraživanjima osigurat će upotreba većeg broja bioloških replika, uz korištenje nekoliko referentnih gena. Provedena analiza genske ekspresije potvrđuje uspješnost optimizacije metode izolacije zigotnih embrija i ukazuje na potrebu za optimizacijom izolacije veće količine mRNA iz embrija. Ove metode omogućit će precizne transkriptomске analize i bolje razumijevanje genske regulacije točno određenih embrionalnih stadija uročnjaka u budućim istraživanjima.

6 LITERATURA

Abrahamsson M. (2016) Patterning during embryo development in *Pinus*. Doktorski rad. Sveučilište u Uppsali, Odsjek za biljnu biologiju, Fakultet prirodnih izvora i agrikulturalnih znanosti.

Autran D., Baroux C., Raissig M. T., Lenormand T., Wittig M., Grob S., Steimer A., Barann M., Klostermeier U. C., Leblanc O., Vielle-Calzada J. P., Rosenstiel P., Grimanelli D. i Grossniklaus U. (2011) Maternal epigenetic pathways control parental contributions to *Arabidopsis* early embryogenesis. *Cell*. **145**: 707-719.

Aybeke M. (2013) Embryo and protoplast isolation from *Barlia robertiana* seeds (Orchidaceae). *American Journal of Plant Sciences*. **4**: 1-8.

Babu Y., Musielak T., Henschen A. i Bayer M. (2013). Suspensor length determines developmental progression of the embryo in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **162**: 1448-1458.

Baev V., Naydenov M., Apostolova E., Ivanova D., Doncheva S., Minkov I. i Yahubyan G. (2010) Identification of RNA-dependent DNA-methylation regulated promoters in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*. **48**: 393-400.

Baroux C., Autran D., Gillmor C. S., Grimantelli D. i Grossniklaus U. (2016) The maternal to zygotic transition in animals and plants. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. **73**: 1-12.

Bayer M., Nawy T., Giglione C., Galli M., Meinnel T. i Lukowitz W. (2009) Paternal control of embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Science*. **323**: 1485-1488.

Bayer M., Slane D. i Jurgens G. (2017) Early plant embryogenesis - dark ages or dark matter? *Current Opinion in Plant Biology*. **35**: 30-36.

Belmonte M. F., Kirkbride R. C., Stone S. L., Pelletier J. M., Bui A. Q., Yeung E. C., Hashimoto M., Fei J., Harada C. M., Munoz M. D., Le B. H., Drews G. N., Brady S. M., Goldberg R. B. i Harada J. J (2013) Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the *Arabidopsis* seed. *PNAS*, **110**, 10.1073/pnas.1222061110.

Betts N. S., Berkowitz O., Liu R., Collins H. M., Skadhauge B., Dockter C., Burton R. A., Whelan J. i Fincher G. B. (2017) Isolation of tissues and preservation of RNA from intact, germinated barley grain. *The Plant Journal*. **91**: 754-765.

- Brukhin V. i Morozova N. (2011) Plant growth and development - basic knowledge and current views. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*. **6**: 1-53.
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J. i Wittwer C. T. (2009) The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. **55**: 611-622.
- Casson S., Spencer M., Walker K. i Lindsey K. (2005) Laser capture microdissection for the analysis of gene expression during embryogenesis of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. **42**: 111-123.
- Chen L., Bernhardt A., Lee J. H. i Hellmann H. (2015) Identification of *Arabidopsis* MYB56 as a novel substrate for CRL3 (BPM) E3 ligases. *Molecular Plant*. **8**: 242-250.
- Chen L. i Hellmann H. (2013) Plant E3 ligases: flexible enzymes in a sessile world. *Molecular Plant*. **6**: 1388-1404.
- Chen X., Truksa M., Shah S. i Weselake R. J. (2010) A survey of quantitative real-time polymerase chain reaction internal reference genes for expression studies in *Brassica napus*. *Analytical Biochemistry*. **405**: 138-140.
- Costa L. M., Marshall E., Tesfaye M., Silverstein K. A. T., Mori M., Umetsu Y., Otterbach S. L., Papareddy R., Dickinson H. G., Boutiller K., VandenBosch K. A., Ohki S. i Gutierrez-Marcos J. F. (2014) Central cell-derived peptides regulate early embryo patterning in flowering plants. *Science*. **344**: 168-172.
- Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi M. K. i Scheible W. R. (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **139**: 5-17.
- Earley K., Smith M. R., Weber R., Gregory B. D. i Poethig R. S. (2010) An endogenous F-box protein regulates ARGONAUTE1 in *Arabidopsis thaliana*. *Silence*. **1**: 15-25.
- Englhart M., Šoljić L. i Sprunck S. (2017) Manual isolation of living cells from the *Arabidopsis thaliana* female gametophyte by micromanipulation. U: Schmidt A. (ur.), *Plant Germline Development: Methods and Protocols*. New York, Springer, str. 221-234.

