

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Aleš KLADNIK

**CITOLOŠKA ANALIZA RAZVOJA ENDOSPERMA IN
KORENINSKE ČEPICE KORUZE (*Zea mays* L.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**CYTOLOGICAL ANALYSIS OF MAIZE (*Zea mays* L.) ENDOSPERM
AND ROOT CAP DEVELOPMENT**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2003

Doktorska disertacija je zaključek podiplomskega študija biologije.

Delo je bilo opravljeno na organizacijah:

- Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
- Department of Plant Pathology, University of Florida, Gainesville, USA

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepu Komisije za podiplomski študij Univerze z dne 21. 5. 2002 (po pooblastilu Senata Univerze v Ljubljani) je bila sprejeta tema doktorske disertacije in za mentorico imenovana prof. dr. Marina Dermastia.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Maja KOVAČ

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo

Članica: prof. dr. sc. Marijana KRSNIK-RASOL

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zavod za molekularnu biologiju

Članica: prof. dr. Marina DERMASTIA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 17. december 2003

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Aleš Kladnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK 577.2:581.19:582.542(043.3)=863
- KG slikovna citometrija/endoreduplikacija/endopoliploidnost/*miniature-1*/invertaza/
saharoza sintaza/prostornina celic/3-D model
- AV KLADNIK, Aleš, univ. dipl. biolog
- SA DERMASTIA, Marina (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2003
- IN CITOLOŠKA ANALIZA RAZVOJA ENDOSPERMA IN KORENINSKE
ČEPICE KORUZE (*Zea mays* L.)
- TD Doktorska disertacija
- OP XVIII, 196 s., 3 pregl., 79 sl., 1 pril., 148 vir.
- IJ sl
- JJ sl/en
- AI V endospermu koruze smo s slikovno citometrijo ocenili prostorsko razporeditev velikosti celic in njihove stopnje endopoliploidnosti. Razvili smo 3-D model, ki nam je omogočil oceno celotne strukture endosperma na podlagi mediane vzdolžne rezine. S pomočjo modela smo primerjali razvoj endosperma divjega tipa in mutante *mn1*, ki je brez invertaze iz celične stene v prenosnih celicah na bazi endosperma. Ugotovili smo, da je majhnost endosperma *mn1* posledica zmanjšane rasti/ekspanzije celic v osrednjem delu in posledično verjetno manjše mitotske aktivnosti v obrobem delu endosperma. Proces endoreduplikacije v endospermu *mn1* ni bil prizadet, v obeh genotipih smo opazili jedra z vsebnostjo DNA od 3 C do 192 C, vendar sta bili velikost in število celic z največjimi vrednostmi C v *mn1* manjša kot v *Mn1*. Razpoka, ki se pojavi med endospermom *mn1* in materinskim tkivom placento-halazne plasti (PHP), je bila posledica odmika premajhnega endosperma *mn1* od normalno razvitega materinskega tkiva. V PHP se je od 4. do 20. dneva po opraitvi razvilo 20 do 25 plasti celic, ki so programirano odmirale v obeh genotipih. V PHP smo opazili tudi nalaganje fenolnih spojin. V plasteh celic bližje endospermu smo opazili hidroksicimetne kisline, v nižjih plasteh, bližje žilam v pedicelu, pa so bili flavonoidi. Predpostavljamo, da so fenolne spojine vključene v razvoj abscizijske plasti. V koreninski čepici smo z imunolokalizacijo pregledali nalaganje izocima saharoza sintaze SUS1. Večjo količino SUS1 smo opazili v zunanjih, endopoliploidnih celicah čepice, katerih jedra so vsebovala 16 C in več DNA. Prostornina celic se je večala s stopnjo endopoliploidnosti. Predvidevamo, da endoreduplikacija omogoča večje nalaganje SUS1 v celicah čepice, SUS1 pa bi bila lahko vključena v sintezo polisaharidov sluzi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC 577.2:581.19:582.542(043.3)=863
- CX image cytometry/endoreduplication/endopolyploidy/*miniature-1*/invertase/sucrose synthase/cell volume/3-D model
- AU KLADNIK, Aleš
- AA DERMASTIA, Marina (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2003
- TI CYTOLOGICAL ANALYSIS OF MAIZE (*Zea mays* L.) ENDOSPERM AND ROOT CAP DEVELOPMENT
- DT Doctoral dissertation
- NO XVIII, 196 p., 3 tab., 79 fig., 1 ann., 148 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Spatial distribution of cell size and level of endopolyploidy of cells were analysed in maize endosperm using image cytometry. We developed a 3-D model that allowed us to estimate the composition of the whole endosperm on the basis of a median longitudinal section. Using the model, we compared the endosperm development in wild-type and *mn1* mutant, lacking cell-wall invertase in basal endosperm transfer cells. Smallness of the *mn1* endosperm was a consequence of reduced cell growth/expansion in the central part and impaired cell division in the peripheral part of the endosperm. The endoreduplication process was not affected in *mn1*, both genotypes contained 3 C to 192 C nuclei. However, both volume and number of cells with highest C values were lower in *mn1* as compared to *Mn1*. The gap, forming between *mn1* endosperm and maternal tissue of placento-chalazal layer (PC layer), was a result of the detachment of the small *mn1* endosperm from the normally developed maternal tissue. 20 to 25 layers of dead cells developed in the PC layer in both genotypes during 4 to 20 days after pollination in the process of programmed cell death. In addition, we observed accumulation of phenolic compounds in the PC layer. Hydroxycinnamic acids were located in the layers of maternal cells near the endosperm, whereas in the lower layers in the pedicel we found massive deposition of flavonoids. We suggest that phenolic substances might be involved in the development of the abscission layer. In addition, we found increased amounts of sucrose synthase isozyme SUS1 in the outer cells of the maize root cap. The SUS1 positive cells overlapped significantly with cells of increased endopolyploidy levels. We suggest that SUS1 accumulation is enhanced by endoreduplication and that SUS1 may have a role in mucilage synthesis.

KAZALO VSEBINE

| | |
|---|----------|
| Ključna dokumentacijska informacija | III |
| Key words documentation | IV |
| Kazalo vsebine | V |
| Kazalo preglednic | X |
| Kazalo slik..... | XI |
| Kazalo prilog | XVI |
| Okrajšave | XVII |
| Slovarček..... | XVIII |
| | |
| 1 UVOD..... | 1 |
| | |
| 2 PREGLED OBJAV | 2 |
| 2.1 KORUZA (<i>Zea mays</i> L.) | 2 |
| 2.2 KARIOPSA KORUZE..... | 3 |
| 2.2.1 Semenska zasnova | 4 |
| 2.2.2 Dvojna oploditev | 5 |
| 2.2.3 Razvoj endosperma..... | 5 |
| 2.2.4 Prenosne celice | 7 |
| 2.2.5 Placento-halazna plast | 7 |
| 2.2.6 Mutanta <i>mn1</i> | 8 |
| 2.3 KALITEV KARIOPSE | 9 |
| 2.3.1 Koreninska čepica | 9 |
| 2.4 RAST IN RAZVOJ ORGANOV | 11 |
| 2.4.1 Celični cikel in vrednost C | 12 |
| 2.4.2 Endoreduplikacija..... | 12 |
| 2.4.3 Programirana celična smrt v razvoju rastlin | 13 |
| 2.5 VLOGA SLADKORJEV V RAZVOJU RASTLIN | 15 |
| 2.5.1 Invertaza..... | 15 |
| 2.5.2 Saharoza sintaza..... | 16 |
| 2.6 NAMEN DELA | 18 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3 | MATERIAL IN METODE | 19 |
| 3.1 | RASTLINSKI MATERIAL | 19 |
| 3.1.1 | Opis rastlin | 19 |
| 3.1.2 | Vzgoja rastlin do zrelosti | 19 |
| 3.1.3 | Vzgoja kalic | 21 |
| 3.2 | PRIPRAVA PREPARATOV | 22 |
| 3.2.1 | Fiksacija rastlinskega materiala | 22 |
| 3.2.1.1 | Formalin – očetna kislina – etanol (FAA)..... | 22 |
| 3.2.1.2 | Fiksiranje kariops | 22 |
| 3.2.1.3 | Fiksiranje kalic | 23 |
| 3.2.2 | Priprava rezin | 23 |
| 3.2.2.1 | Dehidracija vzorcev | 23 |
| 3.2.2.2 | Vklapljanje v parafin | 24 |
| 3.2.2.3 | Rezanje na mikrotomu | 24 |
| 3.3 | HISTOKEMIČNE REAKCIJE..... | 25 |
| 3.3.1 | Kvantitativno barvanje DNA po Feulgenu | 25 |
| 3.3.2 | Barvanje DNA z DAPI | 26 |
| 3.3.3 | Barvanje fragmentirane DNA z reakcijo TUNEL | 27 |
| 3.3.4 | Barvanje kondenziranega kromatina s kristal vijoličnim | 28 |
| 3.3.5 | Barvanje kutina in suberina s Sudan IV | 29 |
| 3.3.6 | Barvanje lignina s floroglucinolom | 29 |
| 3.3.7 | Barvanje kaloze z anilin modro – fluorescenčno metodo | 29 |
| 3.3.8 | Barvanje flavonoidov z Naturstoffreagenz A | 30 |
| 3.4 | IMUNOHISTOKEMIČNE REAKCIJE..... | 31 |
| 3.4.1 | Imunolokalizacija izocima saharoza sintaze SUS1 | 31 |
| 3.5 | MIKROSKOPIJA | 33 |
| 3.6 | KVANTITATIVNA ANALIZA SLIKE | 34 |
| 3.6.1 | Denzitometrična meritev količine DNA | 34 |
| 3.6.1.1 | Umeritev sistema in odprava napak na zajeti sliki | 36 |
| 3.6.1.2 | Merjenje stabilnosti osvetlitve..... | 38 |
| 3.6.1.3 | Merjenje relativne količine DNA v tkivnih rezinah | 40 |
| 3.6.2 | Kvantitativno ovrednotenje imunolokalizacijskega barvanja | 42 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3.6.2.1 | Prikaz imunolokalizacijskega barvanja s psevdo barvami..... | 42 |
| 3.6.2.2 | Kvantitativno ovrednotenje imunolokalizacijskega barvanja v posameznih celicah v čepici | 42 |
| 3.6.2.3 | Povezava imunolokalizacijskega signala s ploidnostjo celic | 44 |
| 3.6.3 | Meritev velikosti..... | 44 |
| 3.6.3.1 | Meritev velikosti celic..... | 44 |
| 3.6.3.2 | Meritev velikosti koreninskih vršičkov | 45 |
| 3.6.4 | Obdelava podatkov | 46 |
| 3.6.4.1 | Odstranjevanje dvojnikov | 46 |
| 3.6.4.2 | Povezava podatkov za ploidnost in velikost celic | 47 |
| 3.6.4.3 | Ocena tridimenzionalne porazdelitve celic v koreninski čepici..... | 47 |
| 3.6.4.4 | Ocena tridimenzionalne porazdelitve celic v endospermu | 50 |
| 3.6.4.4.1 | <i>3-D model endosperma.....</i> | <i>52</i> |
| 3.6.4.4.2 | <i>3-D model endosperma mlajših razvojnih stopenj (4–8 DPO).....</i> | <i>53</i> |
| 3.6.4.4.3 | <i>3-D model endosperma starejših razvojnih stopenj (10–16 DPO).....</i> | <i>54</i> |
| 3.6.4.5 | Statistična obdelava podatkov | 56 |
| 4 | REZULTATI | 57 |
| 4.1 | VIZUALIZACIJA CELIČNIH PROCESOV V KARIOPSI..... | 57 |
| 4.1.1 | Razporeditev jeder v kariopsi..... | 57 |
| 4.1.2 | Citološka analiza materinskega tkiva..... | 66 |
| 4.1.2.1 | Nucel..... | 66 |
| 4.1.2.1.1 | <i>Število jeder posameznih razredov ploidnosti v vzdolžnih rezinah kariopse.....</i> | <i>66</i> |
| 4.1.2.1.2 | <i>Fragmentacija DNA v jedrih nucela</i> | <i>72</i> |
| 4.1.2.2 | Perikarp | 74 |
| 4.1.2.2.1 | <i>Število jeder posameznih razredov ploidnosti v vzdolžnih rezinah kariopse.....</i> | <i>74</i> |
| 4.1.2.3 | Placento-halazna plast..... | 80 |
| 4.1.2.3.1 | <i>Stopnja endopoliploidnosti jeder.....</i> | <i>80</i> |
| 4.1.2.3.2 | <i>Izguba jeder in morfologija celic v placento-halazni plasti</i> | <i>80</i> |
| 4.1.2.3.3 | <i>Fragmentacija DNA v jedrih placento-halazne plasti.....</i> | <i>87</i> |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 4.1.2.3.4 | <i>Nalaganje sekundarnih spojin v celične stene</i> | 89 |
| 4.1.3 | Citološka analiza filialnega tkiva | 94 |
| 4.1.3.1 | Embrio..... | 94 |
| 4.1.3.1.1 | <i>Število jeder posameznih razredov ploidnosti v vzdolžnih rezinah kariopse</i> | 94 |
| 4.1.3.2 | Endosperm..... | 100 |
| 4.1.3.2.1 | <i>Število jeder posameznih razredov ploidnosti v vzdolžnih rezinah kariopse</i> | 100 |
| 4.1.3.2.2 | <i>Število in prostornina celic v celotnem endospermu (ocena s 3-D modelom)</i> | 108 |
| 4.1.3.2.3 | <i>Število in prostornina celic v celotnem endospermu (ocena s 3-D modelom) glede na stopnjo endopoliploidnosti</i> | 114 |
| 4.1.3.2.4 | <i>Fragmentacija DNA v jedrih endosperma ob embriu</i> | 127 |
| 4.2 | VIZUALIZACIJA CELIČNIH PROCESOV V KORENINSKI ČEPICI | 128 |
| 4.2.1 | Kalitev in rast kalic | 128 |
| 4.2.1.1 | Morfološki parametri koreninskih vršičkov | 130 |
| 4.2.2 | Število celic v koreninski čepici in prostornina čepice | 132 |
| 4.2.3 | Endopoliploidnost celic v koreninski čepici | 133 |
| 4.2.4 | Imunolokalizacija izocima saharoza sintaze SUS1 | 140 |
| 4.2.5 | Kvantifikacija imunolokalizacijskega barvanja | 145 |
| 4.2.6 | Povezava imunolokalizacijskega signala za SUS1 s stopnjo endopoliploidnosti celic | 148 |
| 5 | RAZPRAVA IN SKLEPI | 149 |
| 5.1 | RAZPRAVA | 149 |
| 5.1.1 | Metode | 149 |
| 5.1.2 | Zakaj je endosperm <i>mn1</i> majhen? | 152 |
| 5.1.2.1 | Razvoj materinskega tkiva | 152 |
| 5.1.2.2 | Razvoj embria..... | 154 |
| 5.1.2.3 | Razvoj endosperma..... | 155 |
| 5.1.3 | Nastanek razpoke med endospermom in materinskim tkivom v kariopsi <i>mn1</i> | 164 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 5.1.4 | Poseben transportni sistem v placento-halazni plasti in nastanek abscizijske plasti..... | 166 |
| 5.1.5 | Razvoj koreninske čepice..... | 172 |
| 5.1.5.1 | Vpliv substrata na rast korenin..... | 172 |
| 5.1.5.2 | Stopnja endopoliploidnosti celic v koreninski čepici..... | 174 |
| 5.1.5.3 | Lokalizacija saharoza sintaze v koreninski čepici..... | 175 |
| 5.1.5.4 | Povezava med endopoliploidnostjo in količino SUS1 proteina ter morebitna vloga saharoza sintaze v koreninski čepici..... | 176 |
| 5.2 | SKLEPI..... | 178 |
| 6 | POVZETEK..... | 180 |
| 7 | SUMMARY | 183 |
| 8 | VIRI | 186 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|---|-----|
| Pregl. 4.1. Število celic, prostornina in površina endosperma <i>Mn1</i> in <i>mn1</i> ; podatki ocenjeni s 3-D modelom..... | 108 |
| Pregl. 4.2. Dolžina in prirastek primarnih korenin po gojenju v različnih substratih. | 129 |
| Pregl. 5.1. Povprečna dolžina koreninske čepice in hitrost rasti primarne korenine..... | 173 |

KAZALO SLIK

| | |
|---|----|
| Sl. 2.1. Struktura razvijajoče se kariopse koruze, vzdolžni prerez (Kiesselbach, 1949)..... | 4 |
| Sl. 2.2. Skica placento-halazne plasti v bazalnem delu kariopse, okrog 10 DPO..... | 8 |
| Sl. 3.1. Vzgoja rastlin koruze v rastlinjaku in storž koruze z 1 : 1 deljenim potomstvom, 12 DPO..... | 20 |
| Sl. 3.2. Vlažna komora..... | 28 |
| Sl. 3.3. Razmerje med izmerjeno sivo vrednostjo in resnično vrednostjo transmisije, ki jo predstavlja siva vrednost, ter optična gostota (OG), izračunana iz transmisije..... | 38 |
| Sl. 3.4. Nihanje jakosti osvetlitve in neenakomerna osvetlitev vidnega polja (brez korekcije senčenja)..... | 39 |
| Sl. 3.5. Siva vrednost in koeficient variacije pikslov v centru zaporedoma zajetih slik. | 39 |
| Sl. 3.6. Vpliv logaritemske transformacije na frekvenčno porazdelitev IOG vrednosti..... | 40 |
| Sl. 3.7. Premikanje po preparatu z izbiranjem jeder..... | 41 |
| Sl. 3.8. Pretvorba sivih vrednosti na sliki v psevdobarve..... | 42 |
| Sl. 3.9. Kvantitativno ovrednotenje imunolokalizacijskega barvanja za saharoza sintazo SUS1..... | 43 |
| Sl. 3.10. Merjeni parametri v koreninskem vršičku..... | 46 |
| Sl. 3.11. Prepoznavanje dvojnikov pri merjenju IOG in velikosti celic..... | 47 |
| Sl. 3.12. Celice koreninske čepice v vzdolžnem prerezu in ocena števila celic v prečnem prerezu..... | 48 |
| Sl. 3.13. Obrisi celic v koreninski čepici..... | 49 |
| Sl. 3.14. Merjenje velikosti celic v endospermu in priprava slike za izračun 3-D modela endosperma..... | 51 |
| Sl. 3.15. Izdelava 3-D modela endosperma za razvojne stopnje od 4. do 8. DPO..... | 53 |
| Sl. 3.16. Izdelava 3-D modela endosperma za razvojne stopnje od 10. do 16. DPO..... | 55 |
| Sl. 4.1. Stopnja endopoliploidnosti v kariopsi koruze divjega tipa <i>Mn1</i> in mutante <i>mn1</i> , 4 DPO..... | 60 |
| Sl. 4.2. Stopnja endopoliploidnosti v kariopsi koruze divjega tipa <i>Mn1</i> in mutante <i>mn1</i> , 6 DPO..... | 61 |

| | |
|---|----|
| Sl. 4.3. Stopnja endopoliploidnosti v kariopsi koruze divjega tipa <i>Mn1</i> in mutante <i>mn1</i> , 8 DPO..... | 62 |
| Sl. 4.4. Stopnja endopoliploidnosti v kariopsi koruze divjega tipa <i>Mn1</i> in mutante <i>mn1</i> , 10 DPO..... | 63 |
| Sl. 4.5. Stopnja endopoliploidnosti v kariopsi koruze divjega tipa <i>Mn1</i> in mutante <i>mn1</i> , 12 DPO..... | 64 |
| Sl. 4.6. Stopnja endopoliploidnosti v kariopsi koruze divjega tipa <i>Mn1</i> in mutante <i>mn1</i> , 16 DPO..... | 65 |
| Sl. 4.7. Število izmerjenih jeder v nucelu v vzdolžnih rezinah kariops koruze divjega tipa <i>Mn1</i> in mutante <i>mn1</i> | 67 |
| Sl. 4.8. Frekvenčna porazdelitev jeder v nucelu glede na relativno vsebnost DNA. | 68 |
| Sl. 4.9. Površina preseka jeder in stopnja endopoliploidnosti jeder v nucelu..... | 70 |
| Sl. 4.10. Fragmentacija DNA v jedrih nucela. | 73 |
| Sl. 4.11. Število izmerjenih jeder v perikarpu v vzdolžnih rezinah kariops koruze divjega tipa <i>Mn1</i> in mutante <i>mn1</i> | 75 |
| Sl. 4.12. Frekvenčna porazdelitev jeder v perikarpu glede na relativno vsebnost DNA. | 76 |
| Sl. 4.13. Površina preseka jeder in stopnja endopoliploidnosti jeder v perikarpu. | 78 |
| Sl. 4.14. Večanje števila plasti celic v placento-halazni plasti, ki izgubijo jedra; 0–28 DPO..... | 81 |
| Sl. 4.15. Štetje plasti celic v placento-halazni plasti, ki so izgubile jedra. | 85 |
| Sl. 4.16. Število plasti celic brez jeder v placento-halazni plasti. | 85 |
| Sl. 4.17. Neoplojena semenska zasnova in razvijajoča se kariopsa (oplojena) iz istega storža, 12 DPO. | 86 |
| Sl. 4.18. Kondenzirana jedra v placento-halazni plasti v kariopsi <i>Mn1</i> (A) in <i>mn1</i> (B), 10 DPO. | 87 |
| Sl. 4.19. Fragmentacija DNA v jedrih celic v placento-halazni plasti. | 88 |
| Sl. 4.20. Vzdolžni rezini kariops divjega tipa (A) in mutante <i>mn1</i> (B), 16 DPO, barvani s Sudan IV. | 89 |
| Sl. 4.21. Vzdolžna rezina kariopse divjega tipa, 16 DPO, barvana s floroglucinolom v HCl. | 89 |

| | |
|---|-----|
| Sl. 4.22. Vzdolžne rezine kariops divjega tipa <i>Mn1</i> in mutante <i>mn1</i> , 2–16 DPO, barvane z DAPI in anilin modrim v 0,15 M K_2HPO_4 (pH 8,2). | 91 |
| Sl. 4.23. Fenolne snovi v placento-halazni plasti v kariopsah divjega tipa in mutante <i>mn1</i> , 6 DPO..... | 92 |
| Sl. 4.24. Fenolne snovi v placento-halazni plasti v kariopsah divjega tipa in mutante <i>mn1</i> , 16 DPO..... | 93 |
| Sl. 4.25. Število izmerjenih jeder v embriu v vzdolžnih rezinah kariops koruze divjega tipa <i>Mn1</i> in mutante <i>mn1</i> | 95 |
| Sl. 4.26. Frekvenčna porazdelitev jeder v embriu glede na relativno vsebnost DNA..... | 96 |
| Sl. 4.27. Površina preseka jeder in stopnja endopoliploidnosti jeder v embriu. | 98 |
| Sl. 4.28. Število izmerjenih jeder v endospermu v vzdolžnih rezinah kariops koruze divjega tipa <i>Mn1</i> in mutante <i>mn1</i> | 101 |
| Sl. 4.29. Frekvenčna porazdelitev jeder v endospermu glede na relativno vsebnost DNA. | 102 |
| Sl. 4.30. Površina preseka jeder in relativna količina DNA v jedrih v endospermu. | 104 |
| Sl. 4.31. Premer jeder v endospermu glede na stopnjo endopoliploidnosti. | 106 |
| Sl. 4.32. Velikost celic v medianih vzdolžnih rezinah kariopse koruze. | 109 |
| Sl. 4.33. Število celic in prostornina endosperma. | 110 |
| Sl. 4.34. Število celic in prostornina, ki jo zavzemajo celice v endospermu divjega tipa <i>Mn1</i> in mutante <i>mn1</i> 4 do 16 DPO..... | 112 |
| Sl. 4.35. Razmerje med številom celic v endospermu mutante <i>mn1</i> in divjega tipa <i>Mn1</i> v posameznih razredih velikosti celic. | 113 |
| Sl. 4.36. Stopnja endopoliploidnosti celic v medianih vzdolžnih rezinah kariopse koruze. | 115 |
| Sl. 4.37. Sestava endosperma po vrednostih C 4 do 16 DPO. | 116 |
| Sl. 4.38. Število celic posameznih stopenj endopoliploidnosti v endospermu in prostornina, ki jo zavzemajo v endospermu 4 do 16 DPO..... | 117 |
| Sl. 4.39. Prostornina celic v endospermu glede na stopnjo endopoliploidnosti..... | 119 |
| Sl. 4.40. Mediana prostornina celic v endospermu divjega tipa (črni simboli) in mutante <i>mn1</i> (rdeči simboli) glede na stopnjo endopoliploidnosti 4 do 16 DPO..... | 121 |

| | |
|---|-----|
| Sl. 4.41. Razmerje števila celic (A), prostornine endosperma (B) in medianih prostornin celic (C) v <i>mn1</i> proti <i>Mn1</i> endospermu, 4–16 DPO..... | 121 |
| Sl. 4.42. Število celic v endospermu glede na prostornino celic in stopnjo endopoliploidnosti..... | 123 |
| Sl. 4.43. Prostornina endosperma, ki jo zavzemajo celice v razredih glede na prostornino celic in stopnjo endopoliploidnosti..... | 125 |
| Sl. 4.44. Fragmentacija DNA v jedrih celic endosperma ob embriju..... | 127 |
| Sl. 4.45. Dolžina primarne korenine kalic koruze..... | 129 |
| Sl. 4.46. Morfološki parametri, izmerjeni v medianih longitudinalnih rezinah vršičkov korenin, gojenih v različnih substratih..... | 131 |
| Sl. 4.47. Razmerje med ocenjenim številom celic in prostornino koreninskih čepic..... | 132 |
| Sl. 4.48. Stopnja endopoliploidnosti jeder v koreninski čepici..... | 134 |
| Sl. 4.49. Relativna količina jedrne DNA v celicah čepic korenin, gojenih v različnih substratih..... | 135 |
| Sl. 4.50. Mediani longitudinalni rezini čepic korenin, gojenih v vodi (A) in v prsti (B)..... | 136 |
| Sl. 4.51. Prostornina celic različnih stopenj endopoliploidnosti v koreninskih čepicah. ... | 137 |
| Sl. 4.52. Povprečna prostornina celic glede na stopnjo endopoliploidnosti..... | 138 |
| Sl. 4.53. Frekvenčna porazdelitev celic v koreninski čepici glede na prostornino celic in stopnjo endopoliploidnosti..... | 139 |
| Sl. 4.54. Imunolokalizacija izocima saharoza sintaze SUS1 v vršičkih primarnih korenin, gojenih v nesterilizirani prsti..... | 141 |
| Sl. 4.55. Imunolokalizacija izocima saharoza sintaze SUS1 v vršičkih primarnih korenin, gojenih v sterilizirani prsti..... | 142 |
| Sl. 4.56. Imunolokalizacija izocima saharoza sintaze SUS1 v vršičkih primarnih korenin, gojenih v nesterilizirani vodi..... | 143 |
| Sl. 4.57. Imunolokalizacija izocima saharoza sintaze SUS1 v vršičkih primarnih korenin, gojenih v sterilizirani vodi..... | 144 |
| Sl. 4.58. Razporeditev celic, ki vsebujejo malo ali veliko SUS1 antigena, v koreninski čepici..... | 146 |
| Sl. 4.59. Frekvenčna porazdelitev celic v koreninski čepici glede na prostornino celic in jakost imunolokalizacijskega signala za SUS1..... | 147 |

| | |
|--|-----|
| Sl. 4.60. Razmerje med stopnjo endopoliploidnosti in jakostjo imunolokalizacijskega signala za SUS1 v celicah koreninske čepice. | 148 |
| Sl. 5.1. Propadanje vsebine celic v placento-halazni plasti <i>Mn1</i> , 9 DPO (A–D) in zmanjšanje števila plazmodezem v celicah tik pod endospermom, 5 DPO (E) in 9 DPO (G). | 168 |

KAZALO PRILOG

Priloga A: Vilhar B, Kladnik A, Blejec A, Chourey PS, Dermastia M. 2002. Cytometrical evidence that the loss of seed weight in the *miniature1* seed mutant of maize is associated with reduced mitotic activity in the developing endosperm. *Plant Physiology* 129: 23-30.

OKRAJŠAVE

| | |
|------------------|--|
| DAPI | <i>4',6' diamino-2-phenylindole·2HCl</i> |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| DPO | dnevi/dni/dan po opraitvi |
| IOG | integrirana optična gostota |
| INCW2 | izocim invertaze iz celične stene, kodiran z genom <i>Mn1</i> |
| <i>Mn1</i> | genotip rastline je divjega tipa |
| <i>mn1</i> | genotip rastline je <i>miniature-1</i> , semenska mutanta koruze brez izocima invertaze iz celične stene INCW2, ki se specifično izraža v bazalnem delu endosperma |
| NST | <i>Naturstoffreagenz A</i> ; difenilborova kislina-2-aminoetilester |
| PCS | programirana celična smrt |
| PHP | placento-halazna plast; plast materinskega tkiva med žilami v pedicelu in endospermom |
| SUS1 | izocim saharoza sintaze, kodiran z genom <i>Sus1</i> |
| TBA | terciarni butilni alkohol |
| TUNEL | <i>terminal deoxynucleotidyl transferase mediated X-dUTP nick end labeling</i> |
| UV | ultravijolična |

SLOVARČEK

- apikalno v kariopsi označuje del, kjer je viden ostanek vratu plodnice; v koreninski čepici označuje skrajni vršiček čepice
- bazalno v kariopsi označuje del, kjer je pedicel; v koreninski čepici označuje del, kjer je meristem (na meji med čepico in telesom korenine)
- bitna slika računalniška slika, sestavljena iz točk
- denzitometrija kvantitativno merjenje koncentracije snovi na podlagi absorpcije svetlobe
- dorzalno uporabljeno pri orientaciji v kariopsi – na nasprotni strani kot ventralno (v smeri pravokotno na os bazalno-apikalno)
- endosperm triploidno tkivo v semenu, ki služi za prehrano embria
- embrio zarodek nove rastline v semenu
- Feulgen *barvanje po*; kvantitativno barvanje DNA s Schiffovim reagentom
- kariopsa majhen suh enosemnski plod, v katerem seme ostane obdano s perikarpom
- pedicel pecelj klaska, cveta, plodu ali lista
- perikarp stena plodnice v razvitem plodu
- piksel najmanjša enota računalniške bitne slike
- ventralno uporabljeno pri orientaciji v kariopsi – na strani kariopse, kjer je embrio
- voksel najmanjša enota tridimenzionalne računalniške bitne slike (volumski piksel)
- vrednost C 1 C je količina DNA v nepodvojenem haploidnem genomu

1 UVOD

Dandanes je koruza ena najpomembnejših prehranskih rastlin, za stare indijanske kulture pa je bila pomembna že pred tisočletji. Posvetili so ji celo nekaj božanstev, kar ni presenetljivo, saj so njena zrna dobesedno akumulatorji energije Sonca. Že takrat so želeli vzgojiti sorte, ki bi dajale velik pridelek.

Iskanje novih načinov za povečanje pridelka prehranskih rastlin daje velik zagon raziskavam rasti in razvoja rastlin ter je veliko prispevalo k poznavanju procesov, ki oblikujejo končno obliko rastline. V koruzi se založne snovi shranjujejo v endospermu, po mnenju nekaterih raziskovalcev nenavadnem dvojčku embria. Kolikšen bo endosperm, je odvisno od natančno uravnanih procesov delitve celic in njihovega povečevanja. V rastlinah so celične delitve omejene na meristemska območja, nastale celice pa nato prispevajo k rasti organa s povečevanjem. V nekaterih skupinah rastlin, tudi pri koruzi, ima v procesu rasti in diferenciacije celic pomembno vlogo endoreduplikacija, večkratno podvajanje celotnega genoma znotraj istega jedra. Endopoliploidne celice imajo večjo prostornino kot celice z običajno, diploidno količino DNA v jedrih, imele pa naj bi tudi večjo metabolno aktivnost. O pravi vlogi endoreduplikacije je še vedno veliko vprašanj, saj se navidez naključno pojavlja v različnih taksonomskih skupinah rastlin. V razvoju organov pa ni pomembna le natančna regulacija delitve in rasti celic, temveč tudi nadzorovano, programirano odmiranje celic. Vsi naštetih procesi imajo v razvoju organov pomembno vlogo, saj le kooordinirano nastajanje celic, njihova rast in odmiranje na točno določenih mestih vodi do delujočih tkiv.

V regulaciji rasti in razvoja rastlin je še veliko neznank. Kljub temu pa nove mikroskopske tehnike v povezavi z analizo slike omogočajo kvantitativen opis razvoja organov in s tem globlji vpogled v delovanje celičnih in organizemskih sistemov.

2 PREGLED OBJAV

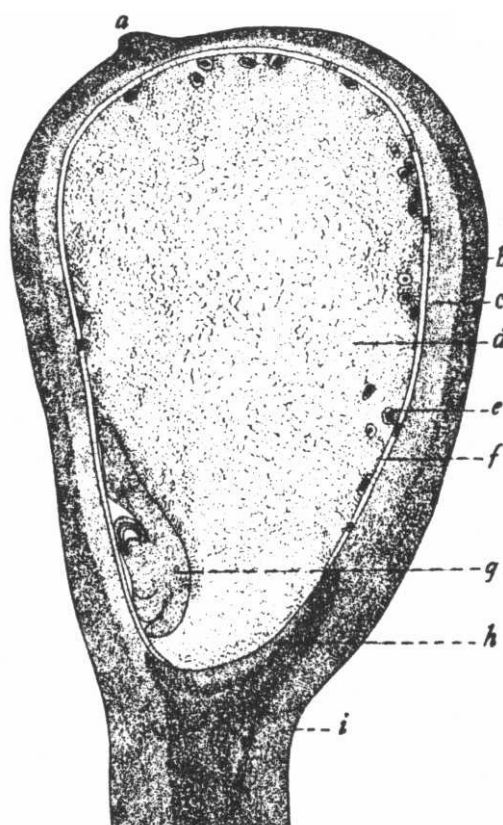
2.1 Koruza (*Zea mays* L.)

Koruza je že dolgo povezana s človekom. Že stara indijanska ljudstva, Maji, Azteki in Inki, so jo čislali zaradi obilnega pridelka in lahke vzgoje. Zaradi velikega vpliva na njihovo življenje so ji posvetili kar nekaj božanstev (Weatherwax, 1954). Na območju zdajšnje Mehike so jo gojili že 5000 let pred našim štetjem (Heiser, 1990). V šestnajstem stoletju so jo v Evropo prinesli španski zavojevalci Amerike. Hitro se je razširila po južnih deželah Evrope, vendar dolgo ni bila priznana kot zdrava hrana, bila pa je botanična zanimivost. Večji pomen je imela za evropske priseljence v Ameriko in še vedno je pridelovanje koruze najbolj razširjeno prav v Ameriki (Weatherwax, 1954). Koruza se uporablja kot živinska krma, v človekovi prehrani pa je pomemben vir ogljikovih hidratov. Koruza je pomembna tudi kot objekt za raziskovalno delo, saj je poleg navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) modelna rastlina za molekularno biološke raziskave. Za razvoj sodobne genetike je koruza za botanike to, kar je za zoologe *Drosophila* (Heiser, 1990).

Koruza spada v družino trav (*Poaceae*). Njen najbližji divji sorodnik je trava teozint (*Zea diploperennis*, *Z. perennis* ali starejše ime *Euchlaena mexicana* Schrad.), ki še vedno raste v območjih Mehike in Gvatemale (Weatherwax, 1954). Koruzno steblo je razdeljeno na nodije, z enim listom na vsakem nodiju. Listi rastejo dvoredno, vsak je sestavljen iz nožnice, ki objema steblo, in listne ploskve. Iz zalistja izraščajo stranski poganjki, pri dnu stebela na bazi internodijev pa adventivne korenine. Koruza je enodomna rastlina, cvetni klaski pa so karpelni ali prašnični. Karpelni cvetni klaski so združeni v bate (storže), ki so v zalistjih stebelnih listov in so tesno oviti s številnimi listnimi nožnicami (ličje). Os socvetja je odebeljena, internodiji so zelo skrajšani, klaski imajo večinoma zelo zakrnele pleve. Vratovi plodnic so dolgi nekaj 10 centimetrov in na vrhu molijo iz ovoja storža. Prašnični cvetovi so na vrhu stebela v prstastem socvetju, ki je sestavljeno iz več klasastih socvetij (Kiesselbach, 1949; Martinčič s sod., 1999).

2.2 Kariopsa koruze

Razmnoževalna struktura koruze je kariopsa (zrno), ki je tudi najpomembnejši del rastline za človeka. Kariopsa koruze (Slika 2.1) je orešek, nastal iz nadržale plodnice. Seme (embrio, endosperm in ostanki semenske ovojnice ter nucela) je zraslo z osemenjem (perikarp). Endosperm zavzema največji del prostornine zrele kariopse, relativno manjši embrio je na strani, blizu baze endosperma. Naloga endosperma je shraniti dovolj hrane za začetno rast embria ob kalitvi. Celice endosperma so napolnjene s številnimi amiloplasti s škrobnimi zrnji. Na bazi endosperma (najbližje pedicelu) so celice specializirane v prenosne celice in služijo prevajanju hrane od materinske rastline v razvijajoči se endosperm in posredno v embrio. Celice na površini endosperma nimajo škrobnih zrn, temveč sestavljajo alevronsko plast in vsebujejo alevronska zrna in olja. Alevronska plast se ne porablja za prehrano embria, ampak naj bi le prispevala encime za razgradnjo škroba. Perikarp je stena plodnice in tvori trden zunanji ovoj, ki ščiti notranje dele. Na apikalnem delu je viden ostanek vratu plodnice, na bazalnem delu pa prehaja v pedicel brez jasnega prehoda. Med semensko zasnovo in pedicelom je placento-halazna plast, kjer se v zreli kariopsi razvije abscizijska plast. Ravnina abscizijske plasti ustreza hilumu pecljatih vrst, pri katerih se zrela kariopsa v tej ravnini odlomi (Kiesselbach, 1949).



Slika 2.1. Struktura razvijajoče se kariopse koruze, vzdolžni prerez (Kiesselbach, 1949).

Pomen oznak: *a* – ostanek vratu plodnice, *b* – perikarp, *c* – notranji del karpelov, ki razpada, *d* – endosperm, *e* – mesto mitoz v endospermu, *f* – alevronska plast, *g* – embrio, *h* – območje hiluma (placento-halazna plast), *i* – pedicel.

2.2.1 Semenska zasnova

V semenski zasnovi, ki je del sporofitne generacije karpelnega cveta, se razvije ženski gametofit – megagametofit ali embrionalna vrečka. Iz megasporocite nastanejo z mejozo štiri spore (vsaka ima 10 kromosomov); tri od njih propadejo. V preostali spori se jedro trikrat deli (brez nastanka vmesnih celičnih sten), nastane embrionalna vrečka z osmimi jedri. Dve od njih se premakneta na sredino embrionalne vrečke – to sta polni jedri, ki bosta postali del prvega jedra endosperma. Na mikropilnem koncu embrionalne vrečke so tri jedra, okoli katerih se oblikujejo celice. Ena od njih se poveča, ta postane jajčna celica, drugi dve pa sta sinergidi. Tudi na nasprotnem delu embrionalne vrečke se oblikujejo tri celice – antipode, ki pa se kmalu začnejo deliti, tako da nastane okrog 30 celic.

Embrionalno vrečko obdaja diploidno tkivo nucela (20 kromosomov), nucel pa je obdan z dvema integumentoma. Semensko zasnovi obdajajo karpeli, ki so združeni v steno plodnice. Nucel je hranilno tkivo za začetni razvoj filialne generacije. Kmalu se v celicah nucela začnejo avtolitični procesi. Ko endosperm raste, pri tem zapolnjuje prostor, kjer so bile prej celice nucela (Kiesselbach, 1949).

2.2.2 Dvojna oploditev

Filialna generacija (embrio in endosperm) nastane z dvojno oploditvijo, ki je značilna za kritosemenke. Skoraj hkrati sta jo konec devetnajstega leta odkrila Nawaschin in Guignard (Raghavan, 2003). Oploditev se zgodi približno 24 ur po opranitvi (Kiesselbach, 1949). Po cevi pelodnega mešička dospeta v embrionalno vrečko dve spermalni jedri (haploidni moški gameti, vsaka ima 10 kromosomov). Eno od njiju se združi z jedrom jajčne celice. Iz te zigote z 20 kromosomi nastane embrio, ki se razvije v hčerinsko rastlino. Drugo spermalno jedro se združi z dvema polnima jedroma. V tej združitvi nastane triploidno jedro s 30 kromosomi (dve kromosomski garnituri prispeva materinska rastlina, eno pa očetovska). Po dvojni oploditvi so v embrionalni vrečki trije tipi celic glede na število kromosomov: triploidne celice endosperma, diploidne celice embria in haploidne antipode (Kiesselbach, 1949; Berger, 1999).

2.2.3 Razvoj endosperma

Triploidno jedro, ki je nastalo po dvojni oploditvi, se začne po 2 do 4 urah sinhrono deliti. Na tak način nastane sincicij z nekaj sto jedri. Tretji dan po oploditvi se začnejo okoli jeder oblikovati celične stene in četrty do peti dan je endosperm popolnoma celulariziran, celice so enojedrne. V endospermu je mitotska aktivnost največja med 8. in 10. dnevom po oploditvi. Okrog 12. dneva celične delitve v osrednjem delu endosperma prenehajo, na obrobju endosperma na nasprotni strani od embria pa se delijo še naprej. Delujejo kot meristemsko tkivo, ki celice oddeljuje v notranjost endosperma, celice v osrednjem delu pa se povečujejo in nalagajo škrob. Celične delitve prenehajo v valu, ki se začne v zgornjem delu endosperma, napreduje proti bazi in nato proti perifernim plastem endosperma. Okoli

20. do 25. dneva se ustavi vsa mitotska aktivnost v celotnem endospermu, razen v alevronski plasti (Lowe in Nelson, 1946; Kiesselbach, 1949; Kowles in Phillips, 1985; Kowles in Phillips, 1988; Berger, 1999, Young in Gallie, 2000). V času od 12. do 15. DPO razvoj endosperma preide v fazo zorenja, ko se začne nalaganje suhe snovi. V endospermu se zelo povečata izražanje in aktivnost encimov, povezanih s sintezo škroba in založnih proteinov. To obdobje traja do smrti celic v endospermu. Nalaganje škroba se začne v osrednjem delu endosperma, se razširi proti periferiji in nato proti bazi endosperma. Sinteza založnih proteinov sledi vzorcu nalaganja škroba, največ založnih proteinov pa se naloži v perifernih plasteh endosperma (Tsai in sod., 1970; Kowles in Phillips, 1988; Doehlert in sod., 1994). Celice endosperma odmrejo v poznem razvoju. Programirana celična smrt se začne okrog 16. DPO v osrednjem delu endosperma, do 24. DPO zajame apikalni del, nato pa se razširi še proti bazi endosperma. Po 20. DPO se začne v endospermu zmanjševati količina DNA, RNA in topnih proteinov (Kowles in Phillips, 1988; Young in sod., 1997, Young in Gallie, 2000). Celice v endospermu odmrejo, vendar njihova vsebina ne propade, ampak se ohrani v mumificiranem stanju. Razgradi se šele ob kalitvi s hidrolitskimi encimi iz alevronske plasti (Dangl in sod., 2000). Celice v alevronski plasti (najbolj zunanja plast celic v endospermu) ostanejo žive in propadejo šele po kalitvi (Haberlandt, 1884, cit. po Fath in sod., 2000). Programirano odmiranje celic so opazili že zgodaj v razvoju kariopse pšenice tudi v materinskem tkivu perikarpa in nucela, ki odmirata, da naredita prostor za hitro rastoči endosperm (Young in Gallie, 2000).

V procesu diferenciacije se celice v endospermu endopoliploidizirajo. Endoreduplikacija se začne okrog 10. DPO (razvoj kariopse koruze so navadno merili v dnevih po opraitvi - DPO, oploditev sledi v enem dnevu) in doseže vrh 16-18 DPO (Kowles in Phillips, 1985). Vsebnost DNA v normalnih delečih se triploidnih celicah v fazi celičnega cikla G_1 je 3 C, v fazi G_2 pa 6 C. Vrednost 1 C je količina DNA v nepodvojenem haploidnem genomu (Swift, 1950). Vsebnost DNA v jedrih celic, ki so že končale en cikel endoreduplikacije, je 6 C. Stopnja endopoliploidnosti največjih centralnih celic je 96 C do 192 C, redko več, kar so ocenili z meritvami prostornine jeder (Tschermak-Woess in Enzenberg-Kunz, 1965), citometrijo jeder, barvanih po Feulgenju (Kowles in Phillips, 1985) in pretočno citometrijo z uporabo fluorescentnih barvil za DNA (Kowles in sod., 1992; Schweizer in sod., 1995; Larkins in sod., 2001; Setter in Flannigan, 2001). Število celic v endospermu je rezultat

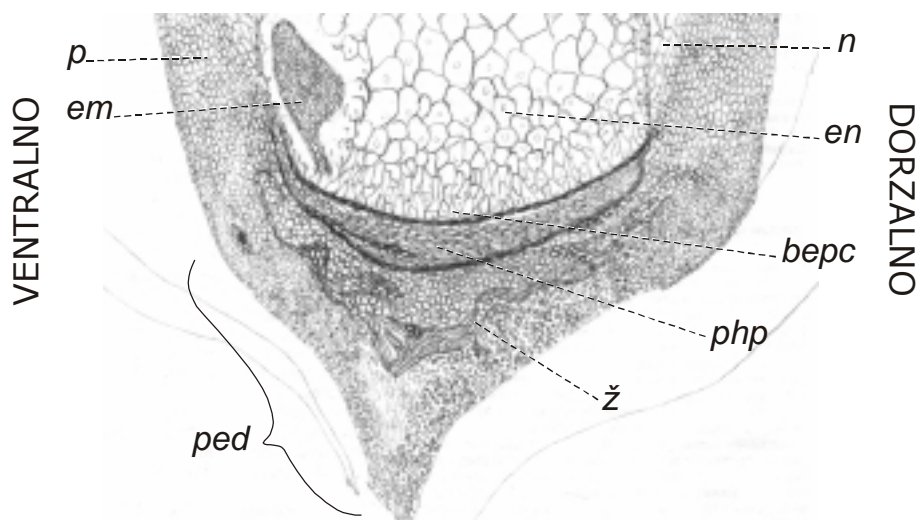
mitotske aktivnosti in je pomemben podatek za razumevanje razvoja endosperma. Pri 16. DPO naj bi doseglo najvišjo vrednost (Kowles in Phillips, 1988). Število celic v endospermu so ocenili s štetjem jeder 16 DPO s pretočno citometrijo ali s štetjem jeder s hemocitometrom po razgradnji tkiva s celulazami. V endospermu so ocenili od 54.000 do 880.000 celic (Jones in sod., 1985; Kowles in sod., 1992; Schweizer in sod., 1995; Setter in Flannigan, 2001).

2.2.4 Prenosne celice

Na bazi endosperma so celice specializirane v prenosne celice. Njihove celične stene so zelo nagubane. Stenam sledijo celične membrane, katerih površina je tako zelo povečana. V prenosnih celicah so našli za te celice specifičen izocim invertaze iz celične stene INCW2, ki je ionsko vezana na celično steno. Invertaza razgradi saharozo, ki po floemu pride v placento-halazno plast v pedicelu, nastali glukoza in fruktoza pa se s protonskimi simporterji monosaharidov transportirata v endosperm (Miller in Chourey, 1992; Shannon in sod., 1986). V prenosnih celicah koruze se specifično izražajo tudi majhni, defenzinom podobni peptidi, bogati s cisteinom, ki imajo protiglivično aktivnost. Ti peptidi se nalagajo tudi v placento-halazni plasti (Thompson in sod., 2001).

2.2.5 Placento-halazna plast

Placento-halazna plast (PHP) je materinsko tkivo tik pod bazalnim delom semenske zasnove oziroma pod bazo endosperma v poznejšem obdobju razvoja. PHP naj bi imela pomembno vlogo v prenosu vode, sladkorjev in drugih hranil v razvijajoče se seme (Felker in Shannon, 1980; Schel in sod., 1984; Thompson in sod., 2001). V času, ko se začne diferenciacija prenosnih celic (okoli 7 DPO), začnejo odmirati tudi celice v PHP (Shannon in sod., 1986). V zreli kariopsi je v predelu PHP razvita absrazijska plast, v kateri so naložene sekundarne spojine. Te jo temno obarvajo, zato jo imenujejo tudi »črna plast« (Kiesselbach, 1949). Slika 2.2 prikazuje skico bazalnega dela kariopse koruze, kjer je prikazana lokacija PHP.



Slika 2.2. Skica placento-halazne plasti v bazalnem delu kariopse, okrog 10 DPO.

Skica vzdolžnega prereza skozi kariopso koruze divjega tipa. *bepc* – bazalne endospermske prenosne celice, *em* – embrio, *en* – endosperm, *p* – perikarp, *php* – placento-halazna plast, *ped* – pedicel, *n* – ostanki nucela, *ž* – konci žil v pedicelu. Sliko narisala Karen Chamusco (Department of Plant Pathology, University of Florida, Gainesville, ZDA).

