CENH3-ovisna indukcija haploidnosti kod biljaka i njezina primjena

Šijanski, Filip

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:603992

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

CENH3-OVISNA INDUKCIJA HAPLOIDNOSTI KOD BILJAKA I NJEZINA PRIMJENA

CENH3-DEPENDENT INDUCTION OF HAPLOIDITY IN PLANTS AND ITS APPLICATION

SEMINARSKI RAD

Filip Šijanski:

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate study of Molecular Biology)

Mentor: dr.sc. Nenad Malenica

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD.....2
1.1. SPONTANO NASTALI HAPLOIDI.....2
1.2. INDUCIRANJE HAPLOIDNOSTI HIBRIDIZACIJOM.....4
1.3. *IN VITRO* METODE DOBIVANJA HAPLOIDA.....5
1.4. DOBIVANJE HAPLOIDA MUTAGENEZOM.....5
2. *CENH3*-OVISNA INDUKCIJA HAPLOIDA.....5
2.1. INDUKCIJA HAPLOIDA *GFP-TS* TRANSGENOM.....5
2.2. INDUKCIJA HAPLOIDA PRIRODNIM VARIJANTAMA *CENH3*.....10
2.3. INDUKCIJA HAPLOIDA TOČKASTIM MUTACIJAMA U *CENH3*.....14
3. PRIMJENA TEHNOLOGIJE INDUKCIJE HAPLOIDA.....18
3.1. DOBIVANJE KLONOVA SPLONIM RAZMNOŽAVANJEM.....18
3.2. *REVERSE BREEDING*.....19
3.3. UDVOSTRUČENI HAPLOIDI ZA QTL MAPIRANJE.....20
4. LITERATURA.....21
5. SAŽETAK.....22
6. SUMMARY.....23

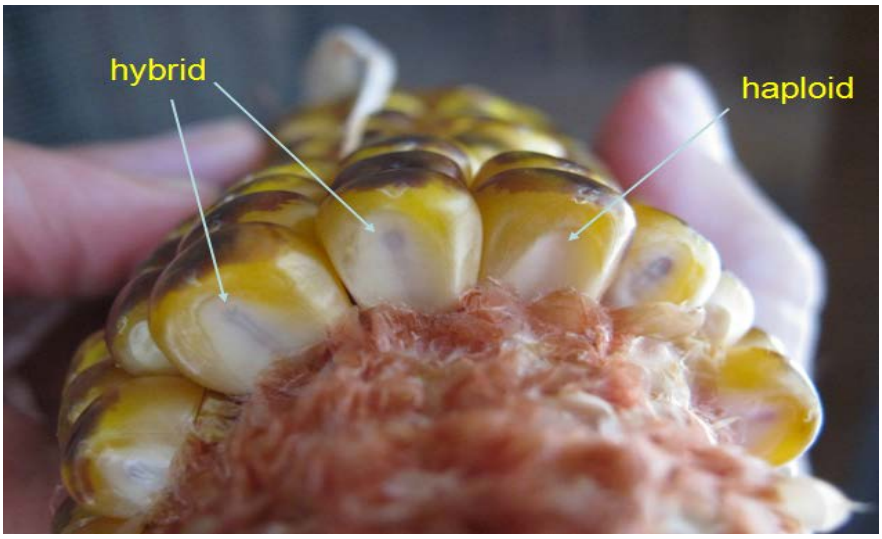
1. UVOD

Pojam haploid se kod biljaka koristi za opis odraslih jedinki (sporofita) čije somatske stanice sadrže isti broj kromosoma kao i gamete iste vrste. U prirodi se haploidne biljke mogu pojaviti spontano ili se mogu dobiti *in vivo* tehnikama poput modificiranog oprašivanja (intra-specifično i interspecifično križanje; križanje polenom biljke tretirane radioaktivnim zračenjem i sl.) ili *in vitro* kulturom nezrelih muških i ženskih gametofita. Haploidi viših biljaka se od diploida mogu razlikovati na nekoliko načina: morfološki, pri čemu su haploidi veličinom manji od diploida (volumen biljne stanice proporcionalan je njezinoj ploidnosti); nekim metaboličkim karakteristikama poput manje koncentracije šećera i ulja u sjemenkama; detekcijom na temelju dimenzija plastida, mjerenjem količine DNA protočnim citometrom te korištenjem genetičkih markera s bojom poput anotcijanskog markera za kukuruz (*Zea mays*) (Dunwell, 2010). Haploidne biljke nalaze primjenu u vrlo širokom opsegu u mnogim aspektima botanike i genetike zbog čega su brzina i efikasnost njihove produkcije od iznimne važnosti za znanstvena istraživanja, poljoprivredu i napredak ostalih djelatnosti koje ih koriste. Neke od primjena su korištenje haploida u hortikulturi kao raznih kultivara npr. pelargonije, kao bioloških alata u istraživanju zbog njihove pogodnosti za citogenetička istraživanja, zbog pogodnosti za transformaciju te zbog lakoće kojom kod njih možemo izolirati mutante s recesivnim svojstvima koja kod diploidnih heterozigotnih jedinki mogu biti prikrivena odnosno neispoljena zbog prisutnosti dominatnih alela za ta svojstva. Od iznimne vrijednosti je naravno primjena haploida u dobivanju čistih linija biljaka. Nime, jednostavnom duplikacijom kromosoma haploidnih jedinki u samo jednoj generaciji možemo dobiti diploidne jedinke homozigotne za sva svojstava (100%-tna homozigotnost na svim lokusima) koja su vrijedan alat za križanja u mnogim granama biologije i agrikulturi. Za razliku od toga konvencionalne tehnike samooprašivanja zahtjevaju velik broj uzastopnih postupaka samooplodnje F2 generacije (9-10 generacija) nakon čega opet rezultiraju potomstvom koje nije u potpunosti homozigotno za sva svojstva. Zbog toga je način dobivanja čistih linija preko haploida puno efikasniji, jeftiniji i brži (Dunwell, 2010).

1.1. Spontano nastali haploidi

Prva spontano nastala haploidna angiosperma koja je otkrivena 1920. godine bila je patuljasta forma pamuka. Otada su znanstvenici počeli istraživati fenomen spontane indukcije haploida kod mnogih biljnih vrsta. Npr. otkrili su kako bi geni *ig1* kod kukuruza (*Zea mays*) i

hap kod ječma (*Hordeum vulgare*) koji su eksprimirani u gametofitima tih biljaka mogli igrati ulogu pri sprečavanju fertilizacije jajne i spermalne stanice pri čemu bi došlo do pojave haploida ili s majčinim ili s očevim setom kromosoma (Pollacsek, 1992). Također, kod kukuruza treba napomenuti da indukcija haploida ovisi o više gena. Naime, u nekoliko istraživanja gdje se ispitivala efikasnost indukcije ženskih haploidnih jedinki otkrilo se da indukcija ženskih haploidnih biljaka izrazito ovisi o genotipu ženskih jedinki korištenih u križanjima. Linije kukuruza koje su korištene kao induktori u tim istraživanjima bile su: RWS, ruski sintetski KMS, francuski WS14, UH400 i Stock6. Marker gen za identifikaciju haploida u tim istraživanjima bio je dominantni gen *R1-nj*, antocijanski fenotipski marker za ljubičastu boju. Križanjem ženskih biljaka različitih genotipova polenom biljaka induktora (homozigotnih za marker *R1-nj*) dobiveno je žensko haploidno potomstvo koje je naslijedilo genom samo majčinske biljke. Haploidno potomstvo razlikovalo se od diploidnog po tome što haploidne sjemenke nisu imale ljubičastu pigmentaciju embrija već samo ljubičastu pigmentaciju endosperma, dok su diploidne sjemenke imale ljubičasto pigmentiran i embrij i endosperm (Sl. 1.; Röber i sur., 2005). U početku je postojala pretpostavka da je kod biljaka induktora haploidnosti funkcionalna samo jedna, od inače dvije spermalne stanice zbog čega ne dolazi do oplodnje jajne stanice, već samo središnje 2n jezgre embrionske vreće. Međutim, zbog pojave ženskih haploida kod samo određenih genotipova majčinskih biljaka, zaključilo se da postoje ili određeni geni inhibitori fertilizacije eksprimirani u jajnoj stanici koji sprečavaju njeno spajanje s jednom od spermalnih stanica te potiču razvoj neoplođene jajne stanice ili određeni postzigotski mehanizmi eliminacije očinskog seta kromosoma (Eder & Chalyk, 2002).