- Expósito-Rodríguez M., Borges A. A., Borges-Pérez A. i Pérez J. A. (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology*. **8**: 131-142.
- Feng J. i Ma L. (2017) A method for characterizing embryogenesis in *Arabidopsis*. *Journal of Visualized Experiments*. **126**: 55969.
- Florez-Rueda A. M., Waser L. i Grossniklaus U. (2020) Laser-assisted microdissection of plant embryos for transcriptional profiling. U: Bayer M. (ur.), *Plant Embryogenesis: Methods and Protocols*. New York, Springer, str. 127-140.
- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwartz H., Hamann T., Offringa R. i Jurgens G. (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*. **426**: 147-153.
- Gao P., Xiang D., Quilichini T. D., Venglat P., Pandey P. K., Wang E., Gillmor C. S. i Datla R. (2019) Gene expression atlas of embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Reproduction*. **32**: 93-104.
- Gautam V. i Sarkar A. K. (2014) Laser assisted microdissection, an efficient technique to understand tissue specific gene expression patterns and functional genomics in plants. *Molecular Biotechnology*. **57**: 299-308.
- Haecker A., Groß-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M. i Laux T. (2004) Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. **131**: 657-668.
- Hepworth S. R., Klenz J. E. i Haughn G. W. (2006) UFO in the *Arabidopsis* inflorescence apex is required for floral-meristem identity and bract suppression. *Planta*. **223**: 769-778.
- Hong S. M., Bahn S. C., Lyu A., Jung H. S. i Ahn J. H. (2010) Identification and testing of superior reference genes for a starting pool of transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology*. **51**: 1694-1706.
- Itoh J., Sato Y., Sato Y., Hibara K., Shimizu-Sato S., Kobayashi H., Takehisa H., Sanguinet K. A., Namiki N. i Nagamura Y. (2016) Genome-wide analysis of spatio-temporal gene expression patterns during early embryogenesis in rice. *Development Advance Online Articles*, The Company of Biologists Ltd., <https://doi.org/10.1242/dev.123661>.

Jagić M., Škiljaica A., Markulin L., Bauer N. i Leljak-Levanić D. (2020) Interakcije uročnjakovih proteina BPM s regulacijskim proteinima metilacije DNA de novo. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a. Zagreb, Hrvatska, 28.02.

Jost R., Berkowitz O. i Masle J. (2007) Magnetic quantitative reverse transcription PCR: A high-throughput method for mRNA extraction and quantitative reverse transcription PCR. *BioTechniques*. **43**: 206-211.

Julian J., Coego A., Lozano-Juste J., Lechner E., Wu Q., Zhang X., Merilo E., Belda-Palazon B., Park S.-Y., Cutler S. R., An C., Genschik P. i Rodriguez P. L. (2019) The MATH-BTB BPM3 and BPM5 subunits of cullin3-RING E3 ubiquitin ligases target PP2CA and other clade A PP2Cs for degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **116**, 15725-15734.

Kanno T., Bucher E., Daxinger L., Huettel B., Bohmdorfer G., Gregor W., Kreil D. P., Matzke M. i Matzke A. J. M. (2008) A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. *Nature Genetics*. **40**: 640-645.

Khalequzzaman M. i Haq N. (2005) Isolation and in vitro fusion of egg and sperm cells in *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*. **43**: 69-75.

Kovacs M., Barnabas B. i Kranz E. (1994) The isolation of viable egg cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sexual Plant Reproduction*. **7**: 311-312.

Kranz E., Bautor J. i and Lorz H. (1991) In vitro fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion. *Sexual Plant Reproduction*. **4**: 12-16.

Lechner E., Leonhardt N., Eisler H., Parmentier Y., Alioua M., Jacquet H., Leung J. i Genschik P. (2011) MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling. *Developmental Cell*. **21**: 1116-1128.

Leljak Levanić D., Horvat T., Martinčić J. i Bauer N. (2012) A novel bipartite nuclear localization signal guides BPM1 protein to nucleolus suggesting its cullin3 independent function. *PloS One*, **7**, 10.1371/journal.pone.0051184.

Lu P., Porat R., Nadeau A. i O'Neill S. (1996) Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *The Plant Cell*. **8**: 2155-2168.