2.2.6 Mutanta *mn1*

Mutanto *mn1*, v kateri je prizadeto le zrno koruze, sta prvič opisala Lowe in Nelson (1946). Masa endosperma *mn1* je le petina mase endosperma divjega tipa, mutacija pa ne vpliva na samo rastlino koruze. Kariopsa mutante *mn1* ima »papirnat« in na vrhu ugreznjen perikarp (Lowe in Nelson, 1946). Vzrok takšnega fenotipa je izguba izocima invertaze iz celične stene INCW2, ki se specifično izraža v prenosnih celicah v bazalnem delu endosperma (Miller in Chourey, 1992; Cheng in sod., 1996). Zgodaj v razvoju mutante *mn1* (okrog 9 DPO) endosperm začne zaostajati v rasti, nato se bazalni del endosperma loči od materinskega tkiva pod njim (placento-halazna plast), ker materinsko tkivo propade. Med endospermom in placento-halazno plastjo nastane značilna razpoka (Miller in Chourey, 1992). Zakaj je ob mutaciji, specifični za filialno tkivo, prizadeto tudi tkivo materinske generacije, še ni znano.

2.3 Kalitev kariopse

Ob kalitvi embrio porabi hranila, ki so v endospermu. Hranila črpa s posebej prilagojenim prvim listom skutelumom. Plast skuteluma, ki je v stiku z endospermom, izloča encime za razgradnjo založnih snovi v endospermu. Drugi list, koleoptila, je spremenjen v ovoj okoli plumule, ki jo sestavlja nekaj pravih listov, zviti v stožec. Primarna korenina (radikula) je zaščitena z ovojem - koleorizo. Ob kalitvi se najprej začne podaljševati primarna korenina skupaj s koleorizo; skupaj predreta perikarp, nato pa korenina kmalu prodre tudi skozi koleorizo. Tudi plumula in koleoptila se podaljšata in predreta perikarp. Sprva koleoptila raste hitreje, nato pa se ustavi, ko pride v stik s svetlobo in plumula prodre skozi njen vrh. V tem času se pojavijo že prve adventivne korenine, ki poženejo iz stebra tik nad nodijem koleoptile, pozneje pa se razvijejo še dodatne adventivne korenine na višjih internodijih stebra. Te potem oblikujejo šopast koreninski sistem koruzne rastline (Kiesselbach, 1949). V raziskavah razvoja korenin so se veliko ukvarjali z razvojem primarne korenine, ki je najpomembnejša za mlado kalico. Korenina raste na apikalnem delu, ki je zaščiten s koreninsko čepico.

2.3.1 Koreninska čepica

Koreninska čepica opravlja več pomembnih nalog za rastlino. Apikalni meristem korenine ščiti pred poškodbami in vdorom patogenov, zaznava težnost, zmanjšuje upor korenine pri prodiranju v zemljo z luščenjem celic s površine čepice in izločanjem sluzi, s sluzjo tudi prilagaja fizikalno-kemijske razmere v rizosferi, omogoča komunikacijo z mikrobi in uravnava rast korenine v skladu s prejetimi signali (Barlow, 1975; Bengough in McKenzie, 1997; Hawes in sod., 2000).

Celice koreninske čepice koruze izvirajo iz kaliptrogena, ki je distalni del apikalnega meristema korenine. Celice kaliptrogena oddeljujejo celice v smeri rasti korenine, te pa se v procesu diferenciacije povečujejo (Kiesselbach, 1949). V nedelečih se jedrih zunaj meristemskega območja še vedno poteka sinteza DNA v ciklih endoreduplikacije (Barlow, 1976). Stopnja endopoliploidnosti celic se tako veča, ko se celica premika vedno bolj proti obrobju čepice, v skladu z delitvami v meristemu. Najbolj zunanje, najstarejše celice v

kolumeli (osrednji steber celic v čepici) vsebujejo jedra s 16 C DNA (Barlow, 1977). Celice v zunanjih plasteh čepice vsebujejo hipertrofirana Golgijeva telesa, ki oddeljujejo velike vezikle, napolnjene s polisaharidi. Ti so vključeni v nastajanje in izločanje sluzi (Moore in Jones, 1967). Pri koruzi je specifična in najpomembnejša sestavina sluzi koreninske čepice fukoza, izločeni polisaharidi pa vsebujejo še glukozo, galaktozo, arabinozo, ksilozo in manozo (Harris in Northcote, 1970; Chaboud, 1983; Bacic in sod., 1986; Osborn in sod., 1999). Velik del glukoze v sluzi je v prosti monosaharidni obliki (Osborn in sod., 1999). S sintezo sluzi se niso veliko ukvarjali, vendar sta Harris in Northcote (1970) predlagala biokemijsko pot za sintezo sluzi, izvedeno iz njene kemične sestave. Z radioaktivno označeno glukozo sta potrdila, da je glukozna prekurzor za sintezo fukoze. Predlagala sta, da naj bi se vse monosaharidne enote sluzi sintetizirale iz saharoze prek UDP-glukoze in D-fruktoze. V skladu s tem modelom so rezultati Ricarda in sod. (1998), po katerih naj bi bila saharoza, in ne heksoze, glavni vir ogljika v koreninah.

2.4 Rast in razvoj organov

Organizmi rastejo s celičnimi delitvami in povečevanjem celic. Potek in regulacija delitve celic je že dobro znana, vendar pa še ni ugotovljeno, od kje točno izvira signal, ki vodi delitev in rast celic, tako da izpolnijo genetsko določen morfogenetski načrt. Razvoj organizmov obravnavata dve glavni teoriji, »celična« in »organizemska«, ki pa naj sploh ne bi bili pravi alternativni, kot trdijo njuni zagovorniki (Tsukaya, 2002). Po celični teoriji so celice osnovni gradniki in rast organizmov je posledica povečevanja števila celic. Celice v meristemu naj bi se po svojem genetskem programu avtonomno delile in povečevale v določenem vzorcu, kar vodi do končne oblike organa. Po organizemski teoriji so celice le razdeljen prostor v organizmu in so celične delitve bolj posledica rasti organizma, kot pa so njen vzrok. Celične delitve so posledica povečevanja tkiva, ki ga z mitozami delijo na dele, ki jih lahko obvladajo posamezna jedra (Kaplan, 1992). Vendar pa niti znotraj enega organizma ni enosmerne povezave med delitvijo celic in rastjo organov; širjenje tkiva je lahko posledica delitve celic, delitve celic pa so lahko posledica širjenja tkiva (Jacobs, 1997). Ker sta obe omenjeni teoriji preveč strogo določeni, so Beemster in sod. (2003) predlagali nov model, ki ju povezuje. Celice so z delitvami in rastjo osnovne enote rastlinske morfogeneze, rastni procesi pa so nadzorovani na nivoju organa (organizma) z izmenjavo rastnih regulatorjev. Tako je dosežena povezava med dogajanjem v posameznih celicah in v celotnem organu, kar omogoča, na primer, nadomestitev prizadete celične delitve s povečanim širjenjem celic (Doonan, 2000). Takšen model je predlagal tudi Tsukaya (2002) in ga imenoval »neocelična teorija«.

Nastale celice se nato diferencirajo za opravljanje specifičnih nalog. Gradient razvoja so opazovali v kličnih listih boba (*Vicia faba*). Na enem koncu so bile mlade, mitotsko aktivne celice, na drugem pa starejše celice, ki so se podaljševale, pomnoževale genom z endoreduplikacijo in nalagale založne snovi (Weber in sod., 1997). V koreninski čepici so opazili gradient celic od mitotsko aktivnih nediferenciranih celic v meristemu prek osrednjih celic s statoliti, ki zaznavajo gravitacijo, do velikih zunanjih celic, ki izločajo sluz (Sievers in Braun, 1996).

2.4.1 Celični cikel in vrednost C

Celični cikel je proces, ki vodi do nastanka dveh hčerinskih celic. Razdeljen je na štiri faze: G1, S, G2 in M. V fazi S se podvoji DNA, v fazi M pa se jedro in celica delita. Med celičnim ciklom se spreminja količina jedrne DNA. Ponavadi količino jedrne DNA izražamo kot vrednost C, pri čemer C pomeni konstantno (angl. »constant«) vrednost. Vrednost 1 C je količina nepodvojenega haploidnega genoma osebk, na primer v jedrih tetrad po mejozi. Vrednost C je neodvisna od števila kromosomov, ki se znotraj vrste lahko spreminja zaradi poliploidnosti (Swift, 1950). V somatskih celicah sporofitov kritosemenk, ki se mitotsko delijo, jedra vsebujejo od 2 C (telofaza mitoze, faza G1) do 4 C DNA (faza G2, profaza mitoze). Vmesne vrednosti količine DNA pa jedra vsebujejo v S fazi, ko se DNA podvaja. Najmanjša in največja vrednost C znotraj posamezne stopnje ploidnosti sta v razmerju 1 : 2 (Bennet in Smith, 1976).

Glavni kontrolni mehanizmi, ki vodijo celični cikel, so evolucijsko skoraj nespremenjeni. Celični cikel v organizmih od kvasovk, rastlin do sesalcev vodijo serinske/treoninske kinaze z imenom od ciklinov odvisne kinaze. Njihova aktivnost je natančno uravnana, da vzdržujejo pravo časovno zaporedje procesov v delitvi celic. Na delovanje ciklinov in od ciklinov odvisnih kinaz vplivajo različni rastlinski hormoni in sladkorji. V nekaterih primerih se celični cikel spremeni v posebno obliko – endoreduplikacijo, ki vodi v endopoliploidizacijo celic (Stals in Inze, 2001).

2.4.2 Endoreduplikacija

Endoreduplikacija je najpogostejši mehanizem, ki vodi do endopoliploidnih celic. Endopoliploidija je obstoj celic z različno stopnjo ploidnosti v sosednjih celicah v istem organizmu in se pogosto pojavlja pri rastlinah, razširjena pa je tudi pri praživalih (protistih), členonožcih, mehkužcih in sesalcih. Nagl (1976) sklepa, da se endopoliploidnost pojavlja pri vrstah z majhnim genomom, ker naj bi bila za nekatere celične funkcije potrebna večja količina jedrne DNA. Vendar te povezave pozneje niso nedvoumno dokazali, saj se je pokazala le šibka negativna korelacija med osnovno količino DNA v jedrih in stopnjo endopoliploidnosti (Barlow, 1978; Barow in Meister,

2003). Najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na pojav endopoliploidnosti, je taksonomski položaj vrste (Barow in Meister, 2003).

Endoreduplikacija je spremenjen celični cikel, v katerem se DNA podvaja, vendar se jedro in celica ne delita. To vodi v nastanek kromosomov z 2^n kromatidami (n se povečuje s številom endociklov), število kromosomov pa ostane nespremenjeno. V endoreduplikaciji sodeluje večina komponent normalnega celičnega cikla, spremenjena je le regulacija njihovega izražanja (Traas in sod., 1998; Joubes in Chevalier, 2000). Pravi pomen endopoliploidizacije še ni znan, obstaja pa tesna povezava med stopnjo ploidnosti in velikostjo celic (Melaragno in sod., 1993; Kondorosi in sod., 2000). Poskusi na kvasovkah so pokazali spremenjeno izražanje genov v izogenih sevih, ki so se razlikovali le po stopnji ploidnosti. Pri njih je bila korelacija izražanja s ploidnostjo za nekatere gene pozitivna, za nekatere pa negativna (Galitski in sod., 1999). Endoreduplikacija v rastlinskih tkivih je tesno povezana s procesom diferenciacije celic. Te naj bi se z endopoliploidizacijo pripravile na poznejše povečanje prostornine (Traas in sod., 1998), povečala naj bi se tudi njihova metabolna aktivnost (Baluška in Kubica, 1992). Ob tem celice izgubijo sposobnost celične delitve (Barlow, 1978).

2.4.3 Programirana celična smrt v razvoju rastlin

V živalskih celicah programirana celična smrt (PCS) poteka kot apoptoza: začne se s krčenjem celice in kondenzacijo kromatina, nato se jedro in pozneje vsa celica razgradi in razdeli v apoptotska telesa, ki jih fagocitirajo sosednje celice. Značilna je razgradnja DNA z endonukleazami v fragmente z velikostjo mnogokratnika 180 baznih parov, kar je vidno na elektroforetskem gelu kot lestvica. Tako razgrajeno DNA lahko zaznamo z reakcijo TUNEL, v kateri se z encimom terminalno deoksinukleotidil transferazo na proste 3' OH konce vežejo označeni nukleotidi.

Apoptoza je bila opisana pri živalih od glist do sesalcev, pri rastlinah pa je ni ali je vsaj zelo redka. Ironično pa beseda »apoptosis« izvirata iz rastlinskega sveta – je grška beseda, ki pomeni odpadanje cvetnih listov in listov z dreves (Dangl in sod., 2000). Pri rastlinah so opazili krčenje celic in kondenzacijo kromatina, našli so kaspazam podobne encime, opazili so tudi razrez DNA v lestvico, vendar se namesto izraza apoptoza bolj uporablja

»apoptozi podobna« celična smrt. Ostanke rastlinskih celic sosednje celice namreč ne fagocitirajo, ker to zaradi celičnih sten ni mogoče (Danon in sod., 2000). Kljub temu so opazili zbiranje vsebine celice v telesca, podobna apoptotskim, v programirani celični smrti, ki je sledila delovanju toksinov (Wang in sod., 1996) in v nastajanju aerenhima v koreninah (Gunawardena in sod., 2001)

Na tak način v rastlinah odmirajo celice, ki so odslužile svojo vlogo, kot so celice endosperma, suspensorja embria, celice koreninske čepice, celice v procesu senescence in celice, vključene v abscizijo rastlinskih delov, vegetativna celica peloda, sinergide, antipode in še druge. Celice, ki šele po smrti začnejo opravljati svojo funkcijo, pa programirano odmrejo po poti, ki se zelo razlikuje od apoptotske poti pri živalih. Tak primer so elementi trahej v ksilemu, nekateri trihomi, sklereide in sklerenhimska vlakna (Krishnamurthy in sod., 2000). Celice trahej se pred smrtjo povečajo, navadno je vključena tudi endopoliploidizacija, sintetizirajo sekundarno celično steno, nato pa se njihova vsebina hitro razgradi s hidrolitskimi encimi iz vakuole (Obara in sod., 2001). Po poti PCS, vendar po drugačnih mehanizmih, odmrejo tudi celice pri nastajanju aerenhima v koreninah, celice alevronske plasti semena ob kalitvi in celice v preobčutljivostni reakciji, ki s smrtjo nekaj celic na mestu vdora patogena omeji njegovo razširitev po rastlini (Pennel in Lamb, 1997; Dangl, 2000).

Celicam endosperma je usojeno, da odmrejo pred zrelostjo kariopse, vendar se za razliko od skoraj vseh drugih evkariotskih celic, v katerih poteka PCS, njihova vsebina ne razgradi in mrtve celice obdržijo jedra in organele. Celična trupla ostanejo v mumificiranem stanju in se razgradijo šele ob kalitvi (Dangl, 2000). PCS se začne v centralnem delu endosperma okrog 16 DPO, v predelu celic z najvišjo stopnjo endopoliploidnosti, nato napreduje proti zgornjemu delu kariopse, na koncu se razširi še proti bazi. Razrez DNA v obliki lestvice, značilne za apoptotski tip celične smrti, so opazili okrog 28 DPO in pozneje (Young in sod., 1997; Young in Gallie, 2000). Že v zgodnjem razvoju (okrog 7 DPO) so z elektronsko mikroskopijo opazili propadanje celic endosperma, ki obdajajo embrio (Schel in sod., 1984). Giuliani in sod. (2002) pa so opisali PCS v embriogenezi v strukturah, ki ne prispevajo k poznejši zgradbi rastline.

2.5 Vloga sladkorjev v razvoju rastlin

Rastline proizvajajo sladkorje v procesu fotosinteze in jih potem uporabljajo kot substrate v metabolizmu in gradnike celic. Da so ti procesi usklajeni, vključene gene uravnavajo tudi sladkorji. Ti prek različnih mehanizmov zaznavanja v celici usmerjajo izražanje genov, aktivnost encimov in razvoj celic. Sladkorji vplivajo na fotosintezo, glikolizo, gliksilatni metabolizem, metabolizem dušika, metabolizem saharoze in škroba, obrambne procese in celični cikel. Na procese ne vplivajo s samo prisotnostjo, temveč verjetneje preko reakcij njihovega metabolizma. Mesta zaznavanja so verjetno različni transporterji sladkorjev in reakcija s heksokinazo (Koch, 1996; Jang in Sheen, 1997; Smeekens, 2000). Saharoza je oblika sladkorjev za transport na velike razdalje po rastlini, služi pa tudi kot signalna molekula, ki uravnava izražanje genov v različnih tkivih. Uravnalno deluje na gene za založne proteine, sintezo škroba in nekatere obrambne proteine (Jang in Sheen, 1997; Weber in sod., 1997; Smeekens, 2000). Saharoza in heksoze večkrat enako učinkujejo na procese v rastlini, zato v literaturi mnogokrat opisujejo le »vpliv sladkorjev« na nek proces. Vendar pa so Weber in sod. (1996) opazili različen vpliv heksoz in saharoze v razvijajočem se semenu boba (*Vicia faba*): heksoze so pozitivno vplivale na celične delitve, saharoza pa je sprožila založne procese.

Sladkorji v obliki polisaharidov so pomembni kot gradniki rastlinskih celic in kot založne snovi. UDP-glukoza, ki nastane iz saharoze, je prekursor za sintezo celuloze (Amor in sod., 1995). Domnevajo tudi, da je prekursor za sintezo polisaharidov v sluzi koreninske čepice (Harris in Northcote, 1970). Saharoza, ki po floemu pride do razvijajoče se kariopse, se porabi v sintezi škroba. Encima, ki sta vključena v mobilizacijo saharoze v različne metabolne procese, sta saharoza sintaza in invertaza (Sturm in Tang, 1999).

2.5.1 Invertaza

Invertaza (β -fruktofuranozidaza, EC 3.2.1.26) je encim, ki nepovratno cepi saharozo v glukozo in fruktozo. Fiziološka vloga invertaze naj bi bila razporejanje saharoze med fotosintetskim izvorom in ponorom v rastlini (Eschrich, 1980). Weber in sod. (1997) domnevajo, da naj bi bila invertaza ključnega pomena pri razvoju semena. Invertaza je v

dveh oblikah: topni (v vakuoli in citoplazmi) in ionsko vezani na celično steno (Sturm, 1999). Obe obliki imata več izocimov. V razvoju kariopse koruze je na celično steno vezana oblika veliko bolj aktivna kot topna oblika, saj je odgovorna za 90 % vse invertazne aktivnosti (Cheng in sod., 1996). Izocim INCW2 se specifično izraža v celicah na bazi endosperma, ki so specializirane za prenos hranilnih snovi v razvijajoči se endosperm (Cheng in sod., 1996). Aktivnost invertaze doseže vrh okrog 12 dni po opraitvi, nato upade (Tsai in sod., 1970; Cheng in sod., 1996). Z avtoradiografskimi metodami so ugotovili, da se saharoza v pedicelu odlaga iz floema, tam pa se razgradi na glukozo in fruktozo. Večina vseh sladkorjev v placento-halazni plasti je v obliki heksoz, ki se transportirajo v endosperm, kjer se saharoza deloma ponovno sintetizira (Shannon, 1968; Porter in sod., 1985).

V koruzi in bobu (*Vicia faba*) naj bi invertaza z razgradnjo saharoze v zgodnjem razvoju semena igrala pomembno vlogo v zagotavljanju heksoz, ki vzdržujejo mitotske delitve in le manjšo vlogo v zagotavljanju substratov za sintezo škroba (Weber in sod., 1997; Cheng in Chourey, 1999). Vrh aktivnosti INCW2 je 12. DPO, kar se ujema s fazo intenzivnih celičnih delitev v endospermu (Cheng in sod., 1996; Cheng in Chourey, 1999).

Velika večina aktivnosti INCW2 je pogrešljiva, saj so z analizo mutant z zmanjšanim izražanjem določili, da že okoli 6 % aktivnosti invertaze v primerjavi z aktivnostjo v divjem tipu zadostuje za razvoj normalnega fenotipa (Cheng in sod., 1996). V mutantah *mn1* brez invertaze v bazalnih celicah endosperma pa se razvije fenotip *miniature-1*. Mutante imajo zelo zmanjšana zrna z nagubanim perikarpom, endosperm pa se loči od propadajočega materinskega tkiva placento-halazne plasti (Miller in Chourey, 1992). V placento-halazni plasti mutant *mn1* je bilo veliko več saharoze v primerjavi z *Mn1*, manj pa je bilo glukoze in fruktoze (Zhou, 2000).

2.5.2 Saharoza sintaza

Saharoza sintaza (UDP-glukoza:D-fruktoza 2- α -D-glukoziltransferaza, EC 2.4.1.13) je encim, ki katalizira reverzibilno pretvorbo saharoze in UDP v fruktozo in UDP-glukozo. Ima pomembno vlogo v metabolizmu, saj saharozo usmerja v različne biokemijske poti, povezane z metabolnimi, strukturnimi in založnimi procesi v rastlinskih celicah.

Biokemijske in genetske raziskave kažejo, da je *in vivo* vloga saharoza sintaze produkcija UDP-glukoze, ki je prekursor za sintezo UDP-galaktoze, škroba, celuloze in kaloze (Amor in sod., 1995; Ruan in sod., 1997; Chourey in sod., 1998; Sturm in Tang, 1999). V vseh doslej raziskanih rastlinskih vrstah so našli dva ali več homolognih genov (ortologov), ki vodijo do različnih izocimov saharoza sintaze, ki imajo navadno tkivno in celično značilne vzorce izražanja. V koruzi so opisali tri gene za saharoza sintazo: *Sus1*, *Sh1* in *Sus3*. Prva dva prispevata več kot 99 % vseh proteinov saharoza sintaze v različnih tkivih (Carlson in sod., 2002). V mladih koreninah se izražata SUS1 in SH1 izocima, vendar so v koreninski čepici zaznali le SUS1 protein (Rowland in sod., 1989). Podobno se le en gen za saharoza sintazo izraža v koreninskih čepicah ječmena (Guerin in Carbonero, 1997) in krompirja (Fu in Park, 1995). Imunolokalizacijske študije so pokazale večjo koncentracijo saharoza sintaze v zunanjih celicah koreninske čepice koruze (Kladnik, 1999).

2.6 Namen dela

Na mikroskopski ravni smo želeli proučiti nekatere procese, ki so vključeni v razvoj koruze. Raziskovali smo procese v bazalnem delu zrna, kjer poteka prenos asimilatov iz materinskega tkiva v endosperm, in ugotavljali, če ter kako, so ti procesi povezani z majhnostjo endosperma mutante *mn1*. Nadalje smo želeli ugotoviti, kako je saharoza sintaza povezana z diferenciacijo celic v koreninski čepici.

Da bi razvojne procese kvantitativno proučili na ravni celotnega tkiva, smo želeli izdelati modele za ovrednotenje citoloških parametrov v treh dimenzijah.

V delu smo preverjali naslednje hipoteze:

- (1) Endosperm mutante *mn1* je manjši zaradi manjšega števila celic in manjše rasti celic, posledično pa imajo celice endosperma *mn1* tudi manjšo stopnjo endoreduplikacije.
- (2) V nastanek razpoke med endospermom in materinskim tkivom v mutanti *mn1* je vključena programirana celična smrt. Zaradi razpoke se prekine dotok hranil in rast endosperma se ustavi. Programirana celična smrt je vključena tudi v nastanek abscizijske plasti v poznem razvoju kariopse v obeh genotipih.
- (3) Glede na znano sestavo polisaharidne sluzi koreninske čepice je vloga saharoza sintaze v koreninski čepici zagotavljanje sladkornih monomerov za sintezo sluzi. Nalaganje saharoza sintaze v celicah koreninske čepice je povezano z diferenciacijo celic in je večje v celicah z višjo stopnjo endopoliploidnosti.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Rastlinski material

3.1.1 Opis rastlin

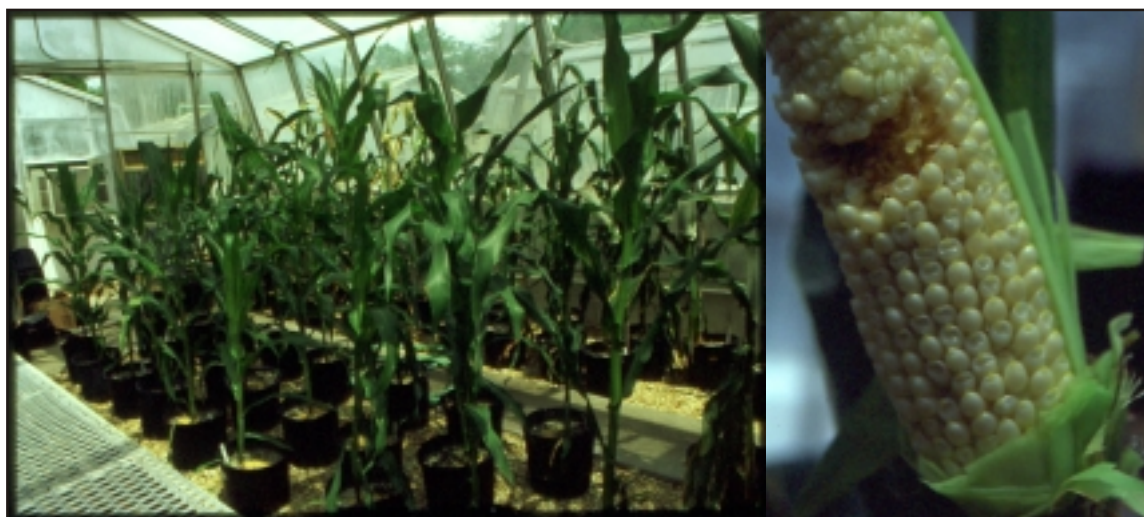
V raziskavi smo uporabili rastline koruze (*Zea mays* L.), »incestne« linije W22 (Wisconsin 22). Genotipi rastlin so bili *Mn1 Mn1* (divji tip), *mn1 mn1* (mutanta invertaze iz celične stene INCW2) in *Mn1 mn1* (heterozigot). Zrna, iz katerih smo vzgojili rastline, je prispeval dr. Prem S. Chourey iz Oddelka za rastlinsko patologijo na univerzi University of Florida, Gainesville, Florida, ZDA.

3.1.2 Vzgoja rastlin do zrelosti

Rastline smo vzgojili v dveh sezonskih serijah na polju in v rastlinjaku dr. Choureyja. Prva serija rastlin je bila vzgojena na polju in je bila zrela za opraševanje v maju leta 2001. Iz te serije smo uporabili kariopse, izrezane iz storžev 16 dni po oprašitvi (DPO), v katerih smo izmerili stopnjo endopoliploidnosti in velikost celic v endospermu. Druga serija rastlin je bila vzgojena v rastlinjaku in je bila zrela za opraševanje konec marca in v aprilu leta 2002. Iz te serije smo uporabili kariopse za merjenje stopnje endopoliploidnosti in velikosti celic v endospermu 4 do 12 DPO in za vsa ostala histološka barvanja preparatov kariops od 0 do 28 DPO. Rastline v rastlinjaku smo vzgojili v prsti za lončnice v 15-litrskih loncih. Zalivali smo jih vsak dan, enkrat na teden smo dodali umetno gnojilo Osmocote. Dnevno-nočni ritem je bil naraven (rastlinjak je bil steklen, brez umetne osvetlitve).

Na vsaki rastlini sta pognali dve karpelni socvetji, ki smo ju pokrili z vrečko iz povoščenega papirja (»shoot bag«, 7 × 20 cm), da smo preprečili nekontrolirano oprašitev. Oprašili smo le socvetje, ki je bilo večje (navadno zgornje). V nekaj dneh so iz socvetja pognali laski (vratovi plodnic). Z britvico smo odrezali konce laskov skupaj s konicami listov, ki ovijajo socvetje. Do naslednjega dne so laski zrasli za nekaj centimetrov. Na tak način smo dosegli enako višino laskov, kar je olajšalo nanos peloda na vse vratove plodnic.

Vrh stebela smo previdno upognili v vodoravno lego, na prašnično socvetje namestili večjo papirnato vrečko (20×40 cm) in odločno stresli pelod v vrečko. Rastline divjega tipa in mutante *mn1 mn1* smo oprašili s pelodom iz iste rastline (samooprašitev) oziroma s pelodom rastlin enakega genotipa (v primeru rastlin divjega tipa, ki so imele zelo malo peloda). Rastline *Mn1 mn1* smo oprašili s pelodom *mn1* (iz rastlin *mn1 mn1*). V tem primeru je bila generacija potomcev deljena 1 : 1. Polovica potomcev je imela genotip endosperma *Mn1 Mn1 mn1* in enak fenotip kot divji tip, saj že ena sama kopija *Mn1* gena zadostuje za razvoj normalnega fenotipa (Cheng in sod., 1996). Druga polovica potomcev z genotipom *mn1 mn1 mn1* pa je imela fenotip *miniature-1* (Slika 3.1).



Slika 3.1. Vzgoja rastlin koruze v rastlinjaku in storž koruze z 1 : 1 deljenim potomstvom, 12 DPO.

Polovica kariops v storžu ima normalen fenotip (genotip endosperma *Mn1 Mn1 mn1*), druga polovica pa fenotip *miniature-1* (majhne zgubane kariope, genotip endosperma *mn1 mn1 mn1*). Iz zgornjega dela storža smo s skalpelom izrezali razvijajoče se kariope.

Na eni od rastlin divjega tipa smo karpelno socvetje oprašili s pelodom *mn1*; v tem primeru so imeli vsi potomci genotip endosperma *Mn1 Mn1 mn1* in fenotip divjega tipa. Iz te rastline smo zaradi pomanjkanja kariops z genotipom endosperma *Mn1 Mn1 Mn1* uporabili kariopso 10 DPO (s fenotipom divjega tipa) za analizo stopnje endopoliploidnosti in velikosti celic. Po oprašitvi smo karpelno socvetje spet pokrili z vrečko, na kateri smo označili datum oprašitve in genotipa starševskih rastlin (v primeru samooprašitve samo z

znakom ⊗). Oploditve se zgodi v enem dnevu po opraitvi (Kiesselbach, 1949). Čas po opraitvi smo uporabili kot merilo razvoja kariopse. Starost kariops smo označevali kot »dnevi po opraitvi« – DPO. Po opraitvi smo v razmakih po 2 dni s skalpelom izrezovali razvijajoče se kariopse iz storža in jih fiksirali, kot je opisano v poglavju 3.2.1.2.

3.1.3 Vzgoja kalic

Kalice koruze divjega tipa (*Zea mays* L., linija W22) smo gojili v sterilnih in nesterilnih razmerah v prsti in v vodi. Polovico zrn smo površinsko sterilizirali v 25-odstotni (v/v) razredčini komercialnega natrijevega hipoklorita (Šampionka Renče, Slovenija) z destilirano vodo s 15-minutnim mešanjem na magnetnem mešalu. Nato smo zrna sprali s sterilno destilirano vodo, jih sterilno imbibirali in dali kaliti v velike petrijevke na vlažen filtrirni papir. Drugo polovico zrn smo imbibirali v nesterilni vodi in dali kaliti v petrijevke na vlažen filtrirni papir. Kalitev je potekala v temi pri sobni temperaturi. Ko so bile radikule kalic dolge 20–30 mm, smo jih prenesli v sterilizirano ali nesterilizirano prst oziroma vodo. Kalice v vodi smo namestili na stiroporne splave z luknjami; skozi luknjo je rastla primarna korenina, zrno in koleoptila pa sta bila na zraku. V prsti oziroma vodi so kalice rastle še 3 dni v temi, nato smo izmerili dolžino primarne korenine in koreninski vršiček fiksirali v FAA (glej 3.2.1.3).

3.2 Priprava preparatov

3.2.1 Fiksacija rastlinskega materiala

3.2.1.1 Formalin – očetna kislina – etanol (FAA)

FAA (v literaturi opisan kot »*formalin acetic acid*«) je najpogosteje uporabljeni fiksativ v rastlinski histologiji. Sestavljen je tako, da so učinki sestavin na tkivo uravnoteženi. Formalin zamreži proteine in prepreči njihovo precipitacijo v etanolu, skupaj jih naredita netopne, vendar pa dobro ne ohranita nukleoproteinov, zato je za fiksacijo jedra dodana še očetna kislina. Alkohol skrči celice, očetna kislina povzroča nabrekanje; alkohol in formalin otrdita tkivo, očetna kislina pa preprečuje otrditev. FAA dobro ohrani jedra, vendar pogosto skrči protoplaste (Jensen, 1962). Fiksativ smo pripravili tik pred uporabo in ga ohladili na 4 °C, ali pa smo ga krajši čas hranili v hladilniku pri 4 °C.

FAA fiksativ (100 ml). Zmešaj 50 ml 96-odstotnega etanola, 35 ml destilirane vode, 10 ml 37-odstotnega formaldehida in 5 ml koncentrirane očetne kisline (led očetne kisline).

3.2.1.2 Fiksiranje kariops

V rastlinjaku smo razvijajoče se kariopse fiksirali v hladnem fiksativu FAA v 20-mililitrskih stekleničkah na ledu. Pred fiksacijo smo kariopsam odrezali lateralni strani, tako da je ostal okoli 3 mm debel mediani del. Stekleničke smo prenesli v laboratorij in jih izpostavili vakuumu (namizna oljna vakuumska črpalka) za 15 minut, da je iz tkiva izšel zrak. Če se tkivo ni potopilo v fiksativu, ko smo izpustili vakuum, smo ga ponovno vzpostavili in izpustili. Kariopse smo fiksirali 16 do 20 ur pri 4 °C v hladilniku in naslednji dan še 6 ur postfiksirali v Farmerjevem fiksativu (mešanica 3 : 1 absolutni etanol : led očetna kislina). Po fiksaciji smo tkivo prenesli v 96-odstotni etanol in shranili pri -20 °C.

3.2.1.3 Fiksiranje kalic

Pred fiksacijo smo primarne korenine kalic, ki so rastle v prsti, previdno sprali v vodi. Terminalne dele primarnih korenin (približno 3 mm) smo odrezali s skalpelom, prenesli v 20-mililitrske stekleničke s hladnim FAA fiksativom in izpostavili vakuumu (vodna vakuumska črpalka) za 15 minut, da je iz tkiva izšel zrak. Če se tkivo ni potopilo v fiksativu, ko smo izpustili vakuum, smo ga ponovno vzpostavili in izpustili. Koreninske vršičke smo fiksirali 24 ur pri 4 °C v hladilniku.

3.2.2 Priprava rezin

3.2.2.1 Dehidracija vzorcev

Vzorci, fiksirane v FAA, smo dehidrirali v seriji razredčin terciarnega butilnega alkohola (TBA; Sigma, ZDA) in etanola, vsak korak po 1 dan. Vzorce, ki so bili shranjeni v 96-odstotnem etanolu smo dehidrirali od 4. koraka naprej. Dehidracija je potekala pri sobni temperaturi, od 6. koraka naprej pa v inkubacijski pečici pri 56–60 °C, ker čisti TBA pri sobni temperaturi kristalizira (temperatura tališča 25,5 °C; ChemFinder.Com, 2003). Med dehidracijo je tkivo ostalo v istih stekleničkah, razredčine smo menjali s plastičnimi pipetami za enkratno uporabo.

TBA razredčine (100 ml vsaka):

1. 10 ml TBA, 40 ml 96-odstotnega EtOH, 50 ml dH₂O
2. 20 ml TBA, 50 ml 96-odstotnega EtOH, 30 ml dH₂O
3. 35 ml TBA, 50 ml 96-odstotnega EtOH, 15 ml dH₂O
4. 55 ml TBA, 45 ml 96-odstotnega EtOH
5. 75 ml TBA, 25 ml 96-odstotnega EtOH
6. 100 ml TBA
7. 100 ml TBA (v tem koraku se lahko v TBA doda kapljica safranina ali eozina, ki obarva tkivo, kar olajša rezanje na mikrotomu)
8. 100 ml TBA

3.2.2.2 Vklapljanje v parafin

Stekleničke z vzorci v TBA v inkubacijski pečici smo napolnili s koščki prečiščenega parafina Paraplast Plus (Sherwood Medical, ZDA), ki se je v 24 urah stopil in zmešal s TBA. Stekleničke so ostale odprte, tako da je TBA počasi izhlapeval. Naslednji dan smo parafin/TBA nadomestili s svežim parafinom in nato še dvakrat v razmaku 12 ur. Ko vsebina stekleničke ni imela več vonja po TBA, smo vzorce vključili v parafinske bloke. Vključevanje je potekalo na topli plošči, na kateri je bil iz aluminijaste folije postavljen pokrit in s treh strani zaprt prostor, ki je zadrževal toploto. S pinceto, segreto na alkoholnem gorilniku, smo vzorec iz stekleničke prenesli v staljen parafin v kovinskem modelu, prekrili s plastičnim nosilcem, zalili s parafinom, postavili najprej v mrzlo vodo za 20 minut, nato pa na led, da se je parafinski blok ločil od modela. Parafinske bloke smo shranjevali pri sobni temperaturi, ob težavah pri rezanju (kompresija rezin, parafinski trak se ne oblikuje) pa smo jih ohladili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.2.3 Rezanje na mikrotomu

Mikroskopske rezine smo pripravili na rotacijskem mikrotomu Autocut 2040 (Reichert-Jung, Nemčija) z zamenljivimi rezili za enkratno uporabo. Parafinski blok smo z britvico trapezoidno obrezali okrog vzorca, tako da sta bili vzporedni stranici bloka vzporedni z rezilom. Ob rezanju se je oblikoval trak, ki smo ga razrezali na majhne skupine rezin. Rezine smo nanесли na destilirano vodo na čistih objektnih stekelcih na topli plošči (40 °C) in pustili, da so se posušile in prilepile na stekelca (navadno okrog 24 ur). Debeline rezin razvijajočih se kariops za merjenje ploidnosti so bile 12 µm za 4. DPO, 16 µm za 6. DPO in 20 µm za 8. do 16. DPO (kompromis med tem, da rezine vsebujejo velika jedra in da se majhna jedra še ne prekrivajo med sabo), enake debeline so bile uporabljene tudi za druga barvanja. Pri barvanju z reakcijo TUNEL so bila rezine kariops debele 10 µm. Debelina rezin koreninskih vršičkov, uporabljenih za merjenje ploidnosti, je bila 16 µm, za imunolokalizacijo SUS1 pa 10 µm.

3.3 Histokemične reakcije

3.3.1 Kvantitativno barvanje DNA po Feulgenu

Metodo smo uporabili za merjenje ploidnosti jeder v tkivnih rezinah. Pri barvanju s Feulgenovo reakcijo se jedra rdeče obarvajo po vezavi Schiffovega reagenta na najmanj dve aldehydni skupini, nastali po odstranitvi purinskih baz adenina in gvanina iz DNA s kislom hidrolizo. DNA se s Feulgenovo reakcijo barva kvantitativno (Feulgen in Rossenbeck, 1924). Uporabili smo postopek, prilagojen po Greilhuberju in Temsch (2001), s podaljšanim časom kisle hidrolize zaradi formaldehidne fiksacije (Greilhuber osebna komunikacija; Fox, 1969).

Parafinske rezine na objektnih stekelcih smo barvali v Coplinovih kozarcih (prostornina tekočine 40 ml, stekelca stojijo pokončno v raztopini, konec stekelca z oznakami ostane suh). Iz rezin smo najprej odstranili parafin s ksilenom (2 × 5 minut). Nato je sledila rehidracija v vrsti razredčin etanola (100-, 96-, 70-, 30-odstotni, vsak korak po 5 minut, pri sobni temperaturi) do destilirane vode. Hidroliza je potekala v 5 M HCl (kalibrirana razredčina, Merck, Nemčija) 75 minut v vodni kopeli pri 20 °C, nato smo jo ustavili v ledeno mrzli destilirani vodi (5 min). Barvanje s Schiffovim reagentom je trajalo 120 minut pri 20 °C, nato smo prebitek barvila odstranili s spiranjem v SO₂-vodi (0,5-odstotni K₂S₂O₅ v 50 mM HCl, 2 × 2 minuti, 2 × 10 minut, 20 minut), rezine sprali v destilirani vodi (3 minute), dehidrirali v obratni etanolni vrsti (vsak korak po 5 minut) do ksilena (2 × 5 minut) in pokrili s krovnim sredstvom za pripravo trajnih preparatov DPX (Fisons, VB) ter krovnim stekelcem.

Priprava Schiffovega reagenta. V 800 ml vrele destilirane vode raztopi 4 g pararosanilin klorida (Sigma, ZDA), premešaj in ohladi na 50 °C. Raztopino vakuumsko prefiltriraj prek dvojnega filtra iz steklenih vlaken (GF/C, Ø 90 mm; Whatman, VB), raztopini dodaj 120 ml 1 M HCl in 12 g K₂S₂O₅ (Merck, Nemčija) in pusti čez noč v temi pri sobni temperaturi. Naslednji dan raztopini dodaj 4 g aktivnega oglja za razbarvanje (Sigma, ZDA), premešaj in nato vakuumsko prefiltriraj prek dvojnega filtra iz steklenih vlaken v suho steklenico (barvilo mora biti prozorno). Schiffov reagent hrani v hladilniku pri 4 °C.

Priprava SO₂-vode (250 ml). V 248 ml destilirane vode odpipetiraj 2,5 ml 5 M HCl. V digestoriju dodaj 1,25 g K₂S₂O₅ (Merck, Nemčija) in premešaj.

3.3.2 Barvanje DNA z DAPI

Fluorokrom DAPI (*4',6' diamino-2-phenylindole-2HCl*) se veže v mali žleb dvovertične DNA, predvsem na AT zaporedja (Kubista, 1987). Ob vezavi na DNA se fluorescenca DAPI poveča za okoli 20-krat (Barcellona in sod., 1990). Ob ekscitaciji z UV svetlobo (ekscitacijski maksimum 358 nm) oddaja modro fluorescenco (emisijski maksimum 461 nm). V tkivnih rezinah specifično barva jedra.

Iz rezin smo odstranili parafin v ksilenu (2×5 minut), rezine rehidrirali v padajoči etanolni vrsti (100-, 96-odstotni etanol po 5 minut, 70-, 30-odstotni etanol, destilirana voda po 3 minute) in uravnovežili v McIlvaineovem pufru pH 7 (5 minut). Okoli rezin smo popivnali odvečno tekočino, nanje nanесли raztopino DAPI (600 nM) za barvanje in inkubirali 15 minut v temi pri sobni temperaturi. Nato smo rezine sprali z destilirano vodo in pokrili s krovnim stekelcem.

Če je bilo barvanje z DAPI zadnji korak v postopku barvanja (na primer po koncu barvanja z reakcijo TUNEL), smo DAPI dodali v vodni pokrivni medij Gel Mount (Sigma, ZDA). Če preparat ni bil v pufru z vrednostjo pH blizu 7 (na primer McIlvaineov pufer ali PBS), smo preparat uravnovežili z inkubacijo v McIlvaineovem pufru (5 minut). Z objektnega stekelca smo popivnali odvečno tekočino, nanесли dve ločeni kapljici Gel Mount-DAPI in pokrili s krovnim stekelcem. Slike preparatov smo posneli z UV ekscitacijo. Modra barva fluorescence jeder in celičnih sten na črnem ozadju ne omogoča zadostnega kontrasta za natančno pregledovanje slik. Zato smo za boljšo vidljivost struktur v nekaterih primerih slike pretvorili v siv negativ, kot v metodi merjenja velikosti celic (glej 3.6.3.1).

Založna raztopina DAPI (1000×). 0,2 mg DAPI (Sigma, ZDA) raztopi v 1 ml destilirane vode. Krajši čas hrani pri 4 °C v temi, za daljše shranjevanje razdeli na alikvote in shrani v zmrzovalniku pri -20 °C.

McIlvaineov pufer (pH 7,0). Pred uporabo zmešaj 8 delov 0,2 M Na_2HPO_4 in 2 dela 0,1 M citronove kisline.

Raztopina DAPI (600 nM) za barvanje. 10 μl založne raztopine DAPI razredči v 10 ml McIlvaineovega pufra.

Gel Mount-DAPI. V 1 ml Gel Mounta (Sigma, ZDA) odpipetiraj 1 μl založne raztopine DAPI (1000×). Previdno premešaj, da ne vneseš mehurčkov zraka.

3.3.3 Barvanje fragmentirane DNA z reakcijo TUNEL

Reakcija TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated X-dUTP nick end labeling*) se uporablja za *in situ* določanje celic, v katerih poteka fragmentacija DNA (na primer v procesu programirane celične smrti). V reakciji terminalna deoksinukleotidil-transferaza (TdT, E.C. 2.7.7.31) veže označene nukleotide na proste 3'-OH konce DNA, neodvisno od predloge, kot kofaktorje pa potrebuje dvovalentne kovinske katione, kot sta Co^{2+} in Mg^{2+} (Deng in Wu, 1983; Promega Enzyme resource guide, Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, 2003). Za barvanje smo uporabili komplet za določanje jeder s fragmentirano DNA »*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*« (Roche Diagnostics GmbH, Nemčija), ki za detekcijo uporablja nukleotide, označene s fluoresceinom.

Iz rezin kariops smo odstranili parafin v ksilenu (2×5 minut), rehidrirali rezine v padajoči etanolni vrsti (100-, 96-odstotni etanol po 5 minut, 70-, 30-odstotni etanol, destilirana voda po 3 minute) in rezine obkročili s PAP pisalom (kot v 3.4.1), navadno dve poskusni rezini in dve rezini za negativno kontrolo. Vsebino celic smo naredili dostopnejšo za reakcijo TUNEL z inkubacijo rezin s proteinazo K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), kar je trajalo 15 minut pri sobni temperaturi, nato smo rezine sprali s pufrom PBS (2×3 minute).

Na poskusne rezine smo nanesti mešanico označenih nukleotidov in TdT encima (»Labeling solution« in »Enzyme solution« iz kompleta, pripravljeno tik pred uporabo, 50 μl na preparat), na kontrolne rezine pa le raztopino z označenimi nukleotidi ali PBS. Rezine smo pokrili s koščki Parafilma (American National Can, ZDA) in 60 minut inkubirali v vlažni komori (Slika 3.2) pri 37 °C v temi. Po koncu inkubacije smo parafilm odstranili tako, da smo okoli nanesti toliko pufra PBS, da je parafilmski košček vzplaval na površino pufra in smo ga lahko odstranili s pinceto. Rezine smo sprali v PBS (3×3 minute) v Coplinovih kozarcih. Z objektnega stekelca smo odstranili odvečno tekočino, na rezine nanesti Gel Mount-DAPI (kot v 3.3.2) in pokrili s krovnim stekelcem. Zeleno fluorescenco s fluoresceinom označenih nukleotidov smo opazovali z ekscitacijo v modrem delu spektra (450–490 nm), modro fluorescenco DAPI pa z ekscitacijo v UV (365 nm).

Založna raztopina proteinaze K (100×). 2 mg proteinaze K (GibcoBRL, ZDA) raztopi v 1 ml sterilizirane destilirane vode. Razdeli na alikvote po 10 µl in shrani pri -20 °C.

Delovna raztopina proteinaze K (20 µg/ml). V epruveto eppendorf z 10 µl založne raztopine proteinaze K odpipetiraj 970 µl destilirane vode, 10 µl 1 M Tris pH 7,5 (Sigma, ZDA) in 10 µl 0,5 M EDTA (Sigma, ZDA).

Založna raztopina PBS (10×). V približno 800 ml destilirane vode raztopi 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,45 g Na₂HPO₄ in 2,4 g KH₂PO₄. Z destilirano vodo dopolni do 1000 ml. Mešaj približno 15 minut, da se soli popolnoma raztopijo. Avtoklaviraj in shrani pri sobni temperaturi.

Pufer PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ in 1,5 mM KH₂PO₄). Zmešaj 100 ml založne raztopine PBS (10×) in 900 ml destilirane vode. Uravnaj pH na 7,4 z dodajanjem 1N HCl.



Slika 3.2. Vlažna komora.

Velika petrijevka (Ø ~20 cm) z nekaj plastni mokrega filtrirnega papirja na dnu. Objektne stekelca ležijo na gumijastih trakovih, ki preprečujejo premikanje stekelc in neposreden stik z vodo.

3.3.4 Barvanje kondenziranega kromatina s kristal vijoličnim

Barvanje s kristal vijoličnim v kombinaciji z barvanjem s safraninom uporabljajo v mikrobiologiji za barvanje po Gramu, v rastlinski citologiji pa jo uporabljajo za barvanje kromosomov v mitози. Kondenziran kromatin v jedrih se obarva vijolično, citoplazma pa ostane kristalno čista (Jensen, 1962). Rezine smo barvali kot opisujeta Baker in Jordan (1953). Rehidrirane rezine smo barvali 15 minut z 1-odstotno vodno raztopino kristal vijoličnega (Crystal Violet, Merck, Nemčija), sprali z destilirano vodo, nanесли 1-odstotno raztopino I₂ v 2-odstotni vodni raztopini KI, sprali z destilirano vodo, na hitro dehidrirali v 70-, 96- in 100-odstotnem etanolu (10 sekund vsak korak), ksilen (2 × 5 min) in pokrili s trajnim pokrivnim medijem Permount (Electron Microscopy Sciences, ZDA) in krovnim stekelcem.