Slika 1. Identifikacija haploidnih sjemenki kukuruza po obojanosti embrija i endosperma (http://www.plantbreeding.iastate.edu/DHF/Service.asp)

Novija istraživanja čak ukazuju na to daje fenomen indukcije haploida kod kukuruza poligensko svojstvo. Drugi interesantan proces je fakultativna apomiksija gdje prilikom ulaska spermalne stanice u embrionsku vreću ne dolazi do spajanja jajne i spermalne stanice, već se obje počinju dijeliti i stvarati kimernu haploidnu biljku kod koje neke stanice imaju majčinski set kromosoma, a neke očinski set.

1.2. Induciranje haploidnosti hibridizacijom

Zatim se započelo s pokušajima kontrolirane indukcije haploida. Jedna od metoda bila je intra-specifično križanje (križanje diplodne i triploidne jedinke, ili diploidne i tetralpoidne jedinke kod npr. šećerne repe) ili inter-specifičnoo križanje (križanje srodnih, ali različitih vrsta biljka npr. križanje dvije vrste ječma *H. vulgare* i *H. bulbosum*). Navedene hibridizacije dala su mali postotak haploidnih potomaka. Također, jedna od korištenih metoda indukcije haploidnih biljaka bila je tretiranje polena radijacijom ili toplinom. U malom postotku dolazilo bi do eliminacije muškog seta kromosoma nakon oplodnje i dobivanja haploida s majčinskim setom kromosoma. I kod metode hibridizacije, kao i pri križanju s ozračenim/zagrijavanim polenom primjećeno je da indukcija haploida ovisi i o genetičkim, a ne samo o eksperimentalnim čimbenicima kao npr. o intenzitetu svijetlosti tijekom ranog embrionalnog razvoja tj. nakon oplodnje.

1.3. *In vitro* metode dobivanja haploida

Nadalje, znanstvenici su za indukciju haploida koristili i *in vitro*- metode koje su uključivale kulturu antera i mikrospora te kulturu sjemenih zametaka. Cilj kulture mikrospora bio je potaknuti mikrosporu na stvaranje haploidnog kalusa koji bi se kasnije usmjerio u razvoj odrasle haploidne biljke. Prilikom same kulture težilo se spriječavanju prve inekvalne diobe mikrospore na malu generativnu i veliku vegetativnu stanicu, nego se htjela postići ekvalna prva dioba. Nadalje, stresni čimbenici poput ograničenog fotoperioda, intenziteta svijetla, atmosfere, kritične temperature, koncentracije dušika i sl. primjenjeni za vrijeme pretretmana mikrospora, pokazali su se efikasnim u induciranju kalusa. To se povezalo sa ekspresijom obrambenih *defence* gena za abiotički stres za koje se smatralo da usmjeravaju razvoj mikrospore prema stvaranja kalusa. Slično je bilo i kod kulture sjemenih zametaka. Ipak, kod obje kulture je postotak formiranih kalusa koji su rezultirali somatskom embriogenezom bio malen (Dunwell, 2010).

1.4. Dobivanje haploida mutagenezom

Najnovija strategija indukcije haploida je metoda dobivanja haploida križanjem mutanata za centromerni histon CENH3 s jedinkama divljeg tipa. Naime, CENH3 protein je važan jer ostvaruje interakciju s centromernom DNA s jedne strane i kinetohorima i mikrotubulima diobenog vretena s druge strane čime osigurava pravilnu segregaciju kromosoma za vrijeme diobe stanice. Strategija ovakve indukcije haploida temelji se na uvođenju određenih mutacija u *CENH3* lokus. Biraju se oni *CENH3* mutanti koji ostanu vijabilni i imaju pravilnu mitozu i mejozu, ali kod kojih prilikom križanja s divljim tipom dolazi do eliminacije cjelokupnog kromosomskog seta. Na taj način haploidni potomci zadržavaju, kromosomski set roditelja divljeg tipa (Chan, 2010).

2. *CENH3*-OVISNA INDUKCIJA HAPLOIDA

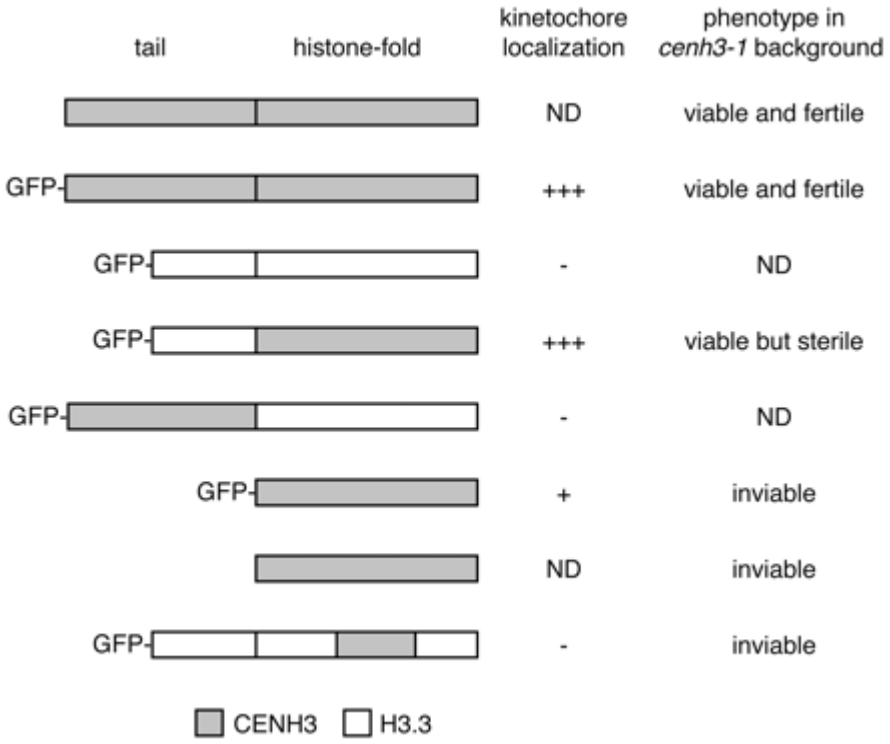
2.1. INDUKCIJA HAPLOIDA *GFP-TS* TRANSGENOM

Centromerna regija DNA ima presudnu ulogu u pravilnoj segregaciji kromosoma tijekom mitoze i mejoze jer ostvaruje interakcije s kinetohornim proteinima a preko njih s mikrotubulima diobenog vretena. Unatoč značajnoj razlici u centromernim DNA slijedovima

između eukariota, sve vrste na tim sekvencama imaju vezanu centromerno-specifičnu varijantu konvencionalnog histona H3, CENH3 (*centromeric histone H3*), koji se nalazi u sastavu centromernih nukleosoma. Iako konvecionalni histoni spadaju među najkonzerviranije (evolucijski najmanje promijenjene) proteine eukariota, kod CENH3 to nije slučaj. Nime, on brzo evoluira tj. značajno se razlikuje od vrste do vrste u slijedu aminokiselina. To se dovodi u vezu sa različitim centromernim sekvencama za koje se veže pa se govori o ko-evoluciji centromernih DNA slijedova i CENH3 proteina (Heinkoff i sur., 2001). Općenito CENH3 se sastoji od dvije regije: C-terminalne domene (tzv. *histone-fold* domena ili HFD) i N-terminalne domene (tzv. N-terminalni rep). C-terminalna regija je konzerviranija i za nju je pokazano da ostvaruje interakciju s centromernom DNA i kinetohornim proteinima, dok je N-terminalni rep hipervarijabilna regija koja je različita i između vrlo srodnih vrsta. Rep se nalazi na površini centromernog nukleosoma i supstrat je za kovalentne modifikacije histona (metilaciju, acetilaciju i dr. epigenetičke oznake).