Lu Y., Wei L. i Wang T. (2015) Methods to isolate a large amount of generative cells, sperm cells and vegetative nuclei from tomato pollen for „omics“ analysis. *Frontiers in Plant Science*. **6**: 391.

Lukowitz W., Roeder A., Parmenter D. i Somerville C. (2004) A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell*. **116**: 109-119.

McCormack E., Tsai Y. C. i Braam J. (2005) Handling calcium signaling: arabidopsis CaMs and CMLs. *Trends in Plant Science*. **10**: 383-389.

Miškec, K. (2019) Uloga konzerviranih domena MATH, BTB i SPOP proteina BPM1 u interakciji s proteinima DMS3, RDM1 i HB6. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.

Morimoto K., Ohama N., Kidokoro S., Mizoi J., Takahashi F., Todaka D., Mogami J., Sato H., Qin F., Kim J.-S., Fukao Y., Fujiwara M., Shinozaki K. i Yamaguchi-Shinozaki K. (2017) BPM-CUL3 E3 ligase modulates thermotolerance by facilitating negative regulatory domain-mediated degradation of DREB2A in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**, E8528-E8536.

Musielak T. J. i Bayer M. (2014) YODA signalling in the early *Arabidopsis* embryo. *Biochemical Society Transactions*. **42**: 408-412.

Nawy T., Bayer M., Mravec J., Friml J., Birnbaum K. D. i Lukowitz W. (2010) The GATA factor *HANABA TARANU* is required to position the proembryo boundary in the early *Arabidopsis* embryo. *Developmental Cell*. **19**: 103-113.

Nolan T., Huggett J. i Sanchez E. (2013) Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR). Laboratory of the Government Chemist, Velika Britanija.

Oñate-Sánchez L. i Vicente-Carbajosa J. (2008) DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research Notes*. **1**: 93-99.

Pali D. (2020) Alternativno prekranje gena *BPM1*, *BPM2* i *BPM3* u uvjetima temperaturnog stresa. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.

Palovaara J., Saiga S., Wendricha J. R., Wout Hoflanda N., Schaycka J. P., Hatera F., Muttea S., Sjollemaa S., Boekschotenb M., Hooiveldb G. J. i Weijersa D. (2017) Transcriptome dynamics revealed by a gene expression atlas of the early *Arabidopsis* embryo. *Nature Plants*. **3**: 894-904.

- Park K., Frost J. M., Adair A. J., Kim D. M., Yun H., Brooks J. S., Fischer R. L. i Choi Y. (2016) Optimized methods for the isolation of *Arabidopsis* female central cells and their nuclei. *Molecules and Cells*. **39**: 768-775.
- Park S. i Harada J. J. (2008) Arabidopsis embryogenesis. *Methods in Molecular Biology*. **427**: 3-16.
- Pfaffl M. W. (2006) Relative quantification. U: Dorak T. (ur.), *Real-time PCR*. New York, Taylor & Francis, str. 63-82.
- Pillitteri L. J., Guo X. i Dong J. (2016) Asymmetric cell division in plants: mechanisms of symmetry breaking and cell fate determination. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **73**: 4213-4229.
- Pintard L., Willis J. H., Willems A., Johnson J. F. J., Srayko M., Kurz T., Glaser S., Mains P. E., Tyers M., Bowerman B. i Peter M. (2003) The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature*. **425**: 311-316.
- Popova O. V., Dinh H. Q., Aufsatz W. i Jonak C. (2013) The RdDM pathway is required for basal heat tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*. **6**: 396-410.
- Raissig M.T., Baroux C. i Grossniklaus U. (2011) Regulation and flexibility of genomic imprinting during seed development. *Plant Cell*. **23**: 16-26.
- Raissig M. T., Gagliardini V., Jaenisch J., Grossniklaus U. i Baroux C. (2013) Efficient and rapid isolation of early-stage embryos from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Journal of Visualized Experiments*. **76**: 50371.
- Radoeva T. i Weijers D. (2014) A roadmap to embryo identity in plants. *Trends in Plant Science*. **19**: 709-716.
- Remans T., Keunen E., Bex G. J., Smeets K., Vangronsveld J. i Cuypers A. (2014) Reliable gene expression analysis by reverse transcription-quantitative PCR: reporting and minimizing the uncertainty in data accuracy. *The Plant Cell*. **26**: 3829-3837.
- Roeder A. H. K. i Yanofsky M. F. (2006) Fruit development in *Arabidopsis*. U: American Society of Plant Biologists, *The Arabidopsis book*, BioOne, e0075.
- Rollins R. C. (1993) The Cruciferae of continental North America: systematics of the mustard family from the Arctic to Panama. Stanford University Press, Stanford.