3.3.5 Barvanje kutina in suberina s Sudan IV

Barvila Sudan (Sudan B, Sudan III in Sudan IV) se uporabljajo za barvanje lipidov. Barvilo je raztopljeno v alkoholu in prehaja v lipidno fazo v tkivu, kjer je boljše topno (Jensen, 1962). V rastlinskem tkivu se suberin obarva rdeče-oranžno, kutin pa rdeče. Na kutin vezan Sudan IV oddaja močno rdečo fluorescenco ob ekscitaciji z modro svetlobo.

Iz rezin smo odstranili parafin v ksilenu (2×5 minut), inkubirali v 100- in 96-odstotnem etanolu po 5 minut in nato 20 minut barvali z 0,5-odstotnim Sudan IV v 85-odstotnem etanolu. Preparate smo sprali v 50-odstotnem etanolu (~1 minuta) in pokrili s 50-odstotnim glicerolom in krovnim stekelcem.

3.3.6 Barvanje lignina s floroglucinolom

Reakcija s floroglucinolom v 20-odstotni HCl je standardna tehnika za lokalizacijo lignina v rastlinskem tkivu (Johansen, 1940). Lignin v tkivu se obarva rdeče-vijolično. Iz rezin smo odstranili parafin v ksilenu (2×5 minut) in jih rehidrirali v etanolni vrsti (100-, 96-, 70-, 30-odstotni etanol) do vode (vsak korak po 5 minut). Nato smo na objektno stekelce nanесли nasičeno raztopino floroglucinola (Phloroglucinol, Sigma, ZDA) v 20-odstotni HCl, pokrili s krovnim stekelcem in takoj posneli slike.

3.3.7 Barvanje kaloze z anilin modro – fluorescenčno metodo

Anilin modro – fluorescenčna metoda se uporablja za barvanje kaloze v rastlinskem tkivu (Currier, 1957), zaradi uporabe alkalnega pufra pa smo lahko opazovali tudi premik fluorescenčnega spektra fenolnih kislin iz hidroksicinamične skupine (Harborne, 1998). Preparate, barvane z DAPI (kot v 3.3.2), smo potem, ko smo posneli slike z UV ekscitacijo, postavili v Coplinove kozarce z destilirano vodo za nekaj minut, da so se krovna stekla ločila od preparatov na objektnih steklih. Preparate smo sprali v treh menjavah destilirane vode in nato na rezine nanесли 0,005-odstotno raztopino vodotopnega barvila anilin modro (Aniline Blue, water soluble, Merck, Nemčija) v 0,15 M K_2HPO_4 , pH

8,2. Po 10 minutah smo na preparate namestili krovna stekelca (brez spiranja) in opazovali z UV ekscitacijo.

Kalozo smo opazili kot zelene točke v nekaterih celičnih stenah. Zaradi alkalnega medija se je spremenila tudi avtofluorescenca celičnih sten. Modra fluorescenca sten je prešla v svetlo modro in zeleno območje. Vzrok za premik fluorescenčnega spektra celičnih sten je bil samo pH pufru, kar smo potrdili z opazovanjem fluorescence preparatov, inkubiranih v samem 0,15 M K_2HPO_4 , in z naparevanjem preparatov z amonijevimi parametri (Harborne, 1998).

3.3.8 Barvanje flavonoidov z Naturstoffreagenz A

Naturstoffreagenz A (NST, difenilborova kislina-2-aminoetilester) tvori komplekse s 3-hidroksi flavoni, katerim se po vezavi batokromno premakne absorpcijski maksimum (Jork in sod., 1989). Flavonoidi z UV ekscitacijo oddajajo zeleno-rumeno do oranžno fluorescenco. Iz rezin smo odstranili parafin v ksilenu (2×5 minut) in jih rehidrirali v etanolni vrsti (100-, 96-, 70-, 30-odstotni etanol) do vode (vsak korak po 5 minut). Na rehidrirane rezine smo nanесли 1 % Naturstoffreagenz A (Sigma, ZDA) v metanolu. Ker je metanol hitro hlapel, smo po minuti inkubacije dodali še kapljico destilirane vode, da se rezine niso izsušile. Sprememba v fluorescenci flavonoidov je vidna takoj po dodatku Naturstoffreagenz A.

3.4 Imunohistokemične reakcije

3.4.1 Imunolokalizacija izocima saharoza sintaze SUS1

Imunolokalizacijo izocima saharoza sintaze SUS1 smo izvedli s primarnimi poliklonskimi zajčjimi protitelesi proti SUS1, pripravljenimi v laboratoriju dr. Prema S. Choureyja (Echt in Chourey, 1985), in kompletom za imunolokalizacijo »*HistoGold*« za iskanje zajčjih primarnih protiteles (Zymed Laboratories, ZDA). Sekundarna protitelesa iz kompleta so konjugirana s 5 nm delci koloidnega zlata. Ti delci so jedra za precipitacijo elementarnega srebra, ki naredi mesta vezave sekundarnih protiteles vidna s svetlobno mikroskopijo. Z detekcijsko metodo, za katero je v rabi koloidno zlato, se izognemo težavam z nespecifičnimi reakcijami, ki lahko nastanejo pri uporabi sekundarnih protiteles, konjugiranih z alkalno fosfatazo ali peroksidazo.

Ves postopek imunolokalizacije smo izvedli pri sobni temperaturi. Rehidracija, dehidracija in spiranje v PBS je potekalo v Coplinovih kozarcih. Iz rezin koreninskih vršičkov smo odstranili parafin s ksilenom (2 × 5 minut). Ksilen je treba pogosto menjati (na približno 20 preparatov), da učinkovito raztopi parafin. Rezine smo rehidrirali v padajoči etanolni vrsti (100-, 96-, 70-, 30-odstotni etanol, vsak korak po 5 minut) do destilirane vode in uravnotežili v pufru PBS (pH 7,4).

Okoli rezin smo popivnali odvečno tekočino in dve skupini rezin obkrožili s PAP pisalom (Zymed Laboratories, ZDA), ki naredi hidrofobno pregrado okrog rezin. Ta preprečuje mešanje reagentov na stekelcu in obenem omogoči porabo čim manjše količine reagentov.

Prva skupina rezin (navadno dve rezini) je bila poskusna, inkubirali smo jo s primarnimi protitelesi; druga je bila kontrolna, inkubirali smo jo z neimunim zajčjim serumom (ne vsebuje protiteles proti SUS1). Nespecifična vezavna mesta za protitelesa smo deaktivirali z inkubacijo v raztopini »*Blocking solution*« iz kompleta (10 minut) in nato poskusne rezine inkubirali v razredčini primarnih protiteles 1 : 500 v PBS v vlažni komori (velika petrijevka z nekaj plastmi vlažnega filtrirnega papirja, Slika 3.2), kontrolne rezine pa z enako razredčino neimunega zajčjega seruma (30 minut pri sobni temperaturi).

Rezine smo sprali v PBS (3×5 minut) in jih nato inkubirali v razredčini sekundarnih protiteles iz kompleta (kozja protitelesa proti zajčjim protitelesom), sprali v PBS (3×5 minut) in inkubirali v sveže pripravljene raztopini »*SilvEnhance*« iz kompleta. Iz omenjene raztopine se izloči srebro, ki se veže na delce zlata na sekundarnih protitelesih in jih poveča, da postanejo vidni s svetlobnim mikroskopom. Reakcijo nalaganja srebra smo pustili teči toliko časa, da je postalo barvanje rezin vidno (okoli 5 minut), nato smo jih sprali v destilirani vodi in dehidrirali v obratni etanolni vrsti do ksilena in preparat pokrili s krovnim sredstvom za pripravo trajnih preparatov Permout (Electron Microscopy Sciences, ZDA) ter krovnim stekelcem.

Založna raztopina PBS (10 \times). V približno 800 ml destilirane vode raztopi 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,45 g Na₂HPO₄ in 2,4 g KH₂PO₄. Z destilirano vodo dopolni do 1000 ml. Mešaj približno 15 minut, da se soli popolnoma raztopijo. Avtoklaviraj in shrani pri sobni temperaturi.

Pufer PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ in 1,5 mM KH₂PO₄). Zmešaj 100 ml založne raztopine PBS (10 \times) in 900 ml destilirane vode. pH uravnaj na 7,4 z dodajanjem 1 N HCl.

3.5 Mikroskopija

Za opazovanje preparatov smo uporabljali mikroskop Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss, Nemčija), opremljen s halogensko osvetlitvijo (HAL 100) za presevno vidno svetlobo in osvetlitvijo z žarnico z živosrebromim lokom (HBO 50), ki oddaja svetlobo že v UV delu svetlobnega spektra, za osvetlitev preparata skozi objektiv (vzbujanje fluorescence). Mikroskop je bil opremljen z dvema kompletoma filtrov za fluorescenco: prvi (UV ekscitacija) je imel ekscitacijski filter 365 nm (*band pass*), delilnik žarkov pri 395 nm in emisijski filter 397 nm (*long pass*); drugi (modra ekscitacija) pa je imel ekscitacijski filter 450-490 nm (*band pass*), delilnik žarkov pri 510 nm in emisijski filter 515 nm (*long pass*). Objektiv, uporabljena pri zajemu slike, sta bila 10× (Plan Neofluar Ph1, NA=0,30; Carl Zeiss, Nemčija) in 40× (Plan Neofluar Pol, NA=0,85; Carl Zeiss, Nemčija)

Za zajem slike smo uporabljali barvno CCD (*charge coupled device*) video kamero (DXC-950P, Sony, Japonska) z ločljivostjo 768 × 576 pikslov in s kartico Matrox Meteor za zajemanje slike v računalniku, ter barvno digitalno CCD kamero (AxioCam MRc, Carl Zeiss Vision, Nemčija) z ločljivostjo 1300 × 1030 pikslov.

Video kamero DXC-950P smo uporabili pri meritvah IOG jeder v preparatih koreninskih čepic in kariops, intenzitete imunolokalizacijskega barvanja v koreninski čepici ter velikosti celic v koreninski čepici in preparatih kariops 16. DPO. Digitalno kamero AxioCam MRc smo uporabili pri meritvah velikosti celic v preparatih kariops od 4. do 12. DPO in pri zajemu slik preparatov, pobarvanih z DAPI, reakcijo TUNEL, anilin modro – fluorescenčno metodo, Sudan IV in floroglucinolom ter avtofluorescence celičnih sten.

3.6 Kvantitativna analiza slike

Mikrografije, zajete s kamero, smo obdelovali v programskem paketu za analizo slike KS400 (Carl Zeiss Vision, Nemčija). Od mnogih zmožnosti, ki jih ima program, smo uporabljali funkcije za zajem slike, operacije za obdelavo celotne slike in računanje s slikami, avtomatsko določanje objektov na sliki s segmentacijo, ročno določanje objektov, merjenje različnih morfoloških parametrov objektov in denzitometrijo. Program smo uporabljali tudi samo kot avtomatsko zapisovalno napravo pri ročnem štetju in merjenju dolžin ter širin. V KS400 smo napisali makro programe za avtomatizacijo daljših postopkov za analizo slike.

3.6.1 Denzitometrična meritev količine DNA

Osnova za kvantitativno oceno količine DNA v jedrih je postopek barvanja po Feulgenju, ki stehiometrično barva DNA (glej 3.3.1). Jakost obarvanja merimo fotometrično z uporabo monokromatske svetlobe.

Od količine barvila v objektu je odvisno, koliko svetlobe absorbira. S kamero na mikroskopu lahko merimo intenziteto svetlobe, ki pride skozi objekt, in jo primerjamo z intenziteto vpadne svetlobe. Iz razmerja nato izračunamo optično gostoto objekta, ki je linearno sorazmerna s količino barvila v objektu. Merilni sistem mora biti umerjen na znane vrednosti transmisije, zajem slike pa mora biti enakomeren po vsem vidnem polju.

Transmitanca je razmerje med intenziteto vpadne svetlobe I_0 in intenziteto izhodne svetlobe I in je neodvisna od absolutne intenzitete vhodne svetlobe:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3.1)$$

Iz transmitance izračunamo absorbanco:

$$A = -\log_{10} T \quad (3.2)$$

Absorpcija svetlobe je premosorazmerna s koncentracijo snovi in dolžino poti svetlobe skozi snov (Lambertov zakon – debelina snovi, Beerov zakon – koncentracija; »več piva spiješ, bolj se ti stemni«):

$$A = K c d \quad (3.3)$$

K – ekstinkcijski koeficient, konstanta, označuje sposobnost snovi za absorpcijo fotonov; c – koncentracija snovi v vzorcu, d – dolžina poti svetlobe skozi vzorec

Če je presek svetlobnega žarka, s katerim merimo absorpcijo, vedno enak, lahko absorbanco A izrazimo kot optično gostoto (OG), produkt $c \times d$ pa je v linearnem sorazmerju s količino barvila v prostornini vzorca, skozi katero potuje žarek. Ker želimo izmeriti le relativno količino DNA v jedrih, lahko konstanto K zanemarimo, linearno sorazmerje produkta $c \times d$ pa zadostuje za relativno meritev. Torej lahko iz enačb (3.1) in (3.2) izpeljemo:

$$OG = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad (3.4)$$

Ker pa je struktura jeder nehomogena, kar zadeva koncentracijo DNA in debelino, ne moremo preprosto izmeriti transmisije skozi celotno jedro in to uporabiti za izračun OG jedra. Tako bi izmerili le povprečno intenziteto svetlobe, ki pride skozi jedro, vendar je zaradi logaritemskega razmerja med transmisijo in absorpcijo taka meritev napačna. Za jedro, razdeljeno na n delov, velja (seveda le, če so izmerjene intenzitete posameznih delov jedra različne):

$$n \log \frac{I_0}{I} \neq \sum_{i=1}^n \log \frac{I_0}{I_i} \quad (3.5)$$

Zato pri meritvi relativne količine DNA v jedrih uporabimo najmanjše elemente slike – piksele. V tem primeru je površina piksla tudi presek svetlobnega žarka, s katerim merimo OG posameznih delov jedra. Za vsak piksel v jedru iz njegove sive vrednosti izračunamo OG , ki jih seštejemo tako, da dobimo integrirano optično gostoto (IOG). IOG je linearno sorazmerna s količino DNA v jedru. Ker računamo s slikami, lahko tudi za vrednost intenzitete vpadne svetlobe vzamemo sivo vrednost piksla iz slike ozadja, ki je na istem

mestu kot piksel v jedru. Kot intenziteto vpadne oziroma presevne svetlobe vzamemo sivo vrednost piksla, saj sta v denzitometrično umerjenem sistemu linearno odvisni, z izhodiščem v (0, 0).

$$IOG = \sum_{i=1}^n \log \frac{I_{0i}}{I_i} \quad (3.6)$$

n – število pikslov v jedru, I_i – intenziteta prepuščene svetlobe skozi jedro na mestu piksla i , I_{0i} – intenziteta vpadne svetlobe na mestu piksla i .

Enačbe za izračun transmisije in absorbance veljajo za absorpcijo monokromatske svetlobe, pa tudi absorpcija svetlobe v kompleksu DNA-Schiffov reagent je spektralno odvisna. Absorpcijski maksimum za jedra, barvana z reakcijo po Feulgenju, je pri 565 nm (Bedi in Goldstein, 1976). Zato je bil v svetlobni poti (pod kondenzorjem) nameščen zelen filter (*band pass* interferenčni filter, z vrhom transmisije pri 540 nm in širino vrha pri polovični transmisiji 90 nm), sive slike pa so bile zajete z zelenim kanalom kamere.

3.6.1.1 Umeritev sistema in odprava napak na zajeti sliki

Za dobro meritev morata biti optimalno nastavljena že vir svetlobe in optična pot v mikroskopu. Žarnica mora biti centrirana, elementi optične poti v mikroskopu pa morajo biti nastavljeni po navodilih za Köhlerjevo osvetlitev. Na kamera mora biti izključeno ojačanje signala (*gain* 0 dB), da je naključni šum čim manjši, in izključena mora biti gama korekcija, da je odziv kamere linearen v večini njenega dinamičnega območja.

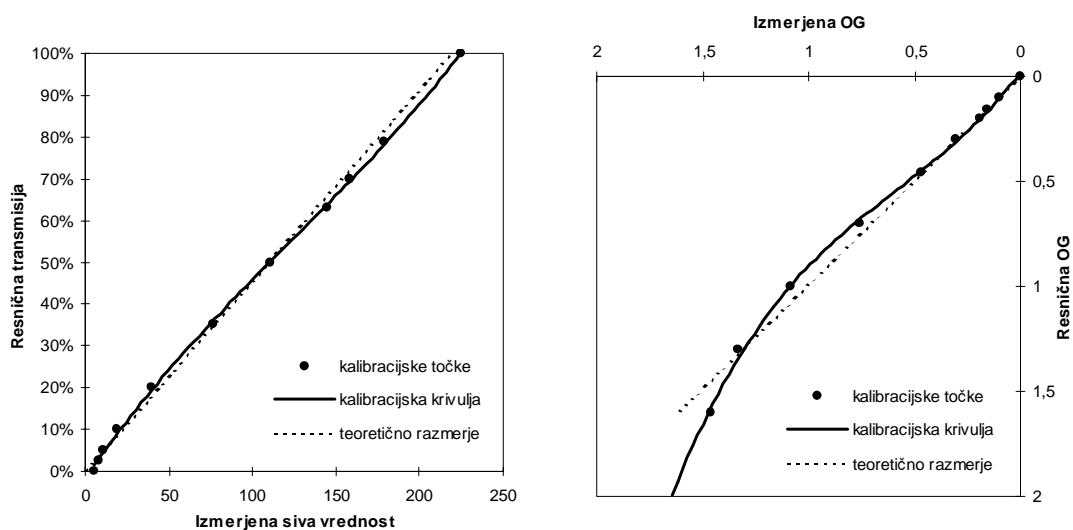
Za denzitometrično merjenje IOG vrednosti jeder mora biti merilni sistem natančno umerjen; zajeta slika mora biti čim bolj enakomerno osvetljena, sive vrednosti, ki jih zajame kamera, pa je treba umeriti na vrednosti transmisije. Pred meritvijo vsakega preparata smo sistem kalibrirali, kot opisujeta Vilhar in Dermastia (2002). Za umeritev sistema so uporabili v našem laboratoriju napisane makre v KS400.

Pri zajemu slike s čipom CCD in digitalizacijo signala s kartico za zajem slike v računalniku je vedno prisoten šum kot naključen odmik vrednosti pikslov v sliki od prave vrednosti, ki pa ga lahko nevtraliziramo z izračunavanjem povprečij zaporedoma zajetih

slik (Russ, 1999). Zato smo za vsako sliko, ki smo jo uporabili pri meritvi, zajeli 32 slik s hitrostjo, kot jo dopušča sistem, in izračunali povprečja po parih. Po prvem povprečevanju je ostalo 16 slik, nato 8, 4, in 2, na koncu je ostala le ena slika, v kateri so bile naključne variacije v vrednostih pikslov izravnane.

Neenakomerno osvetlitev vidnega polja (pojav senčenja) smo izravnali s korekcijo slike kot jo opisujejo Pirard in sod. (1999). Če je bila napaka zelo izražena, smo jo popravili s centriranjem žarnice in ponovno nastavitvijo Köhlerjeve osvetlitve. Po postopku izravnave slike smo dobili sliko ozadja, s katero smo preračunali vsako zajeto sliko v meritvi in dobili enakomerno osvetljeno sliko s sivimi vrednostmi, razporejenimi od 0 do izbrane najvišje vrednosti, v tem primeru 220.

Zagotoviti je treba tudi linearno odvisnost med sivimi vrednostmi na sliki in resničnimi vrednostmi transmisije. Uporabljena video kamera ima dobro linearnost odziva, ki pa jo z denzitometrično kalibracijo še izboljšamo. Kamero smo denzitometrično umerili s kompletom filtrov nevtralne gostote (79 %, 70 %, 63 %, 50 %, 35 %, 20 %, 10 %, 5 % in 2,5 %) ki smo jih zaporedoma polagali v optično pot (v tem primeru na poljsko zaslonko) in zajemali slike praznega polja. Za vrednost transmisije 100 % smo zajeli sliko praznega polja brez uporabe filtrov, za vrednost transmisije 0 % pa smo zajeli sliko pri zaprti optični poti. Iz vrednosti transmisije in izmerjenih sivih vrednosti smo naredili umeritveno krivuljo (Slika 3.3), s pomočjo katere smo v meritvi pretvorili vsako sliko, v kateri so sive vrednosti potem ustrezale vrednostim transmisije. Polinom tretje stopnje je zadovoljivo sledil točkam umeritvene krivulje tudi v temnem območju kamere, kjer je odziv najbolj nelinearen.



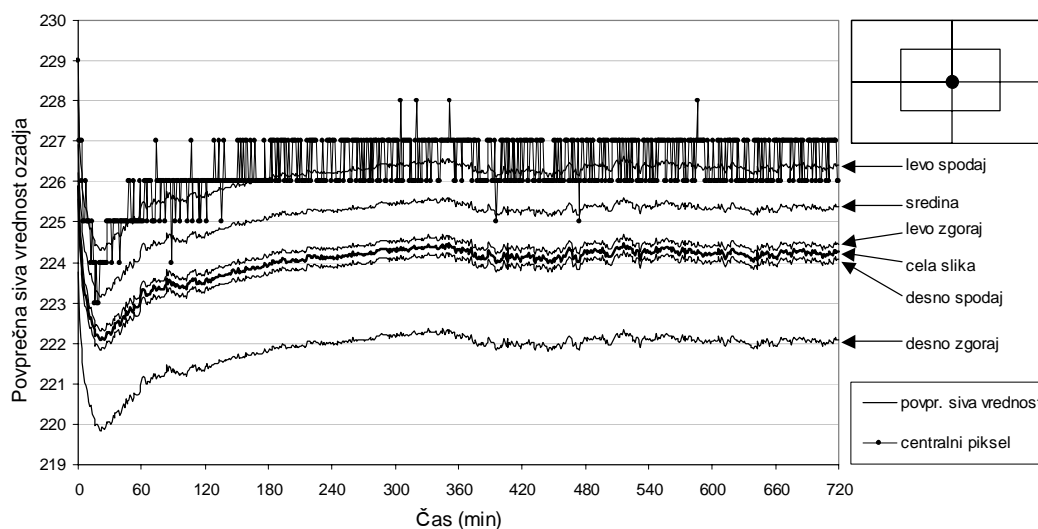
Slika 3.3. Razmerje med izmerjeno sivo vrednostjo in resnično vrednostjo transmisije, ki jo predstavlja siva vrednost, ter optična gostota (OG), izračunana iz transmisije.

Prikazana je tipična kalibracijska krivulja. Skozi umeritvene točke je položen polinom tretje stopnje, s katerim je pred meritvami generirana pretvorbena preglednica. Vsaka zajeta slika v meritvi je s pomočjo vrednosti iz preglednice prilagojena tako, da sive vrednosti v njej ustrezajo resničnim vrednostim transmisije (siva vrednost 0 ustreza transmisiji 0 %, vrednost 220 pa transmisiji 100 % in optični gostoti 0 - vrednost ozadja).

3.6.1.2 Merjenje stabilnosti osvetlitve

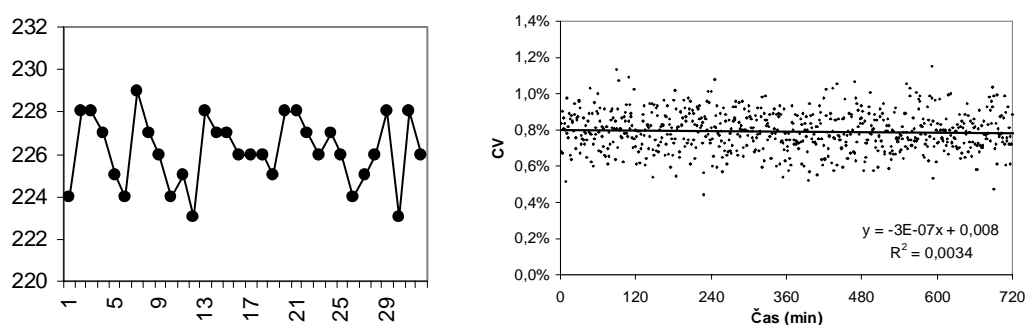
Dršenje jakosti osvetlitve smo spremljali podobno, kot opisujeta Vilhar in Dermastia (2002) ter Puech in Giroud (1999). Osvetlitev je bila nastavljena na vrednost ozadja (okoli 220). Vsako minuto je bili zajeti slika in izmerjena povprečna siva vrednost v celotni sliki in v petih poljih, velikih četrtno velikosti slike (levo zgoraj, levo spodaj, desno zgoraj, desno spodaj in v centru). Za meritev je bila uporabljena slika, izračunana kot povprečje 32 zaporedoma zajetih slik, tako da v meritvah sivih vrednosti ni bilo odstopanj zaradi elektronskega šuma. Razlike v sivih vrednostih med posameznimi deli slike so posledica neenakomerne osvetlitve vidnega polja (pojav senčenja) in so bile v meritvi IOG izravnane s korekcijo senčenja (Slika 3.4). Za oceno elektronskega šuma (*readout noise*, šum pri prenosu in digitalizaciji signala) pa so bile uporabljene vrednosti pikselov v centru 32-ih slik, ker so bile zajete z največjo hitrostjo, se v vrednostih pikselov ne odraža dršenje jakosti

osvetlitve s časom. Koeficient variacije pokaže velikost elektronskega šuma in se s časom ni spreminjal (Slika 3.5).



Slika 3.4. Nihanje jakosti osvetlitve in neenakomerna osvetlitev vidnega polja (brez korekcije senčenja).

Kamera in žarnica prižgani tik pred merjenjem. Drsenje osvetlitve je največje ob ogrevanju, nato se ustali. Desno zgoraj so prikazana polja na sliki, v katerih je bila izračunana povprečna siva vrednost. Po korekciji senčenja se sive vrednosti v vseh delih slike izenačijo.



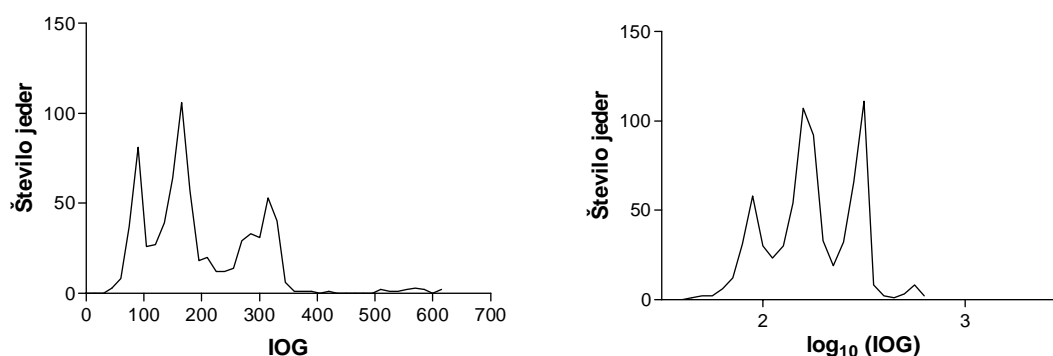
Slika 3.5. Siva vrednost in koeficient variacije pikslov v centru zaporedoma zajetih slik.

Nihanje sive vrednosti piksla v centru merjene slike (32 slik, zajetih s hitrostjo sistema) in koeficient variacije vrednosti sredinskega piksla v 32 zajetih slikah vsako minuto. Siva vrednost piksla v centru 32 zaporedoma zajetih slik pri času 120 min, CV = 0,71 %; najmanjša vrednost = 223, največja vrednost = 229. Velikost elektronskega šuma (izražen kot koeficient variacije, CV) se ne spreminja s časom.

3.6.1.3 Merjenje relativne količine DNA v tkivnih rezinah

Relativno količino DNA v jedrih v tkivnih rezinah smo merili z »metodo interfaznega vrha« (Vilhar in sod., 2001), ki smo jo priredili za uporabo na rezinah, tako da se v meritvi poleg IOG in površine preseka jeder zapisujejo tudi absolutne koordinate jeder v prerezu tkiva. Pred meritvijo vsakega preparata smo sistem umerili s korekcijo senčenja in denzitometrično kalibracijo.

Čeprav je bil postopek barvanja preparatov in merjenja standardiziran, smo IOG jeder primerjali le znotraj enega preparata (zaradi neznane variabilnosti med posameznimi barvanji in merjenji). Med preparati smo primerjali relativno količino DNA, izraženo v enotah C; 1 C je količina DNA v nepodvojenem haploidnem genomu. Vrednost C smo ocenili iz frekvenčne porazdelitve vrednosti IOG v diploidnem tkivu (embrio, perikarp ali nucel) tako, da smo vrednost 2 C priredili modusu prvega vrha porazdelitve IOG, nato pa vrednosti IOG vseh jeder preračunali v enote C. Ker se količina DNA z večanjem stopnje ploidnosti podvaja, smo vrednosti IOG pred izračuni porazdelitev logaritmsko transformirali; tako so bili vrhovi porazdelitev IOG enako oddaljeni (Slika 3.6). Jedra smo razdelili na posamezne skupine, ki ustrezajo stopnjam ploidnosti, tako da smo določili meje na aritmetični sredini med dvema zaporednima modulusoma vrhov frekvenčne porazdelitve logaritmirane IOG.



Slika 3.6. Vpliv logaritmske transformacije na frekvenčno porazdelitev IOG vrednosti.

Prikazana je frekvenčna porazdelitev IOG jeder, izmerjena v vzdolžni rezini koreninske čepice.

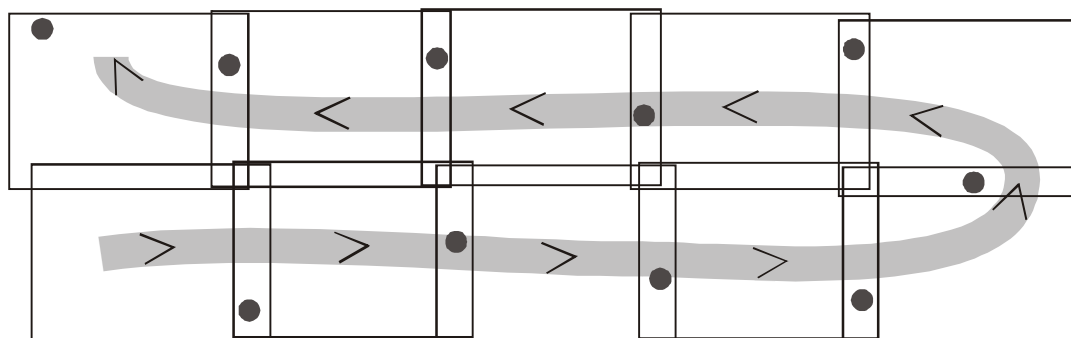
IOG jeder smo merili v vidnih poljih, ki so si sledila v obliki meandrov (Slika 3.7), tako da je bil pokrit celoten preparat. Za merjenje IOG smo uporabljali objektiv 40×, kar je kompromis med tem, da je v vsakem vidnem polju vsaj kakšno jedro, in tem, da je slika jedra sestavljena iz zadostnega števila pikselov za natančno meritev IOG. Pri taki povečavi je bila velikost vidnega polja 250×188 μm (uporabljena video kamera DXC-950P, Sony). Izračun koordinat je potekal po naslednjih enačbah:

$$X = \text{Marker}X + (\text{CGR}AVX - \text{FrameMarker}X) \quad (3.7)$$

$$Y = \text{Marker}Y - (\text{CGR}AVY - \text{FrameMarker}Y) \quad (3.8)$$

X , Y - absolutni koordinati jedra v preparatu; $\text{Marker}X$, $\text{Marker}Y$ - absolutni koordinati referenčnega jedra, ki je izbrano v vsakem vidnem polju; $\text{CGR}AVX$, $\text{CGR}AVY$ - relativni koordinati središča merjenega jedra v sliki; $\text{FrameMarker}X$, $\text{FrameMarker}Y$ - relativni koordinati referenčnega jedra v sliki.

Vsi parametri na sliki so bili merjeni v mikrometrih. Ker je koordinatni sistem računalniške slike »obrtnjen na glavo« (izhodišče je v zgornjem levem kotu, Y koordinate se večajo od zgoraj navzdol), je pri izračunu Y koordinate (enačba 3.8) pred oklepajem minus. Tako smo izračunavali koordinate glede na naravni koordinatni sistem, ki ima izhodišče v spodnjem levem kotu (glede na pozitivne X in Y koordinate).



Slika 3.7. Premikanje po preparatu z izbiranjem jeder.

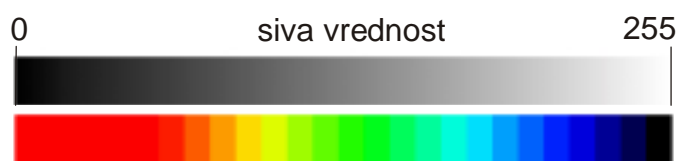
V vsakem vidnem polju (pravokotniki) je treba izbrati jedro (siva pika v vsakem pravokotniku), premakniti vidno polje na naslednji položaj na preparatu in spet izbrati isto jedro. Na tak način se koordinate merjenih jeder preračunavajo glede na celoten preparat. Smer premikanja po preparatu je nakazana s puščicami.

3.6.2 Kvantitativno ovrednotenje imunolokalizacijskega barvanja

Sprejeto v objavo v Canadian Journal of Botany.

3.6.2.1 Prikaz imunolokalizacijskega barvanja s psevdobarvami

Preparate, pobarvane z imunolokalizacijskim barvanjem za SUS1, smo posneli v svetlem polju kot sivo sliko z objektivom 10× in video kamero DXC-950P. V različnih ponovitvah imunolokalizacije je bila intenzivnost barvanja lahko zelo različna, ker je reakcija ojačanja signala z nalaganjem elementarnega srebra na zlato, vezano na sekundarna protitelesa, dokaj nepredvidljiva zaradi hitrega poteka in nestabilnih reagentov. Zaradi primerljivosti porazdelitve imunolokalizacijskega barvanja med preparati smo območje sivih vrednosti, kjer je bil signal, raztegnili od 0 do 255 in nato slike prikazali v psevdobarvah, kjer smo lestvico sivih vrednosti (svetlost) nadomestili z barvno lestvico (Slika 3.8). S podobno lestvico psevdobarv smo prikazali tudi velikost celic in stopnjo endopoliploidnosti v endospermu. Uporaba psevdobarv olajša zaznavanje manjših razlik v svetlosti slike (Russ, 1999). Na izbranih preparatih smo kvantitativno ocenili število in položaj celic, v katerih je imunolokalizacijski signal bolj viden (opisano v poglavju 3.6.4). Kontrolne rezine na istem stekelcu smo posneli z enakimi nastavitvami in razpon sivih vrednosti prilagodili na enake vrednosti kot v poskusnih rezinah, inkubiranih s primarnimi protitelesi proti SUS1.

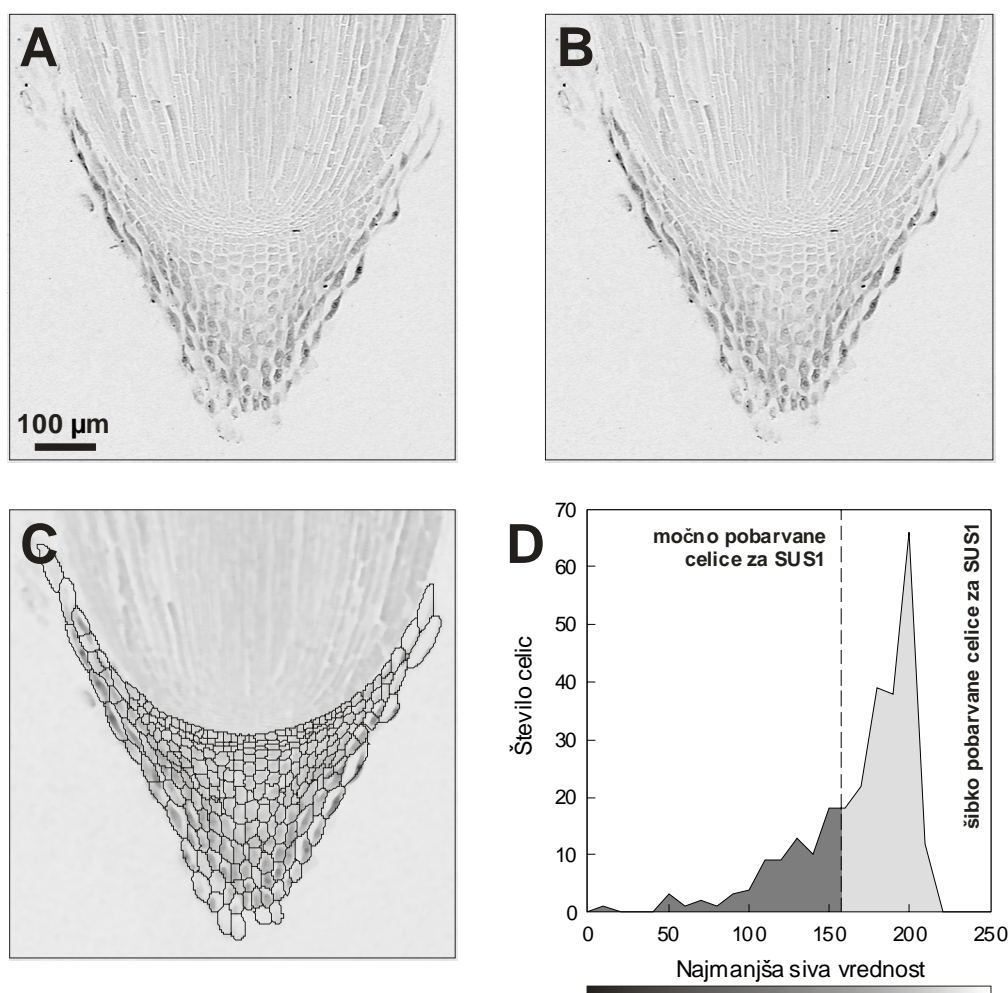


Slika 3.8. Pretvorba sivih vrednosti na sliki v psevdobarve.

3.6.2.2 Kvantitativno ovrednotenje imunolokalizacijskega barvanja v posameznih celicah v čepici

Sivo sliko imunolokalizacijskega barvanja v koreninski čepici smo obdelali s filtrom, ki vsakemu pikslu priredi mediano vrednost pikslov v njegovi okolici. Tako smo zmanjšali lokalne variacije v sivih vrednostih pikslov zaradi metodološkega šuma. S pomočjo slike

obrisov celic, dobljene pri merjenju velikosti celic (3.6.3, Slika 3.13), smo sliko imunolokalizacijskega barvanja razdelili na posamezne celice. V njih smo izmerili najmanjšo sivo vrednost in to uporabili kot oceno relativne količine SUS1 proteina v celici. Celice smo razvrstili v dva razreda, šibko in močno pobarvane celice, ki sta po naši predpostavki v čepici zavzemala enako prostornino. Za vsak preparat koreninske čepice smo določili mejno sivo vrednost; celice z najmanjšo sivo vrednostjo od 0 (0 je črna barva) do mejne vrednosti smo razvrstili v razred močno pobarvanih celic, »veliko SUS1«, celice z višjimi sivimi vrednostmi (do 255, ki je bela barva) pa v razred šibko pobarvanih celic, »malo SUS1« (Slika 3.9).



Slika 3.9. Kvantitativno ovrednotenje imunolokalizacijskega barvanja za saharoza sintazo SUS1.

Zajeta siva slika (A), slika, obdelana s filtrom mediana (B), slika B z dodanimi obrisi celic (C), frekvenčni poligon izmerjenih sivih vrednosti v celicah na sliki C, s prekinjeno črto je označena mejna vrednost (D).

3.6.2.3 Povezava imunolokalizacijskega signala s ploidnostjo celic

Na istih rezinah ni mogoče hkrati izvesti kvantitativnega barvanja DNA in imunolokalizacije, ker metodi nista združljivi. Zato smo imunolokalizacijski signal za SUS1 in relativno količino DNA v celicah koreninske čepice povezali na osnovi položaja posameznih celic v različnih vzdolžnih rezinah. Podatke za vse rezine smo enako orientirali in postavili izhodišče koordinatnega sistema (0, 0) v sredinsko, najnižjo točko meje med čepico in telesom korenine. Koordinate celic v rezini, pobarvani po Feulgenju, smo položili prek koordinat celic v rezini, pobarvani z imunolokalizacijo. Na vsako od treh rezin, pobarvanih z imunolokalizacijo, smo zaporedoma položili podatke za šest rezin, pobarvanih po Feulgenju. Vsaki imunobarvani celici smo določili stopnjo ploidnosti kot mediano šestih podatkov za ploidnost celic, ki so bile najbližje v vsaki od šestih rezin, barvanih po Feulgenju. Na enak način smo vsaki celici z znano stopnjo ploidnosti določili stopnjo imunobarvanja za SUS1 (označili z »malo SUS1« ali »veliko SUS1«) kot mediano treh podatkov za imunobarvanje. S tem postopkom smo za vsako celico v devetih preiskovanih rezinah koreninskih čepic določili stopnjo ploidnosti in stopnjo imunolokalizacijskega barvanja za SUS1.

3.6.3 Meritev velikosti

3.6.3.1 Meritev velikosti celic

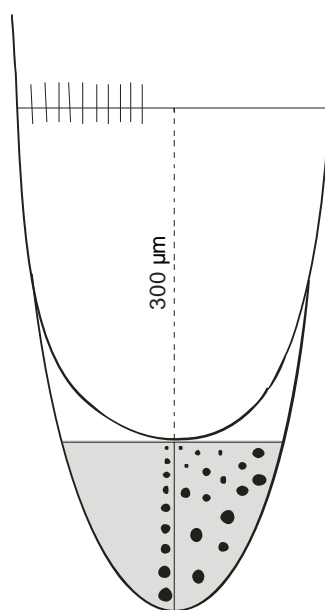
Za merjenje velikosti celic smo izrabili avtofluorescenco celičnih sten ob ekscitaciji z UV svetlobo valovne dolžine 365 nm. Nepobarvane celične stene so z UV ekscitacijo oddajale modro fluorescenco zaradi vezanih fenolnih kislin (Lichtenthaler in Schweiger, 1998). Preparat koreninske čepice in preparat kariops 16 DPO smo merili z video kamero DXC-950P, druge preparate kariops (4 do 12 DPO) pa z digitalno kamero AxioCam MRc, ki je bolj občutljiva in zato primernejša za zajem fluorescenčne svetlobe. Za meritve smo uporabljali objektiv 10×. Pri taki povečavi je bila velikost vidnega polja 1003×752 μm (video kamera DXC-950P) oziroma 1379×1092 μm (digitalna kamera AxioCam MRc). V vsakem vidnem polju smo zajeli sliko fluorescence celičnih sten z UV ekscitacijo in sliko v presewni svetlobi s priprto zaslonko kondenzorja (sliko smo potrebovali predvsem za

orientacijo v preparatu). Nato smo sliko fluorescence celičnih sten pretvorili v sivo sliko, raztegnili kontrast in pretvorili v negativ. Tako smo dobili sliko temnih sten na svetlem ozadju, kar se je pokazalo kot najprimernejši kontrast za razločevanje struktur na sliki. Kadar je bila slika fluorescence dvoumna, smo jo lahko med meritvijo primerjali s sliko preparata, posneto v svetlem polju.

Celice smo merili tako, da smo prek grafične tablice NewSketch 1212 III (Genius, Tajvan) obrisovali njihove stene (Slika 3.14 A) in beležili površino, najmanjši in največji premer prereza celic ter koordinate centra celic. Absolutne koordinate celic v preparatu smo računali kot v poglavju 3.6.1.3. Pozneje smo sliko obrisov celic uporabili za razdelitev slike imunolokalizacijskega barvanja v koreninski čepici na posamezne celice za količinsko ovrednotenje barvanja v celicah (glej 3.6.4) in za oceno 3-D strukture endosperma (glej 3.6.4.4). Prostornino posameznih celic smo v primeru koreninske čepice ocenili kot kvader (produkt površine prereza celice in najmanjšega premera), prostornino celic v endospermu pa kot kroglo (polmer smo izračunali iz površine prereza celice). Ker so celice v meristemu koreninske čepice sploščene v vzdolžni smeri, smo njihovo prostornino ocenili kot produkt površine prereza celice in največjega premera. Na tak način smo izračunali prostornino celic, katerih površina prereza je bila manjša od $180 \mu\text{m}^2$ (Bengough in sod., 2001).

3.6.3.2 Meritev velikosti koreninskih vršičkov

Vzdolžne rezine koreninskih čepic smo barvali po Feulgenu in merili dolžino in širino čepice, število celic v liniji od meristema do konice čepice, površino prereza čepice od konice do meristema, število jeder v prerezu, širino telesa korenine in število celičnih linij v korenini na razdalji $300 \mu\text{m}$ od meristema (Slika 3.10). Za vsako obdelavo kalic smo izmerili parametre v petih preparatih koreninskih vršičkov, in sicer na dvanajstih zaporednih rezinah za vsak preparat. Mediano rezino smo poiskali na podlagi dolžine čepice, pomagali smo si tudi s površino prereza čepice, številom jeder v prerezu in številom celic v liniji od meristema do konice čepice.



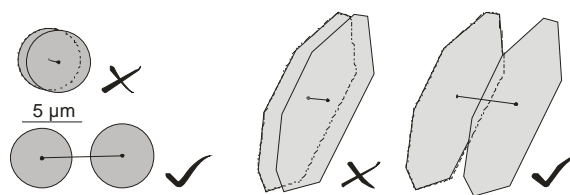
Slika 3.10. Merjeni parametri v koreninskem vršičku.

V koreninskih vršičkih koruze smo merili: dolžino in širino čepice, število celic v liniji od meristema do konice čepice, površino prereza čepice od konice do meristema, število jeder v prerezu, širino telesa korenine in število celičnih linij v korenini na razdalji 300 µm od meristema.

3.6.4 Obdelava podatkov

3.6.4.1 Odstranjevanje dvojnikov

Dvojniki so dvakrat izmerjeni podatki (IOG ali velikost celic) v istih celicah, ker se vidna polja v meritvah delno prekrivajo. Koordinate dvakrat izmerjenih podatkov so bile blizu skupaj, niso pa bile popolnoma enake. Zato smo vse podatke primerjali po metodi najbližjega soseda, ki vsakemu podatku poišče podatek, ki mu je najbližji. Iz vsakega para, kjer sta bila podatka preblizu skupaj, smo nato izločili en podatek. Mejno vrednost smo določili za vsako serijo podatkov iz enega preparata posebej; navadno je bila najmanjša dovoljena razdalja med dvema podatkom 5 µm. Podatke za velikost celic smo še dodatno »očistili«. Uporabili smo dodatno merilo, po katerem je morala biti razdalja med centroma dveh celic večja kot polovica najmanjšega kalipernege premera vsake od celic. Merilo ni bilo ostro, da nismo izločili celic z delno prekrivajočimi se obrisi (Slika 3.11).



Slika 3.11. Prepoznavanje dvojnikov pri merjenju IOG in velikosti celic.

Sliki dveh jeder, med katerima je razdalja manj oziroma več kot 5 μm (levo). Sliki dveh celic, med katerima je razdalja manjša oziroma večja od polovice najmanjšega premera celice (desno). Kjer sta podatka preblizu skupaj (označeno z x), je treba enega od njiju zbrisati.

3.6.4.2 Povezava podatkov za ploidnost in velikost celic

Na preparatih smo najprej izmerili ploidnost jeder, nato pa še velikost celic. Podatke, iz katerih smo odstranili dvojnike, smo poravnali v preglednici v programu Excel (Microsoft Corporation, ZDA) na podlagi njihovih koordinat v preparatu. Po potrebi smo podatke zavrteli in premaknili (po enačbah 3.9 in 3.10), nato pa z metodo najbližjega soseda povezali podatke za ploidnost celic z velikostjo celic. Ker v nekaterih prerezanih celicah na preparatu ni bilo jeder ali pa so bila le-ta poškodovana, smo podatek za ploidnost najprej priredili celicam, ki vsebujejo jedra, nato pa preostalim celicam priredili vrednosti za ploidnost njihovih najbližjih sosedov.

$$x_{rot} = x \cos \varphi + y \sin \varphi + x_p \quad (3.9)$$

$$y_{rot} = y \cos \varphi - x \sin \varphi + y_p \quad (3.10)$$

x_{rot} , y_{rot} – koordinati x in y , zavrteni za kot φ okrog koordinatnega izhodišča (0, 0) in premaknjeni za x_p , y_p .