Do povezanosti CENH3 lokusa s pojavom haploidnosti došlo je savim slučajno. Iz istraživanja na animalnim sistemima pretpostavilo se da će i kod biljaka CENH3 protein biti esencijalan čija bi nul-mutacija (potpuna funkcionalna inaktivacija) bila letalna. U tu svrhu je identificiran i izoliran *cenh3-1* mutant iz tetraploidnih biljaka *A. thaliana* mutiranih kemijskom mutagenezom. *Cenh3-1* mutant je izoliran upravo iz tetraploidnih biljaka zbog toga što su gametofiti tetraploidnih biljaka diploidi te bi stoga eventualno letalna gametofitska mutacija mogla biti komplementirana alelom divljeg tipa. *Cenh3-1* mutacija je tranzicija baze G→A na poziciji 161. nukleotida od mjesta početka translacije (**A**TG = +**1**). Kako je taj G važan element za izrezivanje drugog introna dolazi do nepravilnog prekrajanja transkripta i nastajanja krnjeg proteina od 46 aminokiselina, za razliku od proteina divljeg tipa dugačkog 178 aminokiselina. Budući da C-terminalna domena (HFD) CENH3, ključna za lokalizaciju centromera i funkciju kinetohora, počinje tek s 82. aminokiselinom smatra se da je *cenh3-1* nul mutacija. Slijedilo je križanje tetraploida s diploidom divljeg tipa te dobivanje triploda s *cenh3-1* mutacijom. Nadalje, takav triploid križan je s diploidom divljeg tipa što je, u određenom postotku, dalo diploidno potomstvo heterozigotno za *cenh3-1* alel. Takav ishod je indicirao da i ženski i muški gametofit mogu funkcionirati bez *CENH3* gena divljeg tipa obzirom da se je morao naslijediti haploidnom gametom kako bi završio u diploidnom potomku. Heterozigoti za *cenh3-1* fenotipski se nisu razlikovali od jedinki divljeg tipa, no prilikom samooplodnje i analize potomstva 1/4 sjemenki nije klijalo, dok se za 1/4 sjemenki pokazalo da su homozigoti (*CENH3/CENH3)*, a za 2/4 da su heterozigoti (*cenh3-1/CENH3)*. Daljnjom analizom same embriogeneze utvrđeno je da se *cenh3-1/cenh3-1* embriji razvijaju

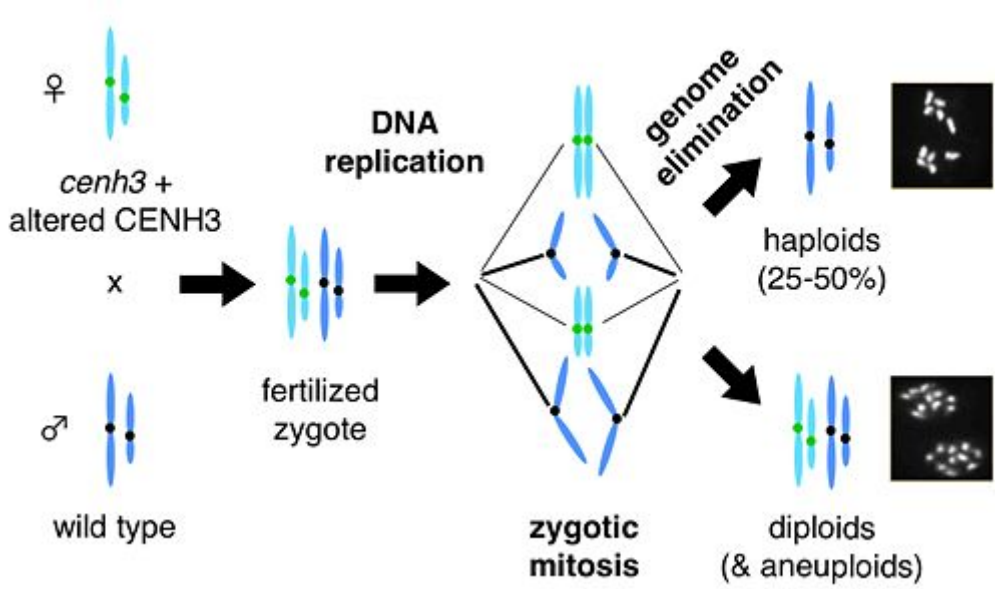
do srednje globularnog stadija i nakon toga odumiru. To je objašnjeno prisustvom naslijeđene početne količine majčinih *CENH3* mRNA u citoplazmi jajne stanice. Potom je ispitano koje bi modificirane varijante CENH3 dodane u *cenh3-1/CENH3* heterozigota mogle komplementirati *cenh3-1/cenh3-1* homozigotno potomstvo. Transgeni su na N-terminlanom kraju sadržavali GFP, zeleni fluorescentni protein, u svrhu detekcije interakcije CENH3 s centromernom DNA i kinetohornim proteinima. Korištene su sljedeće varijante transgena: GFP-CENH3 (CENH3 N- i C-terminus) , GFP-H3.3 (H3.3 N- i C-terminus), GFP-CENH3-H3.3 I (CENH3 N-terminus i H3.3 C-terminus), GFP-CENH3-H3.3 II (CENH3 C-terminus i H3.3-N-terminus) i GFP-CENH3-H3.3 III (CENH3 nukleotidi 1167-1419 i H3.3. nukleotidi 1-306 i 532-597). Transformirani su heterozigoti za *cenh3-1* jer *cenh3-1/ cenh3-1* jedinke nisu vijabilne. Transformanti narasli na selektivnoj podlozi potom su genotipizirani. Ako je komplementacija transgenom bila uspješna na podlozi su se mogli identificirati vijabilni *cenh3-1/cenh3-1* potomci. Analizom je utvrđeno da su jedino GFP-CENH3 i GFP-CENH3-H3.3 tzv GFP-*tailswap* (CENH3 C-terminus i H3.3 N-terminus), mogli komplementirati letalne *cenh3-1/cenh3-1* homozigote (Sl. 2.). *Cenh3-1/cenh3-1* jedinke komplementirane GFP-CENH3 transgenom fenotipski se nisu razlikovale od jedinki divljeg tipa te su imale funkcionalnu mitozu i mejozu i bile su fertilne. Jedinke komplementirane GFP-*tailswap*-om također su bile vijabilne i imale funkcionalnu mitozu, no imale su manju rozetu listova i kraće internodije u odnosu na jedinke divljeg tipa te su većinom bile muški sterilne. Nadalje, ispitano je da li GFP-CENH3 transgeni iz drugih biljnih vrsta mogu komplementirati letalnu *cenh3-1* mutaciju u *A. thaliana.* Za korištene vrste se pokazalo da je jedino GFP-CENH3 iz vrste *Arabidopsis arenosa* u mogućnosti komplementirati letalnu *cenh3-1* mutaciju *A. thaliana,* dok GFP-CENH3 fuzijski proteini iz vrsta *Brassica rapa i Zea mays* nisu mogli komplementirati letalnu mutaciju iako je bilo vidljivo da stupaju u interakciju s kinetohorama *A. thaliana* što se vidjelo po fluorescentnom signalu GFP-a. S druge strane, GFP-CENH3 proteini čovjeka, *S. cerevisae* i *C.elegans* nisu niti komplementirali letalnu mutaciju niti su davali fluorescentni signal što je ukazivalo na nedostatak interakcije s kinetohorima. Na temelju ovih rezultata zaključeno je da ortologni CENH3 mora biti od bliskog srodnika *A. thaliana* da bi došlo do komplementacije (Ravi i sur., 2010).



Slika 2. Kinetohorna lokalizacija CENH3/H3.3 konstrukata i komplemetacija letalne cenh3-1 mutacije u embriju. ND, nije determinirano; +++, jak GFP fluorescencijski signal na kinetohorima; +, slabiji GFP fluorescencijski signal na kinetohorima; -, nema GFP signala na kinetohorima (Ravi i sur., 2010).

Nadalje, slijedila su ispitivanja efikasnosti dobivenih transgenih biljaka kao induktora haploida. Tako su ženske (emaskulirane) GFP-*tailswap* biljke bile križane s 5 različitih ekotipova divljeg tipa *A. thaliana* (CENH3/CENH3 homozigoti). Pokazalo se da je 25-40% potomstva tog križanja bilo haploidno i svi ti haploidi su imali naslijeđene setove kromosoma isključivo od muških biljaka divljeg tipa. Ostatak potomstva su bili hibridni diploidi i aneuploidi. Isti efekt indukcije haploida se pojavio i pri križanju muških GFP-*tailswap* biljaka s ženskim biljkama divljeg tipa pri čemu je svo haploidno potomstvo naslijedilo setove kromosoma isključivo od majčinske biljke (Sl. 3.) Postotak haploida iz tog križanja bio je nešto manji, 5-10%. Do indukcije haploida također je došlo prilikom križanja ženskih GFP-CENH3 biljaka s muškim biljkama divljeg tipa. Pri tom križanju je kod haploidnog potomstva došlo do potpune eliminacije seta kromosoma majčinske biljke, samo što je postotak haploida u ukupnom potomstvu bio manji, oko 8%. Kod recipročnog križanja nije zamijećena pojava haploidnog potomstva pa prema tomu zaključujemo da je mutantna biljka komplementirana s GFP-*tailswap*-om jači induktor haploidnosti za razliku od mutantne biljke komplementirane s GFP-CENH3. Vrlo je važna činjenica da među potomstvom nakon samooplodnje transgenih