Sakai K., Taconnat L., Borrega N., Yansouni J., Brunaud V., Paysant-Le Roux C., Delannoy E., Magniette M. M., Lepiniec L., Faure J. D., Balzergue S. i Dubreucq B. (2018) Combining laser-assisted microdissection (LAM) and RNA-seq allows to perform a comprehensive transcriptomic analysis of epidermal cells of *Arabidopsis* embryo. *Plant Methods*. **14**: 10.

Scott R. J., Armstrong S. J., Doughty J. i Spielman M. (2008) Double fertilization in *Arabidopsis thaliana* involves a polyspermy block on the egg but not the central cell. *Molecular Plant*. **1**: 611-619.

Sealfon S. C. i Chu T. T. (2011) RNA and DNA Microarrays. U: Walker J. M. (ur.), *Methods in Molecular Biology*. New York, Springer, 3-34.

Siles L., Eastmond P. i Kurup S. (2020) Big data from small tissues: extraction of high-quality RNA for RNA-sequencing from diferent oilseed *Brassica* seed tissues during seed development. *Plant Methods*. **16**: 80-87.

Slane D., Kong J., Berendzen K. W., Kilian J., Henschen A., Kolb M., Schmid M., Harter K., Mayer U., Smet I. D., Bayer M. i Jürgens G. (2014) Cell type-specific transcriptome analysis in the early *Arabidopsis thaliana* embryo. *Development*. **141**: 1-10.

Sreedharan S. P., Kumar A. i Giridhar P. (2018) Primer design and amplification efficiencies are crucial for reliability of quantitative PCR studies of caffeine biosynthetic N-methyltransferases in coffee. *3 Biotech*. **8**: 467-473.

Škiljaica A. (2016) Wheat MATH-BTB proteins and their role in early embryogenesis. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.

Škiljaica A., Lechner E., Jagić M., Majsec K., Malenica N., Genschik P. i Bauer N. (2019) The protein turnover of *Arabidopsis* BPM1 is involved in regulation of fowering time and abiotic stress response. *Plant Molecular Biology*. **102**: 359-372.

Terpstra I. i Heidstra R. (2009) Stem cells: the root of all cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. **20**: 1089-1096.

Tilsner J., Nicolas W., Rosado A. i Bayer E. M. (2016) Staying tight: plasmodesmal membrane contact sites and the control of cell-to-cell connectivity in plants. *Annual Review of Plant Biology*. **67**: 337-364.

- Uchiumi T., Komatsu S., Koshihara T. i Okamoto T. (2006) Isolation of gametes and central cells from *Oryza sativa* L. *Sexual Plant Reproduction*. **19**: 37-45.
- Udvardi M. K., Czechowski T., Scheible W. R. (2008) Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*. **20**: 1736-1737.
- Ueda M., Zhang Z. i Laux T. (2011) Transcriptional activation of *Arabidopsis* axis patterning genes *WOX8/9* links zygote polarity to embryo development. *Developmental Cell*. **20**: 264-270.
- Venglat P., Xiang D., Yang H., Wan L., Tibiche C., Ross A., Wang E., Selvaraj G., i Datla R. (2013) Gene expression profiles during embryo development in *Brassica napus*. *Plant Breeding*. **132**: 514-522.
- Weber H., Bernhardt A., Dieterle M., Hano P., Mutlu A., Estelle M., Genschik P. i Hellmann H. (2005) Arabidopsis AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiology*. **137**: 83-93.
- Weber H. i Hellmann H. (2009) *Arabidopsis thaliana* BTB/POZ-MATH proteins interact with members of the ERF/AP2 transcription factor family. *The FEBS Journal*. **276**: 6624-6635.
- Xiang D., Venglat P., Tibiche C., Yang H., Risseuw E., Cao Y., Babic V., Cloutier M., Keller W., Wang E., Selvaraj G. i Datla R. (2011) Genome-wide analysis reveals gene expression and metabolic network dynamics during embryo development in *Arabidopsis*^{[W][OA]}. *Plant Physiology*. **156**: 346-356.
- Xu B. (2013) Characterization of a novel calcium sensor in *Arabidopsis thaliana*. Doktorski rad, Sveučilište u Adelaideu, Fakultet znanosti.
- Yadegari R. i Drews G. N. (2004) Female gametophyte development. *The Plant Cell*. **16**: 133-141.
- Ying-Hsia C., Heather H., Ranran Z., Zhenying G. i Ricardo V. L. (2019) In situ hybridization: Introduction to techniques, applications and pitfalls in the performance and interpretation of assays. *Seminars in Diagnostic Pathology*. **36**: 336-341.
- Xu B., Cheval C., Laohavisit A., Hocking B., Chiasson D., Olsson T. S. G., Shirasu K., Faulkner C. i Gilliham M. (2017) A calmodulin-like protein regulates plasmodesmal closure during bacterial immune responses. *New Phytologist*. **215**: 77-84.