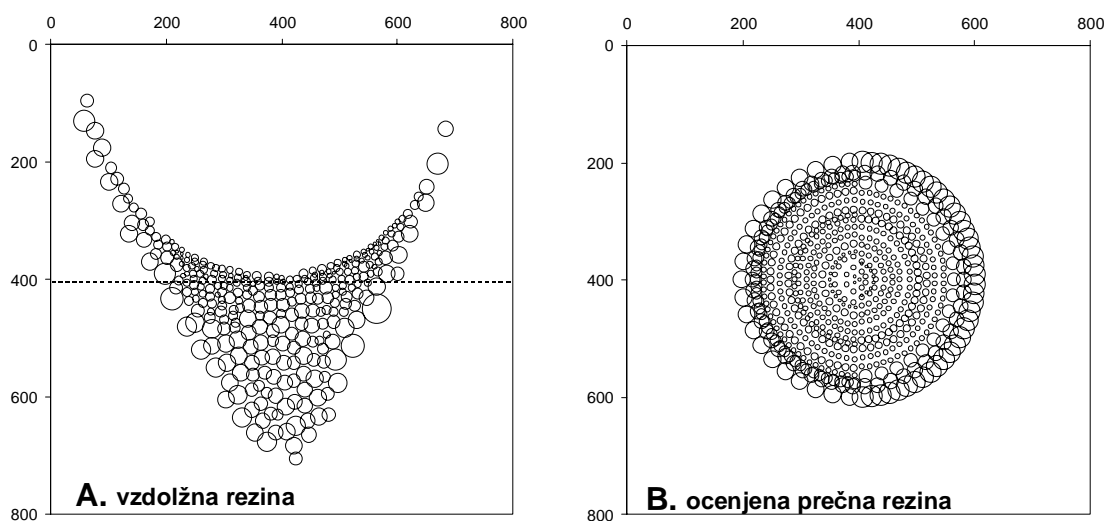
3.6.4.3 Ocena tridimenzionalne porazdelitve celic v koreninski čepici

Ker so mnoga rastlinska tkiva radialno simetrična, lahko njihovo tridimenzionalno strukturo ocenimo iz vzdolžnega prereza. Število celic v koreninski čepici smo ocenili po prirejenem postopku, ki ga opisujejo Bengough in sod. (2001). Število celic smo ocenili tako, da smo za vsako celico v rezini izračunali, kolikokrat se lahko pojavi v loku, ki

ustreza polovici obsega kroga (π) s središčem v osi simetrije rezine in polmerom, ki ustreza razdalji centra celice od osi simetrije (Enačba 3.11 in Slika 3.12).

$$N = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\pi r_i}{d_i} \right) \quad (3.11)$$

N – ocena števila celic v koreninski čepici, n – število celic v vzdolžni rezini, r_i – razdalja centra celice od osi simetrije rezine, d_i – premer celice v pravokotni smeri glede na os simetrije.



Slika 3.12. Celice koreninske čepice v vzdolžnem prerezu in ocena števila celic v prečnem prerezu.

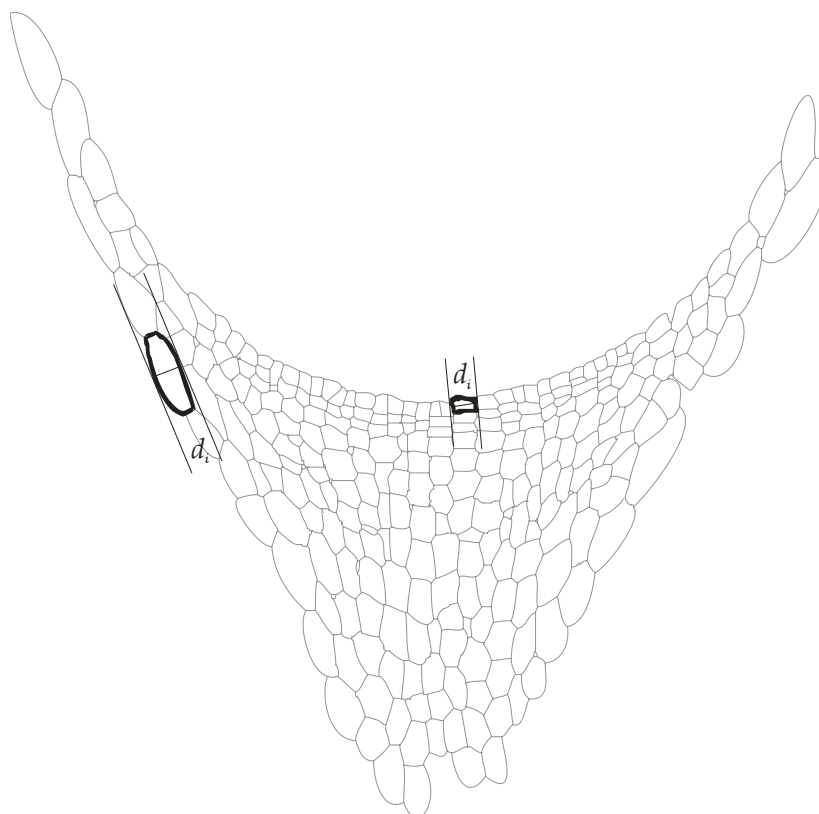
Premer simbolov ustreza premeru celic. Prikazana je razporeditev izmerjenih celic v vzdolžni rezini (A) in ocenjena razporeditev celic v prečni rezini (B) na višini, označeni s prekinjeno črto na sliki A. Enote na oseh so v mikrometrih.

Celice v koreninski čepici so večinoma podaljšane v vzdolžni smeri vzporedno z osjo simetrije čepice. Zato smo kot premer celice d_i v zgornji enačbi vzeli kar najmanjši premer celice (Slika 3.13). Meristemske celice pa so stisnjene v vzdolžni smeri, zato smo v tem primeru kot premer celice vzeli količnik površine prereza celice z najmanjšim premerom celice (tako smo dobili daljšo stranico prereza celice, če predpostavimo, da je ta pravokotnik). Na tak način smo izračunali d_i za celice, katerih površin prereza je bila manjša od $180 \mu\text{m}^2$ (Bengough in sod., 2001). Tako smo zajeli večino meristemskih celic. Prostornino posamezne celice smo ocenili kot kvader, in sicer kot produkt površine prereza celice in d_i .

Prostornino celotne koreninske čepice smo izračunali kot vsoto prostornin vseh celic. Ker se premer celice d_i pojavlja tako v izračunu števila celic in v izračunu prostornine celic, se pokrajša, tako da lahko prostornino čepice izračunamo neposredno iz produktov površin prerezov celic in njihovih oddaljenosti od osi vrtenja:

$$V = \sum_{i=1}^n (N_i V_i) \rightarrow V = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\pi r_i}{d_i} \times S_i d_i \right) \rightarrow$$
$$V = \sum_{i=1}^n (\pi r_i S_i) \tag{3.12}$$

V – ocena prostornine koreninske čepice, n – število celic v vzdolžni rezini, N_i – ocenjeno število celic i , V_i – prostornina celice i , S_i – površina prereza celice i , r_i – razdalja centra celice od osi simetrije rezine, d_i – premer celice v pravokotni smeri glede na os simetrije.



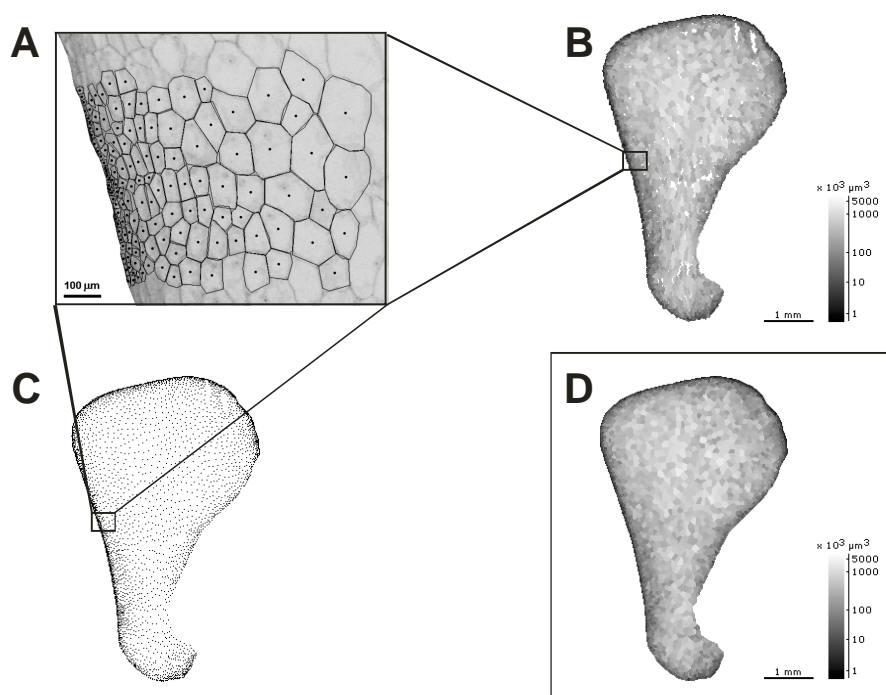
Slika 3.13. Obrisi celic v koreninski čepici.

Prikazan je premer celice d_i , uporabljen v izračunu števila celic v celotni čepici.

3.6.4.4 Ocena tridimenzionalne porazdelitve celic v endospermu

Del objavljen v Plant Physiology 129 (2002) 23-30. (Priloga A)

Porazdelitev celic v endospermu smo ocenili na podoben način kot v koreninski čepici. Na preparatih smo izmerili velikost celic z obrisovanjem celičnih sten. Za vsako celico smo zabeležili koordinate centra in površino prereza celice. Prostornino celic smo ocenili kot kroglo. Med merjenjem je sprti nastajala slika preparata, v kateri so bile velikosti celic predstavljene s sivimi vrednostmi pikslov (v logaritemski skali). Na nekaterih mestih so piksli manjkali zaradi poškodb v preparatu, izpuščenih celic ali nedotikajočih se celic. To smo popravili z »virtualno celularizacijo«, metodo prilagojeno po metodi generiranja mozaika po Matérnu (1960). Sliko smo na novo ustvarili tako, da smo vsakemu pikslu v sliki endosperma priredili sivo vrednost njemu najbližjega centra celice (Slika 3.14 A-D). Po podobnem postopku smo generirali tudi sliko razporeditve vrednosti C, le da smo vsakemu pikslu v endospermu priredili najbližjo vrednost C, izmerjeno po metodi merjenja IOG v tkivnih rezinah (glej 3.6.1.3).



Slika 3.14. Merjenje velikosti celic v endospermu in priprava slike za izračun 3-D modela endosperma.

A – obrisovanje celic, B – slika prezev celic, sive vrednosti pomenijo prostornino celic, C – slika centrov celic, D – na novo ustvarjena slika z »virtualno celularizacijo«.

S 3-D modelom endosperma (glej 3.6.4.4.1) smo vzporedno obdelali sliko razporeditve velikosti celic in razporeditve vrednosti C. Za vsak voksel (voksel je ekvivalent piksla v treh dimenzijah, najmanjši element 3-D bitne slike) smo tako dobili podatek o prostornini celic, ki jih predstavlja, in njihovi vrednosti C. Z modelom smo lahko ocenili prostornino endosperma in število celic v njem:

$$V = \sum_{i=1}^m (n_i \times v_0) \quad (3.13)$$

V – prostornina endosperma, m – število virtualnih prečnih rezin, n_i – število vokslov v prečni rezini i, v_0 – prostornina enega voksla.

$$N = \sum_{i=1}^{SV_{maks}} \sum_{j=1}^{C_{maks}} \left(n_{i,j} \times \frac{v_0}{v_i} \right) \quad (3.14)$$

N – število celic v endospermu, SV_{maks} – največja siva vrednost, uporabljena za kodiranje prostornine celic (v našem primeru 254), C_{maks} – največja vrednost C v preparatu, $n_{i,j}$ – število vokslov s sivo vrednostjo i , ki kodira prostornino celic in vrednostjo C j , v_0 – prostornina enega voksla, v_i – prostornina celice, ki jo predstavlja siva vrednost i .

Posamezni členi vsot v enačbi (3.14) so se med izračunavanjem 3-D modela endosperma zapisovali v preglednico, tako, da smo dobili podatke o številu celic, ki pripadajo različnim razredom vrednosti C , razvrščene glede na prostornino celic v toliko razredov, kolikor sivih vrednosti je bilo uporabljenih za kodiranje prostornine celic (SV_{maks}). Za nadaljnje statistične analize smo celice po prostornini združili v večje razrede.

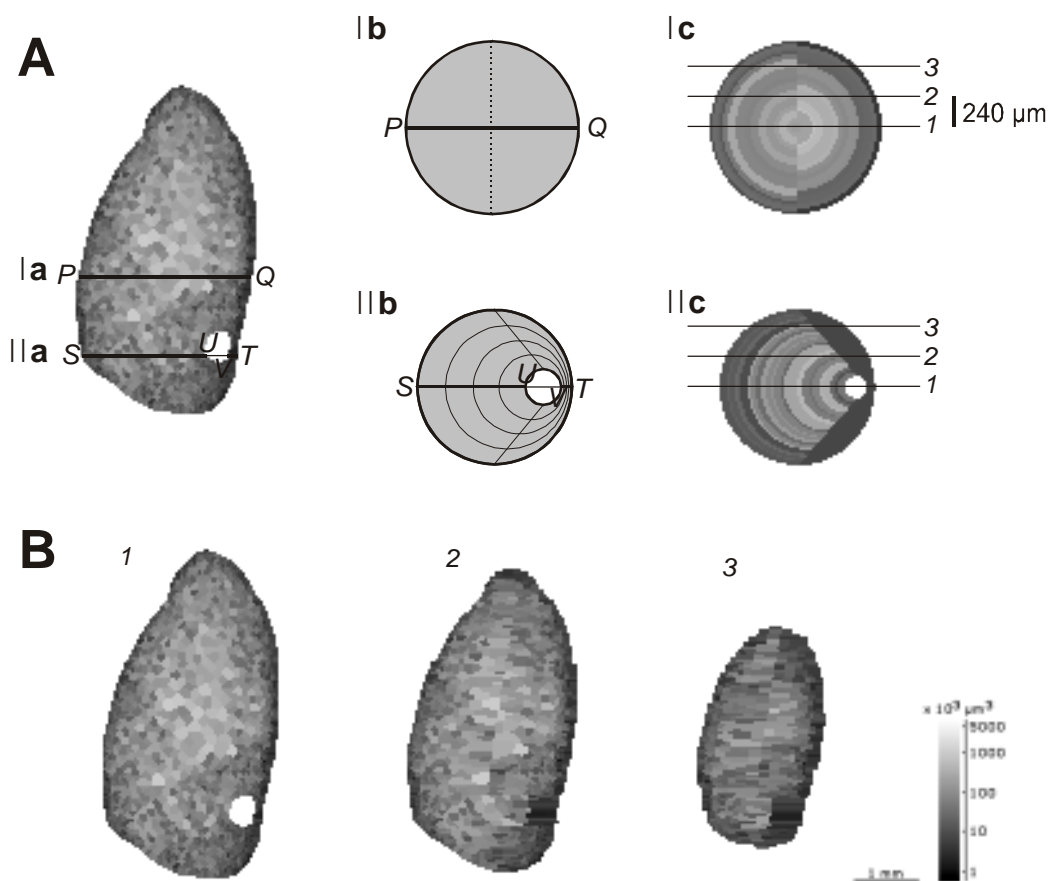
3.6.4.4.1 3-D model endosperma

Iz popravljene 2-D slike endosperma (Slika 3.14 D) smo ekstrapolirali 3-D strukturo endosperma. Vzdolžno rezino smo v osnovi zavrteli okrog osi simetrije. Ker pa je tridimenzionalna oblika endosperma nepravilna, slike nismo zavrteli kot celote, ampak smo jo vrteli po posameznih vrsticah z višino enega piksla okrog njihovih osi simetrije. Za vsako vrstico pikslov (primer Slika 3.15 A in 3.16 A, Ia črta PQ in IIa črta ST) smo izračunali virtualni prečni prerez, sestavljen iz vokslov, kot je prikazano na Slikah 3.15 A in 3.16 A, Ib in IIb. Prečni prerez smo napolnili s sivimi vrednostmi na podlagi profila sivih vrednosti izvirne vrstice pikslov (Slika 3.15 A in 3.16 A, Ic in IIc). Za vrstice pikslov, ki niso bile v območju endosperma, kjer se rastoči embrio razvija v endospermskem žepu, smo prečni prerez ocenili kot krog s premerom PQ (Slika 3.15 A in 3.16 A, Ia in Ib). Profil sivih vrednosti smo zavrteli za $\pm 90^\circ$ in dobili koncentrične pasove vokslov, ki so imeli enake sive vrednosti v polovicah krožnih lokov (Slika 3.15 A in 3.16 A, Ic). Celice endosperma v okolici embria so bile drugačne kot celice dorzalnega dela endosperma. V mlajših razvojnih stopnjah (od 4. do 8. DPO) je bil embrio popolnoma obdan z endospermom, v poznejšem razvoju (od 10. do 16. DPO) pa je bil embrio obdan z endospermom le z ene strani. Zato smo za oceno porazdelitve celic v delu endosperma pod

vplivom embria uporabili drugačen model za zgodnje (glej 3.6.4.4.2) in poznejše razvojne stopnje endosperma (glej 3.6.4.4.3).

3.6.4.4.2 3-D model endosperma mlajših razvojnih stopenj (4–8 DPO)

Prečne prereze endosperma v območju embria smo ocenili na podlagi krožnic, katerih premer pada od premera endosperma (Slika 3.15 A, I**b** razdalja *ST*) do premera embria (Slika 3.15 A, I**b** razdalja *UV*), središče pa se premika od središča endosperma do središča embria (Slika 3.15 A, I**b**). Profila sivih vrednosti med točkama *S* in *U* ter točkama *V* in *T* smo preračunali v pasove vokslov, kot je prikazano na Sliki 3.15 A, I**c**. Na Sliki 3.15 B so prikazani primeri virtualnih vzdolžnih rezin, izračunanih z opisanim modelom (oznake 1, 2 in 3 ustrezajo oznakam na Sliki 3.15 A).

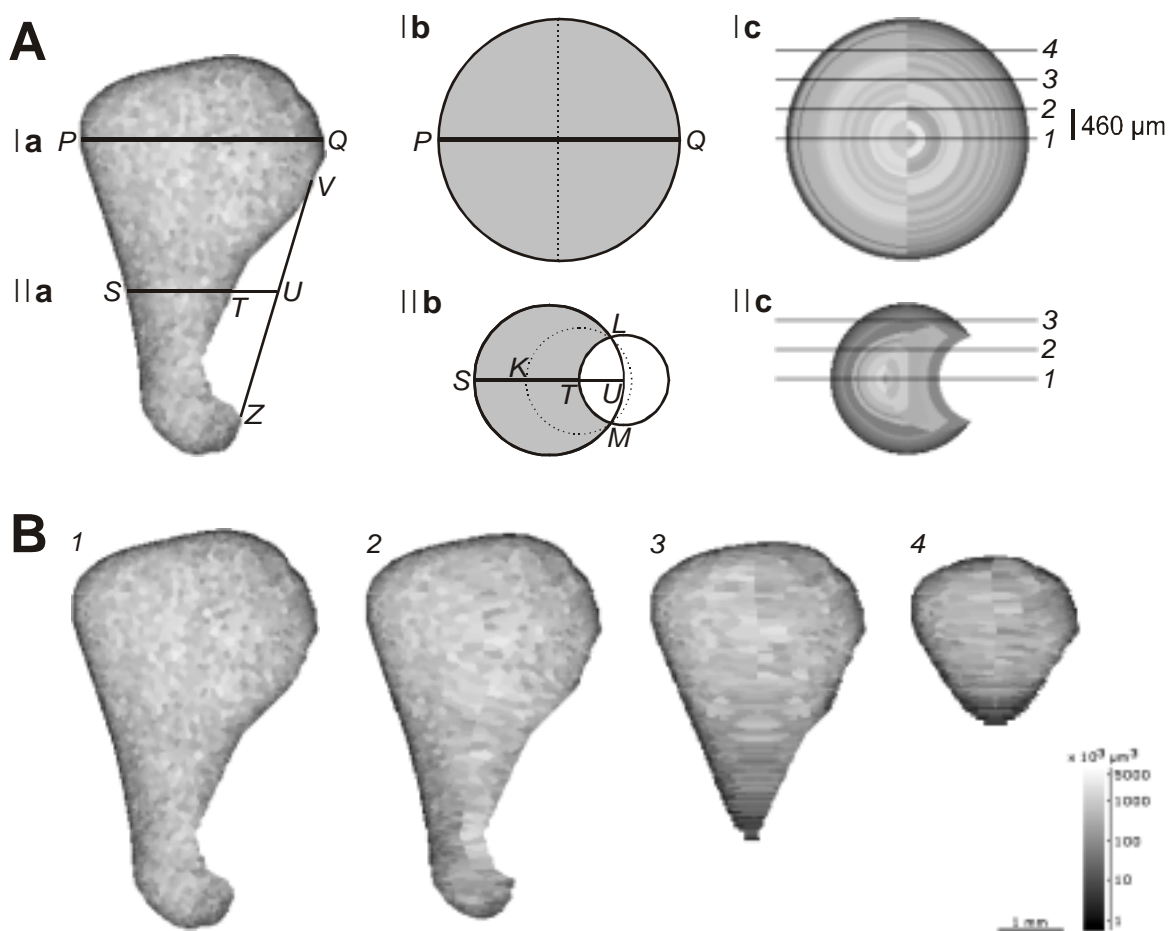


Slika 3.15. Izdelava 3-D modela endosperma za razvojne stopnje od 4. do 8. DPO.

A – vrtenje posameznih vrstic pikslov, izračunavanje virtualnih prečnih prerezov, B – izračunani virtualni vzdolžni prerezi.

3.6.4.4.3 3-D model endosperma starejših razvojnih stopenj (10–16 DPO)

Za oceno prečnih prerezov v območju endospermskega žepa (Slika 3.16 A, vodoravne vrstice med točkama *V* in *Z*) smo najprej povezali skrajni točki žepa z ravno črto (Slika 3.16 A, črta *VZ*). Za polmer endospermskega žepa smo privzeli razdaljo *TU*, razdaljo *SU* pa za premer kroga, ki je očrtan prečnemu prerezu endosperma (Slika 3.16 A, IIa in IIb). Velikosti celic, ki obkrožajo endospermski žep, so bile drugačne kot velikosti celic v zunanjih plasteh endosperma, ki mejijo na perikarp. Zato smo definirali »območje vpliva embria« kot krog na osnovi treh točk (Slika 3.16 A, prekinjena črta v IIb): sredina profila sivih vrednosti (*K*) in točki presečišča med krogom, očrtanim endospermu, in krogom endospermskega žepa (*L* in *M*). Profil sivih vrednosti med točkama *S* in *T* smo preračunali v pasove vokslov, kot je prikazano na Sliki 3.16 A, IIc. Sive vrednosti pikslov med točkama *K* in *T* so bile uporabljene za izračun vrednosti vokslov v »območju vpliva embria«, vrednosti pikslov med točkama *S* in *K* pa za izračun vrednosti vokslov v preostalem delu endosperma. Na Sliki 3.16 B so prikazani primeri virtualnih vzdolžnih rezin, izračunanih z opisanim modelom (oznake 1, 2, 3 in 4 ustrezajo oznakam na Sliki 3.16 A).



Slika 3.16. Izdelava 3-D modela endosperma za razvojne stopnje od 10. do 16. DPO.

A – vrtenje posameznih vrstic pikslov, izračunavanje virtualnih prečnih prerezov, B – izračunani virtualni vzdolžni prerezi.

3.6.4.5 Statistična obdelava podatkov

Podatke, ki so bili eksponentne narave (velikost celic, količina DNA), smo pred analizami logaritmirali, tako se je njihova porazdelitev približala Gaussovi porazdelitvi. Za opis porazdelitev smo uporabljali parametrične ali neparametrične kazalce, odvisno od oblike porazdelitve. Za primerjave posameznih razredov znotraj ene ponovitve smo vedno uporabljali enosmerno analizo variance, ker ima večjo moč pri majhnih vzorcih kot neparametrična oblika (Kruskal-Wallis) in ni občutljiva za majhne odklone oblike porazdelitev od normalne (Motulsky, 1995). Posamezne skupine smo primerjali med seboj s Tukeyjevim posttestom (GraphPad Prism verzija 3.02 za okolje Windows, GraphPad Software, ZDA). Kjer smo primerjali le dva razreda, smo uporabili *t*-test. Iz median oziroma aritmetičnih sredin, izračunanih iz posameznih ponovitev, smo računali povprečja, standardno deviacijo in standardno napako. Podatke smo prikazovali s frekvenčnimi porazdelitvami in razpršenimi grafi. Za statistično analizo smo uporabljali program GraphPad Prism 3 in Microsoft Excel 97 (Microsoft Corporation, ZDA), grafe pa smo narisali v programih GraphPad Prism 3, Microsoft Excel 97 in SigmaPlot 8 (SPSS Science Software GmbH, Nemčija).

4 REZULTATI

4.1 Vizualizacija celičnih procesov v kariopsi

Del objavljen v Plant Physiology 129 (2002) 23-30. (Priloga A)

Razvoj kariopse smo spremljali na medianih vzdolžnih rezinah. Rezine kariops, izrezanih iz storžev 0 do 28 dni po opraitvi (DPO), smo barvali z različnimi histološkimi tehnikami. Na podlagi pregledanih preparatov smo v obdobju razvoja od 4. do 12. DPO izbrali po eno tipično kariopso genotipov *Mn1* (divji tip) in mutante *mn1*, v prejšnji raziskavi pa smo 16. DPO izbrali po dve kariopsi obeh genotipov. V izbranih kariopsah se je 4. DPO v endospermu že končala celularizacija, v nekaterih drugih kariopsah pa smo v tem času še opazili necelulariziran osrednji del endosperma. V času od 4. do 16. DPO v celicah endosperma še ni veliko suhe snovi, ki v poznejših razvojnih stopnjah onemogoča izdelavo nepoškodovanih parafinskih rezin celotne kariopse. Na medianih vzdolžnih rezinah izbranih kariops, starih od 4 do 16 DPO, smo natančneje raziskali razvoj kariopse s kvantitativnim barvanjem DNA in merjenjem velikosti celic. Kariopse 4 do 12 DPO so bile vzgojene na rastlinah v rastlinjaku, kariopse 16 DPO pa na rastlinah na polju, zato sta skupini podatkov v prikazu rezultatov meritev ločeni.

4.1.1 Razporeditev jeder v kariopsi

Na Slikah 4.1 do 4.6 je prikazana primerjava razporeditev izmerjenih jeder v medianih vzdolžnih rezinah kariops divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1* v času od 4 do 16 dni po opraitvi. V meritvi smo izmerili le jedra, ki se niso prekrivala med seboj in niso bila poškodovana. Zato je bilo izmerjenih jeder v vseh primerih manj, kot je bilo vseh jeder, vidnih v rezini. Izmerjena jedra smo znotraj vsakega tkiva (nucel, perikarp, embrio, endosperm) razdelili na razrede vrednosti C na osnovi vrhov, ki so se oblikovali v frekvenčnih porazdelitvah relativne vsebnosti DNA v jedrih. V razred perikarp smo uvrstili jedra v celicah stene plodnice in v celicah pedicela, ki meji na semensko zasnovo.

Podrobnejše analize vsakega tkiva posebej so opisane v poglavjih 4.1.2.1 (nucel), 4.1.2.2 (perikarp), 4.1.3.1 (embrio) in 4.1.3.2 (endosperm). Jedra 2 C do 8 C so bila v nucelu, perikarpu in embriju (diploidna tkiva), jedra 3 C do 192 C pa v endospermu (triploidno tkivo).

Razvoj kariops divjega tipa in mutante *mn1* je bil podoben v času od 4. do 8. DPO (Slike 4.1 do 4.3). 4. DPO je večino prostora v semenski zasnovi zavzemal diploidni nucel, triploidni endosperm je zavzemal le malo prostora. V nadaljnjem razvoju je rastoči endosperm postopoma nadomeščal nucel. V bazalnem delu endosperma so bila vidna diploidna jedra embria, ki je do 8. DPO popolnoma obdan z endospermom. V endospermu so bila jedra različnih vrednosti C enakomerno porazdeljena.

V času 6 in 8 DPO so imela jedra v notranji plasti stene plodnice (bližje nucelu) večinoma vrednosti 2 C, jedra v zunanji plasti pa večinoma 4 C.

Razvoj kariops od 10. DPO naprej se je razlikoval med obema genotipoma (Slike 4.4 do 4.6). Perikarp na apikalnem delu kariopse *mn1* ni bil v tesnem stiku z endospermom kot pri *Mn1*, ampak je bil naguban, med perikarpom in endospermom je bil v tem delu prazen prostor (zrak). Apikalni del *mn1* endosperma ni bil zaobljen kot v *Mn1*.

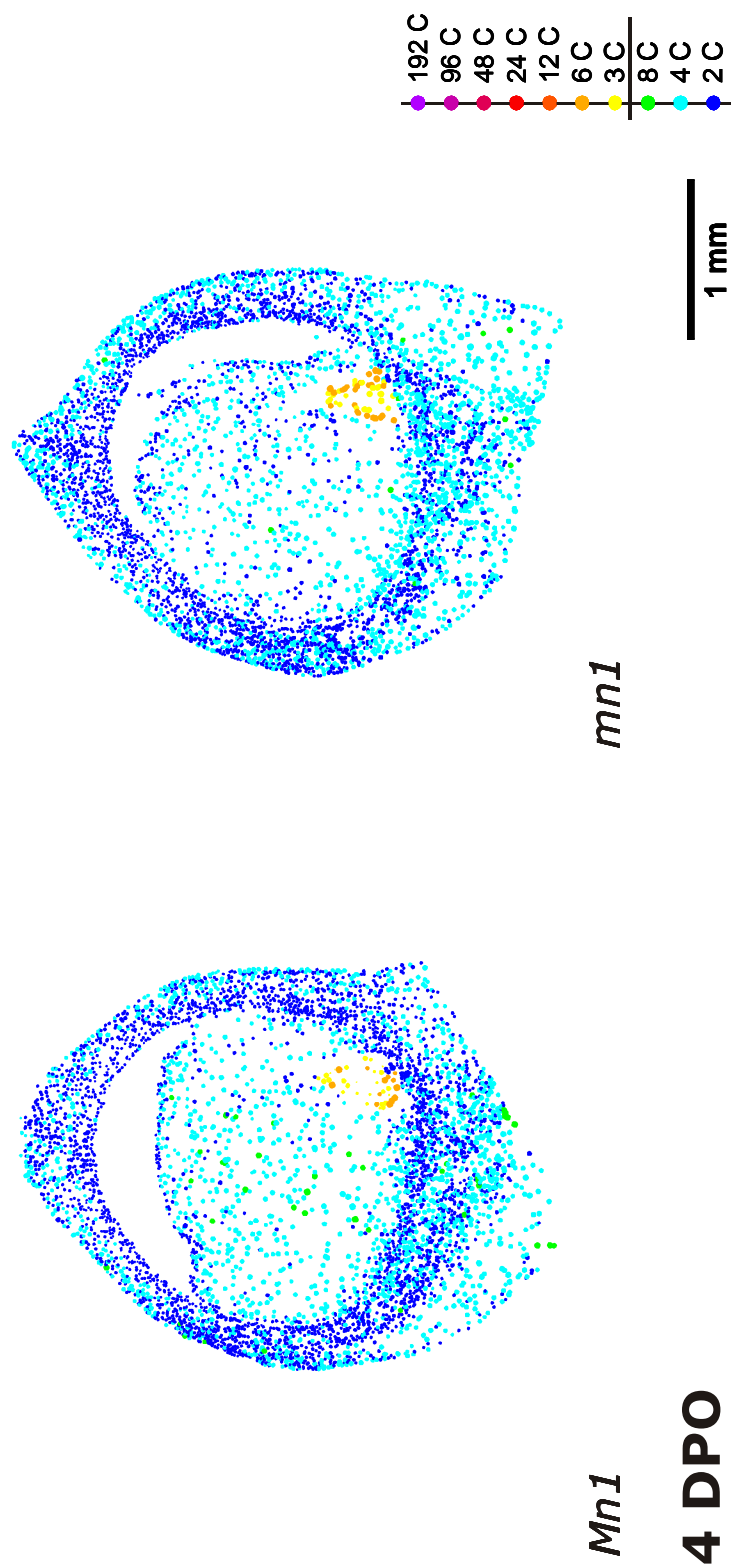
Razporeditev jeder različnih vrednosti C v endospermu je bila podobna pri obeh genotipih. Na obodu endosperma so prevladovala jedra z nizkimi vrednostmi C, v osrednjem delu endosperma pa so bila jedra z najvišjimi vrednostmi C. Razporeditev celic v endospermu, kjer smo vsaki celici priredili vrednost C, je prikazana na Sliki 4.36. V času od 4. do 8. DPO je bil razvijajoči se endosperm obdan z nucelom, v katerem so bila večinoma jedra 2 C in 4 C. V nucelu *Mn1* pa smo 8. DPO opazili tudi več endopoliploidnih jeder 8 C (Slika 4.3 in Slika 4.7). Od 10. DPO naprej je bil nucel prisoten le še kot tanka plast med endospermom in perikarpom z redkimi jedri.

Jedra v zunanji plasti perikarpa so postala endopoliploidna. Prva jedra z vrednostjo 8 C smo opazili 6. DPO, od 12. DPO naprej pa so se pojavljala v večjem številu v perikarpu obeh genotipov (Slika 4.5).

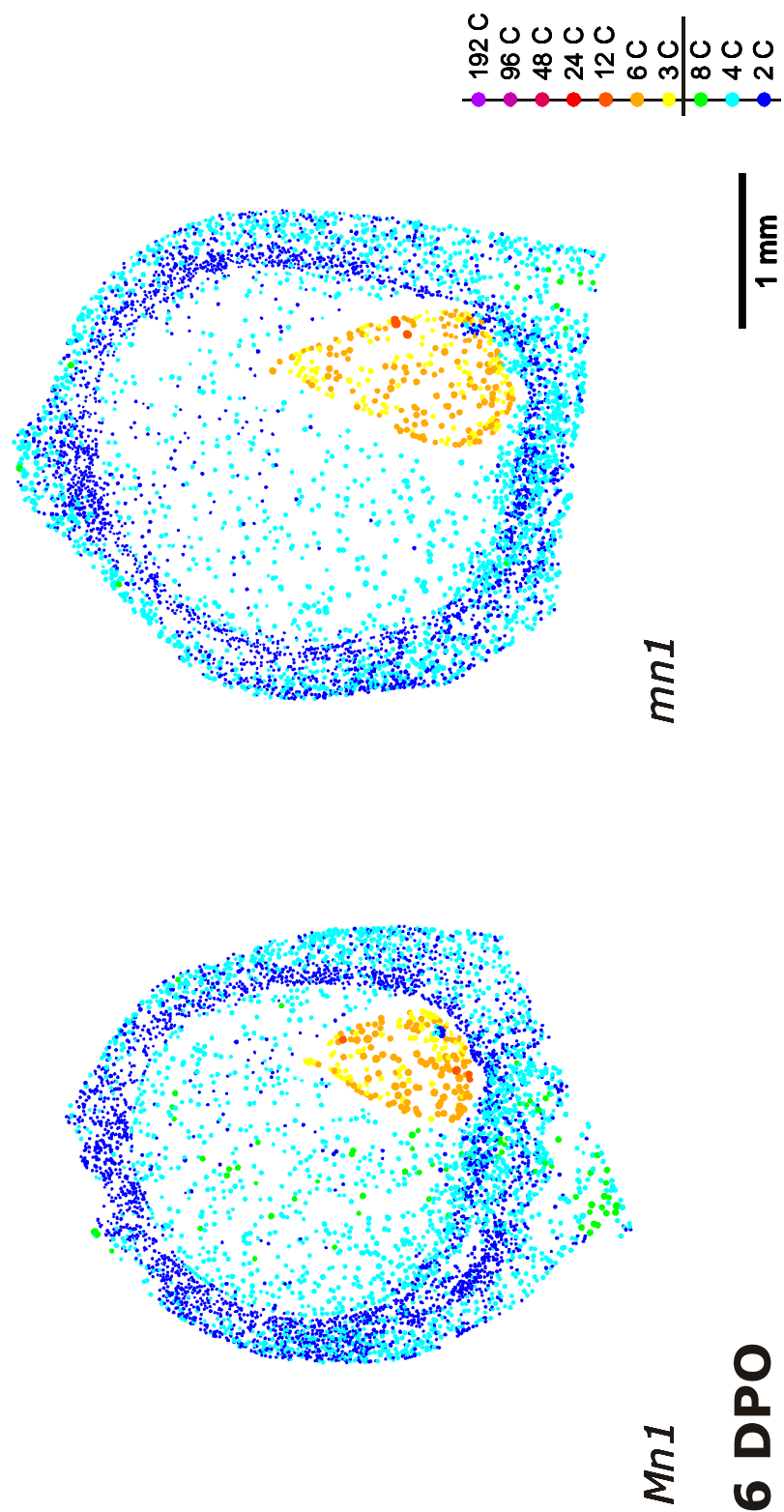
Od 10. DPO naprej embrio na videz ni bil več popolnoma obdan z endospermom in je rasel med endospermom in perikarpom. Vendar je bila med embrijem in perikarpom še

eno celico debela plast alevronskih celic, tako da je bil embrio še vedno znotraj endosperma (Slike 4.4 do 4.6). Votlina, v kateri raste embrio, je endospermški žep.

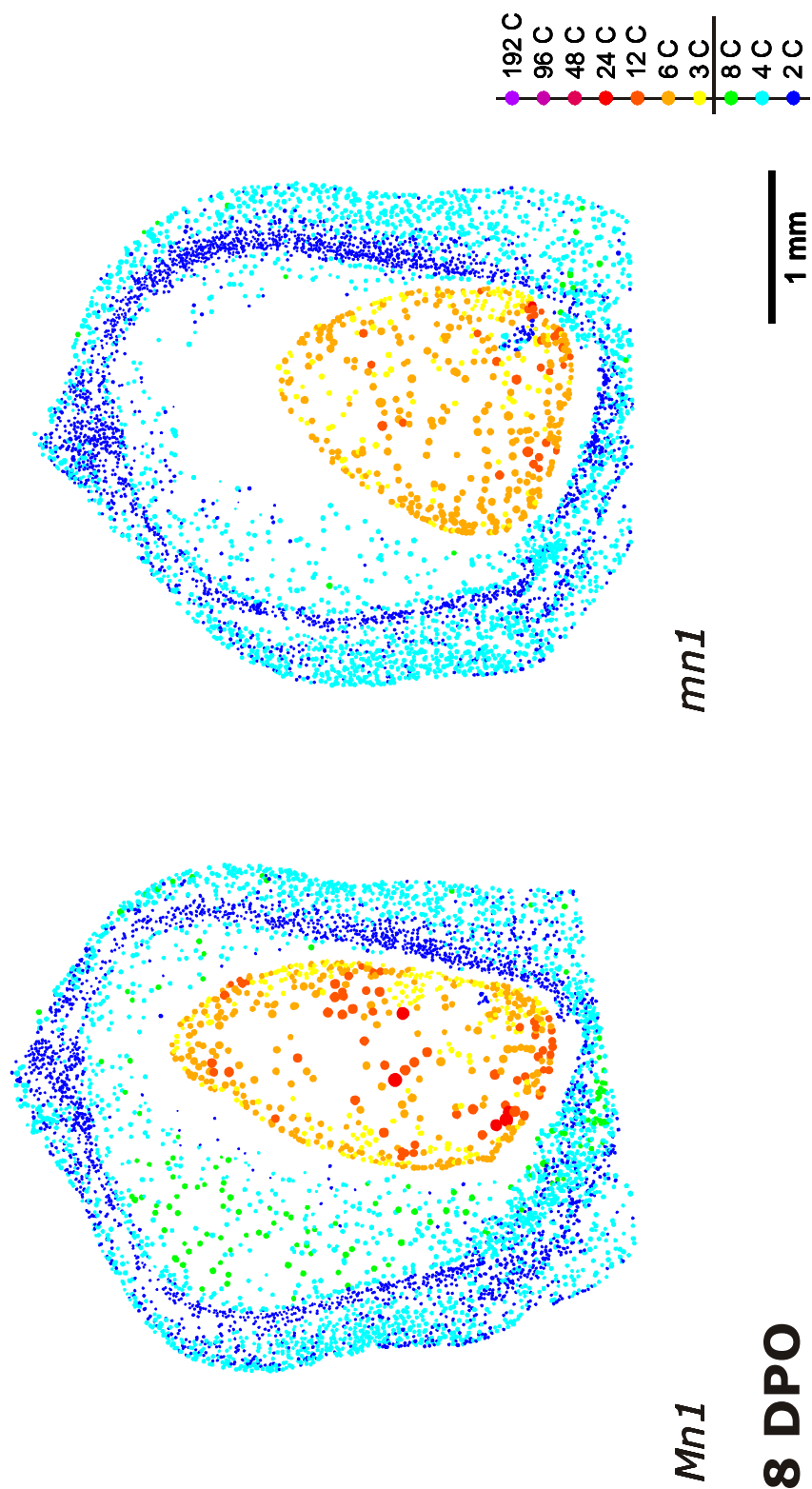
Anatomski znak, po katerem se kariopsa *mnI* loči od kariopse divjega tipa, je tudi razmik med bazalnim delom endosperma in placento-halazno plastjo (materinskim tkivom tik pod endospermom). Od 8. DPO naprej je bilo v placento-halazni plasti območje, v katerem ni bilo jeder (Slike 4.3 do 4.6) v obeh genotipih. Vendar so bile na tem mestu še ohranjene celične stene (glej 4.1.2.3.2), v kariopsi *MnI* je bil endosperm še v stiku z materinskim tkivom, v kariopsi *mnI* pa smo opazili tudi ločenost bazalnega dela endosperma od celic placento-halazne plasti.



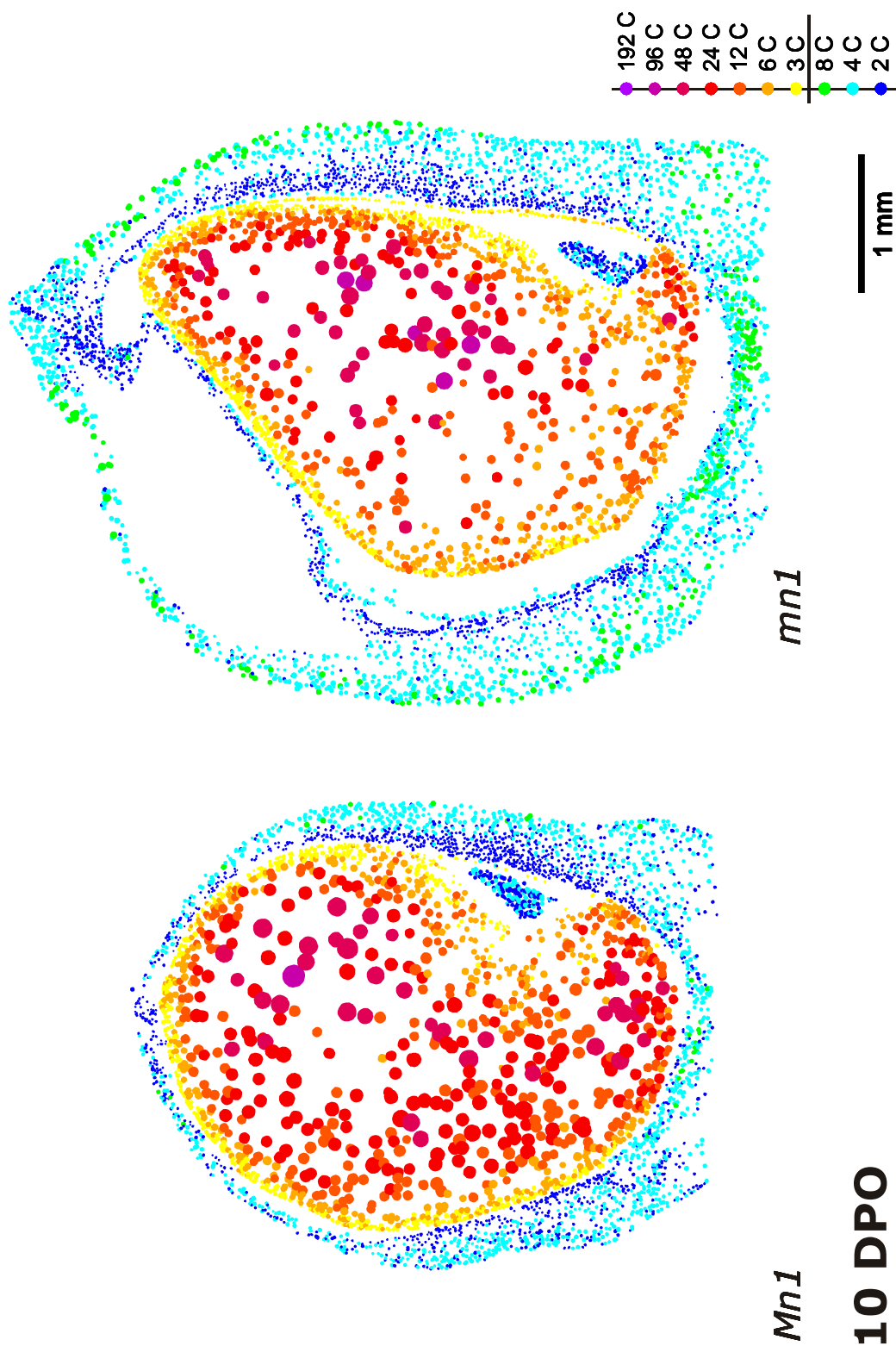
Slika 4.1. Stopnja endopoliploidnosti v kariopsi koruze divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1*, 4 DPO. Izmerjenih 4948 jeder v *Mn1* in 4638 jeder v *mn1*. Rastline so bile vzgojene v rastlinjaku.



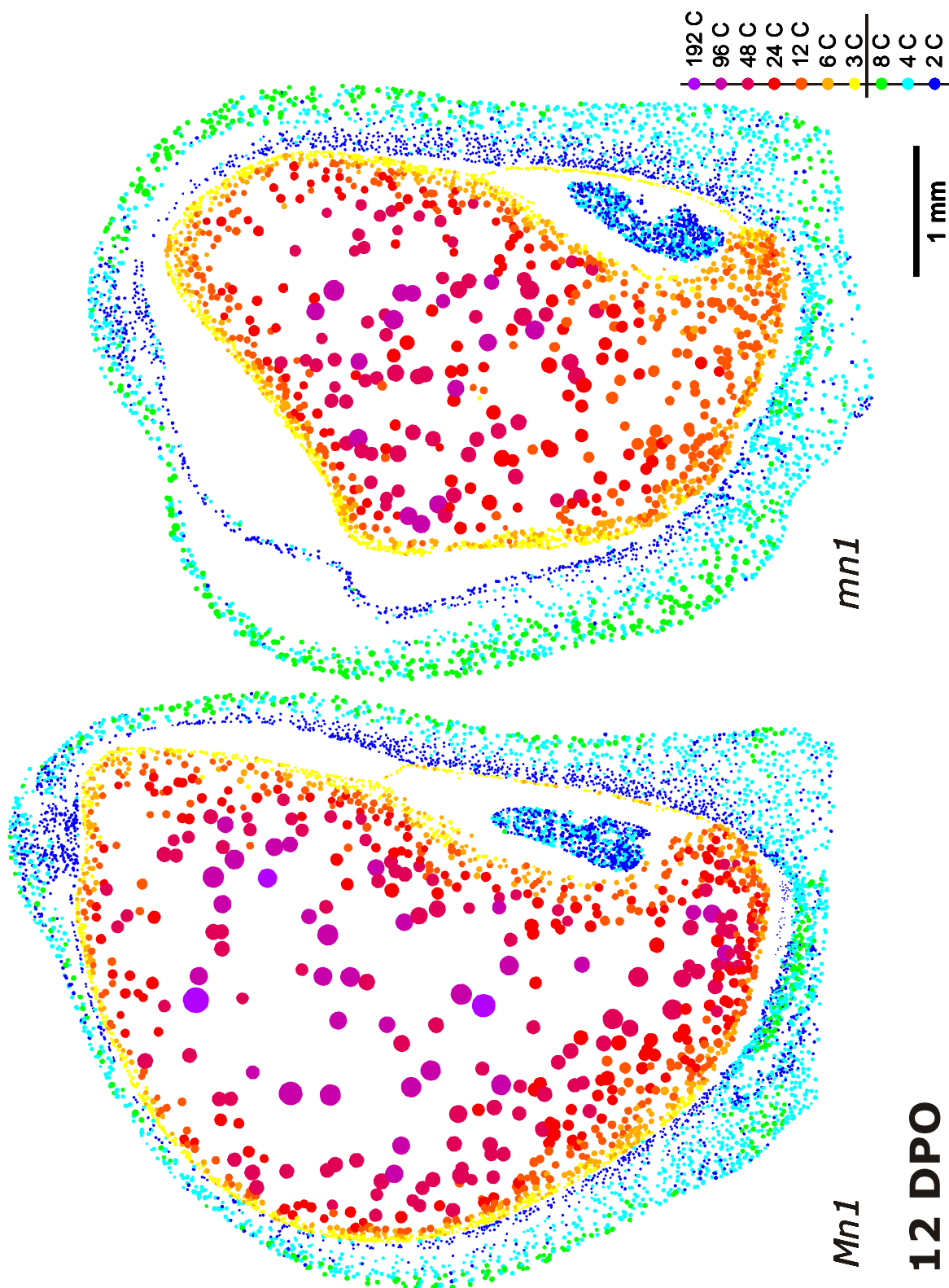
Slika 4.2. Stopnja endopoliploidnosti v kariopsi koruze divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1*, 6 DPO. Izmerjenih 5037 jeder v *Mn1* in 4782 jeder v *mn1*. Rastline so bile vzgojene v rastlinjaku.