biljaka (GFP-tailswap x GFP-tailswap i GFP-CENH3 x GFP-CENH3) nije došlo do eliminacije nijednog seta kromosoma roditelja i nije bilo haploidnih jedinki. Haploidi *A. thaliana* su morfološki slični diploidima, ali su veličinom manji, imaju manje listove rozete, manje cvjetove i generalno sterilne su. Kako bi se dobile čiste homozigotne linije potrebno je duplicirati haploidni genom. U tu svrhu se može upotijebiti kolhicin koji inhibira formiranje diobenog vretena tijekom mitoze pa somatske stanice nakon normalne duplikacije kromosoma postanu diploidne. Također, duplikacija kromosoma može se dogoditi i spontano u somatskim stanicama haploida, a to se može primjetiti po pojavi diploidnih ogranaka cvatova s fertilnim komuškama pri čemu nakon samooplodnje nastanu diploidne sjemenke iz koijh će niknuti 100%-tni homozigoti . Moguć je i nastanak diploidnih gameta pri nereduktivnoj mejozi koje se u malom postotku sponatano javljaju zbog nepravilne segregacije kromosoma u anafazi I mejoze. Naime, zbog neuravnotežene segregacije kromosoma haploida tijekom anafaze I u malom postotku slučajeva svi kromosomi otputuju na isti pol stanice zbog čega nakon prve mejotske diobe nastanu diploidne gamete koje nakon druge mejotske diobe daju vijabilne haploidne gamete. Kako do nereduktivne mejoze može doći i u muškim i uženskim germinativnim stanicama, nakon samooplodnje određen postotak potomstva bit će diploidni 100%-tni homozigoti. Nadalje pokazalo se da je moguće smanjiti ploidnost poliploida križanjem s induktorom haploida (GFP-*tailswap*). Naime, križanjem tetraploidne linije *A. thaliana* s GFP-*tailswap* biljkom (diploid), u malom postotku vijabilnih potomaka identificirani su diplodi homozigotni za sva svojstva čiji je set kromosoma naslijeđen isključivo od diploidnih gameta tetraploida divljeg tipa. (Chan & Ravi, 2010).



Slika 3. Shematski prikaz križanja *cenh3-1* homozigota s ubačenim konstruktima CENH3 s divljim tipom i genomske eliminacije (http://chan.openwetware.org/Research.html).

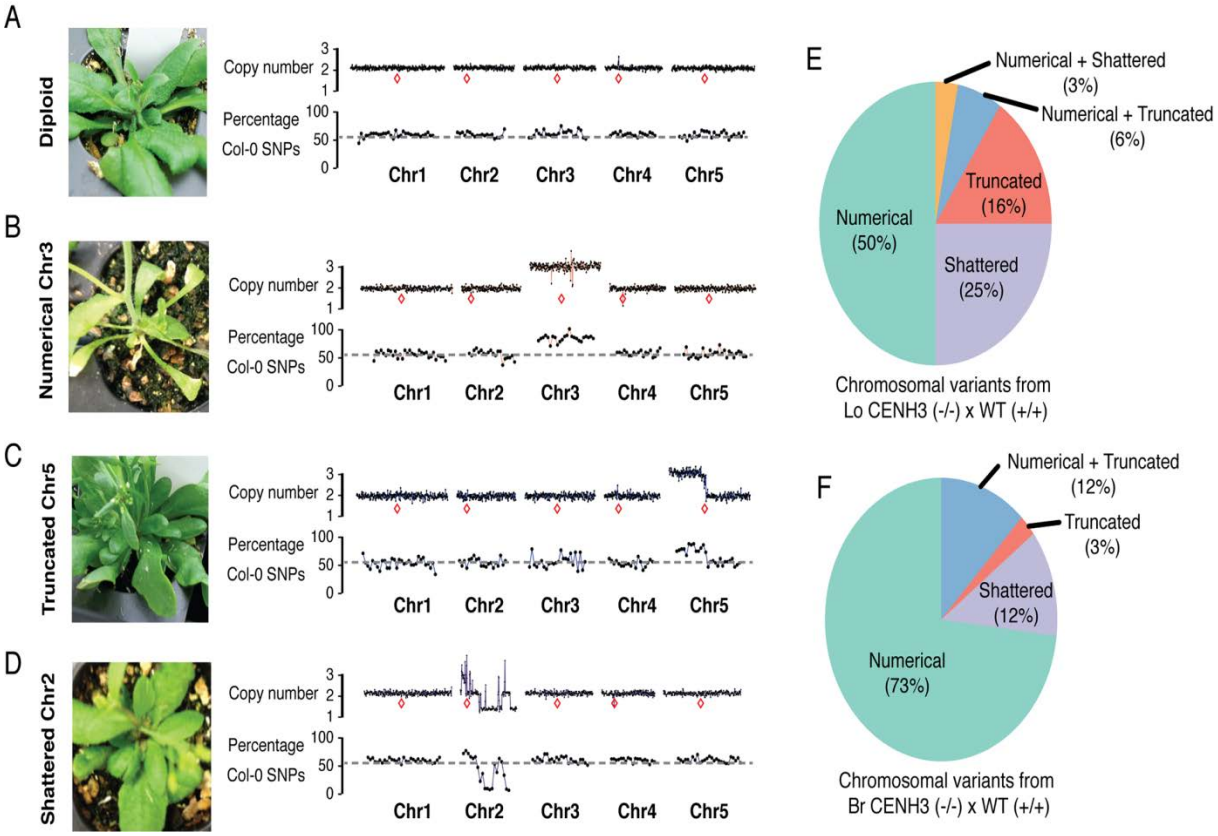
2.2. INDUKCIJA HAPLOIDA PRIRODNIM VARIJANTAMA *CENH3*

U ovom odlomku bit će prikazana i prodiskutirana mogućnost funkcionalne zamjene endogenog CENH3 vrste *A. thaliana* CENH3 proteinima njoj srodnih vrsta. Također, biti će ispitana efikasnost transgeničnih *A. thaliana* komplementiranih *CENH3* genima iz srodnih vrsta kao induktora haploida.

Nakon eksperimenata indukcije haploida s GFP-konstruktima CENH3 postavljeno je pitanje što bi se dogodilo kada bi se za komplementaciju mutiranog endogenog CENH3 *A.thaliana* koristile prirodne varijante CENH3 srodnih vrsta *A. thaliana.* Proučavanjem CENH3 proteina različitih vrsta primjećeno je sljedeće: 1. unatoč raznolikosti sekvenci, esencijalne funkcije CENH3 su očuvane kod velikog broja vrsta; 2. uslijed divergencije CENH3 proteina povećava se genetska nestabilnost i nepravilna segregacija kromosoma u hibridima; 3. divergencija brzo evoluirajućeg N-terminalnog repa CENH3 (NTT) odgovorna je za nepravilnu segregaciju kromosoma i genomsku eliminaciju u hibridnoj zigoti. U ovom istraživanju su za početak odabrani CENH3 proteini iz porodice *Brassicaceae* (u koju spada i *A.thaliana*) za koje se htjelo ispitati da li mogu komplementirati letalnu *cenh3-1* mutaciju. U tu svrhu klonirani su *CENH3* lokusi iz vrsta *Brassica rapa* (*BrCENH3*) i *Lepidium oleraceum* (*LoCENH3*). Zatim je slijedila transformacija *cenh3-1/CENH3* heterozigota *A. thaliana*

plazmidima s *BrCENH3* ili *LoCENH3* genom pod kontrolom endogenog *CENH3* promotora i terminatora *A. thaliana*. Analizom potomtva oba križanja (za *BrCENH3* i za *LoCENH3*) zapažene su vijabilne *cenh3-1/cenh3-1* jedinke što je ukazivalo na uspješnu komplementaciju letalne mutacije s obje varijante CENH3. Fenotipski se komplementirane *cenh3-1/cenh3-1* jedinke nisu razlikovale od jedinki divljeg tipa, mitoza i mejoza su bile očuvane te su jedinke bile fertilne pri samooplodnji. Budući da je u prijašnjim istraživanjima s GFP-konstruktima pokazano da samo vrlo bliski srodnik *A. thaliana*, vrsta *A. arenosa* može komplementirati letalnu *cenh3-1* mutaciju, dok ostale biljke iz porodice *Brassicaceae* to nisu bile u stanju, prema rezultatima ovog istraživanja može se zaključiti kako GFP biljeg interfeira s CENH3 funkcijom i ne daje realnu sliku mogućnosti komplementacije cenh3-1 mutacije prirodnim varijantama CENH3 iz drugih vrsta.