Yeung E. C. i Meinke D. W. (1993) Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor. *The Plant Cell*. **5**: 1371-1381.

Yu X., Luo A. i Sun M. (2016) An efficient antipodal cell isolation method for screening of cell type-specific genes in *Arabidopsis thaliana*. *PloS One*, **11**, 10.1371/journal.pone.0166390.

Zhang S., Thakare D. i Yadegari R. (2018) Laser-capture microdissection of maize kernel compartments for RNA-seq-based expression analysis. U: Lagrimini L. M. (ur.), *Maize: Methods and Protocols*. New York, Springer, str. 153-163.

Zhao P., Zhou X., Shen K., Liu Z., Cheng T., Liu D., Cheng Y., Peng X. i Sun M. (2019) Two-step maternal-to-zygotic transition with two-phase parental genome contributions. *Developmental Cell*. **49**: 882-893.

Zhong H., Elumalai S., Nalapalli S., Richbourg L., Prairie A., Bradley D., Dong S., Su X. J., Gu W., Strebe T., Shi L. i Que Q. (2018) Advances in agrobacterium-mediated maize transformation. *Methods in Molecular Biology*. **1676**: 41-59.

Zhong X., Hale C. J., Law J. A., Johnson L. M., Feng S., Tu A. i Jacobsen S. E. (2012) DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. *Nature Structural & Molecular Biology*. **19**: 870-875.

Zhou J. J. i Luo J. (2018) The PIN-FORMED auxin efflux carriers in plants. *International Journal of Molecular Sciences*. **19**: 2759-2780.

Zhou X., Shi C., Zhao P. i Sun M. (2019) Isolation of living apical and basal cell lineages of early proembryos for transcriptome analysis. *Plant Reproduction*. **32**: 105-111.

<https://serc.carleton.edu/details/images/9022.html> (pristupljeno 06.02.2021.)

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012995_GeneRuler_100bp_DNALadder_50ug_UG.pdf (pristupljeno 20.10.2020.)

https://www.sutter.com/manuals/P-30_OpMan.pdf (pristupljeno 28.10.2020.)

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/DynabeadmRNADIRECTMicro_UG_Rev004_20120514.pdf (pristupljeno 15.11.2020.)

<http://www.vhir.org/portal1/images/content/Quality%20assessment%20of%20total%20RNA.pdf> (pristupljeno 09.01.2021.)

<http://www.controltecnica.com/bio/wp-content/uploads/2016/03/NanoDrop-8000-Pureza-de-Acidos-Nucleicos.pdf> (pristupljeno 10.01.2021.)

<https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/methods-of-rna-quality-assessment/> (pristupljeno 18.01.2021.)

<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf> (pristupljeno 20.01.2021.)

https://genomique.irc.ca/resources/files/How_to_deal_with_qPCR_results.pdf (pristupljeno 21.01.2021.)

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1997. godine u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu Nikole Tesle i XI. gimnaziju. 2015. godine upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, nakon kojeg sam obrazovanje nastavila na diplomskom studiju molekularne biologije na istom fakultetu. Dobitnica sam stipendije Grada Zagreba za izvrsnost za učenike srednjih škola i za studente na preddiplomskom i diplomskom studiju. Tijekom studija sam odradila nekoliko praksi u različitim laboratorijima Instituta Ruđer Bošković i Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu koje su uključivale različite metode molekularne i stanične biologije. Također, praktično iskustvo proširila sam na terenskoj nastavi iz botanike i zoologije te odrađivanjem demonstratura na kolegiju Zoologija. 2016. godine sudjelovala sam u provedbi kongresa „Central European Genome Stability and Dynamics Meeting“, a 2017. i 2018. godine sudjelovala sam u organizaciji i provedbi edukativnog projekta „Noć biologije“ čiji je cilj popularizacija znanosti. 2017. i 2019. godine aktivno sam sudjelovala na javnim seminarima „BioStudologije“ koji su uključivali interaktivni pristup učenicima srednjih škola. Višegodišnje iskustvo rada s učenicima osnovnih i srednjih škola stekla sam držeći instrukcije iz matematike, kemije i fizike.