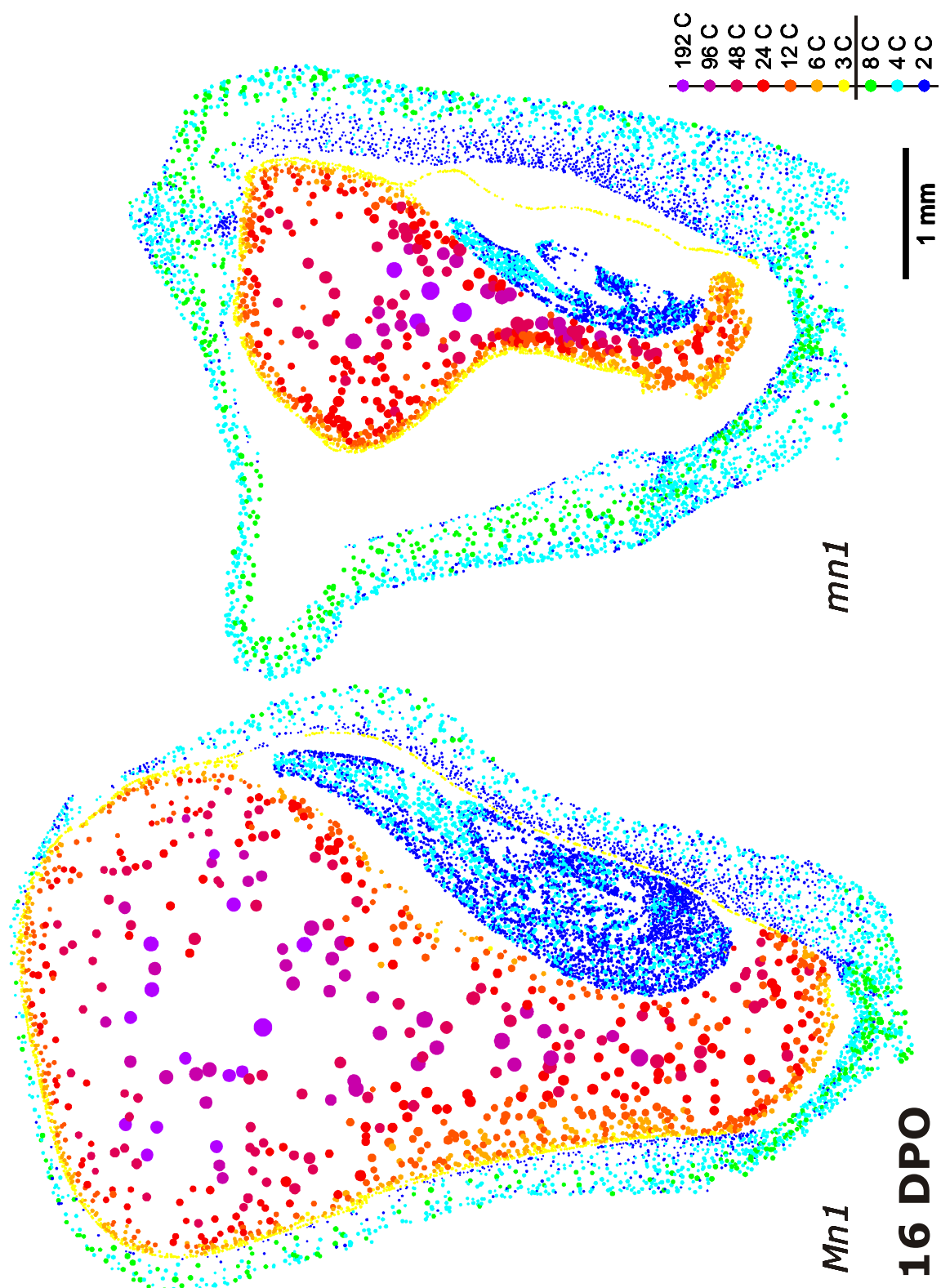
Slika 4.3. Stopnja endopoliploidnosti v kariopsi koruze divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1*, 8 DPO. Izmerjenih 5244 jeder v *Mn1* in 5045 jeder v *mn1*. Rastline so bile vzgojene v rastlinjaku.



Slika 4.4. Stopnja endopoliploidnosti v kariopsi koruze divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1*, 10 DPO. Izmerjenih 3996 jeder v *Mn1* in 5896 jeder v *mn1*. Rastline so bile vzgojene v rastlinjaku.



Slika 4.5. Stopnja endopoliploidnosti v kariopsi koruze divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1*, 12 DPO. Izmerjenih 6278 jeder v *Mn1* in 5939 jeder v *mn1*. Rastline so bile vzgojene v rastlinjaku.



Slika 4.6. Stopnja endopoliploidnosti v kariopsi koruze divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1*, 16 DPO.

Za oba genotipa je prikazana po ena vzdolžna rezina od dveh izmerjenih. Izmerjenih 8924 jeder v *Mn1* in 7246 jeder v *mn1*. Rastline so bile vzgojene na polju.

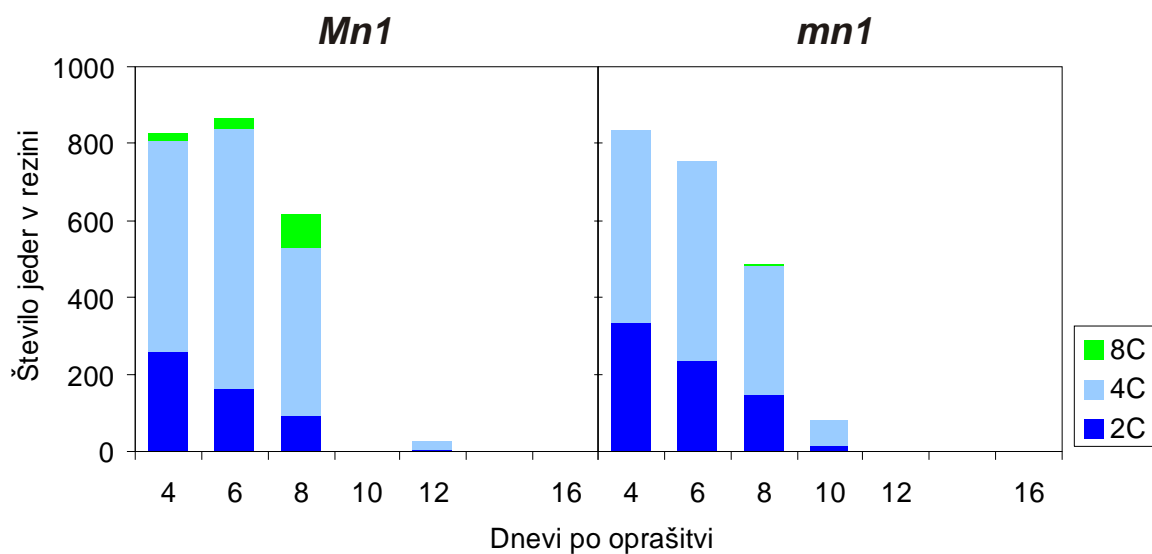
4.1.2 Citološka analiza materinskega tkiva

4.1.2.1 Nucel

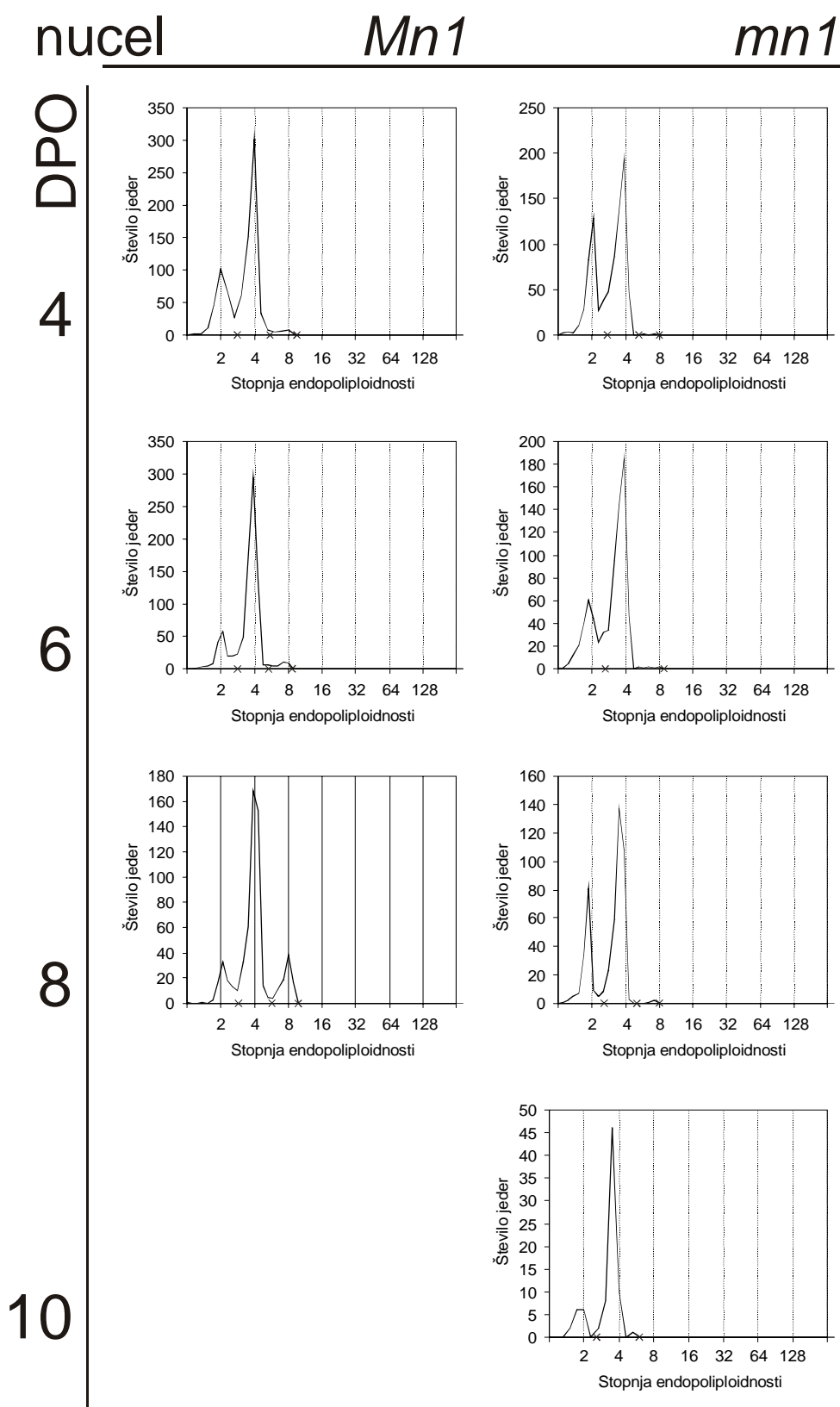
4.1.2.1.1 Število jeder posameznih razredov ploidnosti v vzdolžnih rezinah kariopse

V nucelu divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1* je bilo največ jeder na začetku proučevanega obdobja razvoja (4. do 6. DPO), do 10. DPO pa se je njihovo število strmo zmanjšalo. V kariopsi *Mn1* 12 DPO in kariopsi *mn1* 10 DPO smo izmerili ploidnost jeder v zadnjih ostankih nucela. Za nucel je bil značilen velik delež jeder 4 C proti 2 C, v njem pa smo opazili tudi endopoliploidna jedra 8 C. Jeder 8 C je bilo največ 8. DPO v obeh genotipih, vendar pa je njihovo število v *Mn1* zelo presegalo število v *mn1*. V vzdolžnih rezinah kariops *Mn1* 10 DPO, *mn1* 12 DPO in obeh genotipov 16 DPO nismo opazili jeder nucela (Slika 4.7 in Slika 4.8).

Jedra v nucelu smo ločili na razrede vrednosti C na podlagi frekvenčnih porazdelitev faktorja C, izračunanega iz IOG jeder (Slika 4.8). V *Mn1* je bil vrh 2 C nižji v primerjavi s 4 C kot v *mn1*. V *Mn1* je bil dobro viden tudi vrh 8 C (Slika 4.8), ki ga je v *mn1* predstavljalo le nekaj posameznih jeder (Slika 4.9). Za jedra 4 C iz mikroskopskih preparatov ne moremo z gotovostjo trditi, ali jedra 4 C pripadajo že prvemu endoreduplikacijskemu ciklu ali pa so to jedra v G2 fazi mitoze. Verjetno pa je populacija 4 C jeder mešana. Z vedno večjo stopnjo endopoliploidnosti se je večala tudi velikost jeder. Razporeditev jeder se je po stopnji endopoliploidnosti (prikazana kot faktor C) in velikosti (prikazana kot logaritem površine preseka jeder v rezini) oblikovala v skupine (Slika 4.9). V obeh genotipih je bila velikost jeder v enakem območju za jedra v posameznih skupinah (Slika 4.9).

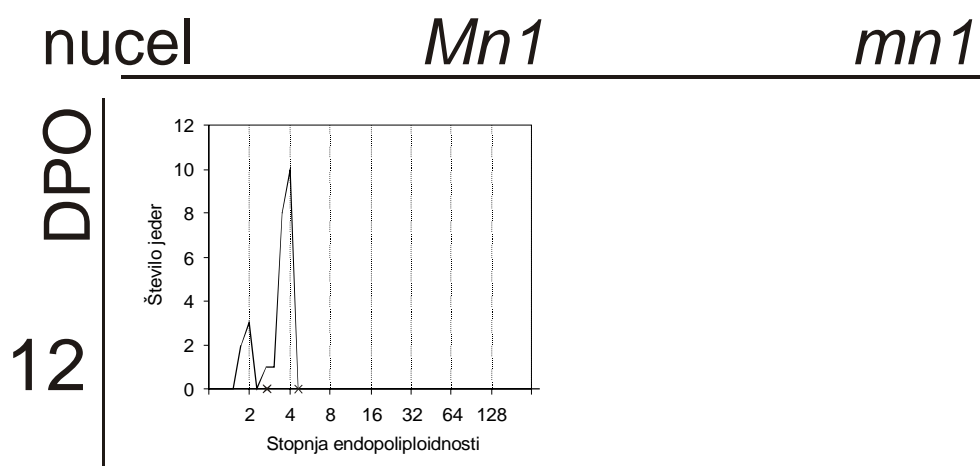


Slika 4.7. Število izmerjenih jeter v nucelu v vzdolžnih rezinah kariops koruze divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1*.



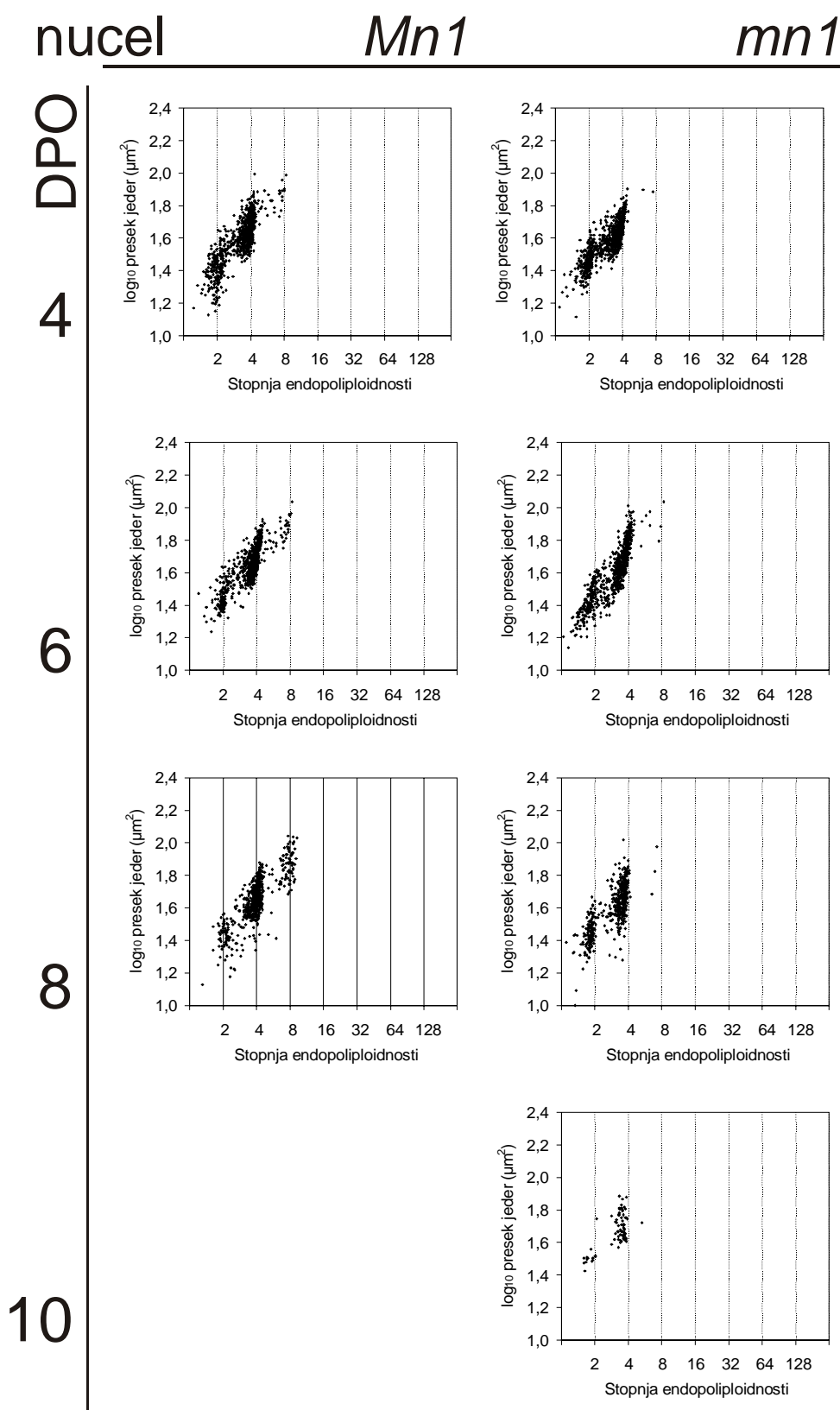
Slika 4.8. Frekvenčna porazdelitev jeter v nucelu glede na relativno vsebnost DNA.

(Slika se nadaljuje na naslednji strani.)



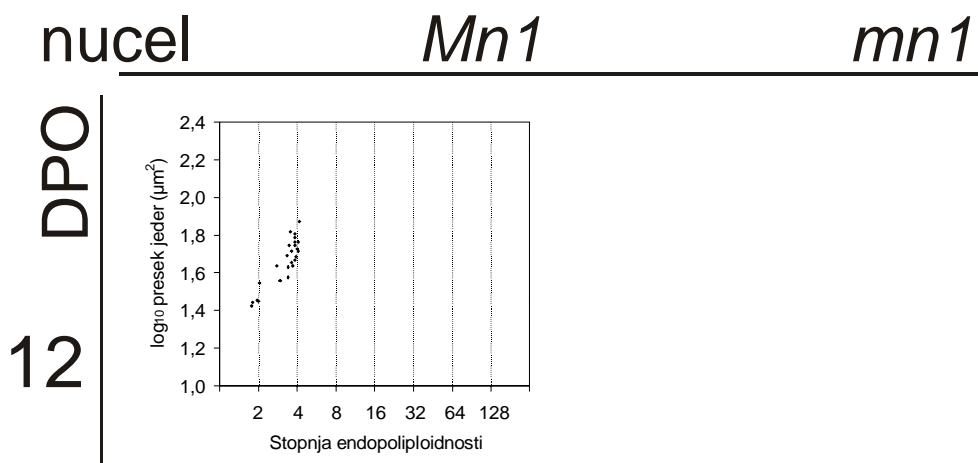
Slika 4.8. Frekvenčna porazdelitev jeter v nucelu glede na relativno vsebnost DNA.

(Nadaljevanje slike s prejšnje strani.) Meje med razredi jeter z različno stopnjo endopoliploidnosti so označene s križci (×) na osi x. Pri razvojnih stopnjah, za katere podatki niso prikazani, v rezini ni bilo jeter nucela.



Slika 4.9. Površina preseka jeder in stopnja endopoliploidnosti jeder v nucelu.

(Slika se nadaljuje na naslednji strani.)

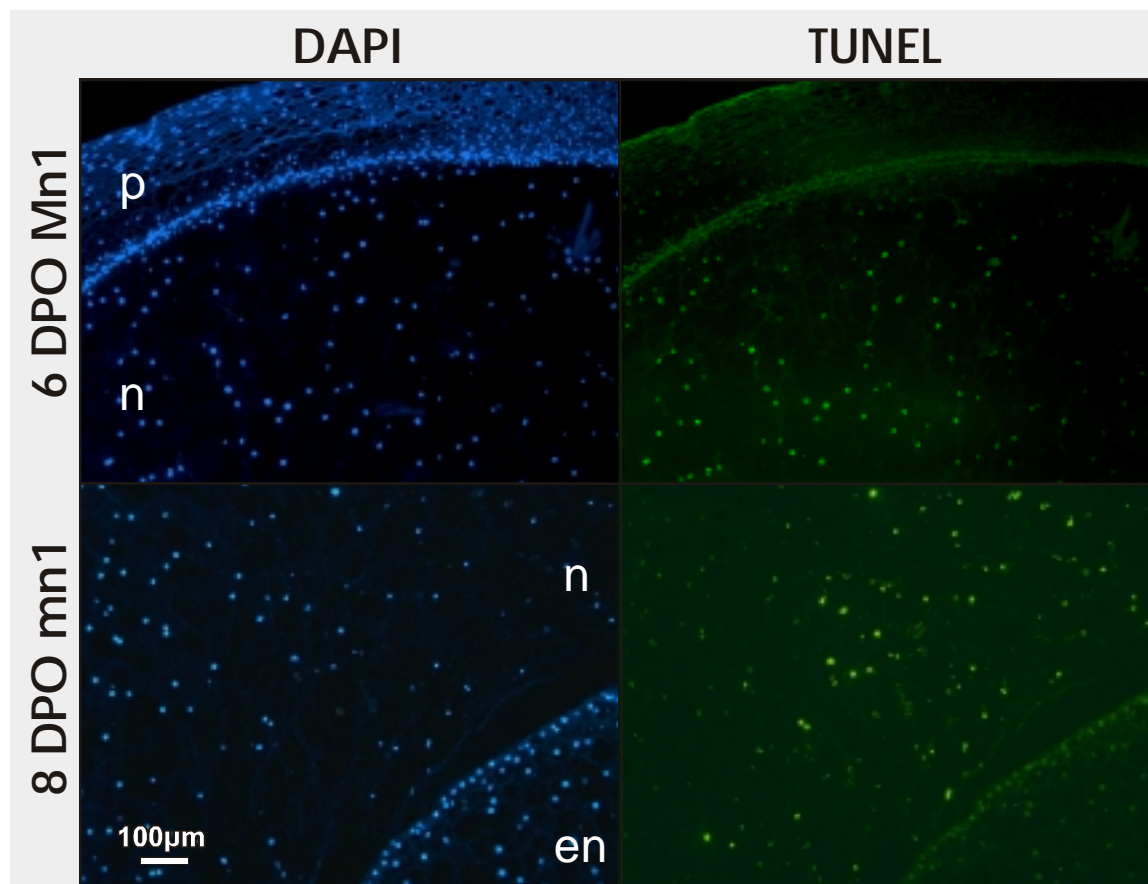


Slika 4.9. Površina preseka jeter in stopnja endopoliploidnosti jeter v nucelu.

(Nadaljevanje slike s prejšnje strani.) Pri razvojnih stopnjah, za katere podatki niso prikazani, v rezini ni bilo jeter nucela.

4.1.2.1.2 Fragmentacija DNA v jedrih nucela

Da bi ugotovili naravo propadanja celic v nucelu, smo na vzdolžnih rezinah kariops izvedli reakcijo TUNEL. Od 6. do 8. DPO smo v jedrih nucela opazili močno zeleno fluorescenco s fluoresceinom označenih nukleotidov, ki so se vezali na proste 3' OH konce DNA (Slika 4.10). Barvanje je dokazovalo, da je bila DNA v jedrih nucela razrezana z endonukleazami že pred propadom celic. Specifičnost reakcije smo potrdili s primerjavo fluorescence jeder, barvanih s TUNEL reakcijo, in fluorescence jeder, barvanih z DAPI, ki barva vso DNA v vseh jedrih. Jedra v nucelu so se močneje barvala z reakcijo TUNEL, kot jedra v perikarpu (Slika 4.10, *Mn1* 6 DPO) ali jedra v endospermu (Slika 4.10, *mn1* 8 DPO). Slika 4.10 tudi prikazuje, da je signal fluorescence jeder, barvanih z reakcijo TUNEL, podoben v kariopsi divjega tipa (*Mn1* 6 DPO) in v kariopsi mutante *mn1* (*mn1* 8 DPO).



Slika 4.10. Fragmentacija DNA v jedrih nucela.

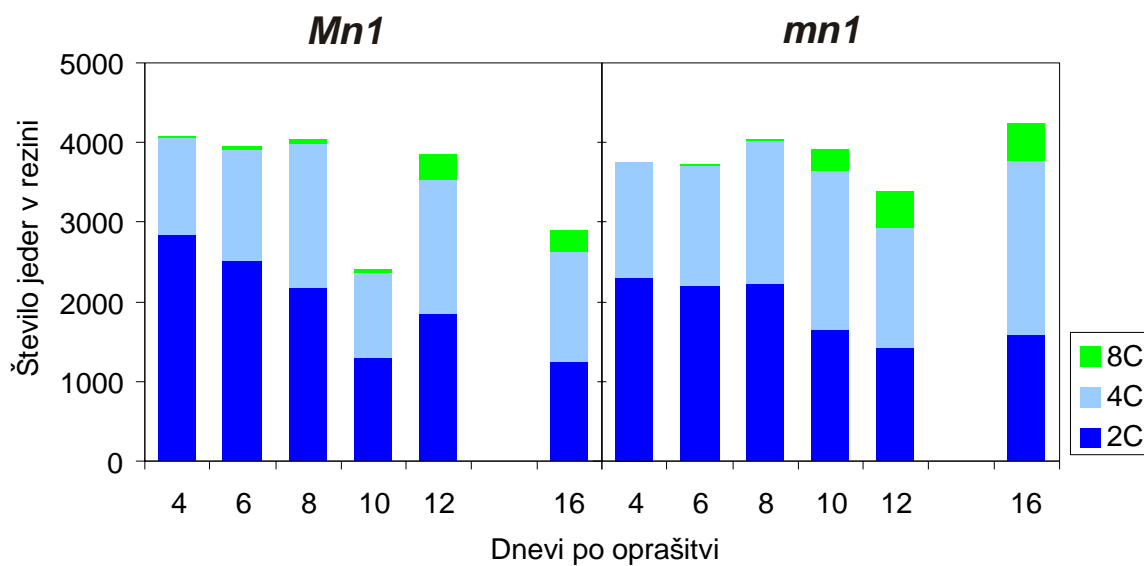
Vzdolžni rezini razvijajoče se kariopse divjega tipa *Mn1* 6 DPO in *mn1* mutante 8 DPO (*mn1*). DAPI obarva vsa jedra, z reakcijo TUNEL pa močnejše svetijo jedra s fragmentirano DNA. Pomen oznak: *p* – perikarp, *n* – nucel, *en* – endosperm.

4.1.2.2 Perikarp

4.1.2.2.1 Število jeder posameznih razredov ploidnosti v vzdolžnih rezinah kariopse

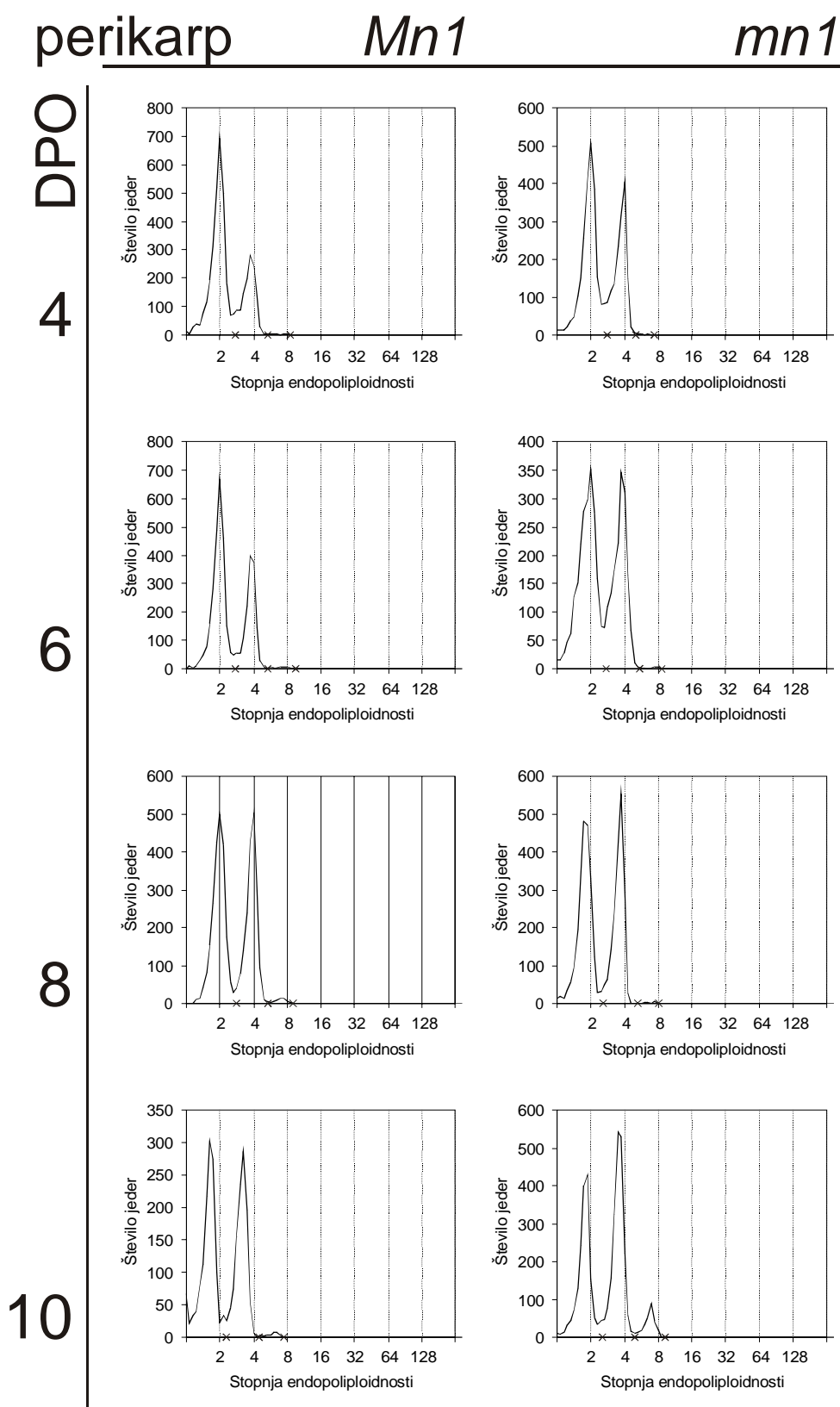
V proučevanih vzdolžnih rezinah kariops divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1* je bilo v perikarpu približno enako število izmerjenih jeder v razvojnih stopnjah od 4. do 16. DPO. Tudi med obema genotipoma ni bilo pomembnih razlik (Slika 4.11). Število jeder 2 C in 4 C je bilo približno enako v vseh opazovanih razvojnih stopnjah v obeh genotipih. Več 2 C jeder je bilo le v perikarpu *Mn1* 4 in 6 DPO. Več endopoliploidnih jeder 8 C smo opazili v perikarpu *Mn1* 12. DPO in pozneje, v perikarpu *mn1* pa 10. DPO in pozneje. Glede na celotno število jeder odstopa le perikarp *Mn1* 10 DPO, vendar zaradi premalo podatkov ne moremo sklepati o statističnem pomenu odstopanja.

Jedra v perikarpu smo ločili na razrede vrednosti C na podlagi frekvenčnih porazdelitev faktorja C, izračunanega iz IOG jeder (Slika 4.12). V perikarpu sta bila vrhova frekvenčnih porazdelitev, ki ustrezata jedrom 2 C in 4 C, približno enako visoka pri obeh genotipih v vseh pregledanih stopnjah razvoja (rahlo odstopa le *Mn1* 4 in 6 DPO). Opaznejši vrh, ki ustreza jedrom 8 C, se je pojavil 12. DPO pri *Mn1* in 10. DPO pri *mn1* (Slika 4.12). Pred tem časom so bila v perikarpu prisotna le posamezna jedra 8 C (Slika 4.13). Za jedra 4 C iz mikroskopskih preparatov ne moremo z gotovostjo trditi, ali jedra 4 C pripadajo že prvemu endoreduplikacijskemu ciklu ali pa so to jedra v G2 fazi mitoze. Verjetno je populacija 4 C jeder mešana. Z vedno večjo stopnjo endopoliploidnosti se je večala tudi velikost jeder. Razporeditev jeder se je po stopnji endopoliploidnosti (prikazana kot faktor C) in velikosti (prikazana kot logaritem površine preseka jeder v rezini) oblikovala v skupine (Slika 4.13). V obeh genotipih je bila velikost jeder v enakem območju za jedra v posameznih skupinah (Slika 4.13).



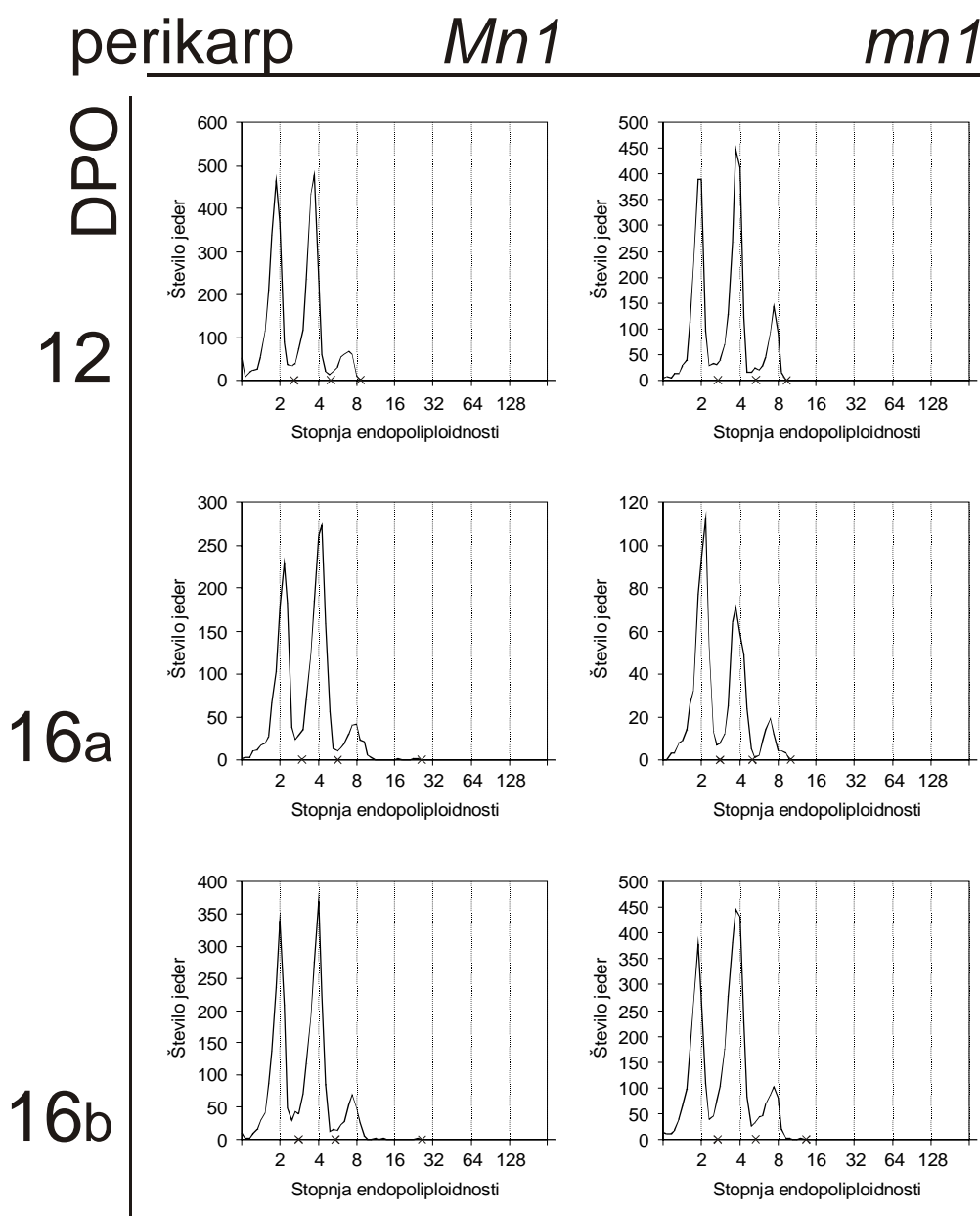
Slika 4.11. Število izmerjenih jeter v perikarpu v vzdolžnih rezinah kariops koruze divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1*.

Pri 16. DPO prikazani podatki za eno od dveh izmerjenih rezin pri obeh genotipih (prikazani na Sliki 4.6).



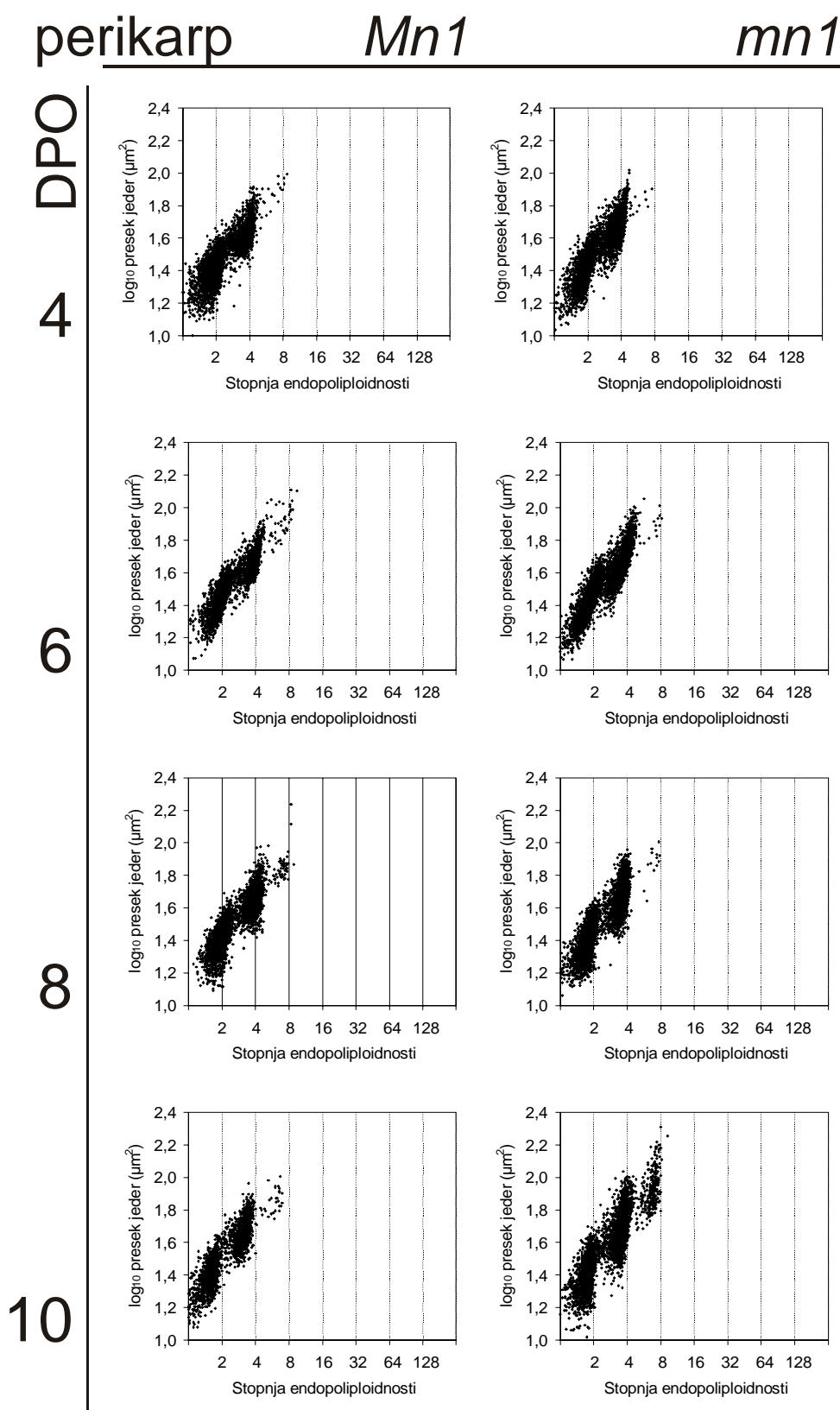
Slika 4.12. Frekvenčna porazdelitev jeter v perikarpu glede na relativno vsebnost DNA.

(Slika se nadaljuje na naslednji strani.)



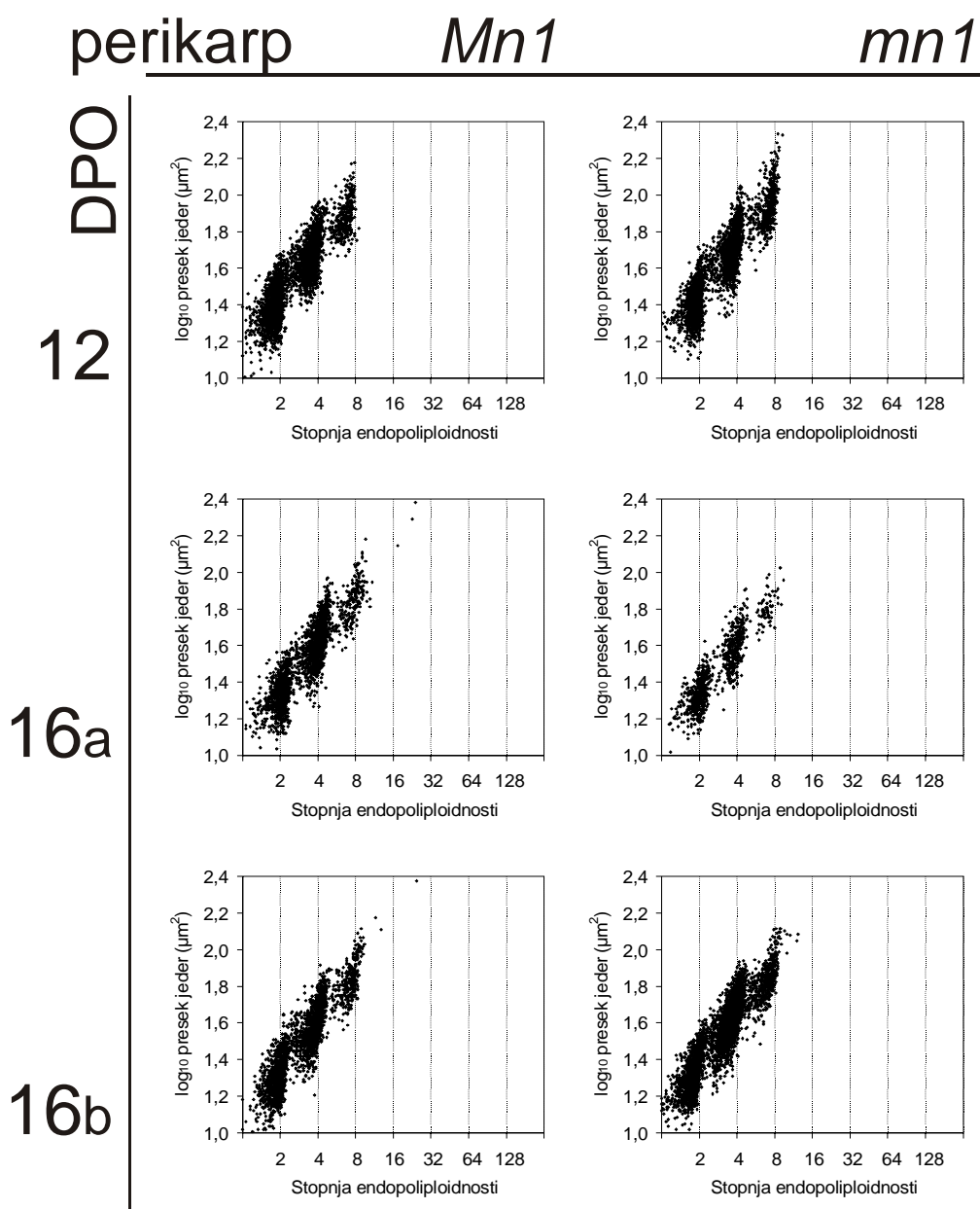
Slika 4.12. Frekvenčna porazdelitev jeter v perikarpu glede na relativno vsebnost DNA.

(Nadaljevanje slike s prejšnje strani.) Meje med razredi jeter z različno stopnjo endopoliploidnosti so označene s križci (×) na osi X. Pri 16. DPO so prikazani podatki za dve izmerjeni rezini, pri ostalih pa za eno izmerjeno rezino.



Slika 4.13. Površina preseka jeder in stopnja endopoliploidnosti jeder v perikarpu.

(Slika se nadaljuje na naslednji strani.)



Slika 4.13. Površina preseka jeder in stopnja endopoliploidnosti jeder v perikarpu.

(Nadaljevanje slike s prejšnje strani.) Pri 16. DPO so prikazani podatki za dve izmerjeni rezini, pri ostalih pa za eno izmerjeno rezino.

4.1.2.3 Placento-halazna plast

Rokopis pripravljen za objavo.

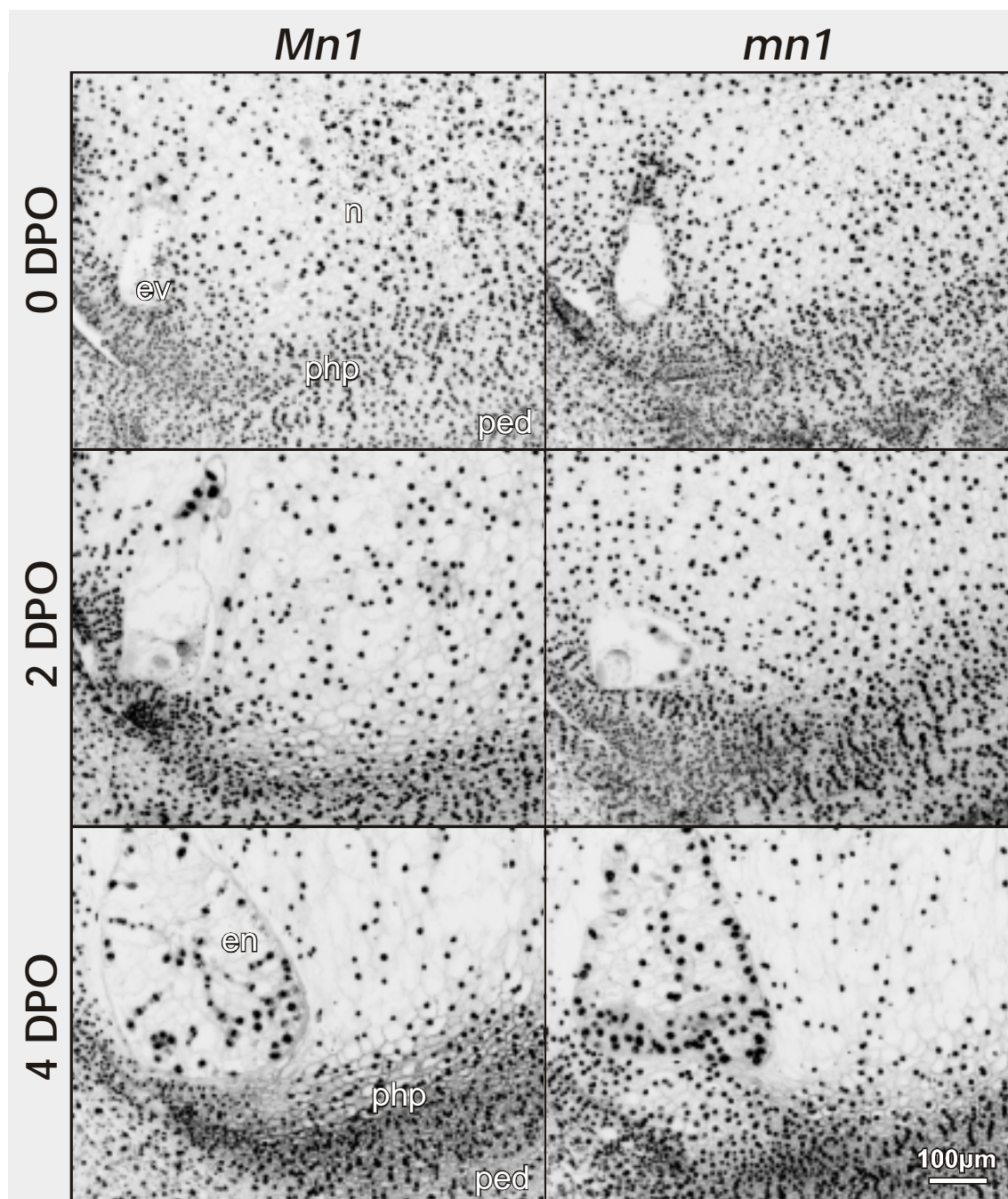
4.1.2.3.1 Stopnja endopoliploidnosti jeder

Od 4. do 6. DPO je bila stopnja ploidnosti jeder v placento-halazni plasti (PHP) večinoma 2 C in 4 C v kariopsah obeh genotipov. Med njimi smo opazili le posamezna jedra z vsebnostjo DNA 8 C (Slika 4.1 in Slika 4.2, jedra tik pod semensko zasnovno). V kariopsi divjega tipa je bila 8. DPO v območju PHP vidna skupina endopoliploidnih jeder 8 C, v mutanti *mn1* jih ni bilo (Slika 4.3). V času 10 DPO je bila večja skupina 8 C jeder vidna v PHP v mutanti *mn1*. Prav tako smo jih opazili v divjem tipu, vendar v manjšem številu (Slika 4.4). V rezinah kariops 12 in 16 DPO smo v obeh genotipih v PHP opazili skupino jeder 8 C v plasti pod jedri z vsebnostjo DNA 2 C in 4 C. Nad njimi pa je bila plast, kjer jeder ni bilo (Slika 4.5 in Slika 4.6).