Nadalje, htjela se ispitati efikasnost transgenih *cenh3-1/cenh3-1* biljaka s BrCENH3 i LoCENH3 kao induktora haploida. U tu svrhu su ženske jedinke genotipa *LoCENH3/LoCENH3* i *BrCENH3/BrCENH3* redom oprašivane polenom Ler *gl1-1* (CENH3/CENH3) biljaka. Analizom F1 generacije zapaženo je da 14-47% sjemenki nije proklijalo. Za 2-12% (za LoCENH3) i 1-2% (za BrCENH3) jedinki F1 generacije smatralo se da su haploidi jer su bili su fenotipa Ler *gl1-1* i imali su isključivo naslijeđen kromosomski set muškog roditelja. Kasnijom analizom na protočnom citometru to je i potvrđeno. Ostatak jedinki F1 generacije bili su aneuploidi; 11, 3% (za LoCENH3) i 8,3% (za BrCENH3) te diploidi (Tab. 2.). Morfološki aneuploidi *A. thaliana* razlikovali su se od diploida po abnormalnoj morfologiji listova, nepravilnom grananju bočnih ogranaka, a bile su i sterilne. Nakon fenotipske identifikacije aneuploida u F1 generaciji odabrano je 96 aneuploida (48 iz križanja s LoCENH3 i 48 iz križanja s BrCENH3) za analizu pomoću NGS-a (sekvenciranja nove generacije) te bioinformatičkim metodama pri čemu su otkrivena tri tipa kromosomskih aberacija kod 73 jedinke: 1. brojčana aneuploidija (npr. trisomija kromosoma 3); 2. krnji kromosomi (npr. dodatna kopija jednog dijela kromosoma 5); 3. oštečenje kromosoma koji su izgubili ili dobili neke segmente DNA (Sl. 4.). Pri tom su dodatne kopije nekih kromosoma ili segmenata kromosoma uvijek bile podrijetlom od transgenog roditelja. Iako su aneuploidi većinom bili produkti nepravilne segregacije čitavih kromosoma, dio aneuploida bili su produkt sub-kromosomalnih promjena u broju kopija nekog segmenta što je važan pokazatelj da prilikom ovakvih vrsta križanja može doći do stvaranja novih genetskih kariotipa.



Slika 4. Karakterizacija genotipa aneuploida nastalih križanjem jedinki cenh3-1/cenh3-1 komplementiranih s LoCENH3 ili BrCENH3 s jedinkama divljeg tipa sekvenciranjem cjelokupnog genoma: A) diploid, B) aneuploid (numerički), C) aneuploid (krnji kromosom), D) aneuploid (oštečen kromosom), E) i F) udjeli pojedinih varijanti aneuploida za križanja s jedinkama LoCENH3(-/-) i BrCENH3(-/-) (Maheshwari i sur., 2015).

Budući da su esencijalane funkcije CENH3 proteina sačuvane i kod dvosupnica i kod jednosupnica napravljena je filogenija prema 67 sekvenci C-terminalne regije (HFD) CENH3 proteina iz zelenih algi, paprati, dvosupnica i jednosupnica radi usporedbe sa stvarnim filogenetskim odnosima među odabranim vrstama. Pri tom je zapažena velika podudarnost filogenetskog stabla na temelju HFD sekvenci i stvarnog evolucijskog stabla tih vrsta. Nadalje, htjelo se testirati da li je CENH3 biljaka izvan porodice Brassicaceae u stanju komplementirati letalnu *cenh3-1* mutaciju. U tu svrhu testirani su CENH3 vinove loze (*Vitis vinifera*), kao jedne od najranije nastalih rozida te kukuruza (*Zea mays*), kao jedne široko rasprostranjene jednosupnice. Konstrukti genomskih sekvenci CENH3 vinove loze (*VvCENH3*) i kukuruza (*ZmCENH3*) na identičan su način kao i prethodno *B. rapa* i *L. oleraceum* ubačeni u *cenh3-1* heterozigota *A. thaliana* i testirani za komplementaciju.

Pokazano je da su obje varijante mogle komplementirati letalnu cenh3-1 mutaciju, a *cenh3-1* recesivni homozigoti fenotipski se nisu razlikovali od jedinki divljeg tipa i bili su fertilni prilikom samooplodnje.

Također, u ovom istraživanju htjela se ispitati efikasnost kimernih CENH3 proteina kao induktora haploida te istražiti koja regija CENH3 je presudni faktor za nepravilnu segregaciju kromosoma i genomsku eliminaciju u hibridnoj zigoti. U tu svrhu korišteni su CENH3 od *A. thaliana* (AtCENH3) I CENH3 od *L. oleraceum* (LoCENH3) za izradu sljedećih kimernih proteina: AtNTT-LoHFD i LoNTT-AtHFD (NTT=N-terminalani rep CENH3, HFD=C-terminalna regija CENH3). Ti konstrukti su već opisanim postupkom bili transformirani u *cenh3-1* heterozigota nakon čega je pokazano da uspješno komplementiraju letalnu *cenh3-1* mutaciju. Slijedilo je ispitivanje njihove efikasnosti kao induktora haploida. Ženske biljke s kimernim CENH3 proteinima oprašivane su divljim tipom te se nakon toga gledalo koliki je postotak haploidnog potomstva tih križanja. Kod križanja s jedinkama AtNTT-LoHFD od 554 jedinki F1 generacije nije pronađen nijedan haploid, dok je kod križanja s jedinkama LoNTT-AtHFD od 124 jedinki F1 generacije 2 jedinke su bile haploidi, a 23 jedinke aneuploidi (Tablica 1.).

Tablica 1. Prirodna varijacija CENH3 proteina, pogotovo njegove NTT domene, uzrok je genomske eliminacije (Maheshwari i sur., 2015)

Transgene	T1 family name	% normal seed	Total No. of Plants Analysed	Haploids (%)	Diploids (%)	Aneuploids (%)
GFP-tailswap	11	20 (n = 1187)	606	240 (40)	167 (28)	199 (32)
L. oleraceum CENH3	2	58 (n = 464)	552	18 (3)	480 (87)	54 (10)
	19	53 (n = 167)	133	15 (11)	93 (70)	25 (19)
	21	86 (n = 294)	529	10 (2)	490 (93)	29 (5)
B. rapa CENH3	1	70 (n = 180)	283	5 (2)	243 (86)	35 (12)
	3	65 (n = 200)	246	2 (1)	219 (89)	25 (10)
	9	84 (n = 304)	464	4 (1)	445 (96)	15 (3)
AtNTT-LoHFD	4	83 (n = 138)	38	0 (0)	35 (92)	3 (8)
	8	97 (n = 393)	249	0 (0)	230 (92)	19 (8)
	9	92 (n = 364)	117	0 (0)	113 (97)	4 (3)
	24	97 (n = 385)	150	0 (0)	150 (100)	0 (0)
LoNTT-AtHFD	1	10 (n = 403)	119	2 (2)	94 (79)	23 (19)
	3	0 (n = 236)	0	N. A.	N. A.	N. A.
	6	1 (n = 152)	5	0 (0)	4 (80)	1 (20)
	19	2 (n = 334)	0	N. A.	N. A.	N. A.

doi:10.1371/journal.pgen.1004970.t001

Na temelju tih rezultata zaključilo se da je NTT sekvenca ima kritičnu ulogu pri segregaciji kromosoma i eliminaciji genoma. Također, kimerni LoNTT-AtHFD pokazao je jači učinak nepravilne segregacije kromosoma nego LoCENH3 pa se nagađa je li objašnjenje za ovu pojavu ko-evolucija obaju domena CENH3, zbog čega je funkcija CENH3 proteina narušena, ako domene potječu iz različitih vrsta. Također, rekonstrukcija evolucijske povijesti na temelju NTT sekvenci nije moguća zbog hipervarijabilnosti duljine sekvence (od 23 aminokiseline kod vrste *Pisum sativum* do 194 aminokiseline kod vrste *Brachopodium distachyon*) i aminokiselinskog slijeda sekvence. Ipak, korištenjem MEME programa za identifikaciju kratkih konzerviranih blokova sekvencijske homologije kod NTT sekvenci identificirano je 7 blokova konzerviranih proteinskih sekvenci. Blok 1 i blok 2 identificirani su u skoro svim ispitanim biljkama kao i u histonu H3, a nisu identificirani kod vrste *Homo sapiens.* Zbog toga se došlo do zaključka da je HFD potreban za lokalizaciju centromera zbog čega se strukuralno i funkcionalno slabo mijenja u vremenu, dok NTT brzo evoluira kako bi se prilagodio vrsno-specifičnim razlikama u centromernoj okolini. Blokovi sekvencijske homologije bivaju izgubljeni i budu dobiveni u kontekstu evolucije, a reprezentiraju funkcionalne module važne za interakciju s ostalim asocirajućim proteinima centromere. Na koncu, svaki CENH3 prilagođava se vlastitoj staničnoj odnosno centromernoj okolini. Ipak, ovim istraživanjem demonstrirano je kako vrsno-specifična varijegacija CENH3 može pridonijeti gentskoj varijaciji i reproduktivnoj izolaciji populacija (Maheshwari i sur., 2015).