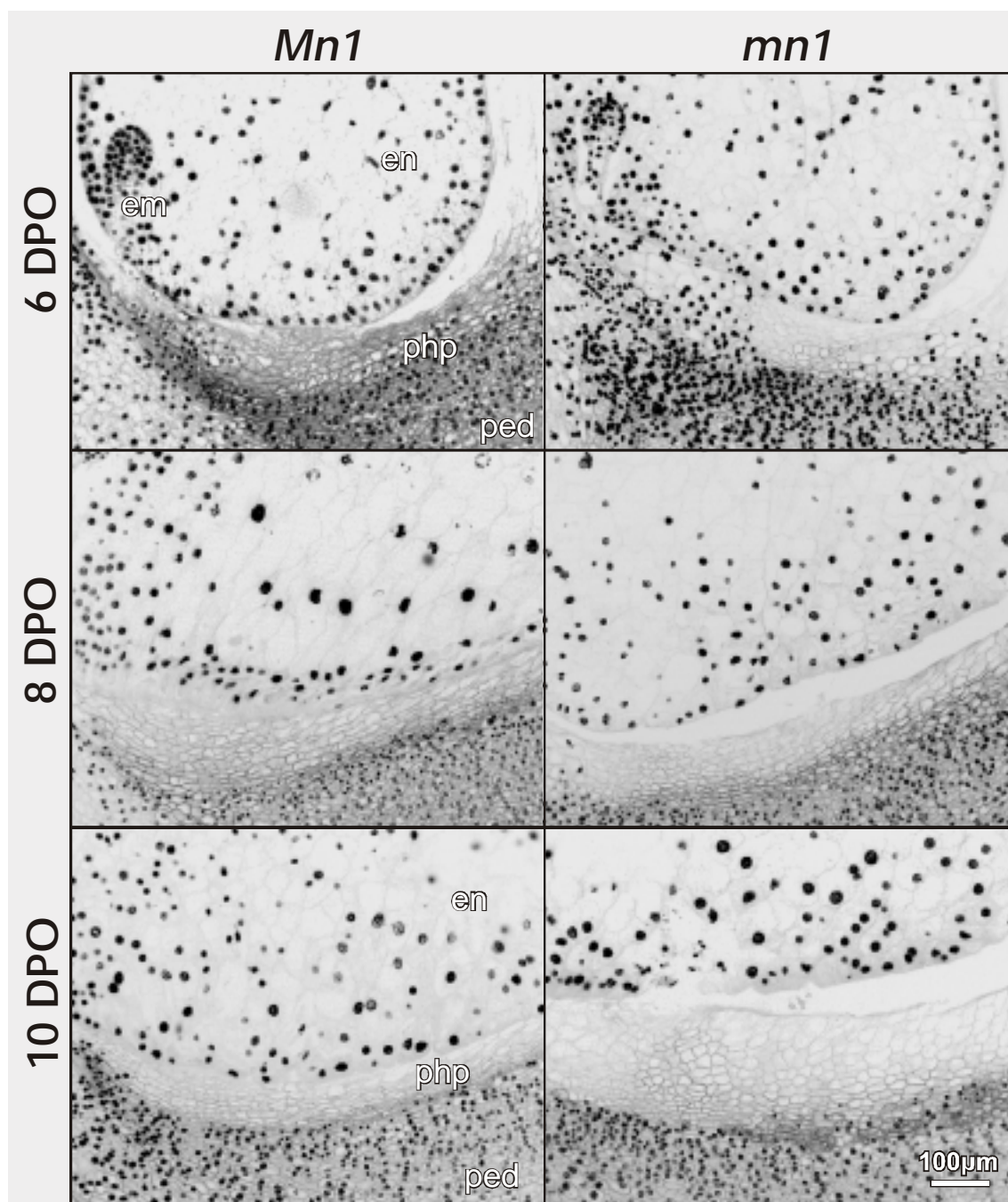
4.1.2.3.2 Izguba jeder in morfologija celic v placento-halazni plasti

Razvoj PHP smo spremljali v času od 0 do 28 DPO. Zgodnji razvoj bazalnega dela kariopse je potekal enako pri divjem tipu *Mn1* in mutanti *mn1*. V neoplojeni semenski zasnovi smo videli embrionalno vrečko, ki jo je obdajala množica jeder nucela. Pod semensko zasnovno, v PHP, so vse celice vsebovale jedra (Slika 4.14, 0 DPO). V območju endosperma in embria smo 2. DPO opazili nekaj jeder filialne generacije, v PHP ni bilo sprememb (Slika 4.14, 2 DPO). 4. DPO je bil endosperm že celulariziran, pod dorzalno stranjo endosperma (stran od embria) pa smo v PHP opazili nekaj celic v skupini, ki so bile brez jeder (Slika 4.14, 4 DPO). Šesti dan po opraitvi je bil v obeh genotipih viden embrio kijaste oblike, v PHP pod bazo endosperma pa smo opazili večje območje celic brez jeder kot v kariopsi 4. DPO (Slika 4.14, 6 DPO). V poznejšem razvoju se je nadaljevalo izginjanje jeder iz celic v PHP; razširilo se je v bazalni smeri proti žilam v pedicelu, prav tako se je razširilo proti dorzalni strani kariopse, skupaj z rastočim endospermom (Slika 4.14, 8 do 28 DPO). Do 8. DPO med genotipoma še ni bilo večjih razlik (Slika 4.14, 8

DPO), 10. DPO pa je bila plast celic brez jader v mutanti *mn1* že debelejša kot v *Mn1* (Slika 4.14, 10 DPO).

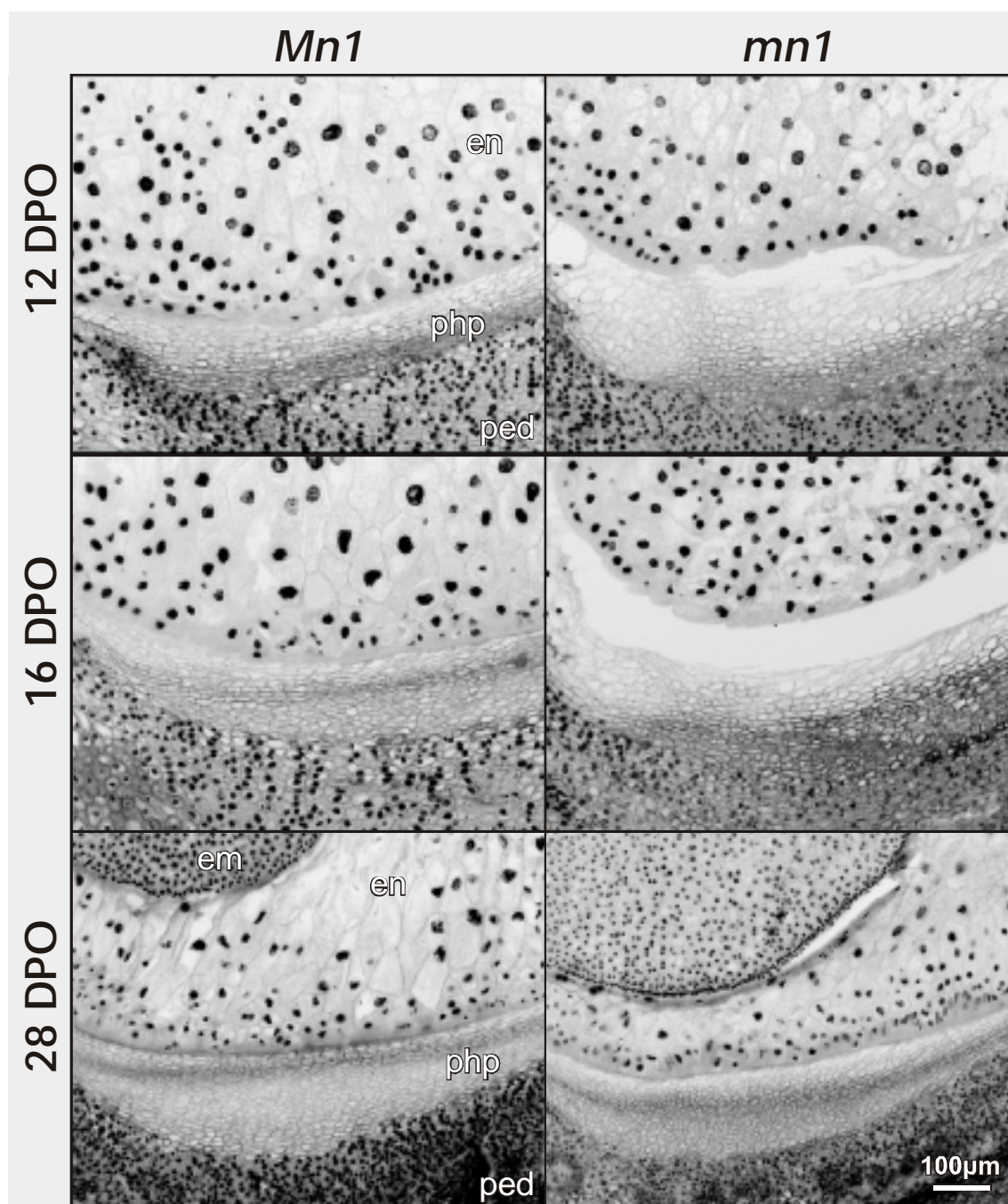


Slika 4.14. Večanje števila plasti celic v placento-halazni plasti, ki izgubijo jedra; 0–28 DPO.
(Slika se nadaljuje na naslednji strani.)



Slika 4.14. Večanje števila plasti celic v placento-halazni plasti, ki izgubijo jedra; 0–28 DPO.

(Nadaljevanje slike s prejšnje strani; slika se nadaljuje na naslednji strani.)

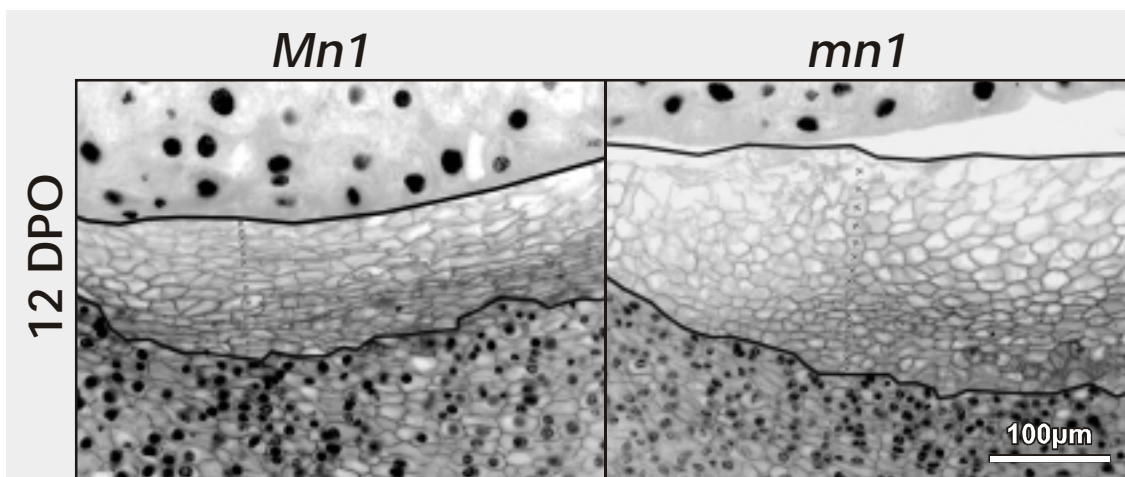


Slika 4.14. Večanje števila plasti celic v placento-halazni plasti, ki izgubijo jedra; 0–28 DPO.

(Nadaljevanje slike s prejšnjih dveh strani.) Vzdolžne rezine razvijajočih se kariops so barvane z DAPI, posnete slike pa so prikazane v sivem negativu. Placento-halazna plast je na vsaki sliki v spodnjem delu, ventralna stran kariopse je vedno na levi. Pomen oznak: *ev* – embrionalna vrečka, *n* – nucel, *php* – placento-halazna plast, *ped* – pedicel, *em* – embrio, *en* – endosperm.

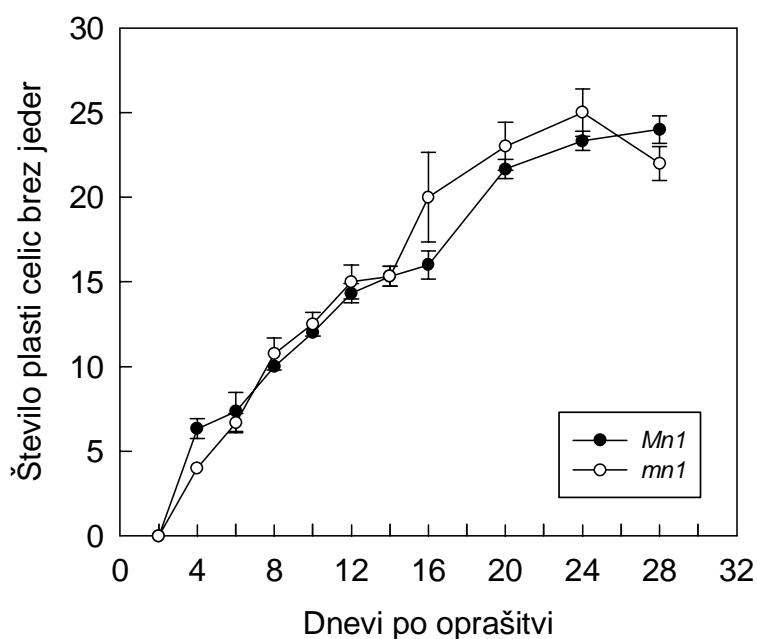
Da bi ugotovili, ali je število plasti celic brez jeder različno v obeh genotipih, smo prešteli število plasti na ventralni strani PHP, kjer je bila plast brez jeder najdebelejša. Primer štetja plasti je prikazan na preparatih kariops obeh genotipov, 12. DPO (Slika 4.15).

Štetje plasti celic, ki so izgubile jedra, od 0 do 28. dne po opraitvi, je pokazalo, da se število plasti ni bistveno razlikovalo med obema genotipoma. V obeh genotipih se je v obdobju od 4 do 24 DPO razvilo 5 do 25 plasti celic brez jeder (Slika 4.16). Vidna razlika med genotipoma je bila le v obliki celic v PHP. V divjem tipu so bile celice bolj podolgovate in ožje v smeri pravokotno na PHP, kot pa celice v *mn1*, kjer so bile te bolj nepravilnih oblik in širše v smeri pravokotno na PHP (Slika 4.15).



Slika 4.15. Štetje plasti celic v placento-halazni plasti, ki so izgubile jedra.

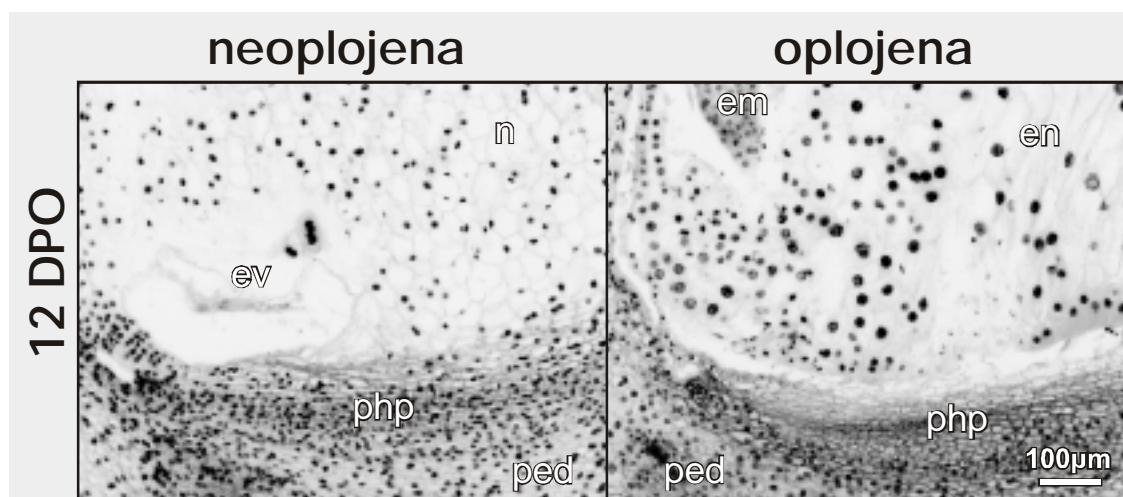
Prikazani sta vzdolžni rezini kariops *Mn1* in *mn1* 12. DPO. Območje celic brez jeder je obrobljeno s črno črto, štetje plasti celic je prikazano s križci. Ventralna stran kariopse je na levi. Vzdolžni rezini sta barvani z DAPI in prikazani v sivem negativu.



Slika 4.16. Število plasti celic brez jeder v placento-halazni plasti.

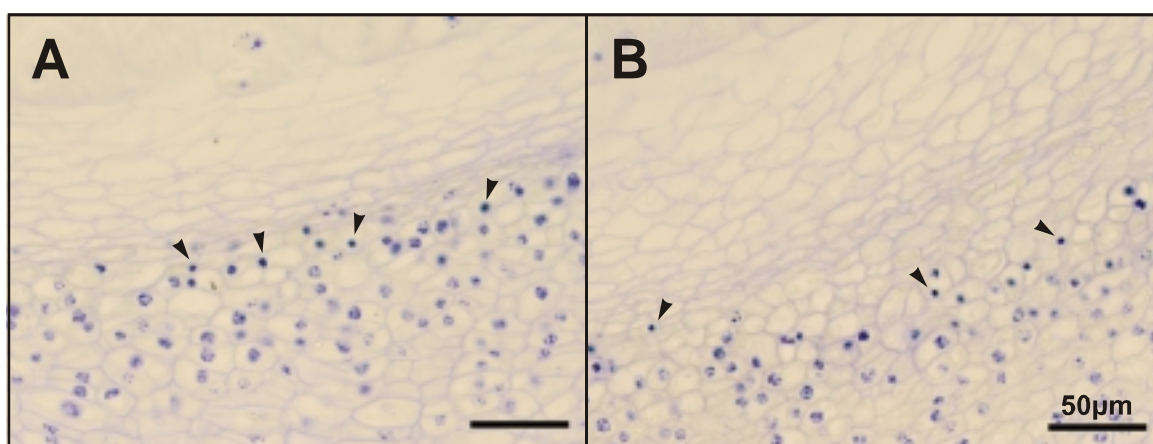
Prikazana sta povprečje in standardna deviacija števila plasti celic brez jeder v placento-halazni plasti kariops divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1* v času od 0 do 28 DPO (vsaka točka predstavlja meritev na treh preparatih). Plasti so preštete v smeri pravokotno na placento-halazno plast na ventralni strani kariopse.

V območju PHP neoplojenih semenskih zasnov celice niso izgubile jeder v času, ko se je to zgodilo v oplojenih semenskih zasnovah na istem storžu. Prikazan je vzdolžni prerez skozi neoplojeno in oplojeno semensko zasnovo iz istega storža, 12. DPO (Slika 4.17). Celice v primerljivem območju PHP so v neoplojeni semenski zasnovi vsebovale jedra, medtem ko smo v kariopsi 12. DPO opazili več plasti celic brez jeder.



Slika 4.17. Neoplojena semenska zasnova in razvijajoča se kariopsa (oplojena) iz istega storža, 12 DPO. Vzdolžni rezini sta barvani z DAPI in prikazani sivem negativu. Pomen oznak: *ev* – embrionalna vrečka, *n* – nucel, *php* – placento-halazna plast, *ped* – pedicel, *em* – embrio, *en* – endosperm.

V plasti celic, ki je mejila na območje celic brez jeder v PHP, smo opazili jedra z zelo kondenziranim kromatinom (Slika 4.18). To smo opazili v kariopsah divjega tipa in v mutanti *mn1*. V naslednjih plasteh celic, ki so bile bolj oddaljene od praznih celic, pa je bil kondenziran kromatin (heterokromatin) v jedrih normalno, pegasto razporejen (kondenziran kromatin je bil viden v obliki točk znotraj jeder).

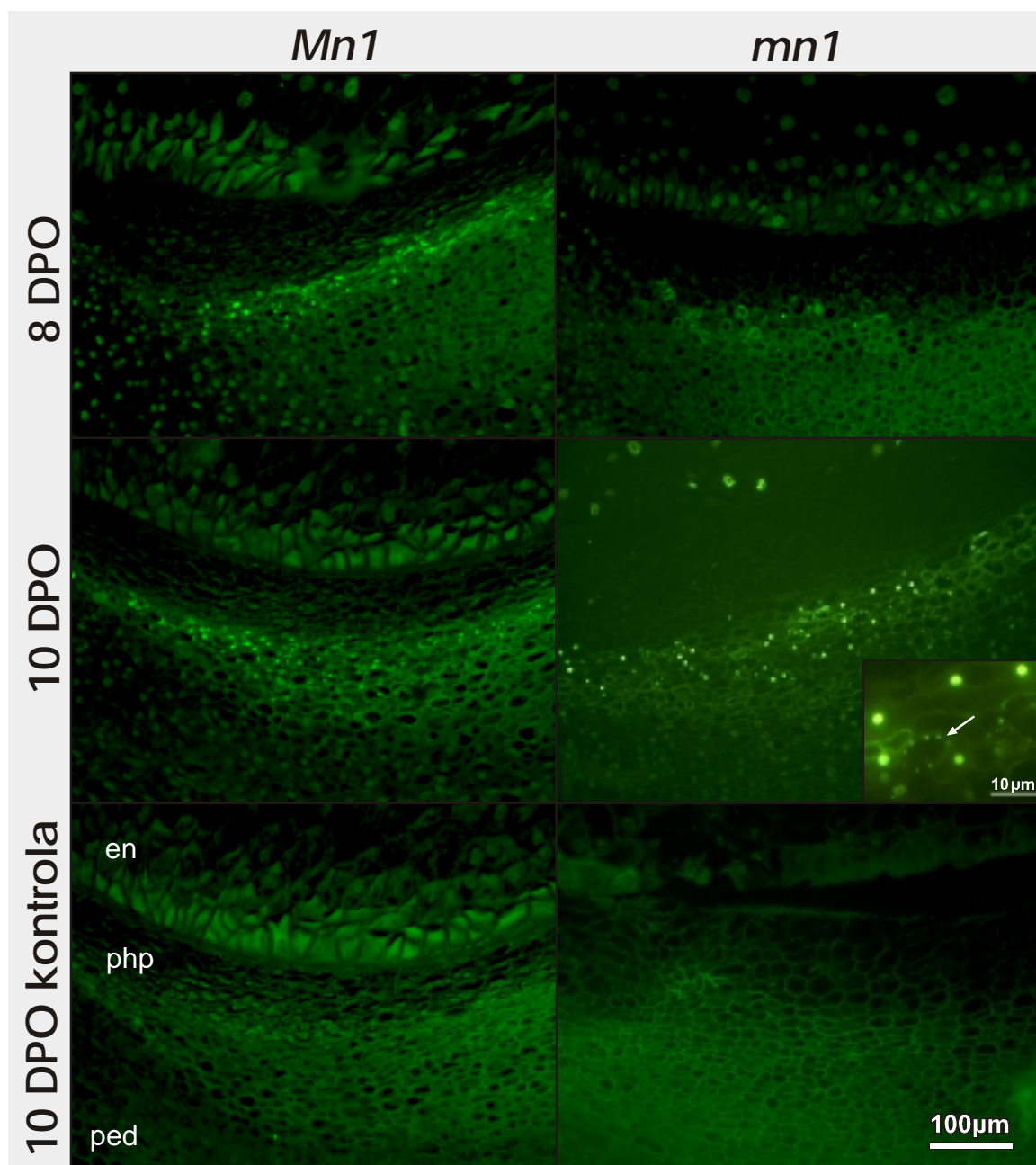


Slika 4.18. Kondenzirana jedra v placento-halazni plasti v kariopsi *Mn1* (A) in *mn1* (B), 10 DPO.

Vzdolžni rezini sta barvani s kristal vijoličnim. Puščice kažejo na jedra, ki so zelo kondenzirana.

4.1.2.3.3 Fragmentacija DNA v jedrih placento-halazne plasti

Vzdolžne rezine kariops smo barvali z reakcijo TUNEL, v kateri so se s fluoresceinom označeni nukleotidi vezali na proste 3' OH konce poškodovane DNA. V rezinah kariops, starih od 2 do 6 DPO, v PHP nismo opazili TUNEL pozitivnih jeder. Značilno fluorescenco v jedrih smo opazili šele 8. DPO, in sicer v obeh genotipih. Število takih jeder se je povečalo do 10. DPO (Slika 4.19) in so bila vedno v nekaj plasteh tik pod celicami brez jeder. V nekaterih primerih smo fluorescenco po reakciji TUNEL opazili kot točke na obodu celice (Slika 4.19, manjša slika v sliki *mn1* 10 DPO). Z modro ekscitacijo, s katero smo vzbujali fluorescenco fluoresceina, smo videli tudi avtofluorescenco vsebine celic.

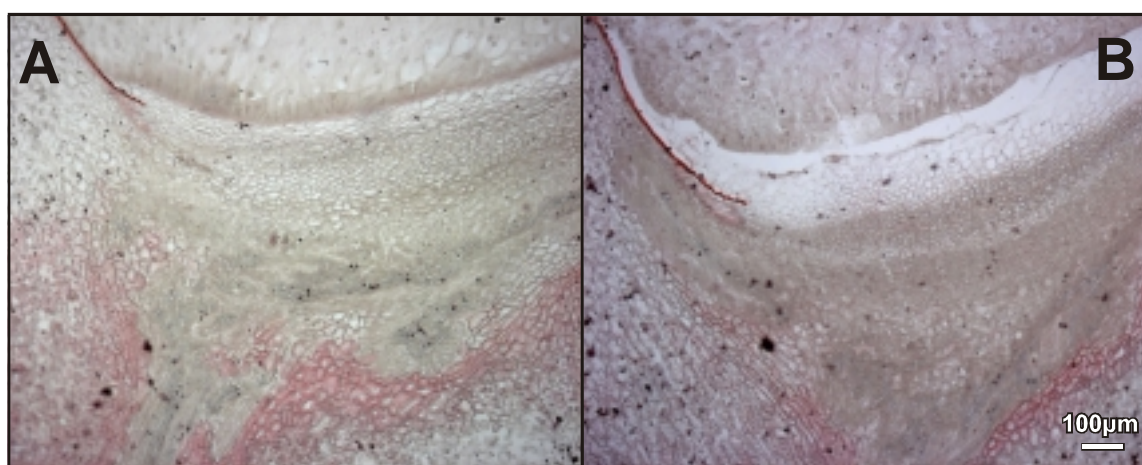


Slika 4.19. Fragmentacija DNA v jedrih celic v placento-halazni plasti.

Vzdolžne rezine kariopse divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1* 8 in 10 DPO, barvane z reakcijo TUNEL. Jedra s fragmentirano DNA oddajajo zeleno fluorescenco. Manjša slika v *mn1* 10 DPO prikazuje povečavo, na kateri je vidna celica s TUNEL pozitivnimi točkami ob celični steni. Kontrolne rezine so bile inkubirane samo s fluoresceinom označenimi nukleotidi, brez TdT encima. Pomen oznak: *en* – endosperm, *php* – placento-halazna plast, *ped* – pedicel.

4.1.2.3.4 Nalaganje sekundarnih spojin v celične stene

Vzdolžne rezine kariops divjega tipa in *mn1* mutante, starih 16 DPO, smo barvali s Sudan IV za kutin in suberin (Slika 4.20) in floroglucinolom v HCl, da bi dokazali prisotnost lignina (Slika 4.21). Nobeno od obeh barvanj ni pobarvalo celic v PHP. S Sudan IV se je barvala kutikula integumenta in suberinizirane celice okoli žil v pedicelu, s floroglucinolom-HCl pa stene ksilemskih elementov v pedicelu.



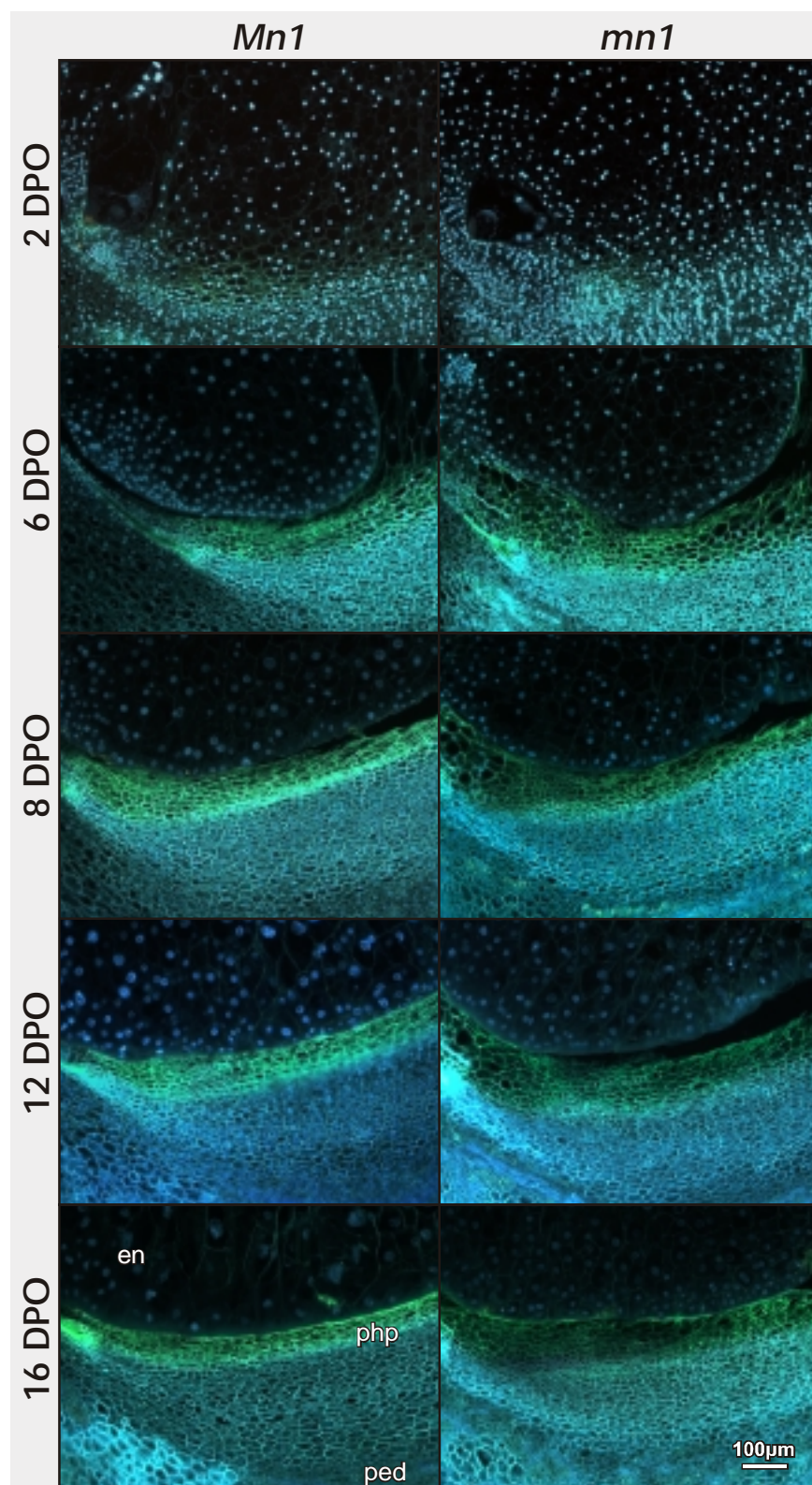
Slika 4.20. Vzdolžni rezini kariops divjega tipa (A) in mutante *mn1* (B), 16 DPO, barvani s Sudan IV. Lipidne snovi se barvajo rdeče. Viden kutin v kutikuli integumenta in suberin okoli žil v pedicelu.



Slika 4.21. Vzdolžna rezina kariopse divjega tipa, 16 DPO, barvana s floroglucinolom v HCl. Lignin v stenah ksilemskih elementov, pobarvan rdeče-vijolično.

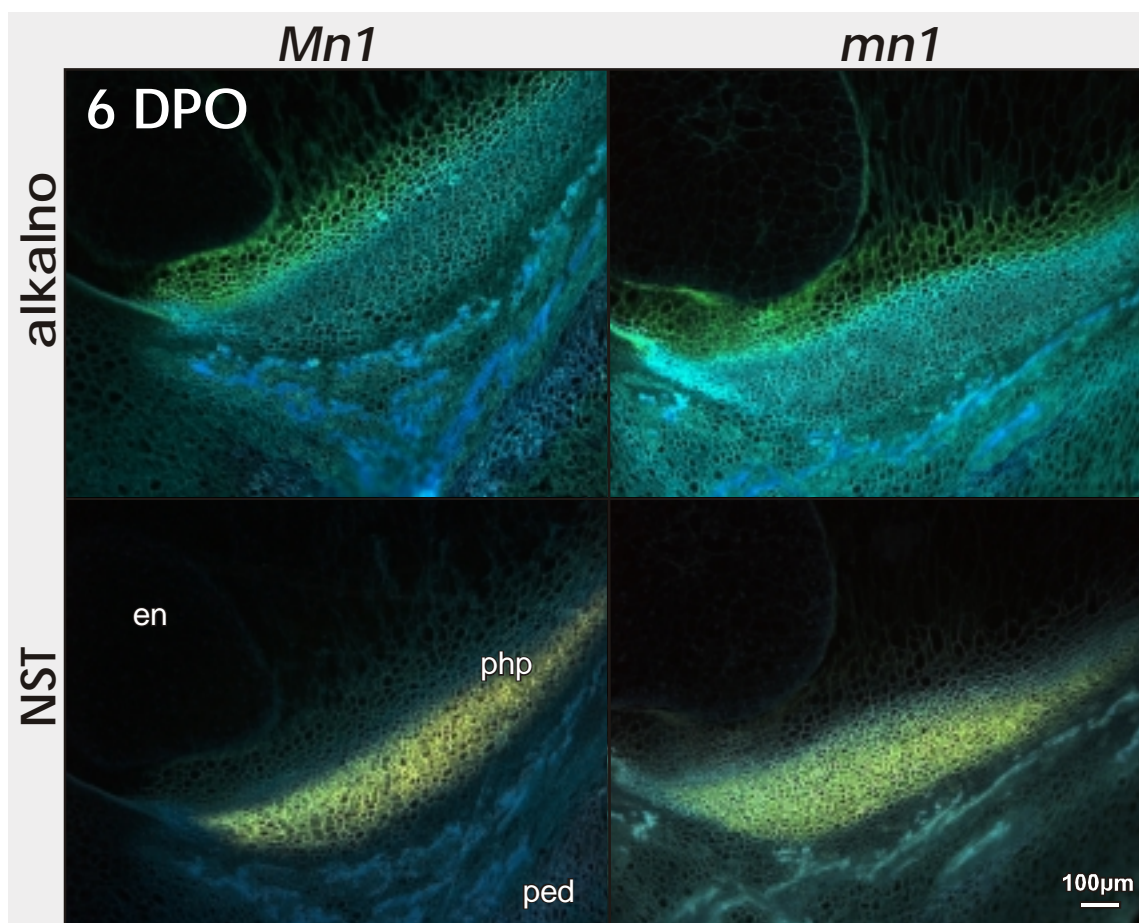
Z barvanjem z anilin modrim – fluorescenčno metodo smo pobarvali vzdolžne rezine kariops od 2. do 16. DPO, da bi določili prisotnost kaloze v stenah PHP (Slika 4.22), vendar je s to metodo nismo dokazali. Celične stene v PHP tik pod endospermom so z UV ekscitacijo sicer oddajale zeleno fluorescenco, ki je bila drugačne barve kot fluorescenca drugih celičnih sten (modra). S poznejšimi poskusi smo dokazali, da se zeleno obarvanje sten v istem območju razvije tudi v preparatih, ki smo jih izpostavili samo alkalnemu mediju (brez barvila anilin modro); preparat smo bodisi naparili z amonijevimi parami ali pa ga inkubirali v 0,15 M K_2HPO_4 (pH 8,2) (Slika 4.23 in Slika 4.24). Premik fluorescence iz modre v zeleno območje dokazuje prisotnost vezanih hidroksicimetnih fenolnih kislin v celičnih stenah. Prve takšne celice smo opazili od 2. do 4. DPO, vendar je bila takrat zelena fluorescenca še šibka v primerjavi s poznejšimi razvojnimi stopnjami (Slika 4.22). Število plasti celic, ki so oddajale zeleno fluorescenco, se je do 8. DPO povečalo na okrog 10 in ostalo na taki vrednosti vse do 28. DPO (zadnja preiskana razvojna stopnja).

Z opazovanjem preparatov po inkubiranju v alkalnem mediju in po barvanju z barvilom Naturstoffreagenz A (NST) smo določili dve različni območji v okviru PHP. Obe sta bili dobro prepoznavni šesti dan po oprahitvi. V alkalnem mediju so celične stene v približno sedmih plasteh celic v PHP tik pod endospermom svetile zeleno, po čemer so se te celice razlikovale od spodaj ležečih plasti. Te so po barvanju z NST oddajale rumeno-zelena fluorescenco. Območje celic, obarvanih z NST, je segalo do žilnega prepleta v pedicelu (Slika 4.23). Barvanje z NST je dokaz za prisotnost flavonoidov v teh celicah. Celice, katerih celične stene oddajajo zeleno fluorescenco v alkalnem, se niso barvale z NST. V neoplojenih semenskih zasnovah nismo opazili barvanja z NST. Z njim so se celice najprej obarvale 2 do 4 DPO. Jakost obarvanja je dosegla vrh 6 DPO in se ni več bistveno spremenila v nadaljnjem razvoju kariopse; enako velja za število plasti celic v PHP, ki so v alkalnem mediju oddajale zeleno fluorescenco (Slika 4.24). V nevtralnem mediju (destilirana voda) je večina celičnih sten v PHP z UV ekscitacijo oddajala močno modro avtofluorescenco, le celične stene tik pod endospermom so svetile opazno šibkeje (Slika 4.24, dH_2O).



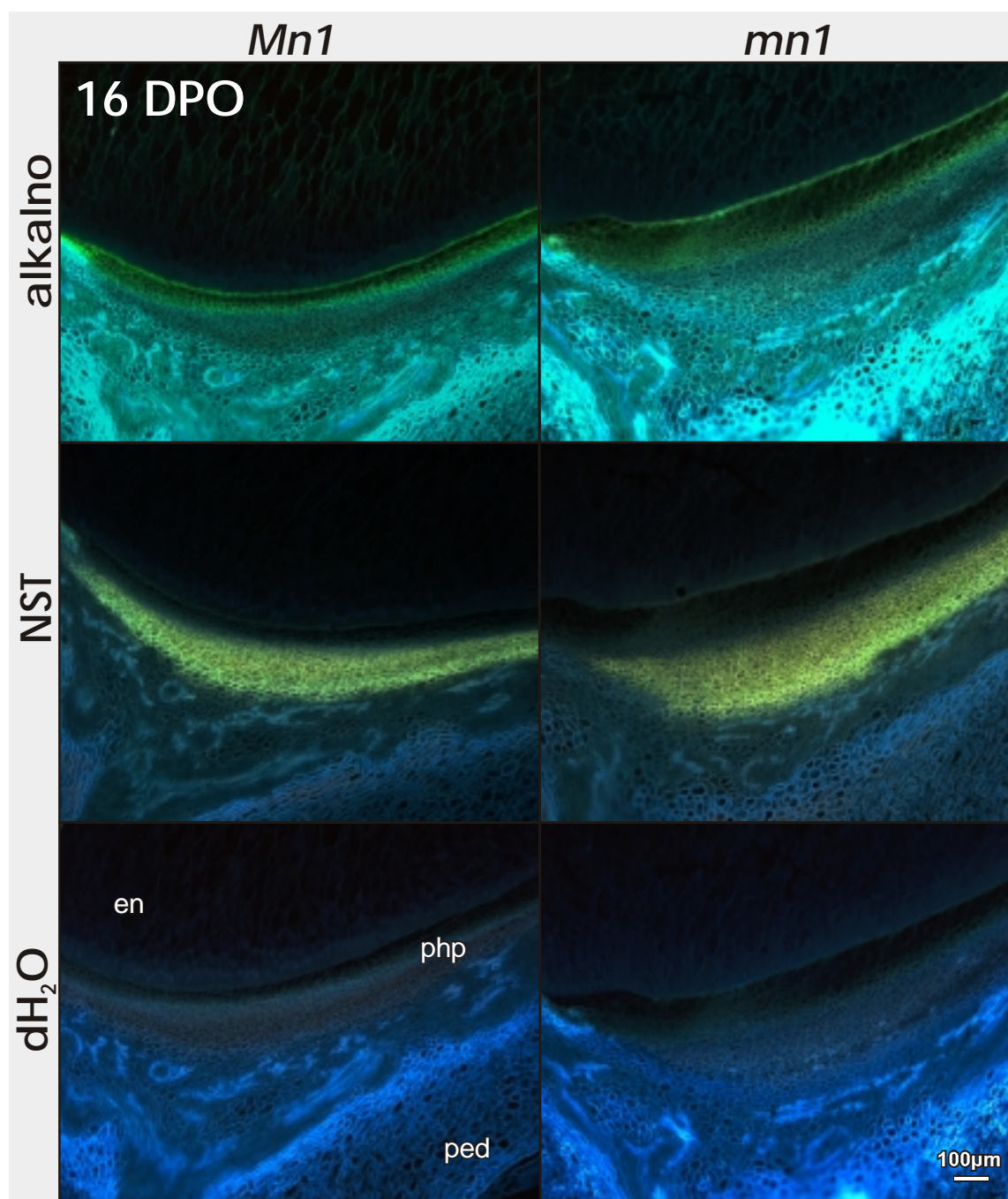
Slika 4.22. Vzdolžne rezine kariops divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1*, 2–16 DPO, barvane z DAPI in anilin modrim v 0,15 M K_2HPO_4 (pH 8,2).

Pomen oznak: *en* – endosperm, *php* – placento-halazna plast, *ped* – pedicel.



Slika 4.23. Fenolne snovi v placento-halazni plasti v kariopsah divjega tipa in mutante *mn1*, 6 DPO.

Zgoraj (alkalno): vzdolžni rezini kariops v alkalnem mediju: preparat *Mn1*, neparjen z amonijevimi parami, in preparat *mn1*, inkubiran v 0,15 M K_2HPO_4 pH 8,2. Spodaj (NST): vzdolžni rezini kariops, barvani z Naturstoffreagenz A v metanolu. Vse slike posnete z UV ekscitacijo. Pomen oznak: *en* – endosperm, *php* – placento-halazna plast, *ped* – pedicel.



Slika 4.24. Fenolne snovi v placento-halazni plasti v kariopsah divjega tipa in mutante *mn1*, 16 DPO.

Zgoraj (alkalno): vzdolžni rezini kariops v alkalnem mediju: preparata *Mn1* in *mn1*, inkubirana v 0,15 M K₂HPO₄ pH 8,2. Sredina (NST): vzdolžni rezini kariops, barvani z Naturstoffreagenz A (v metanolu). Spodaj (dH₂O): avtofluorescenca celičnih sten v rezinah v destilirani vodi. Vse slike posnete z UV ekscitacijo. Pomen oznak: *en* – endosperm, *php* – placento-halazna plast, *ped* – pedicel.