2.3. INDUKCIJA HAPLOIDA TOČKASTIM MUTACIJAMA U *CENH3*

Daljnja istraživanja proučavala su mogućnost indukcije haploidnih biljaka korištenjem jedinki s točkastim mutacijama u *CENH3*. Takav proces dobivanja haploida bio bi znatno brži jer ne zahtijeva ni *knock-out* (funkcionalnu inaktivaciju) endogenog *CENH3* lokusa niti konstrukciju *GFP-tailswap* konstrukta, genetsku modifikaciju za koju je ponekad skupo i teško dobiti autorizaciju za puštanje na tržište. Razlog tome je činjenica što je GFP animalnog prijekla i potječe iz jedne vrste meduze, Drugo, autorizacija za stavljanje na tržište za skupe klasične transgeničene biljke je skupo. S druge strane, biljka s točkastom mutacijom u vlastitom genu se u pravilu ne bi trebala tretirati drugačije od biljke dobivene konvencionalnom mutagenezom.

Testirane su točkaste mutacije unutar *CENH3* lokusa, točnije negove C-terminalne regije (HFD) s ciljem da rezultiraju promjenom jedne aminokiseline unutar ove konzervirane

regije CENH3. Željelo se ispitati da li takav promijenjeni CENH3 mogao uzrokovati eliminaciju kromosoma mutirane biljke pri križanju s biljkom divljeg tipa. U vrstama *Arabidopsis thaliana, Brassica rapa, Solanum lycopersicum* i *Zea mays* identificirano je 47 potencijalnih mutacija u 30 konzerviranih aminokiselina unutar HFD (*histone-fold* domena) regije. Nadalje, konstrukti s točkastim mutacijama transformacijom su ubačeni u *CENH3/cenh3-1* heterozigote i analizirana je njihova sposobnost komplementacije letalne *cenh3-1* mutacije. Utvrđeno je da su svi T1 potomci *cenh3-1/cenh3-1* genotipa bili vijabilni, da su imali funkcionalnu mitozu i mejozu i da se fenotipski nisu razlikovali od jedinki divljeg tipa što je ukazivalo na uspješnu komplementaciju dodanim transgenima. Slijedilo je ispitivanje efikasnosti tih transgeničnih biljaka kao induktora haploida na način da su križane s „indikator″ jedinkama Ler *gl1-1* genotipa koje su bile homozigoti za recesivne alele *er (erecta)* i *gl1 (glabrous1)*. Križanje *cenh3-1* jedinki (koimplementiranih s divljim tipom CENH3) s jedinkama Ler *gl1-1* genotipa očekivano je rezultiralo diploidnim potomcima divljeg tipa, prema tome su svi potomci naslijedili potpune setove kromosoma oba roditelja. Potom su ženske transgenične biljke s točkastim mutacijama u CENH3 bile su oprašivane polenom Ler *gl1-1* biljaka. Ustanovljeno je da su biljke s mutacijama P82S, G83E, A132T i A136T dobri induktori haploida jer su među potomstvom tih križanja fenotipski identificirane jedinke koje su imale eksprimirane recesivne *er* (izrazito uspravan rast) i *gl1* (potpuni nedostatak dlaka/trihoma) i bile su sterilne. To je i potvrđeno kasnijom analizom na protočnom citometru. Također, biljka iz TILLING populacije s točkastom mutacijom A86V je nakon križanja s *Ler gl-1* „indikatorom“ davala haploide (Tablica 2.). Za napomenuti je da su svi identificirani haploidi naslijedili set kromosoma isključivo od očinske biljke Ler *gl1-1*, odnosno da je došlo do eliminacije majčinskog seta kromosoma tj. biljaka s točkastim mutacijama u CENH3. Biljke s mutacijama P102S i G173E nisu inducirale stvaranje haploidnih biljaka. Pri usporedbi mutiranih CENH3 korištenih u opisanom istraživanju s čovječjim CENH3 (CENP-A) predložen je zaključak da se kod mutacija P82S, G83E, A86V može vidjeti važnost te regije koja je blizu N-terminalnog repa u interakciji s DNA molekulom, dok se kod mutacija A132T i A136T može vidjeti važnost te regije kod pakiranja CENH3 u nukleosom (Kuppu i sur., 2015).

Tablica 2. Frekvencija induciranih haploida i postotak neproklijalih sjemenki transgeničnih i TILLING linija korištenih u istraživanju (Kuppu i sur., 2015).

Line	Codon change	Amino acid change	Aborted seeds (%)	Haploids/Total progeny (%)
WT-HFD#1	No change	No change	0	0/199 (0)
WT-HFD#10	No change	No change	0	0/243 (0)
WT-HFD#15	No change	No change	0	0/163 (0)
M1#6	CCA→ TCA	P82S	15	8/334 (2.4)
M1#8	CCA→TCA	P82S	21	2/72 (2.7)
M1#11	CCA→TCA	P82S	20	11/435 (2.5)
M4#16	GGA→GAG	G83E	36	20/164 (12.2)
M4#18	GGA→GAG	G83E	28	18/197 (9.1)
M10#6	CCG→TCC	P102S	10	0/203 (0)
M10#19	CCG→TCC	P102S	0	0/115 (0)
M21#2	GCT→ ACG	A132T	4	3/475(0.63)
M21#2	GCT→ ACG	A132T	10	1/163(0.61)
M26#4	GCA→ACA	A136T	24	7/309 (2.26)
M47#15	GGA→GAA	G173E	0	0/207 (0)
TILLING	GCT →GTT	A86V	32	3/110 (2.72)
M7 # 3	GCT →GTT	A86V	33	9/232 (3.87)

Crosses using transgenic *cenh3-1* -/- plants carrying WT-HFD or *CENH3* point mutants (independently derived lines indicated by #) as well as a TILLING point mutant were assessed. The crosses featuring P82S, G83E, A132T, A136T, A86V (transgenic and TILLING) point mutations led to uniparental (maternal) genome elimination, producing paternal haploids. Lines derived from WT, P102S, and G173E did not produce haploids when crossed, at the scale investigated here (> 0.5% haploids).

doi:10.1371/journal.pgen.1005494.t001

U još jednom istraživanju korišene su biljke s mutacijama u *CENH3* dobivenih iz TILLING populacija vrsta *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare* (ječam) i *Beta vulgaris* (šećerna repa). TILLING je kolekcija mutanata dobivenih kemijskom mutagenezom gdje svaka jedinka ima velik broj točkastih mutacija i omogućuje nam da iz kolekcije otkrijemo one biljke koje imaju točkaste mutacije u željenom genu.Tako je kod ječma, koji ima dvije funcionalne varijante CENH3: α-CENH3 i ß-CENH3, bojanjem centromera imunokemijskim metodama s CENH3 specifičnim antitijelom otkriven signal kod 24 TILLING mutanata, a samo kod jednog mutanta nije došlo do pojave ß-CENH3 signala. To je bio mutant s mutacijom L92F unutar ß-CENH3. Taj mutant je bio vijabilan i imao je funkcionalnu mitozu i mejozu, no imao je defekt vezanja ß-CENH3 na centromeru pa je zbog toga ispitana njegova mogućnost indukcije haploida pri križanju s divljim tipom. Međutim, križanjem navedenog mutanta bilo kao muške bilo kao ženske biljke s biljkom divljeg tipa nije došlo do pojave haploida među potomstvom. Ipak, pronađeni su analogni mutanti kod *A. thaliana* (L130I i L130F) i šećerne repe (L106I i L106F). Kod njih je također bojanjem imunokemijskim metodama pokazan slab signal koji je upućivao na slabo vezanje mutiranog CENH3 na centromeru. Kod obje vrste mutacija zamjena leucina fenilalaninom pokazale su jači efekt jer su dale slabiji signal pri bojanju imunokemijskim metodama pa je mutant *A. thaliana* s

mutacijom L130F uzet kao kandidat za indukciju haploida. Prvo je konstukt CENH3 s mutacijom L130F transformacijom ubačen u *cenh3-1* heterozigota i htjelo se utvrditi je li mutirani CENH3 u mogućnosti komplementirati letalnu mutaciju u *cenh3-1* homozigotima. Nakon što se kod potomaka samooplodnje potvrdilo da je u mogućnosti komplementirati letalnu mutaciju, ženska komplementirana biljka (*cenh3-1* homozigot komplementiran s točkastom *CENH3* mutacijom) oprašivana je divljim tipom pri čemu je dobiveno 4,8% haploida s naslijeđenim setom kromosoma isključivo od očinske biljke, dok su ostali potomci bili diploidi i aneuploidi. Recipročno križanje nije rezultiralo haploidnim potomstvom. Pri samooplodnji *cenh3-1* homozigota komplementiranih mutantnim CENH3, nije došlo do indukcije haploida, već je križanje većinom rezultiralo vijabilnim diploidnim potomstvom koje je imalo funkcionalnu mitozu i mejozu. Western blot analizom se htjelo vidjeti da li efikasnost indukcije haploida korelira s ukupnom količinom CENH3 i pokazalo se da je koncentracija CENH3 kod mutanata s mutacijom L130F u CENH3 bila manja od koncentracije CENH3 kod biljki divljeg tipa za što je mogući uzrok ili povećana razgradnja modificiranih CENH3 od strane proteasoma ili smanjen nuklearni transport modificiranog CENH3 (Karymi-Ashtyani i sur., 2015).