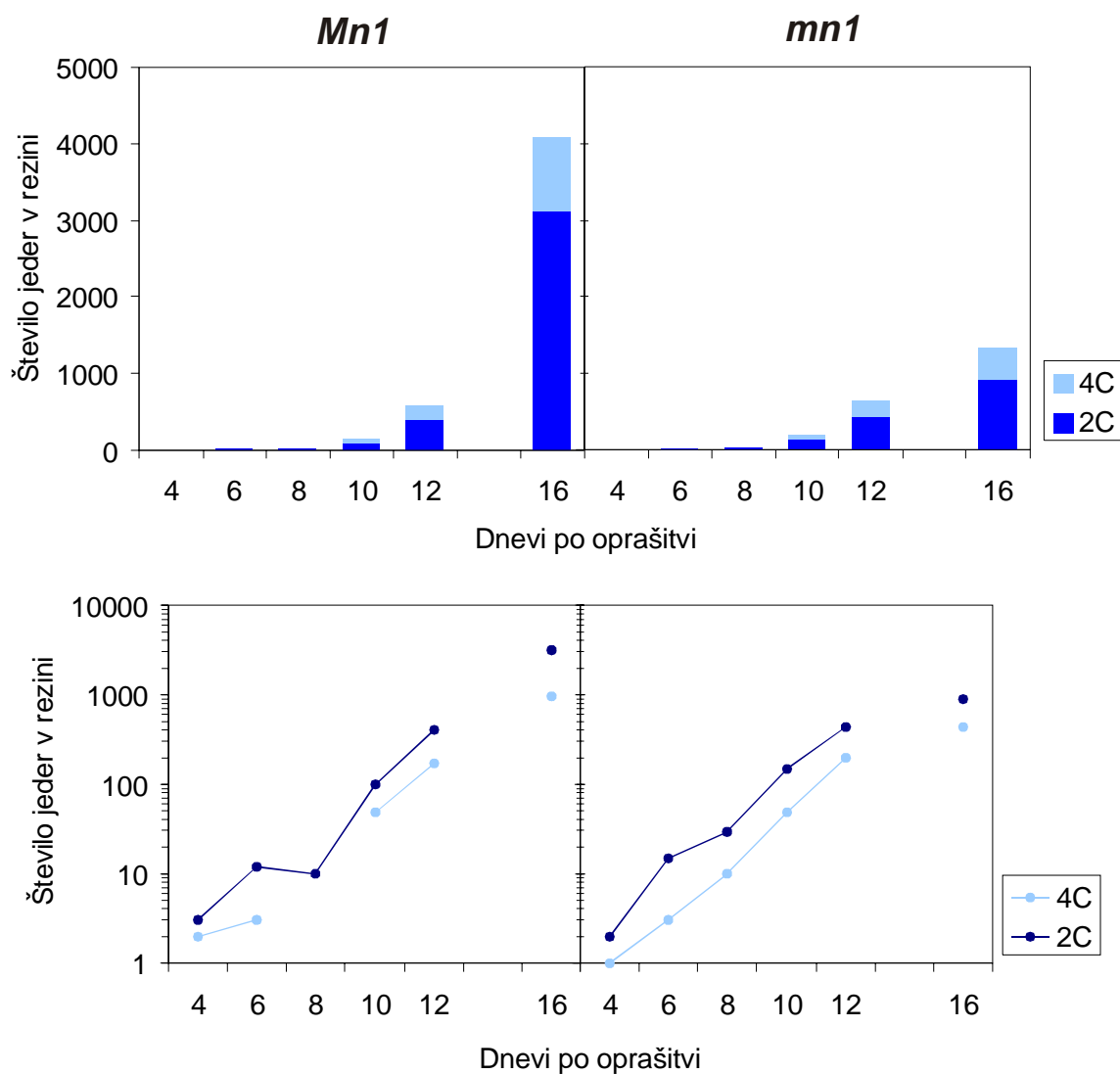
4.1.3 Citološka analiza filialnega tkiva

4.1.3.1 Embrio

4.1.3.1.1 Število jeder posameznih razredov ploidnosti v vzdolžnih rezinah kariopse

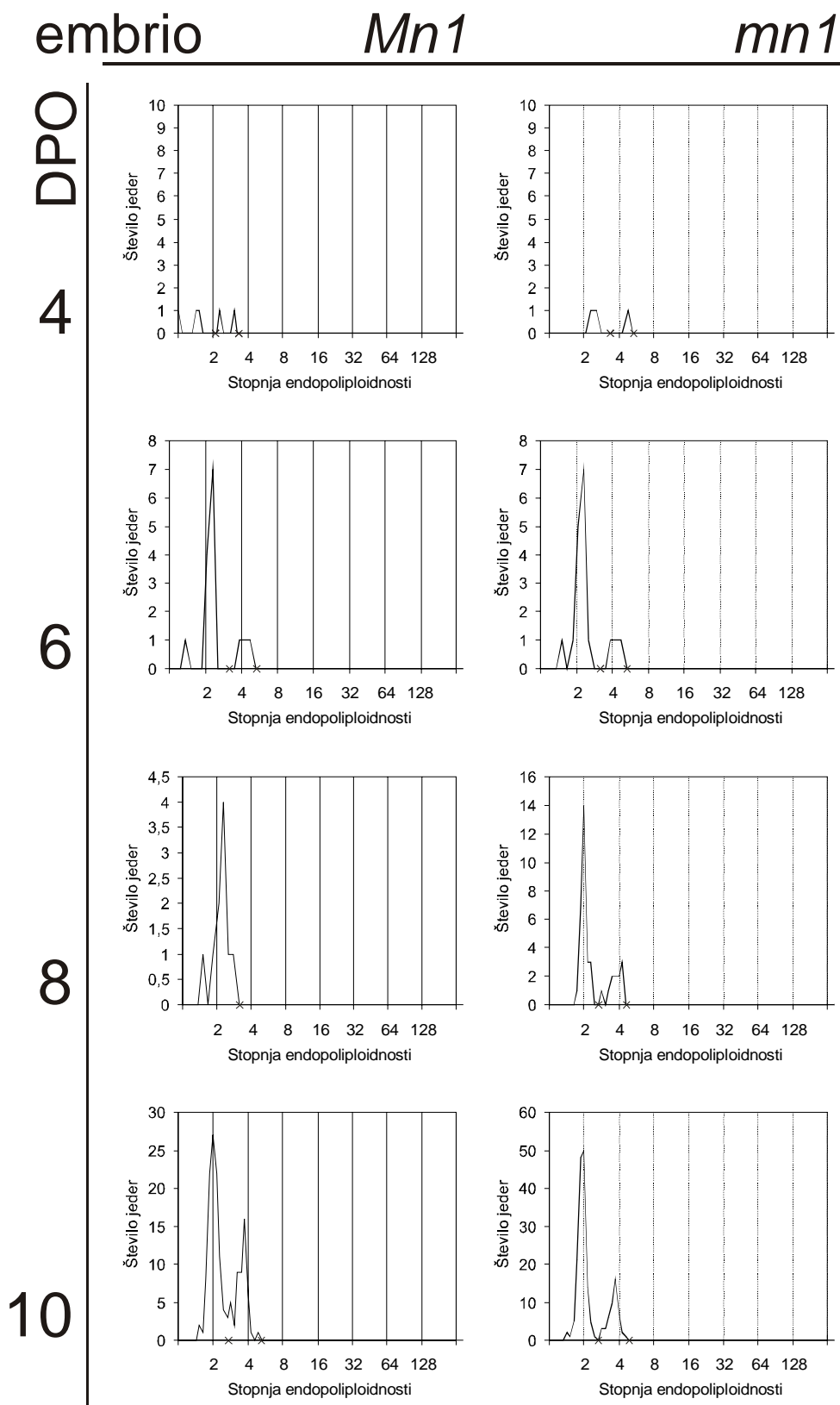
Število jeder v embriu, ki smo jih izmerili v vzdolžnih rezinah kariops divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1* od 4. do 16. DPO, se je strmo večalo od nekaj jeder 4 DPO do več tisoč jeder 16 DPO (Slika 4.25). V embriu so prevladovala jedra 2 C in 4 C; endopoliploidna jedra smo v proučevanem obdobju v embriu opazili zelo redko, le nekaj jeder 8 C v embriu *Mn1* v času 12 in 16 DPO. Za embrio je bil značilen velik delež jeder 2 C glede na 4 C (Slika 4.25, zgoraj in Slika 4.26). Število jeder v rezinah se je večalo eksponentno (Slika 4.25, spodaj), kar kaže, da je embrio mitotsko zelo aktivno tkivo. V obdobju od 4. do 12. DPO je bilo v rezinah približno enako število jeder v obeh genotipih v istem času po opraitvi, pa tudi velikost embria je bila podobna (Slike 4.1 do 4.5). Zato sklepamo, da je v embriu obeh genotipov v obdobju od 4. do 12. DPO približno enako število celic. 16. DPO pa smo v embriu *mn1* izmerili mnogo manj jeder kot v embriu *Mn1* (Slika 4.25). Embria sta se razlikovala tudi po velikosti (Slika 4.6).

Jedra v embriu smo ločili na razrede vrednosti C na podlagi frekvenčnih porazdelitev faktorja C, izračunanega iz IOG jeder (Slika 4.26). 4. DPO smo v rezini opazili le nekaj jeder embria (Slika 4.27). Pozneje se število jeder povečuje in v frekvenčnih porazdelitvah oblikujejo vrhove. Vrh, ki je ustrezal jedrom z vsebnostjo DNA 2 C, je bil v vseh stopnjah v obeh genotipih večji od vrha 4 C. Jedra 4 C so bila večja od jeder 2 C (Slika 4.27).



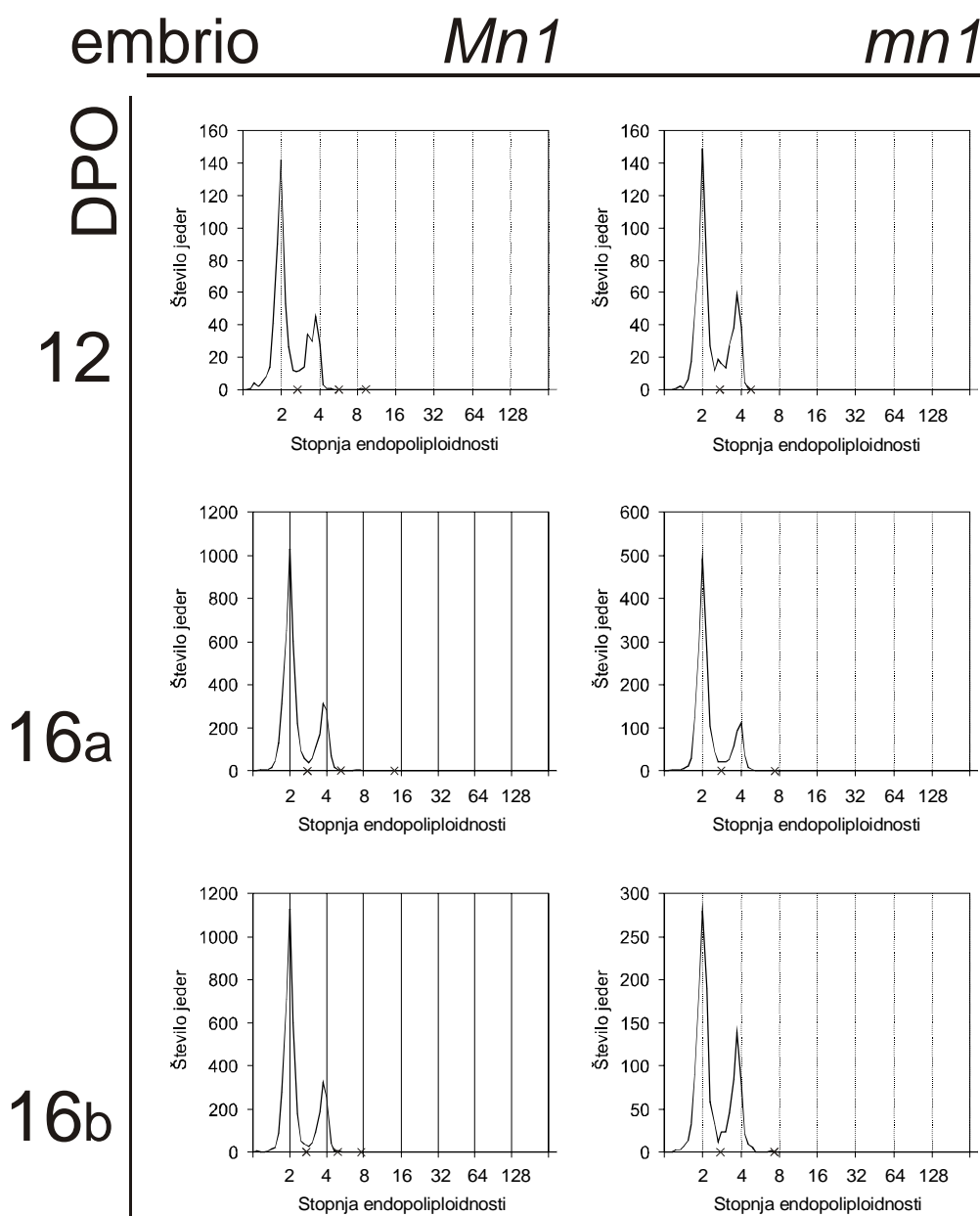
Slika 4.25. Število izmerjenih jeter v embriju v vzdolžnih rezinah kariops koruze divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1*.

Število jeter je prikazano na linearni skali (zgoraj) in na logaritemski skali (spodaj). Pri 16. DPO so prikazani podatki za eno od dveh izmerjenih rezin pri obeh genotipih (prikazani na Sliki 4.6). Podatki so prikazani ločeno, ker so bile kariopse iz druge poskusne serije.



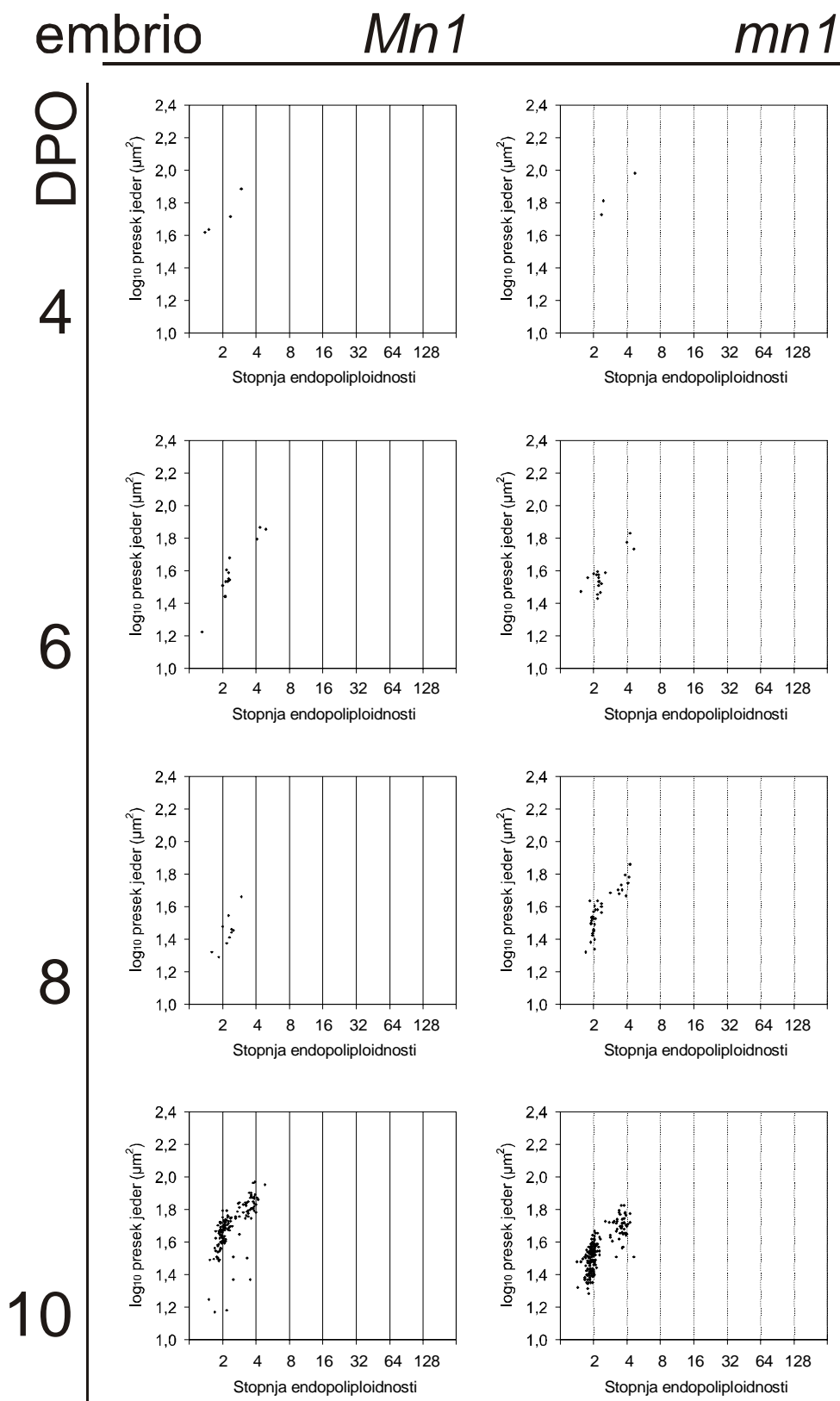
Slika 4.26. Frekvenčna porazdelitev jeter v embriju glede na relativno vsebnost DNA.

(Slika se nadaljuje na naslednji strani.)



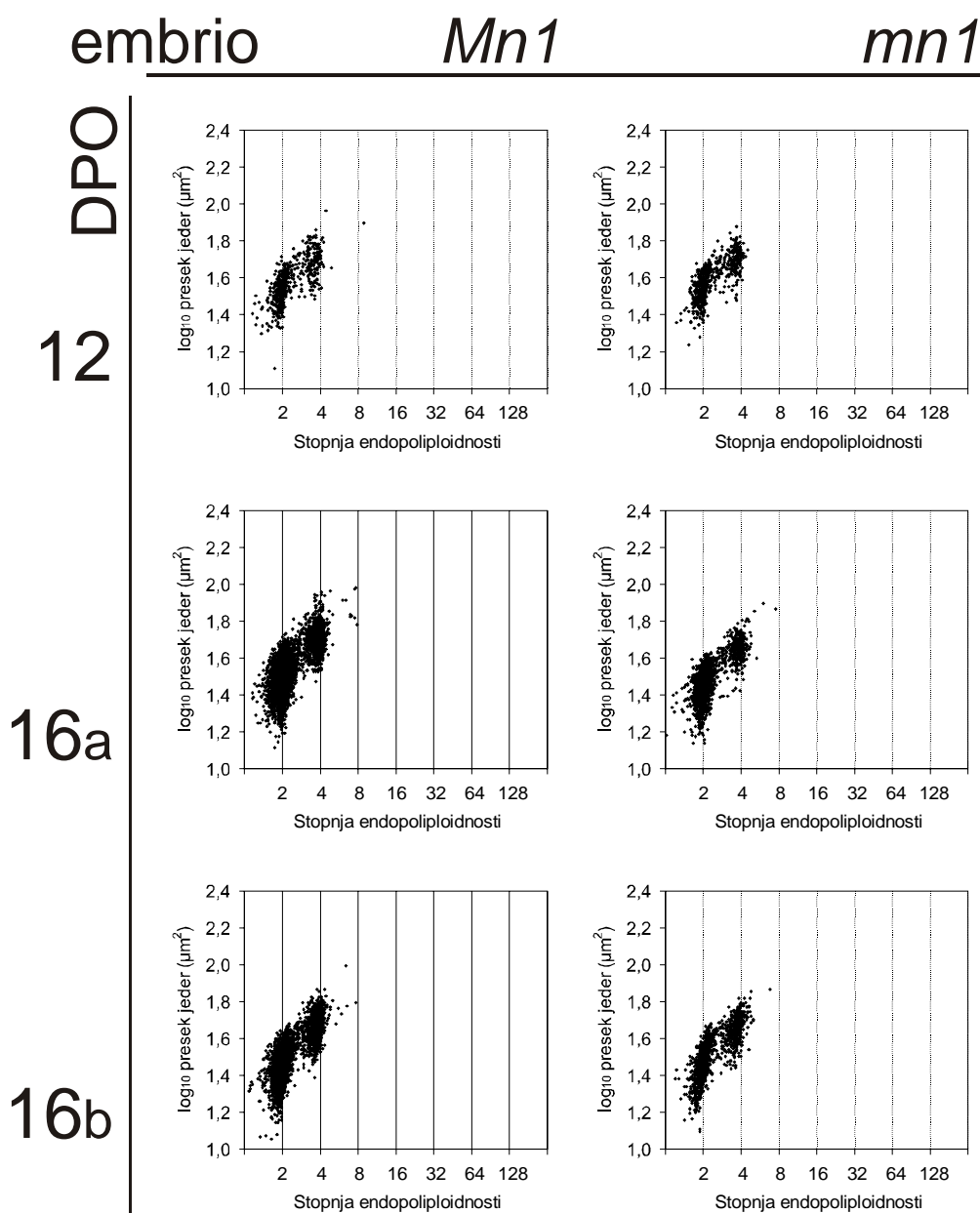
Slika 4.26. Frekvenčna porazdelitev jeter v embriju glede na relativno vsebnost DNA.

(Nadaljevanje slike s prejšnje strani.) Meje med razredi jeter z različno stopnjo endopoliploidnosti so označene s križci (×) na osi X. Pri 16. DPO prikazani podatki za dve izmerjeni rezini, pri ostalih pa za eno izmerjeno rezino.



Slika 4.27. Površina preseka jeder in stopnja endopoliploidnosti jeder v embriju.

(Slika se nadaljuje na naslednji strani.)



Slika 4.27. Površina preseka jeder in stopnja endopoliploidnosti jeder v embriju.

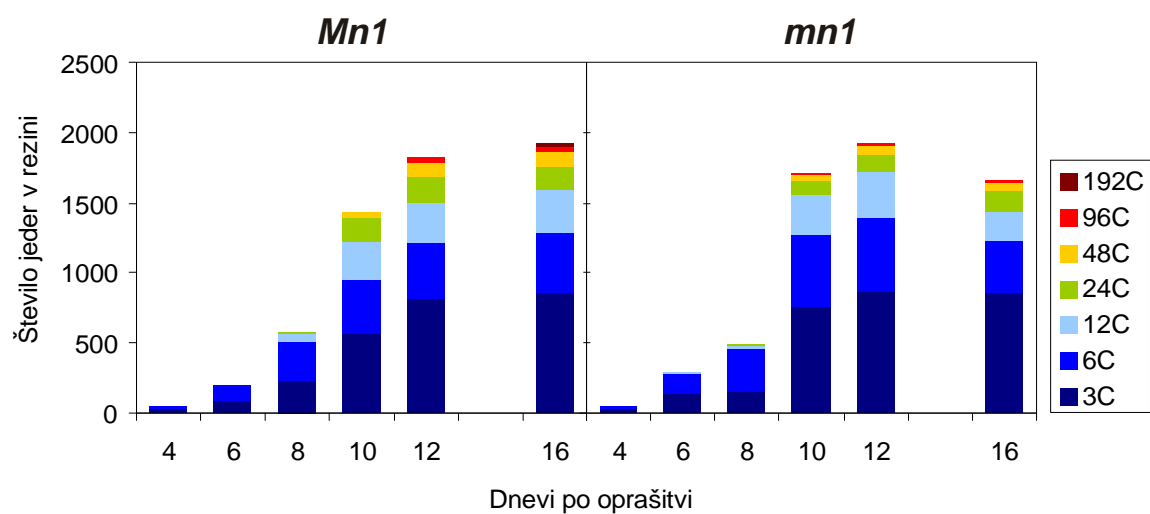
(Nadaljevanje slike s prejšnje strani.) Pri 16. DPO prikazani podatki za dve izmerjeni rezini, pri ostalih pa za eno izmerjeno rezino.

4.1.3.2 Endosperm

4.1.3.2.1 Število jeder posameznih razredov ploidnosti v vzdolžnih rezinah kariopse

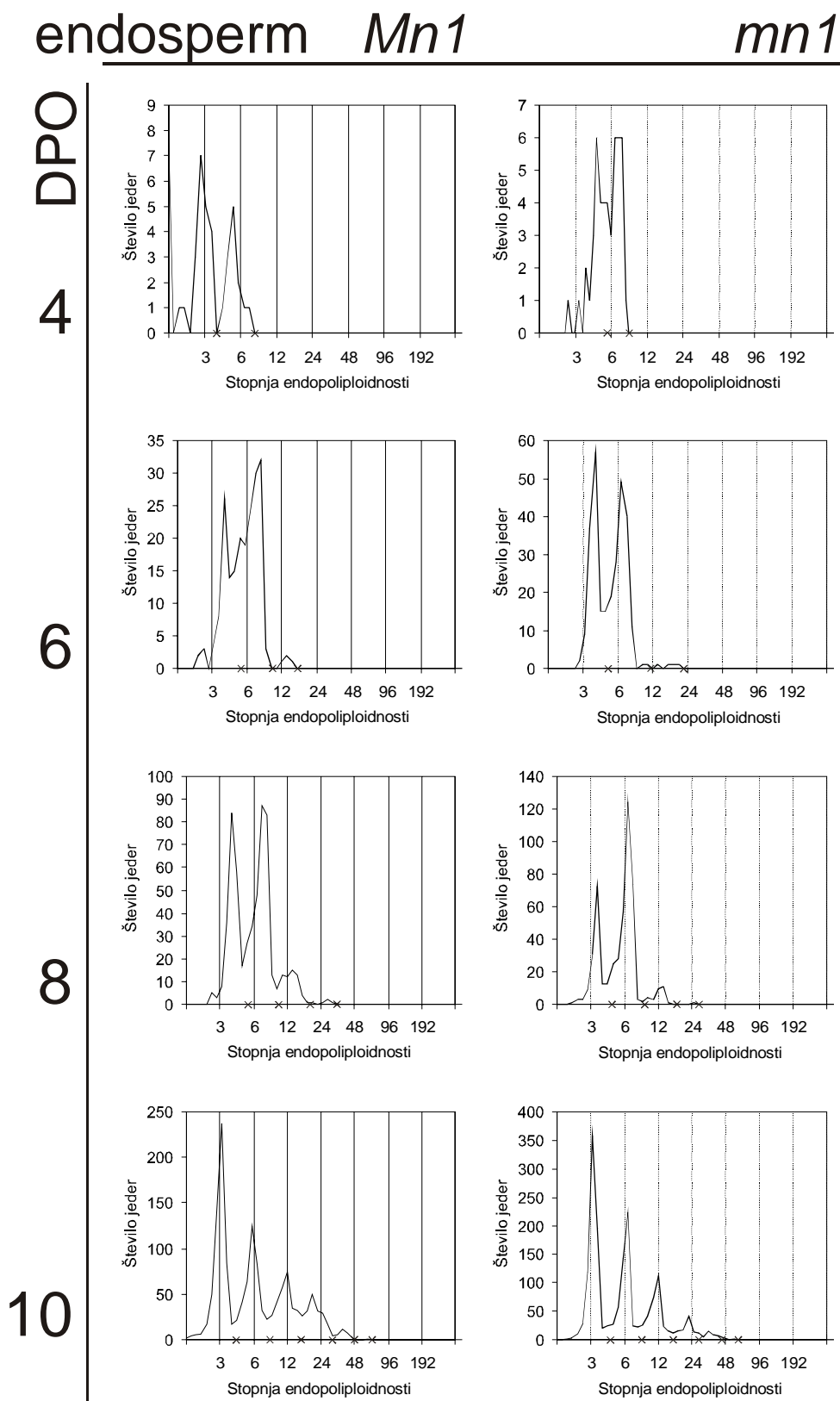
Število jeder v endospermu, ki smo jih izmerili v vzdolžnih rezinah kariops divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1*, se je večalo od 4. do 12. DPO (Slika 4.28). Število jeder 16 DPO ni neposredno primerljivo z drugimi podatki, ker so bile rastline vzgojene v drugačnih razmerah kot materinske rastline serije 4 do 12 DPO. Jedra v endospermu smo ločili na razrede vrednosti C na podlagi frekvenčnih porazdelitev faktorja C, izračunanega iz IOG jeder (Slika 4.29). Število in pojavljanje jeder različnih stopenj endopoliploidnosti je bilo podobno v obeh genotipih. Ker je v endospermu potekala endoreduplikacija, smo v zaporednih razvojnih stopnjah našli jedra z vedno večjo vsebnostjo DNA (endopoliploidna jedra). Na sliki 4.28 je vidno število jeder, ki so v rezini v večjem številu, na frekvenčnih porazdelitvah jeder pa so vidni vrhovi tudi za jedra, prisotna v majhnem številu (Slika 4.29). 4. DPO so bila v endospermu le jedra z vsebnostjo DNA 3 C in 6 C. Šesti dan po opraitvi so prevladovala jedra 3 C in 6 C, opazili pa smo nekaj endopoliploidnih jeder stopnje 12 C (Slika 4.29, 6 DPO). 8. DPO smo v endospermu opazili večinoma jedra 3 C, 6 C in 12 C, opazili pa smo tudi nekaj jeder 24 C. 10. DPO smo poleg jeder 3 C do 24 C opazili tudi jedra 48 C in 96 C. Jedra z najvišjo opaženo stopnjo endopoliploidnosti, 192 C, smo našli v endospermu *Mn1* 12. in 16. DPO, v *mn1* pa 16. DPO.

Z vedno večjo stopnjo endopoliploidnosti se je večala tudi velikost jeder (Slika 4.30). Pri stopnji endopoliploidnosti 24 C je premer jeder v endospermu dosegel ali presegel 20 μm , kolikor so bile debele rezine (Slika 4.31). Jedra višjih vrednosti C pa so bila še večja, tako da so največja jedra (192 C v *Mn1* 12 DPO) v premeru merila kar okoli 40 μm . Premer jeder istih stopenj endopoliploidnosti (ne upoštevaje najvišjih vrednosti C pri vsakem DPO zaradi maloštevilnih izmerjenih jeder) je bil približno enak pri *Mn1* in *mn1* (Slika 4.31).



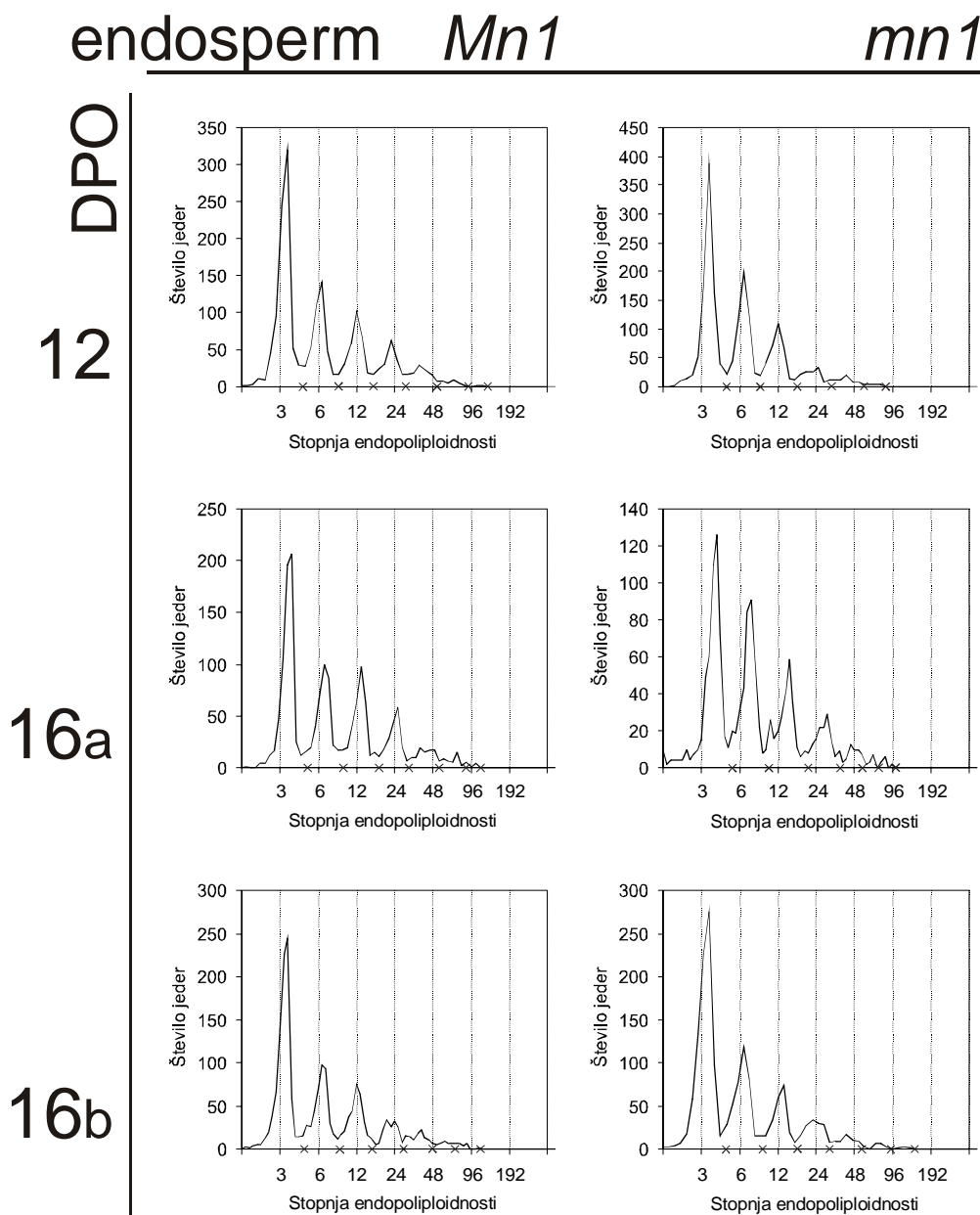
Slika 4.28. Število izmerjenih jeder v endospermu v vzdolžnih rezinah kariops koruze divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1*.

Pri 16. DPO prikazani podatki za eno od dveh izmerjenih rezin pri obeh genotipih (prikazani na Sliki 4.6); podatki so prikazani ločeno, ker so bile materinske rastline vzgojene v drugačnih razmerah kot za serijo 4–12 DPO.



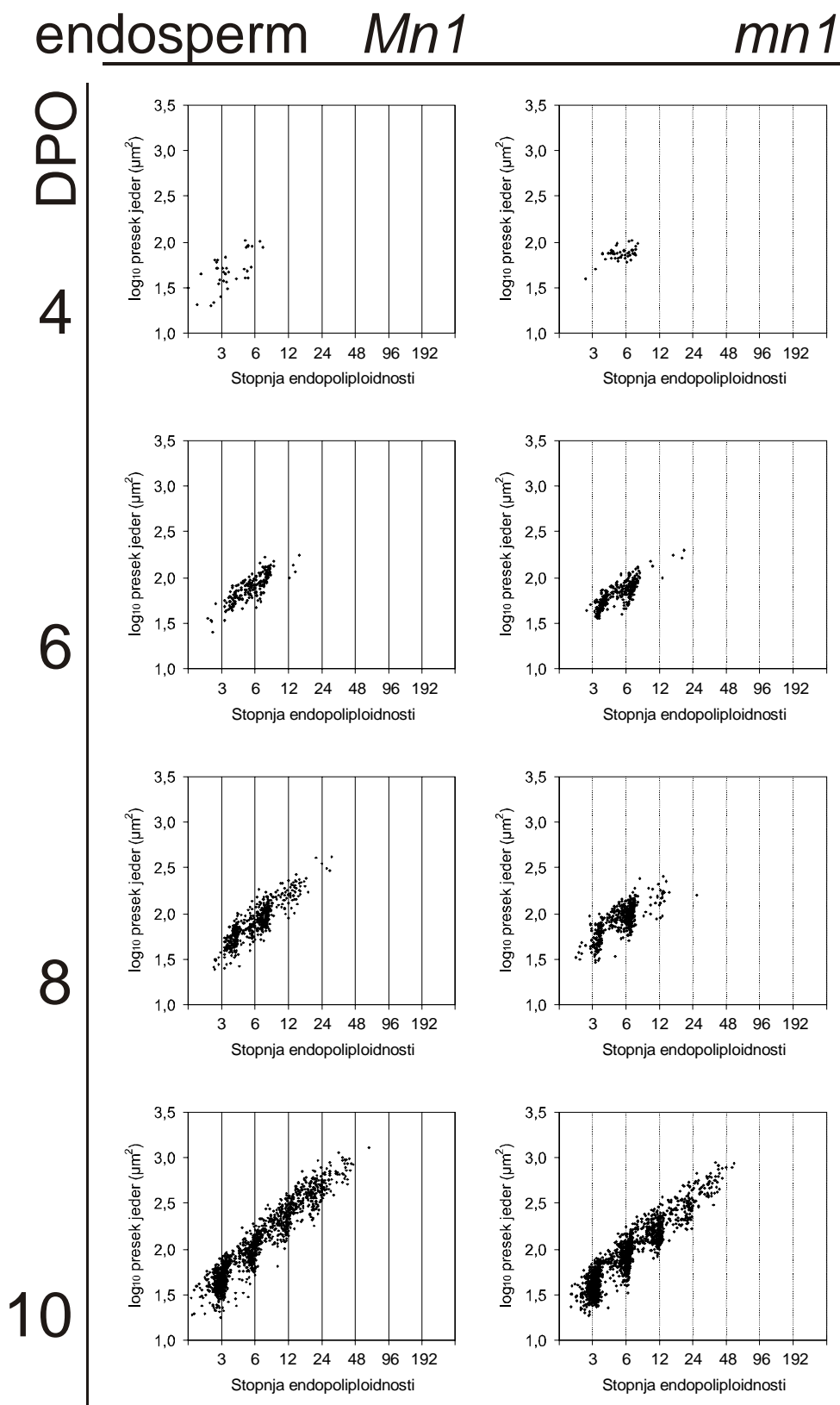
Slika 4.29. Frekvenčna porazdelitev jeter v endospermu glede na relativno vsebnost DNA.

(Slika se nadaljuje na naslednji strani.)



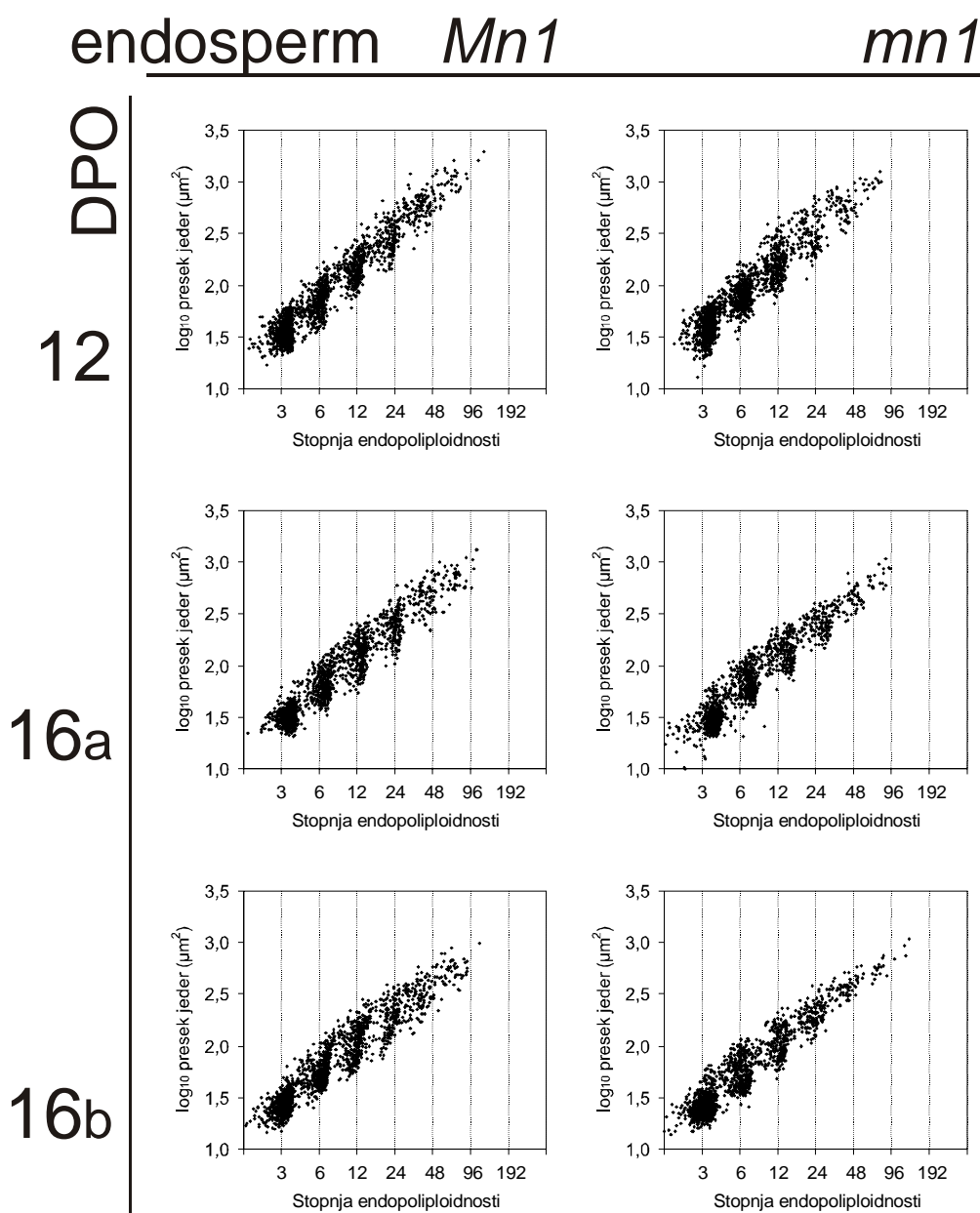
Slika 4.29. Frekvenčna porazdelitev jeter v endospermu glede na relativno vsebnost DNA.

(Nadaljevanje slike s prejšnje strani.) Meje med razredi jeter z različno stopnjo endopoliploidnosti so označene s križci (×) na osi X. Pri 16. DPO prikazani podatki za dve izmerjeni rezini, pri ostalih pa za eno izmerjeno rezino.



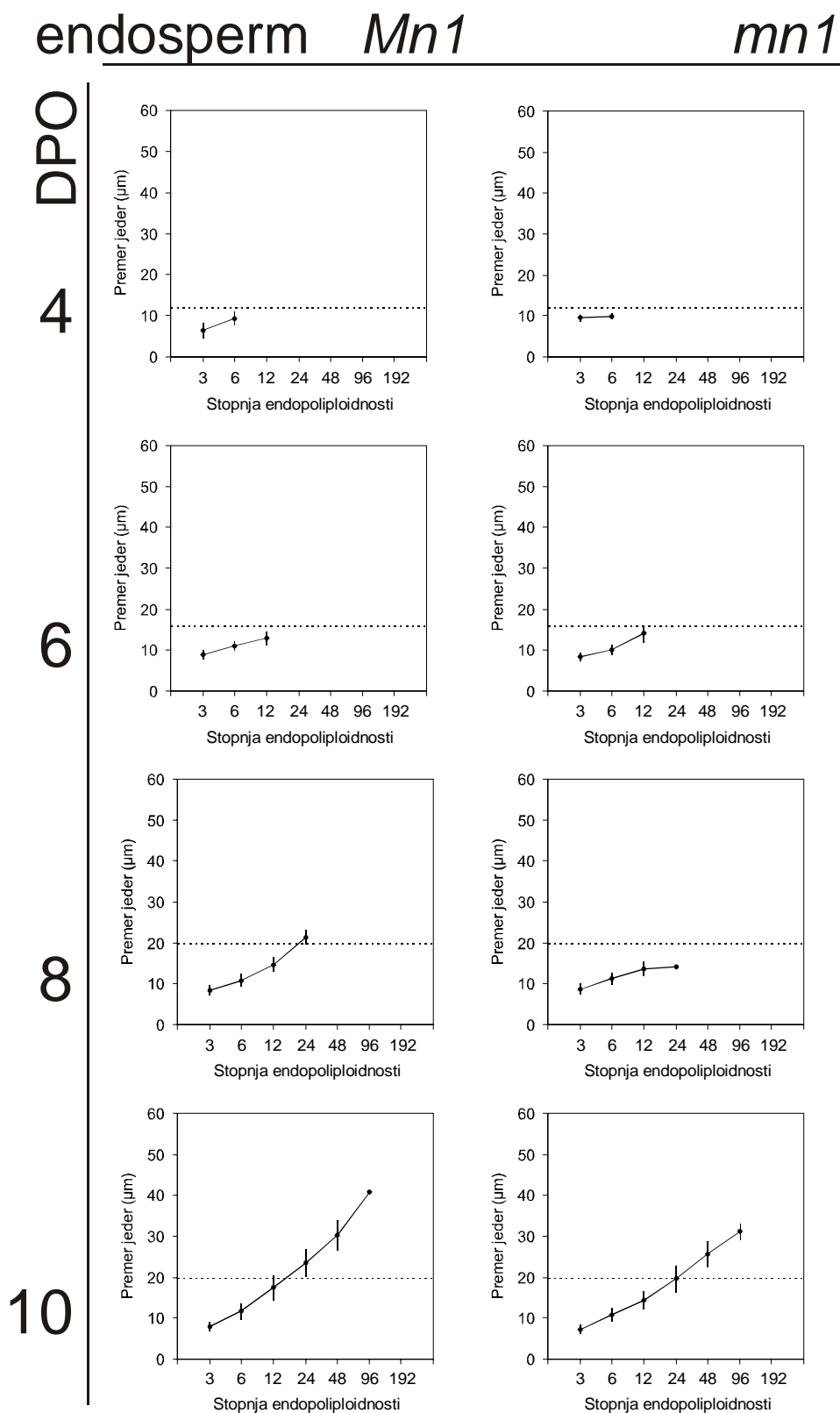
Slika 4.30. Površina preseka jeder in relativna količina DNA v jedrih v endospermu.

(Slika se nadaljuje na naslednji strani.)



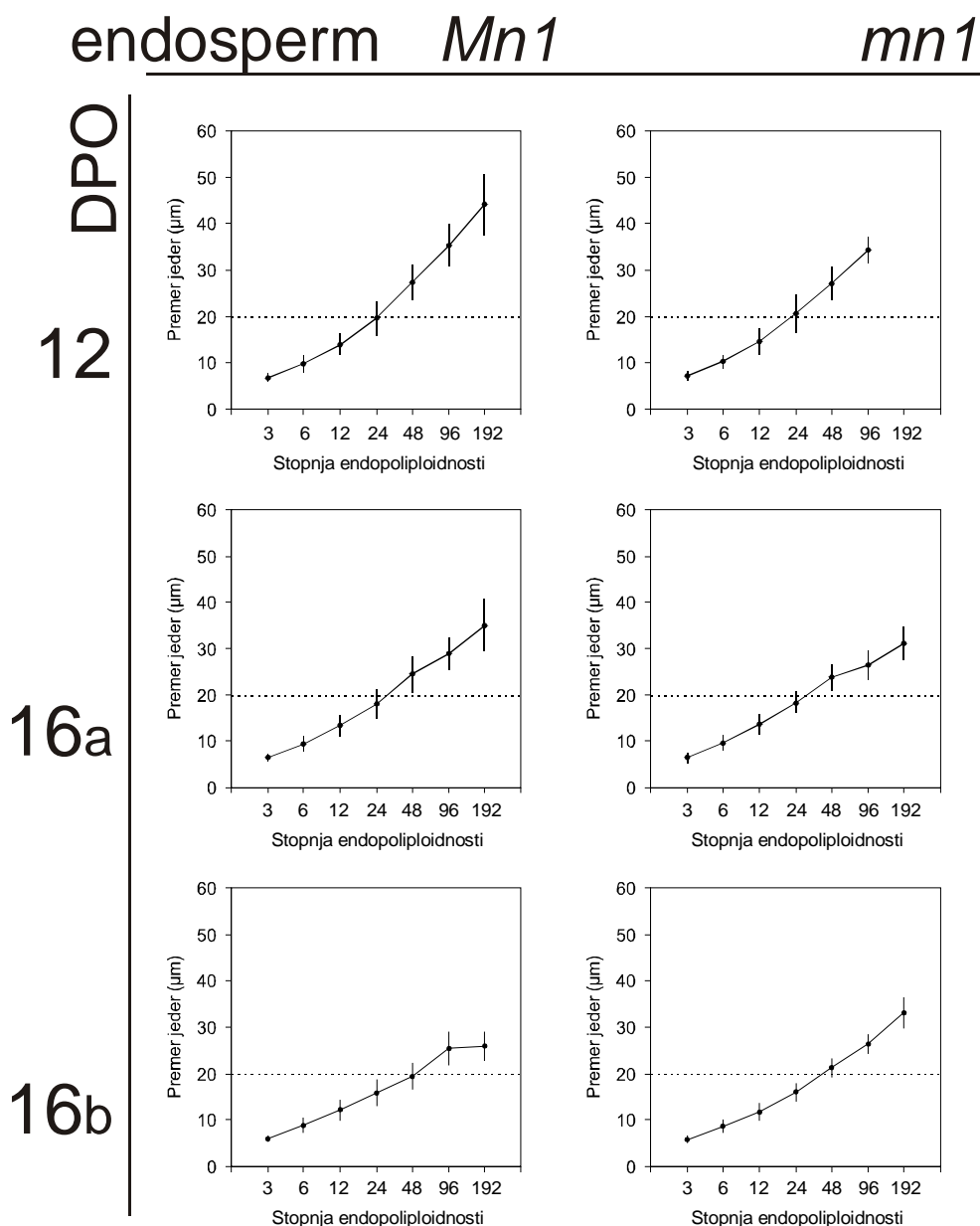
Slika 4.30. Površina preseka jeter in relativna količina DNA v jedrih v endospermu.

(Nadaljevanje slike s prejšnje strani.) Pri 16. DPO so prikazani podatki za dve izmerjeni rezini, pri ostalih pa za eno izmerjeno rezino.



Slika 4.31. Premer jeder v endospermu glede na stopnjo endopoliploidnosti.

(Slika se nadaljuje na naslednji strani.)



Slika 4.31. Premer jeder v endospermu glede na stopnjo endopoliploidnosti.

(Nadaljevanje slike s prejšnje strani.) Prikazan je premer jeder \pm SD. Vodoravna prekinjena črta predstavlja debelino vzdolžne rezine. Pri 16. DPO so prikazani podatki za dve izmerjeni rezini, pri ostalih pa za eno izmerjeno rezino.