Jedan od modela tumači da prilikom ranog embrionalnog razvoja do 16-staničnog stadija dolazi do nejednako brzog vezanja CENH3 proteina na centromere roditelja mutanta i roditelja divljeg tipa zbog čega u određenom trenutku kromosomi roditelja mutanta imaju manje (modificiranih) CENH3 proteina vezanih na svoje centromere za razliku od kromosoma roditelja divljeg tipa, što može biti signal označavanja kromosoma mutanta za degradaciju (Karymi-Ashtyani i sur., 2015). Još malo detaljnije pojašnjenje pojave eliminacije jednog seta kromosoma u hibridnoj zigoti dano je proučavanjem interspecifičnog križanja dvije vrste ječma: *Hordeum vulgare* i *Hordeum bulbosum.* Pri križanju ove dvije vrste može u manjoj mjeri doći do indukcije haploidnih jedinki *H. vulgare,* ako polen potječe od *H. bulbosum.* Također je otkriveno da eliminacija kromosoma *H. bulbosum* ovisi o temperaturi okoliša, točnije češće se događa pri višim temperaturama. Jedna pretpostavka je da su kromosomi *H. vulgare* kondenziraniji od kromosoma *H. bulbosum* zbog čega uslijed asinkrone replikacije parentalnih kromosoma postoji razlika u efikasnosti vezanja CENH3-a (bolje se vežu na kondeziranije kromosome). To bi indiciralo da je vrijeme vezanja CENH3-a i prelazak u sljedeću fazu staničnog ciklusa vrlo kratko. Druga hipoteza govori da se CENH3 iz *H. vulgare* može vezati na centromere *H. bulbosum* i ima dominantno negativni efekt na vezanje CENH3 *H. bulbosum* na centromere. Nedostatak podataka o svim mogućim interakcijama CENH3 s centromernom DNA ječma ne govori u prilog ovoj hipotezi kao ni

činjenica da obje varijante CENH3 mogu uspješno koegzistirati u hibridnom embriju na nižim temperaturama. Opaženi primjeri vezanja CENH3 na regije DNA koje nisu centromere i uspješna koegzistencija CENH3 kineskog kupusa i kukuruza u prisutnosti divljeg CENH3 *A. thaliana* u hibridnoj zigoti također nisu u skladu s drugom pretpostavkom. Buduća istraživanja na ovom polju bi trebala uključiti i detaljniji opis funkcija histonskih šaperona koji omogućuju usmjeravanje i prijenos CENH3 molekula do centromerne DNA te na koji način promjene u strukturi CENH3 mogu utjecati na interakcije histonskih šaperona i CENH3 i njihovu ulogu u eliminaciji pojedinog seta kromosoma u hibridnom embriju (Chan, 2011).

3. PRIMJERI PRIMJENE TEHNOLOGIJE

Ovdje ću nabrojati i ukratko opisati neke tehnologije i metode u botanici, genetici i njihovim primjenjenim djelatnostima koje su se znatno pojednostavile i ubrzale zbog korištenja CENH3-ovisno induciranih haploida. To su a) metode sintetske klonalne reprodukcije, b) stvaranje čistih homozigotnih linija iz heterozigota povratnim križanjem (*reverse breeding*) te c) prozvodnja udvostručenih haploida za QTL mapiranje.

3.1. Dobivanje klonova spolnim razmnožavanjem

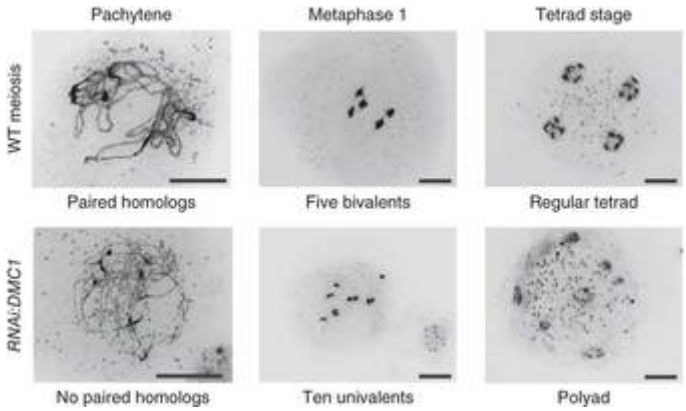
Sintetska klonalna reprodukcija zapravo podrazumijeva apomiksiju: proces nespolnog razmnožavanja biljaka gdje dolazi do stvaranja diploidnih gameta, a u poljoprivredi je taj proces od iznimne važnosti jer omogućuje razmnožavanje hibrida koji se često ne mogu spolno razmnožavati. Manipulacija apomiksije uključuje tri koraka: 1. Treba promijeniti mejozu na način da jedinka stvara diploidne gamete bez rekombinacije između homologa 2. Embriogeneza treba započeti bez oplodnje 3. Razvoj endosperma također mora biti potaknut bez oplodnje. Prvi korak uključuje tri mutacije odgovorne za pretvorbu mejoze u mitozu i dobivanje dipoidnih gameta: *spo11, rec8, osd1*. U tu svrhu su dizajnirani *Mime* i *dyad* mutanti *Arabidopsis thaliana* s navedene tri mutacije koji su stvarali diploidne gamete i križani su sa linijom koja je bila induktor haploida. Korišteni indukrot haploida bio je homozigotan za *cenh3-1* komplementiran GFP-CENH3 konstruktom (muške biljke) i GFP-*tailswap*-om (ženske biljke). Pri križanju ženskih mutanata koji su stvarali diploidne gamete s induktorom haploida GFP-CENH3, 25% potomstva bilo je diploidno, od toga pola genetički identično gametama ženskog roditelja. Pri recipročnom križanju GFP-tailswap ženske biljke muškim

mutanta omoji je stvarao diploidne gamete identificirano je 20% diploidnog potomstva koji su bili genetički identični gametama muškog roditelja. Ostatak potomstva oba križanja su bili aneuploidi koji su se od diploida razlikovali drugačijom morfologijom, vegetativnim rastom, izgledom rozete listova, bojom listova, različitim dobom cvjetanja i reduciranom sterilnošću. Analiza ploidnosti je napravljena protočnim citometrom i nakon otkrivanja diploida slijedila je njihova analiza metodom FISH (Marimuthu i sur., 2011).

3.2. *Reverse breeding*

Kod tehinke „*reverse breeding*“ iz neke hibridne jedinke želi se dobiti jednu ili obje čiste roditeljske linije. Prvo je potrebno suprimirati mejotsku rekombinaciju između homologa homologa i tako dobiti gamete od kojih neke imaju samo kromosome jednog od roditelja predmetnog hibrida. Teoretski tu metodu možemo aplicirati na vrste s manje od 12 kromosoma jer postoji dovoljno velika vjerojatnost za dobivanje gameta s kromosomima samo jednog roditelja. Naime, iako je segregacija kromosoma u odsutnosti krosingovera nasumična vjerojatnost pravilne segregacije u anafazi I mejoze, odnosno stvaranja balansiranih gameta (pola kromosoma na jedan pol, pola na drugi pol) je kod vrsta s malo kromosoma značajna, npr. kod *Arabidopsis thaliana* (2n=10) vjerojatnost stvaranja balansiranih gameta u tom slučaju je 3,25%. U tu svrhu je u jednoj studiji utišan gen *DMC1* kod *Arabidopsis thaliana* i to pomoću antisense RNA unešene transformacijom. Taj gen zaslužan je za krosingover tijekom mejoze pa zbog toga roditeljski kromosomi nisu ulazili u homolognu rekombinaciju (Sl. 5.). Pri križanju takvih *DMC1 knock-down* biljaka s već opisanim GFP-*tailswap* mutantima, određen broj potomaka je bio haploidan i imao je naslijeđen isključivo set kromosoma od jednog *DMC1 knock-down* roditelja. Jednostavnom duplikacijom haploida dobiveni su diploidni homozigoti za sva svojstva. Ovdje je važno za napomenuti da je važnost hibridnih jedinki velika jer oni mogu biti visoko produktivni varijeteti mnogih biljnih kultura. Međutim, heterozigotni genotip od interesa ne može se stabilno širiti sjemenom zbog rekombinacije roditeljskih kromosoma prije prijenosa u sljedeću generaciju pa je upravo ovom metodom omogućena savršena rekonstitucija hetrozigota križanjem iz njih dobivenih homozigota i njihova imortalizacija (isti heterozigotni genotip moguće je dobiti križanjem odgovarajućih iz njega dobivenih čistih linija u bilo kojem trenutku kada taj heterozigotni genotip postane potreban ili poželjan). Također, za razliku od apomiksije ovom metodom je stalno moguće poboljšati svojstva heterozigota i to

putem jednostavne mutageneze i korištenja tradicionalnih metoda križanja na homozigotnim roditeljskim linijama dobivenih putem povratnog križanja heterozigota (Wijnker i sur., 2012).



Slika 5. Usporedba mejoze kod divljeg tipa *A. thaliana* (gornji red) i kod *RNAi:DMC1* transformanata (donji red) (Wijnker i sur., 2012).

3.3. Udvostručeni haploidi za QTL mapiranje

Konačno, mogućnost brze CENH3-ovisne proizvodnje haploida, učinila je haploide pogodnim za QTL mapiranje. QTL, odnosno mapiranje lokusa kvantitativnih svojstava je alat za ispitivanje genetičke osnove fenotipskih varijacija. U prošlosti su za izradu QTL mapi korištene razne strukture segregirajućih populacija dobivenih npr. povratnim križanjem i potomaka F2 generacije od kojih je svaki genetički „fiksiran″ uzastopnom samooplodnjom kroz nekoliko generacija. Dvostruki haplodi dobiveni jednostavnom duplikacijom haploida u odnosu na prethodne metode imaju očitu prednost zbog lakoće i brzine dobivanja i njihove 100%-tne homozigotnosti za sva svojstva. Tako su već u jednom istraživanju Illumina sekvenciranjem udvostručenih haploida *(doubled haploids*) kod *A. tahaliana* uspješno napravljene QTL mape za svojstva povezana s vremenom cvjetanja i za duljinu peteljke lista, a u budućnosti će se raditi i na uzradi QTL mapi za još više svojstava koja su kodirana sa više gena (Seymour i sur., 2012).

4. LITERATURA

Dunwell, J. M. (2010): Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnology Journal (2010) **8**, pp. 377–424

Chan, Simon W. L. (2010): Chromosome engineering: power tool for plant genetics. Trends in Biotechnology, December 2010, Vol. **28**, No. 12

Ravi, M. et al. (2010): The Rapidly Evolving Centromere-Specific Histone Has Stringent Functional Requirements in *Arabidopsis thaliana*. Genetics **186**: 461–471 (October, 2010)

Ravi, M. & Chan, Simon W. L. (2010): Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. NATURE| Vol **464**|25 March 2010

Kuppu, S. et al. (2015): Point Mutations in Centromeric Histone Induce Post-zygotic Incompatibility and Uniparental Inheritance. PLOS Genetics | DOI:10.1371/journal.pgen.1005494, September 9, 2015

Karimi-Ashtiyani, R. et al. (2015): Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.150433311

Chan, Simon W. L. (2011): In a battle between parental chromosomes, a failure to reload. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1110320108

Marimuthu, Mohan P. A. et al (2011): Synthetic Clonal Reproduction Through Seeds. *Science* 331, 876 (2011) DOI: 10.1126/science.1199682

Winjker, E. et al. (2012): Reverse breeding in *Arabidopsis thaliana* generates homozygous parental lines from a heterozygous plant. NATURE GENETICS doi:10.1038/ng.2203

Seymour, D. K. et al. (2012): Rapid creation of Arabidopsis doubled haploid lines for quantitative trait locus mapping. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1117277109

Maheshwari, S. et al. (2015): Naturally Occurring Differences in CENH3 Affect Chromosome Segregation in Zygotic Mitosis of Hybrids. PLOS Genetics | DOI:10.1371/journal.pgen.1004970, January 26, 2015

Röber, F. K. et al. (2005): *IN VIVO* HAPLOID INDUCTION IN MAIZE – PERFORMANCE OF NEW INDUCERS AND SIGNIFICANCE OF DOUBLED HAPLOID LINES IN HYBRID BREEDING. Maydica **50** (2005): 275-283

Eder J. & Chalyk S. (2002): In vivo haploid induction in maize. Theor Appl Genet (2002) **104**:703–708

Pollacsek M. (1992): Management of the ig gene for haploid induction in maize. Agronomie, EDP Sciences, 1992, **12** (3), pp.247-251. <hal-00885471>

Heinkoff, S. et al. (2001): The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. Science. 2001 Aug 10;**293**(5532):1098-102

http://chan.openwetware.org/Research.html

http://www.plantbreeding.iastate.edu/DHF/Service.asp

5. SAŽETAK

Pojam haploid se kod biljaka koristi za opis odraslih jedinki (sporofita) čije somatske stanice sadrže isti broj kromosoma kao i gamete te vrste. U prirodi se mogu pojaviti spontano te dobiti *in vivo* tehnikama poput modificirane polinacije ili *in vitro* kulturom nezrelih muških i ženskih gametofita. Haploidne biljke i tzv. udvostručeni haploidi nalaze vrlo široku primjenu u mnogim aspektima botanike i genetike. Najnovija strategija indukcije haploida je zasnovana na križanju s mutanatom za centromerni histonski protein CENH3. Naime, CENH3 protein je važan za uspostavu interakcije s centromernom DNA s jedne strane i kinetohorom i mikrotubulima diobenog vretena s druge strane čime osigurava pravilnu segregaciju kromosoma za vrijeme diobe stanice. Strategija ovakve indukcije haploida temelji se na uvođenju mutacija u *CENH3* lokus. Kao induktori haploidnosti biraju se oni *CENH3* mutanti koji ostanu vijabilni i imaju pravilnu mitozu i mejozu, ali prilikom križanja dovode do eliminacije vlastitih kromosoma. Na taj način haploidni potomci zadržavaju, kromosomski set isključivo roditelja divljeg tipa. Iako točan mehanizam eliminacije seta kromosoma mutanta u hibridnom embriju još nije poznat smatra se da prilikom ranog embrionalnog razvoja dolazi do nejednako brzog vezanja CENH3 proteina na centromere mutanta i divljeg tipa zbog čega u određenom trenutku kromosomi mutanta imaju manje CENH3 proteina vezanih na svoje centromere za razliku od kromosoma divljeg tipa. Mnoge tehnologije i metode u botanici, genetici i njihovim primjenjenim djelatnostima znatno su pojednostavljene i ubrzane zbog korištenja CENH3-ovisno stvorenih haploida. Neke od tih metoda su metoda sintetske

klonalne reprodukcije, generiranje čistih linija homozigota iz heterozigota povratnim križanjem i prozvodnja dupliciranih haploida za QTL mapiranje.

6. SUMMARY

The term haploid in plants is generally used to designate sporophytes having the gametic chromosome number. They can occur either spontaneously or can be induced by modified pollination methods *in vivo*, or by *in vitro* culture of immature male or female gametophytes. Haploid plants and so-called doubled haploids (DH) are applied in wide extent in various aspects of botany and genetics. The newest strategy for haploid induction introduced in *A. thaliana* is based on crossing with a kinetochore protein mutated plant, more precisely a *CENH3* mutant. Centromeres are loci that nucleate kinetochores, the protein complexes that bind to spindle microtubules and mediate chromosome segregation during cell division. In this novel method, centromeres are subtly disabled by altering the kinetochore protein CENH3 in such a manner that mutants still maintain chromosome segregation function. Crossing this centromere mutant to wild-type plants mixes two sets of chromosomes in the fertilized zygote. Chromosomes from the *CENH3* mutant (the ‘‘haploid inducer’’) have defective kinetochores and can be lost by missegregation during zygotic mitosis. Resulting adult plants are haploids with only chromosomes from their wild-type parent. The exact mechanism of chromosome elimination in the hybrid zygote is unknown yet, altough it is considered that during early embrio development unequally rates of CENH3 loading on mutant and wild-type centromeres lead to the situation that at a certain moment chromosomes of the mutant have less CENH3 loaded on their centromeres than chromosomes of the wild-type. Finally, many technologies and methods in genetics, botany and their related industries have expirienced significant advantages (simplification, rapidity, etc.) from *CENH3*-dependent haploid production. Some of these methods are synthetic clonal reproduction, reverse breeding used for generating homozygous parental lines from a heterozygous plant and quantitative trait locus mapping (QTL).