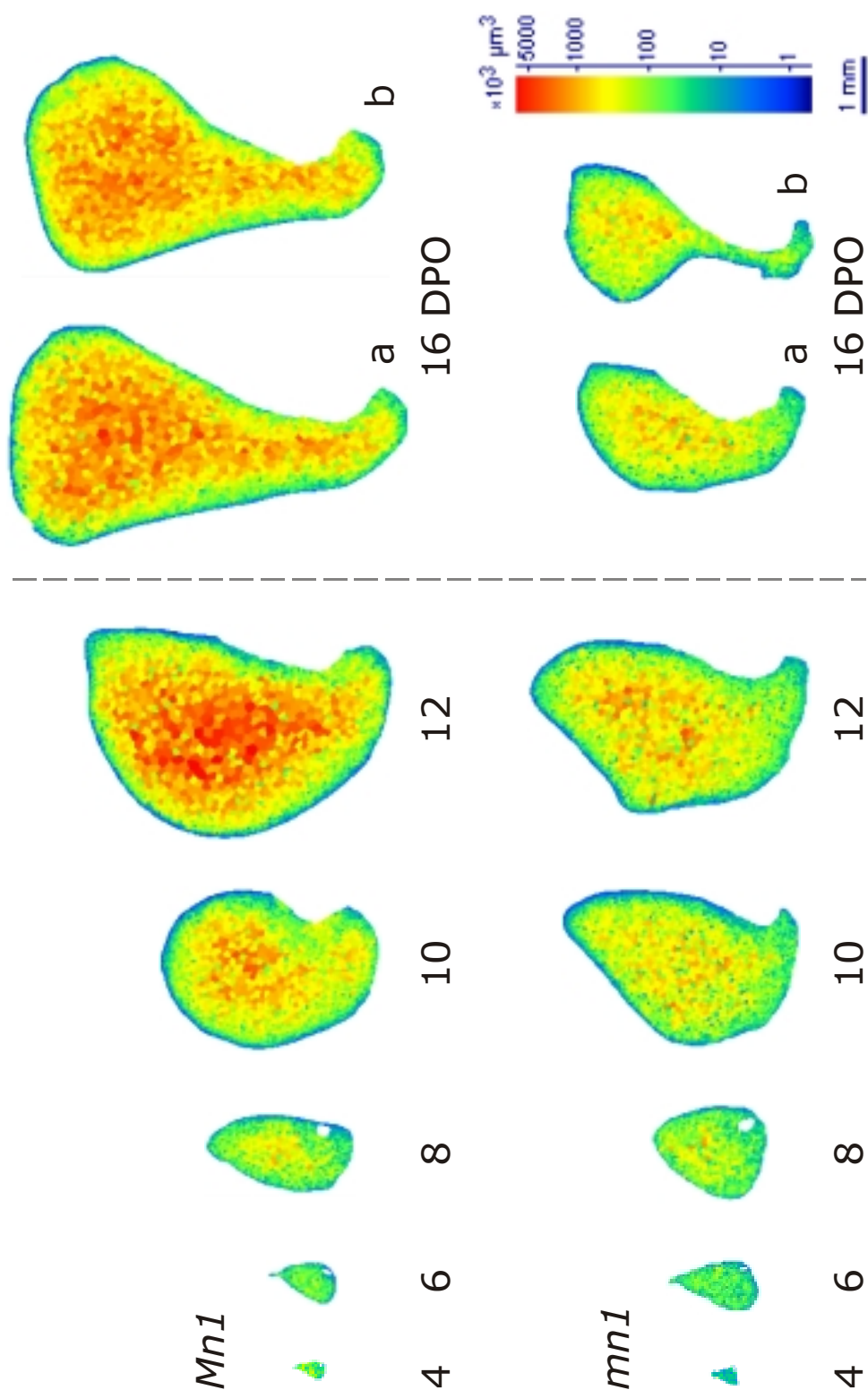
4.1.3.2.2 Število in prostornina celic v celotnem endospermu (ocena s 3-D modelom)

V kariopsah divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1* od 4. do 16. DPO smo s 3-D modelom ocenili število celic v endospermu, prostornino endosperma, prostornino embria in celotno površino endosperma (Preglednica 4.1). Osnova za oceno tridimenzionalne strukture endosperma so bile slike obrisov celic, prikazane na Sliki 4.32. V času od 4. do 12. DPO smo podatke ocenili na podlagi ene vzdolžne rezine skozi kariopso vsakega genotipa, 16. DPO pa smo izmerili podatke v dveh kariopsah za vsak genotip. V začetku razvoja (4 do 8 DPO) je bila porazdelitev celic v endospermu enakomerna (glede na njihovo velikost), v poznejšem razvoju smo majhne celice opazili le v zunanjih plasteh endosperma, osrednji del pa so napolnjevale velike celice (Slika 4.32). Število celic in prostornina endosperma sta se hitro, skoraj eksponentno večala do okrog 10. DPO. Endosperm *mn1* je imel v začetku (4 in 6 DPO) več celic, nato pa je endosperm *Mn1* dosegel (8 in 10 DPO) in presegel (12 in 16 DPO) število celic ter prostornino endosperma *mn1* (Slika 4.33).

Preglednica 4.1. Število celic, prostornina in površina endosperma *Mn1* in *mn1*; podatki ocenjeni s 3-D modelom.

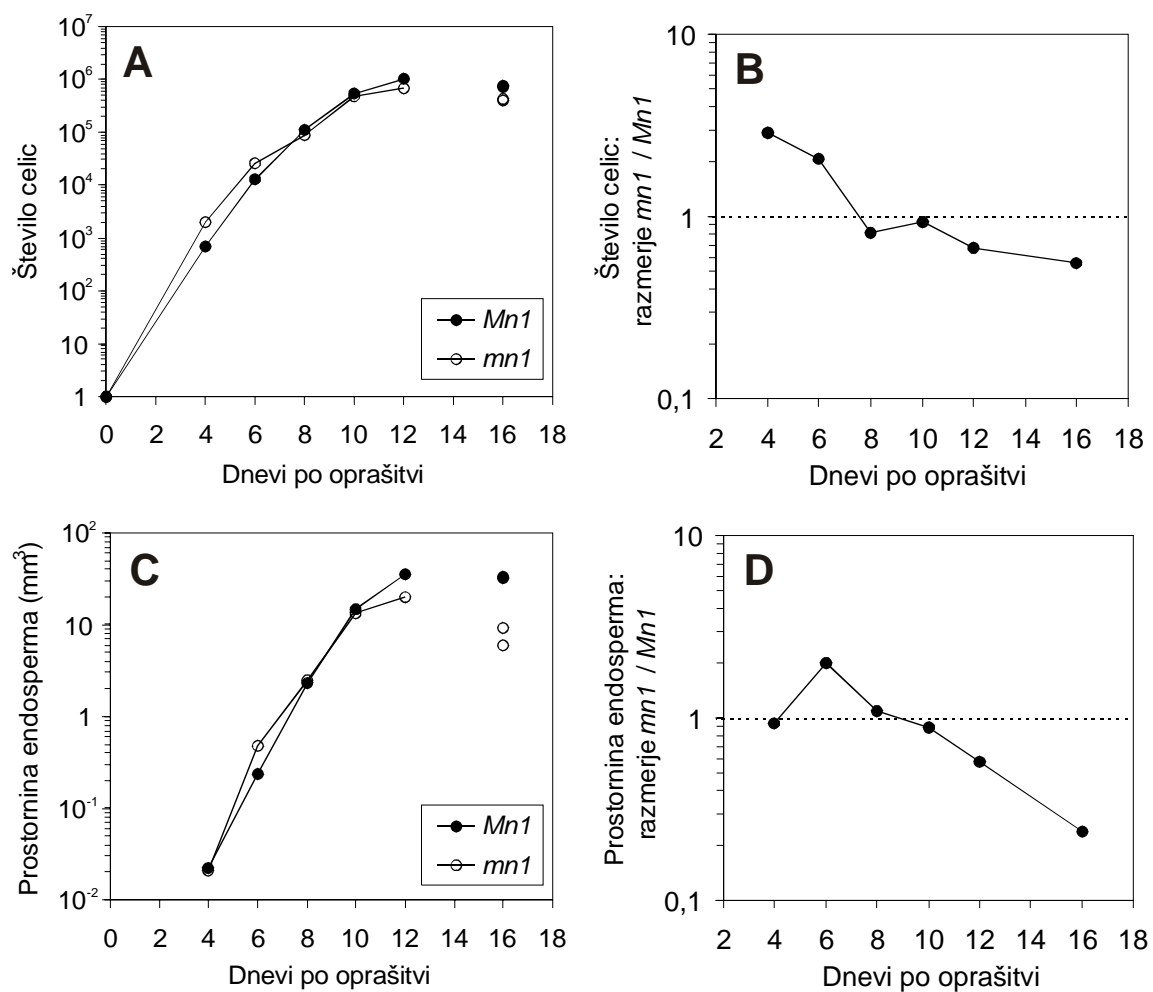
| Dnevi po oprašitvi (DPO) | Število celic v endospermu | | Prostornina endosperma (mm ³) | | Prostornina embria (mm ³) | | Površina endosperma (mm ²) | |
|--------------------------------|-------------------------------|------------|--|------------|--|--------------------|---|------------|
| | <i>Mn1</i> | <i>mn1</i> | <i>Mn1</i> | <i>mn1</i> | <i>Mn1</i> | <i>mn1</i> | <i>Mn1</i> | <i>mn1</i> |
| 4 | 673 | 1930 | 0,02 | 0,02 | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁴ | 0,32 | 0,29 |
| 6 | 12525 | 25758 | 0,24 | 0,47 | 5×10 ⁻⁴ | 2×10 ⁻⁴ | 1,54 | 2,63 |
| 8 | 109446 | 88769 | 2,29 | 2,51 | 0,004 | 0,006 | 7,95 | 7,28 |
| 10 | 528947 | 492060 | 14,72 | 13,09 | 0,09 | 0,08 | 24,89 | 24,04 |
| 12 | 996149 | 676086 | 34,97 | 19,98 | 0,22 | 0,19 | 45,89 | 32,35 |
| 16a¹ | 738433 | 422042 | 31,41 | 9,28 | 1,53 | 0,64 | 44,54 | 19,33 |
| 16b¹ | 751145 | 403571 | 33,23 | 5,95 | 1,51 | 0,64 | 45,19 | 14,43 |

¹ Pri 16. DPO so prikazani podatki za dve izmerjeni kariopsi, ki pa sta iz druge sezonske serije rastlin kot kariopse od 4. do 12. DPO.



Slika 4.32. Velikost celic v medianih vzdolžnih rezinah kariopse koruze.

Kariopse 16. DPO so iz druge poskusne serije kot preostale, zato so prikazane ločeno.

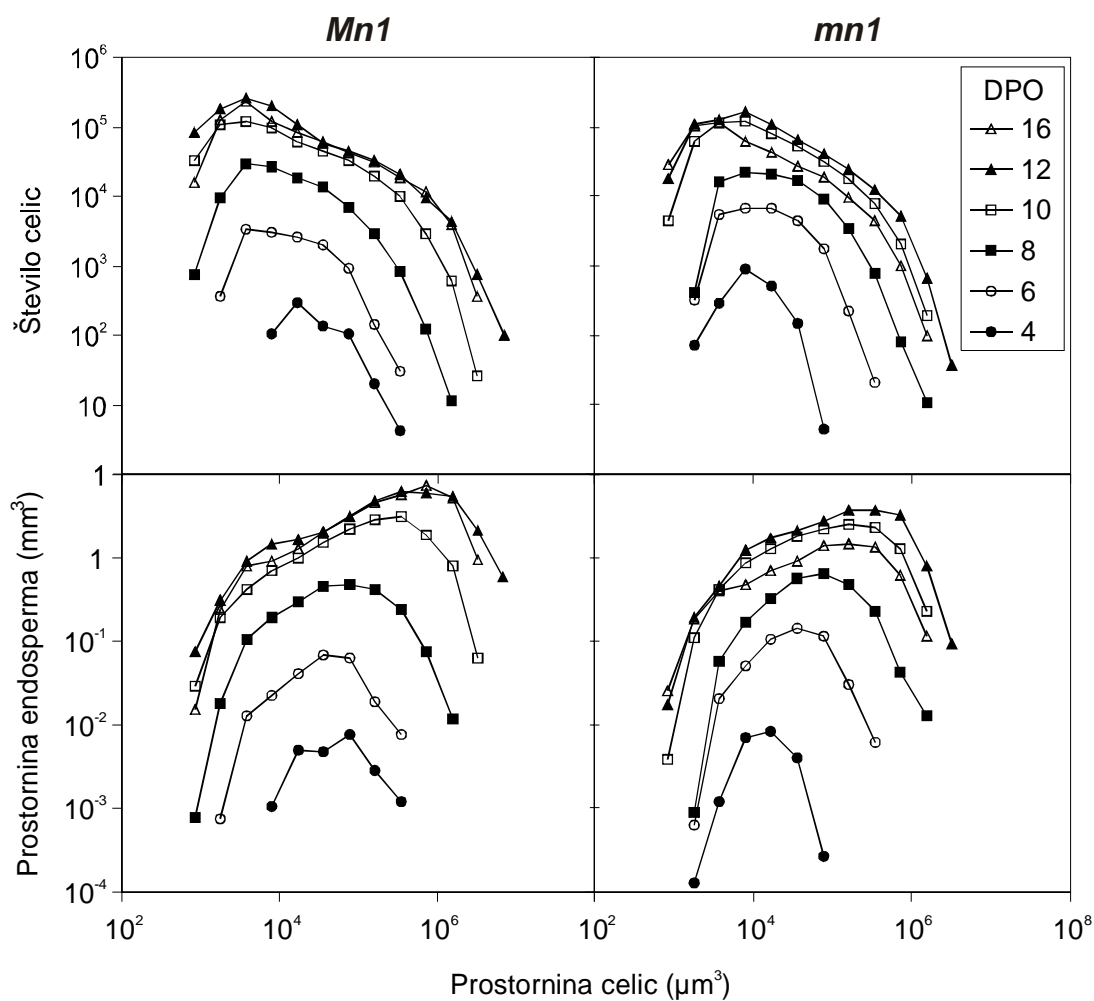


Slika 4.33. Število celic in prostornina endosperma.

Število celic v endospermu, ocenjeno s 3-D modelom iz medianih vzdolžnih rezin kariops koruze (A). Razmerje med številom celic v kariopsi mutante *mn1* in kariopsi divjega tipa *Mn1* (B). Prostornina endosperma, ocenjena s 3-D modelom (C). Razmerje med prostornino endosperma v kariopsi mutante *mn1* in kariopsi divjega tipa *Mn1* (D). Pri 16. DPO sta bili izmerjeni po dve kariopsi za vsak genotip. Prikazana sta oba podatka (A, C), razmerja v B in D so izračunana iz srednjih vrednosti obeh podatkov.

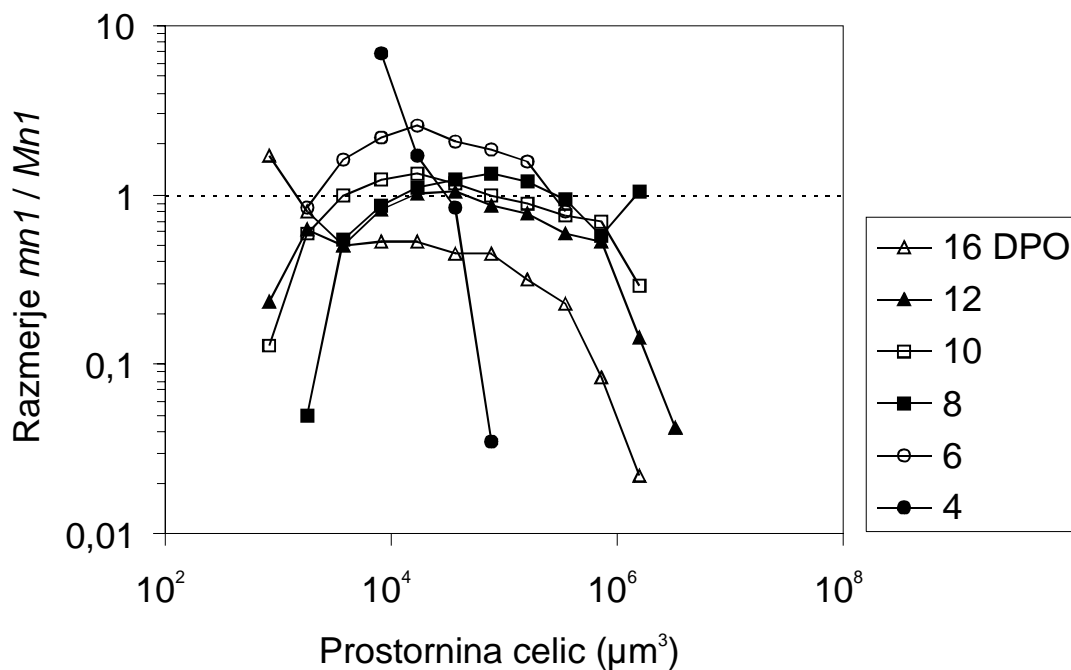
V izračunu s 3-D modelom smo celice razdelili v več razredov glede na njihovo prostornino in prikazali prispevek posameznih razredov celic k celotnemu številu celic v endospermu in prostornini endosperma (Slika 4.34). Štiri dni po opraitvi so celice zavzemale le ozko območje velikosti celic. Celice v *Mn1* so bile večje kot celice v *mn1* (Slika 4.34, položaj porazdelitve 4 DPO). V naslednjih razvojnih stopnjah smo opazili pojavljanje in večanje števila vedno večjih celic in tudi manjših celic. Največ celic v endospermu so predstavljale majhne celice, ki pa, čeprav so bile številne, niso veliko prispevale k prostornini endosperma. Za povečanje prostornine endosperma so bile odgovorne predvsem velike celice, ki so zavzemale le majhen del v skupnem številu celic (Slika 4.34). Hitrost rasti je bila največja na samem začetku razvoja endosperma, potem pa se je relativni prirastek števila celic in prostornine endosperma zmanjševal; to vidimo po tem, da se razdalja med posameznimi krivuljami razporeditev celic na Sliki 4.34 zmanjšuje od 4. do 12. DPO. Endosperm obeh genotipov je bil 16. DPO manjši kot 12. DPO, vendar so bile kariopse 16. DPO iz druge sezonske serije rastlin kot kariopse 4. do 12. DPO. Ker so bile rastline vzgojene v različnih razmerah, jih ne moremo neposredno primerjati. Kljub temu je 16 DPO porazdelitev števila celic in prostornine, ki jo zavzemajo v endospermu po razredih prostornine celic, zelo podobna razporeditvi celic 12 DPO (Slika 4.34).

Razmerje med številom celic v endospermu *mn1* in *Mn1* je najmanjše v skrajnih razredih velikosti celic. V endospermu *mn1* je relativno manj zelo majhnih in zelo velikih celic kot v endospermu *Mn1*, predvsem v času od 8. do 16. DPO. Šestnajst dni po opraitvi je v *mn1* manj celic kot v *Mn1* tudi v osrednjem območju prostornin celic, pri tej stopnji je več celic le v najmanjšem razredu velikosti celic (Slika 4.35).



Slika 4.34. Število celic in prostornina, ki jo zavzemajo celice v endospermu divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1* 4 do 16 DPO.

Celice so razdeljene v razrede glede na njihovo prostornino. Število celic in prostornina v endospermu, ki jo zavzemajo, sta prikazana na logaritemski skali. Pri 16. DPO prikazane srednje vrednosti iz dveh izmerjenih kariops.

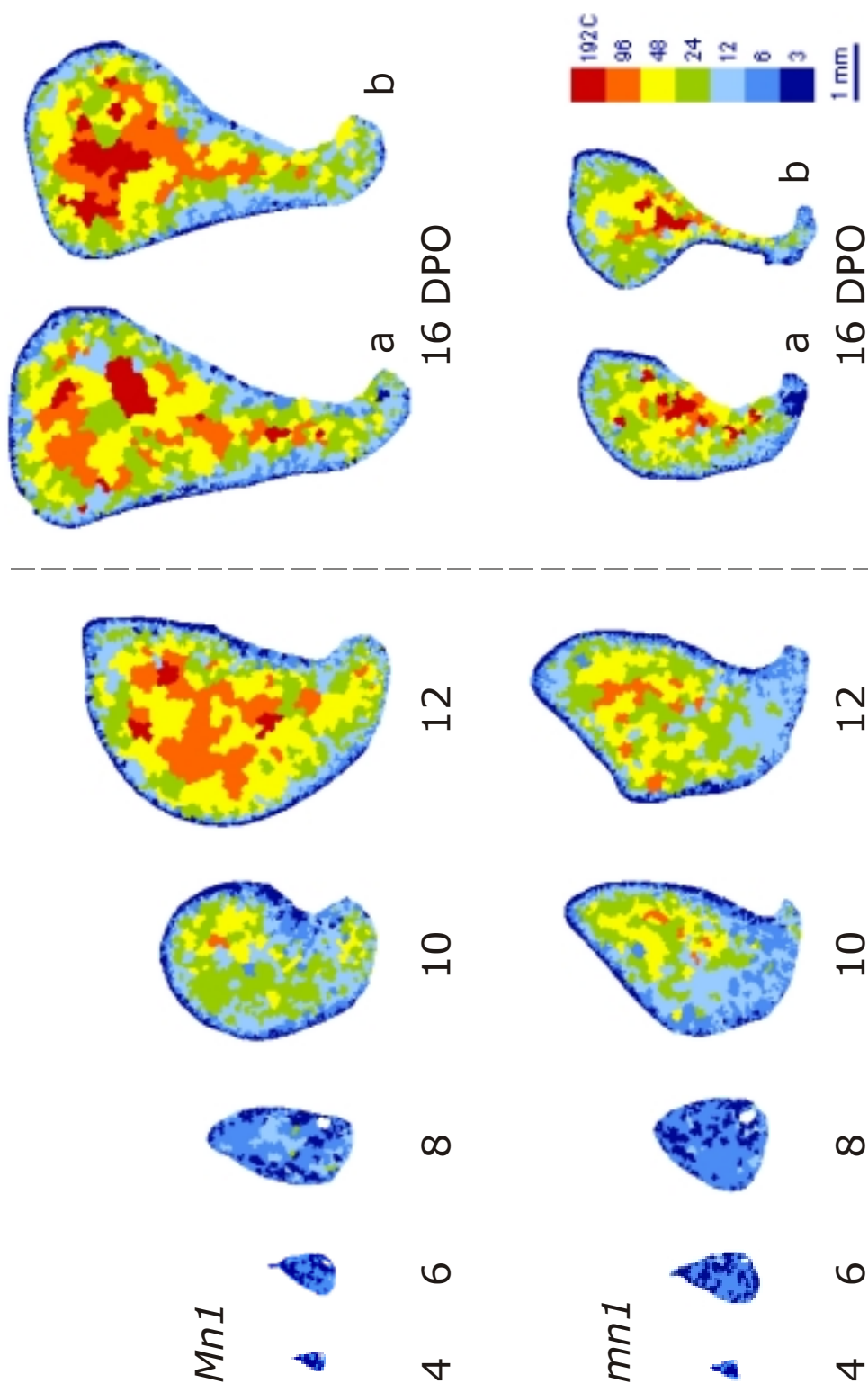


Slika 4.35. Razmerje med številom celic v endospermu mutante *mn1* in divjega tipa *Mn1* v posameznih razredih velikosti celic.

Ker so celice urejene v razrede glede na prostornino celic, je to razmerje enako tudi razmerju prostornin endosperma, ki ga napolnjujejo celice obeh genotipov. Pri 16. DPO prikazane srednje vrednosti iz dveh izmerjenih kariops.

4.1.3.2.3 Število in prostornina celic v celotnem endospermu (ocena s 3-D modelom) glede na stopnjo endopoliploidnosti

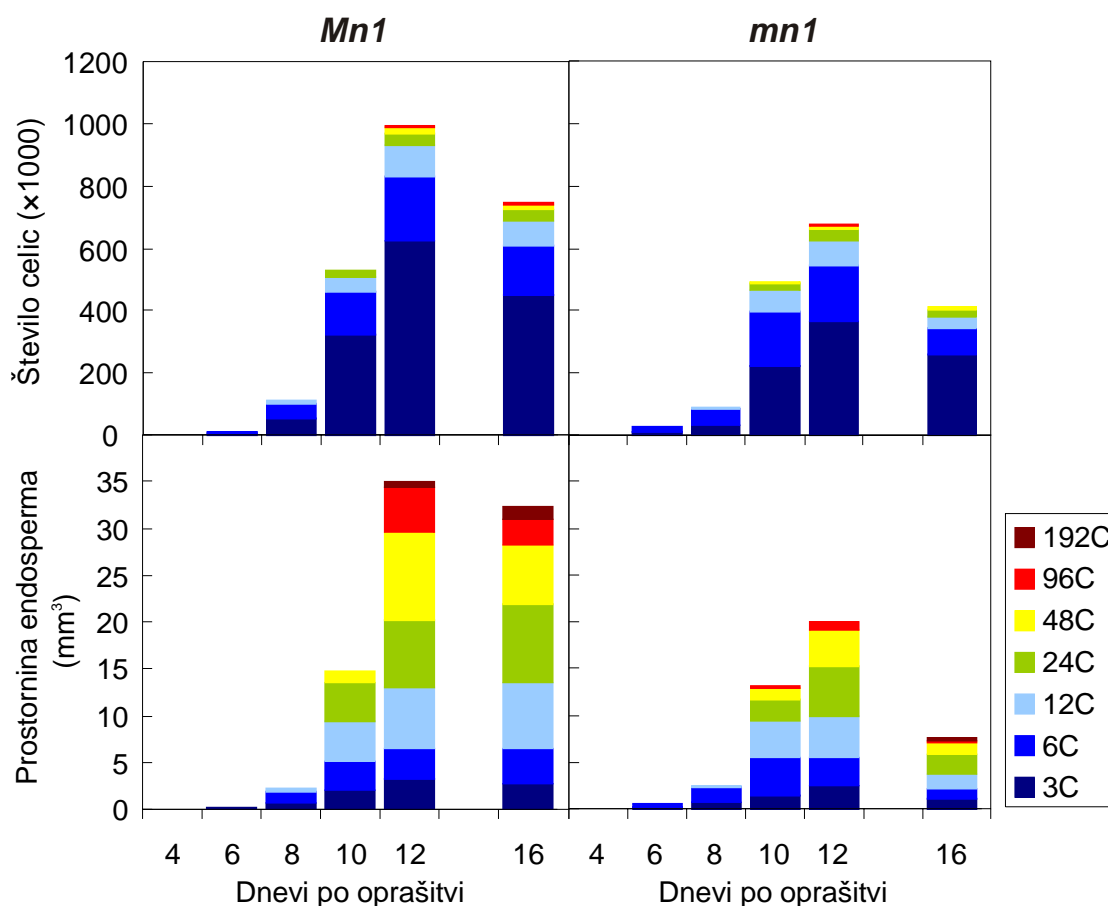
Na osnovi slik prerezov endosperma na Sliki 4.36 smo s 3-D modelom ocenili tudi število celic z različnimi stopnjami endopoliploidnosti v celotnem endospermu. Na Sliki 4.36 je dobro vidna porazdelitev celic v endospermu. Od 4. do 8. DPO so celice z različnimi stopnjami endopoliploidnosti enakomerno razporejene po endospermu. Od 10. DPO naprej pa so bile celice z visoko stopnjo endopoliploidnosti le v osrednjem delu endosperma, celice nizkih vrednosti C pa le v zunanjih plasteh endosperma. Porazdelitev celic z vedno večjo stopnjo endopoliploidnosti (Slika 4.36) se je ujemala s porazdelitvijo celic z vedno večjo prostornino (Slika 4.32). V endospermu obeh genotipov so bile v osrednjem delu celice z visoko vrednostjo C in veliko prostornino. Razlika med genotipoma je bila v bazalnem delu endosperma, kjer so v času od 10. do 16. DPO v *Mn1* prevladovali celice z vrednostmi C od 6 do 48 C, v *mn1* pa le od 6 do 12 C.



Slika 4.36. Stopnja endopoliploidnosti celic v medianih vzdolžnih rezinah kariopse koruze.

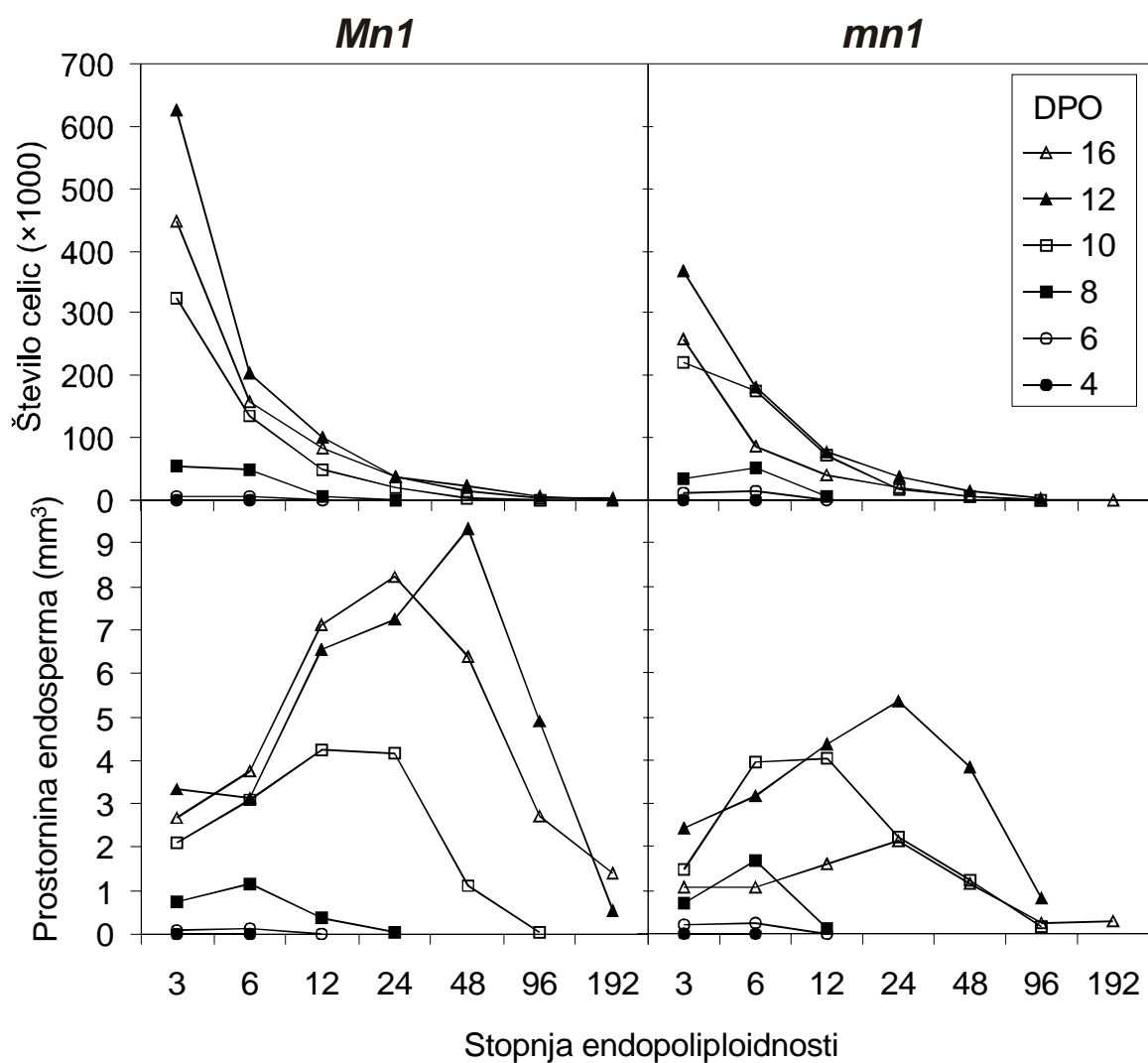
Stopnja endopoliploidnosti je bila izmerjena na istih rezinah kot velikosti celic (Slika 4.32). Kariopse 16 DPO so iz druge poskusne serije kot preostale, zato so prikazane ločeno.

Sestava endosperma je bila, glede na zastopanost celic z različnimi vrednostmi C, podobna pri obeh genotipih. Do 10. DPO sta endosperma obeh genotipov vsebovala približno enako število celic in imela enako prostornino, 12. in 16. DPO pa je bil endosperm *mn1* veliko manjši od *Mn1* (Slika 4.37). V endospermu obeh genotipov so po številu celic prevladovali celice 3 C, celic vsake nadaljnje stopnje endopoliploidnosti je bilo manj. Kljub majhnemu številu pa so celice višjih stopenj endopoliploidnosti zavzele velik delež prostornine endosperma. Osmi dan po oprašitvi so največji del prostornine zavzele celice 6 C, 10. DPO celice 6 C do 24 C, 12. in 16. DPO pa so največji del prostornine endosperma zavzele celice 12 C do 48 C (Slika 4.38).



Slika 4.37. Sestava endosperma po vrednostih C 4 do 16 DPO.

Prikazana sta število celic (zgoraj) in prostornina endosperma (spodaj). Pri 16. DPO so prikazane srednje vrednosti iz dveh izmerjenih kariops.



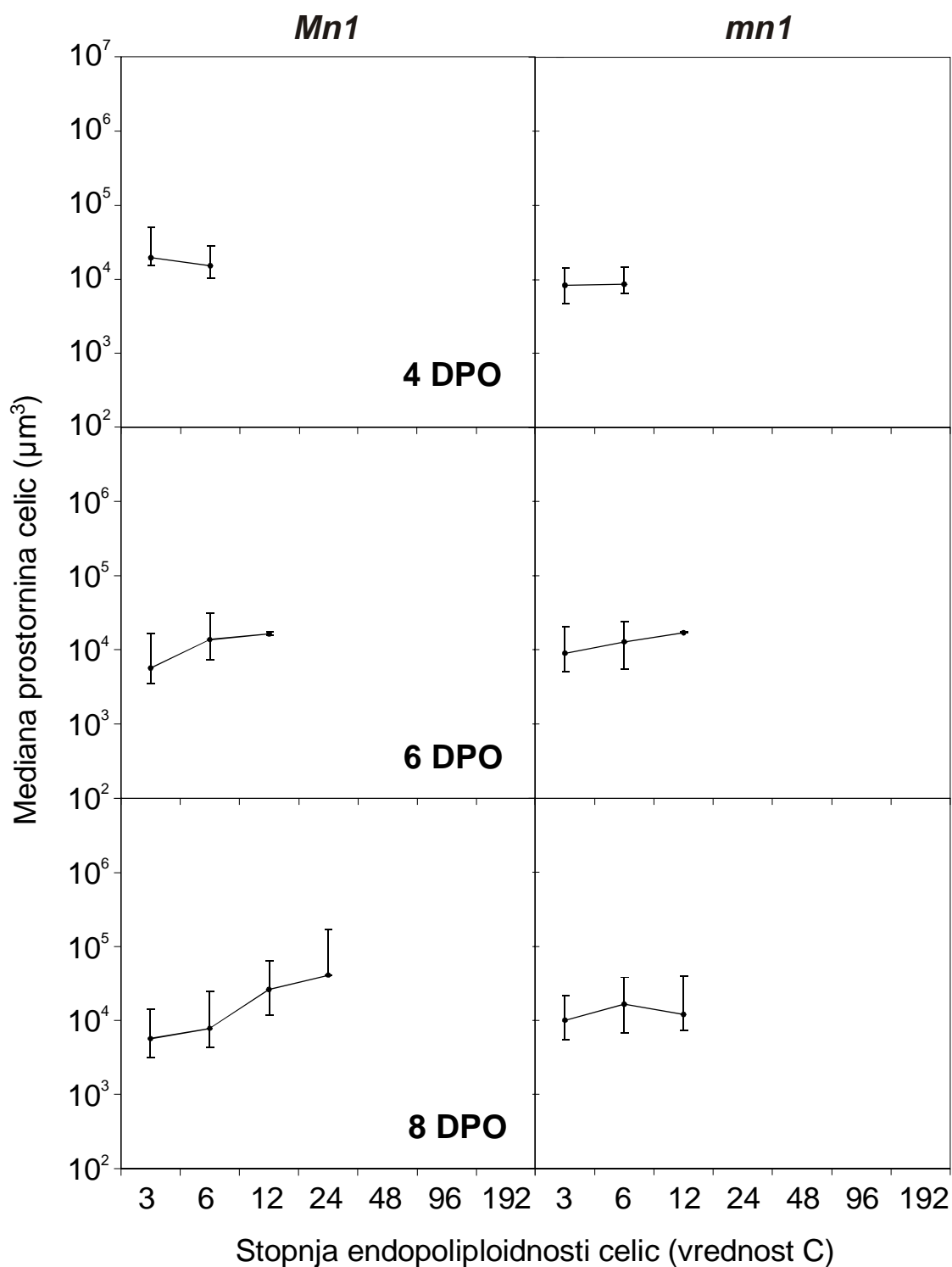
Slika 4.38. Število celic posameznih stopenj endopoliploidnosti v endospermu in prostornina, ki jo zavzemajo v endospermu 4 do 16 DPO.

Pri 16. DPO so prikazane srednje vrednosti iz dveh izmerjenih kariops.

V času od 10. do 16. DPO se je v obeh genotipih prostornina celic povečevala s povečevanjem stopnje endopoliploidnosti. V času 4 in 6 DPO je bila prostornina vseh celic približno enaka, pri *Mn1* pa smo 8. DPO prvič opazili večjo prostornino celic pri večjih vrednostih C (Slika 4.39). Povečevanje prostornine celic je bilo najbolj izrazito pri stopnjah endopoliploidnosti 6 C do 48 C. Celice 192 C so imele podobno prostornino kot celice 96 C. Primerjava medianih prostornin celic med *Mn1* in *mn1* je pokazala, da so bile v *mn1* celice stopenj ploidnosti 24 do 192 C v času od 10. do 16. DPO manjše kot celice *Mn1* (Slika 4.40). Celice istih stopenj endopoliploidnosti so imele približno enako prostornino v času 10 do 16 DPO, izstopale so le celice 48 C in 96 C v *mn1* 12. DPO. V zgodnjih stopnjah razvoja so bile celice 3 C večje kot v poznejših stopnjah (Slika 4.40).

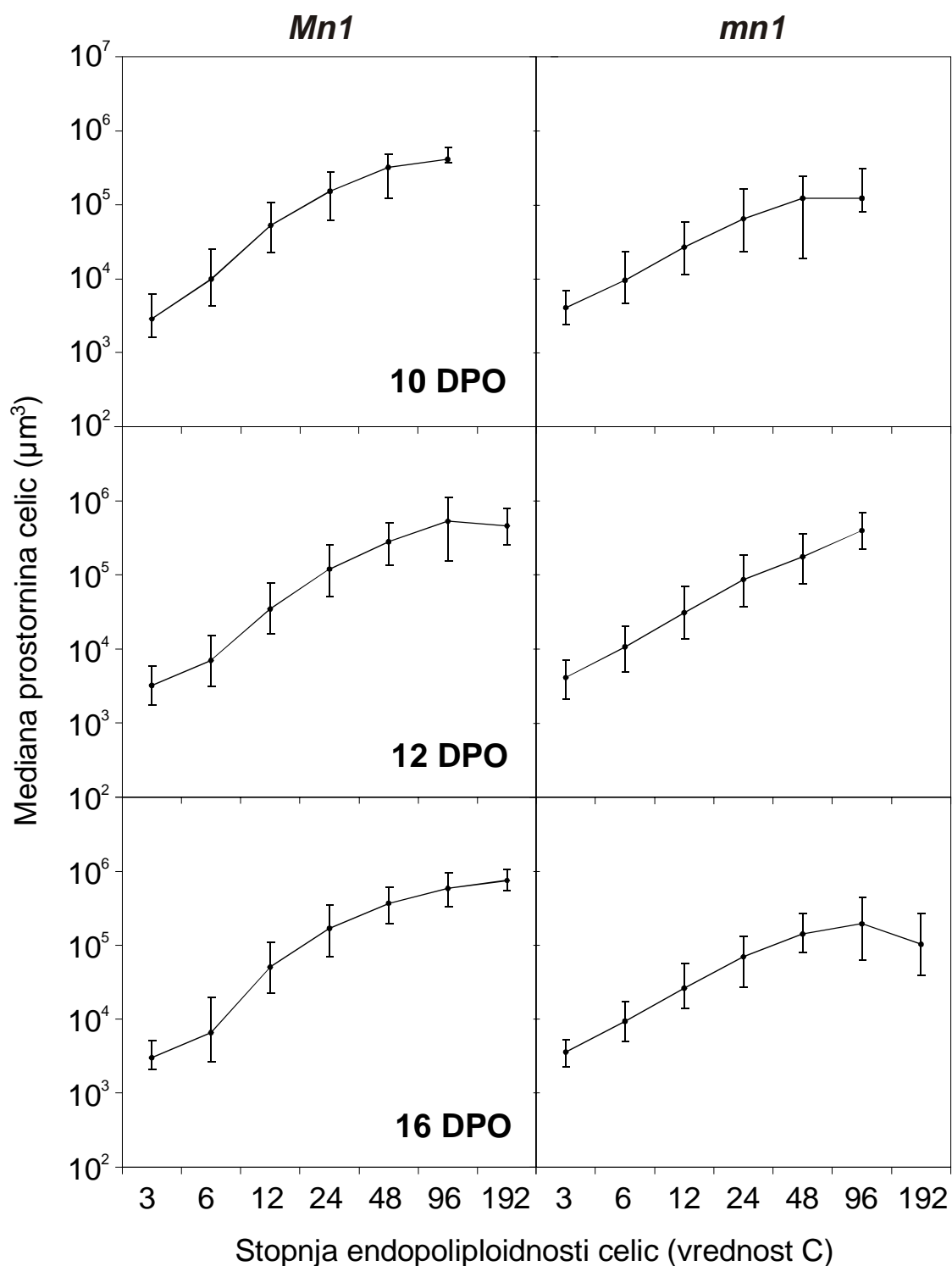
V času 4 do 6 DPO je bilo v endospermu *mn1* več celic vseh vrednosti C kot v *Mn1*, ki so 6. DPO zavzemale tudi večjo prostornino v endospermu. Četrty dan po opraitvi so celice *mn1* zavzemale enako prostornino v endospermu kot *Mn1*, bile pa so približno dvakrat manjše kot celice v endospermu *Mn1* (Slika 4.41). Od 8. do 16. DPO je bilo število 3 C celic v *mn1* le 50-70 % števila celic v *Mn1*. 8 do 12 DPO je bilo število celic 6 C do 24 C podobno v obeh genotipih. Desety dan po opraitvi smo v *mn1* opazili veliko več celic 48 C in 96 C. 16. DPO je bilo v endospermu *mn1* v vseh razredih endopoliploidnosti manj celic kot v *Mn1* (približno 50 %), zavzemale pa so le od 10 do 40 % prostornine v endospermu v primerjavi s celicami *Mn1* istih stopenj endopoliploidnosti. Tudi 12. DPO so celice *mn1* od 12 C do 96 C zavzemale manj prostornine (20 % do 70 %) v endospermu v primerjavi z *Mn1* (Slika 4.41).

Prostornina celic višjih stopenj endopoliploidnosti je bila izrazito manjša v *mn1* endospermu 10. in 16. DPO (20 do 50 % prostornine celic v *Mn1*). Prostornina celic 24 C do 96 C je bila manjša tudi 12. DPO, vendar ne v taki meri (Slika 4.41 C).



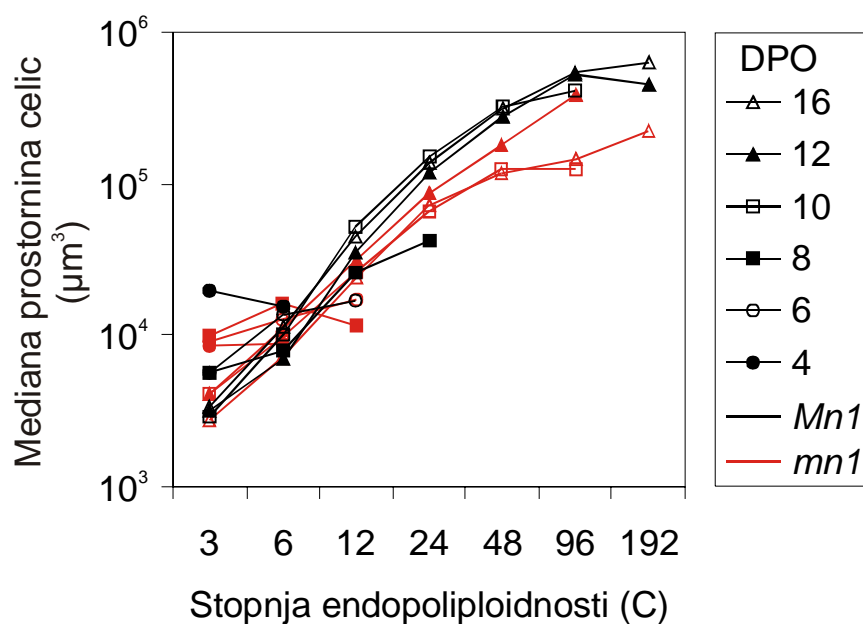
Slika 4.39. Prostornina celic v endospermu glede na stopnjo endopoliploidnosti.

(Slika se nadaljuje na naslednji strani.)



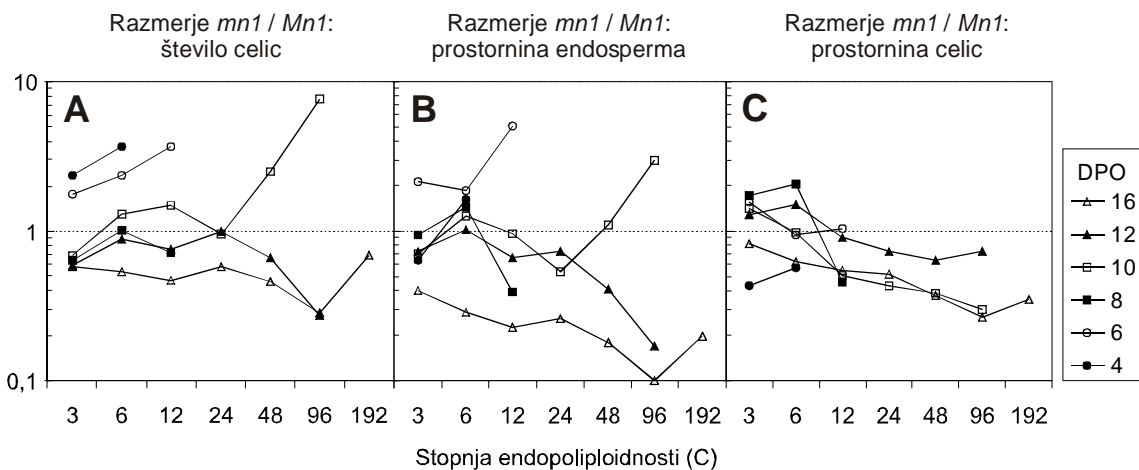
Slika 4.39. Prostornina celic v endospermu glede na stopnjo endopoliploidnosti.

(Nadaljevanje slike s prejšnje strani.) Prikazani so mediana prostornina in prvi ter tretji kvartil. Pri 16. DPO so prikazani podatki za eno od dveh izmerjenih rezin pri obeh genotipih.



Slika 4.40. Mediana prostornina celic v endospermu divjega tipa (črni simboli) in mutante *mn1* (rdeči simboli) glede na stopnjo endopoliploidnosti 4 do 16 DPO.

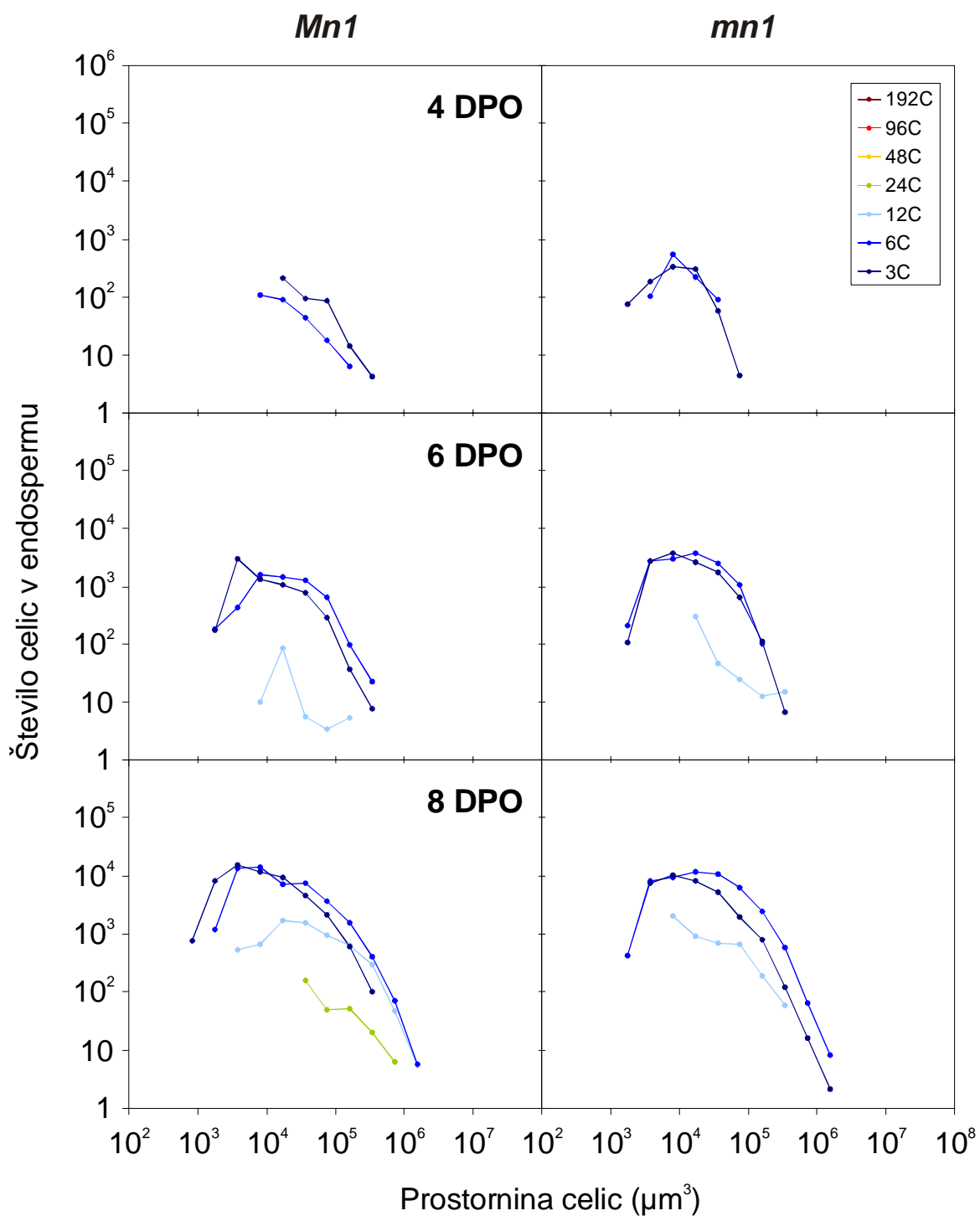
Pri 16. DPO so prikazane srednje vrednosti iz dveh izmerjenih kariops.



Slika 4.41. Razmerje števila celic (A), prostornine endosperma (B) in medianih prostornin celic (C) v *mn1* proti *Mn1* endospermu 4 do 16 DPO.

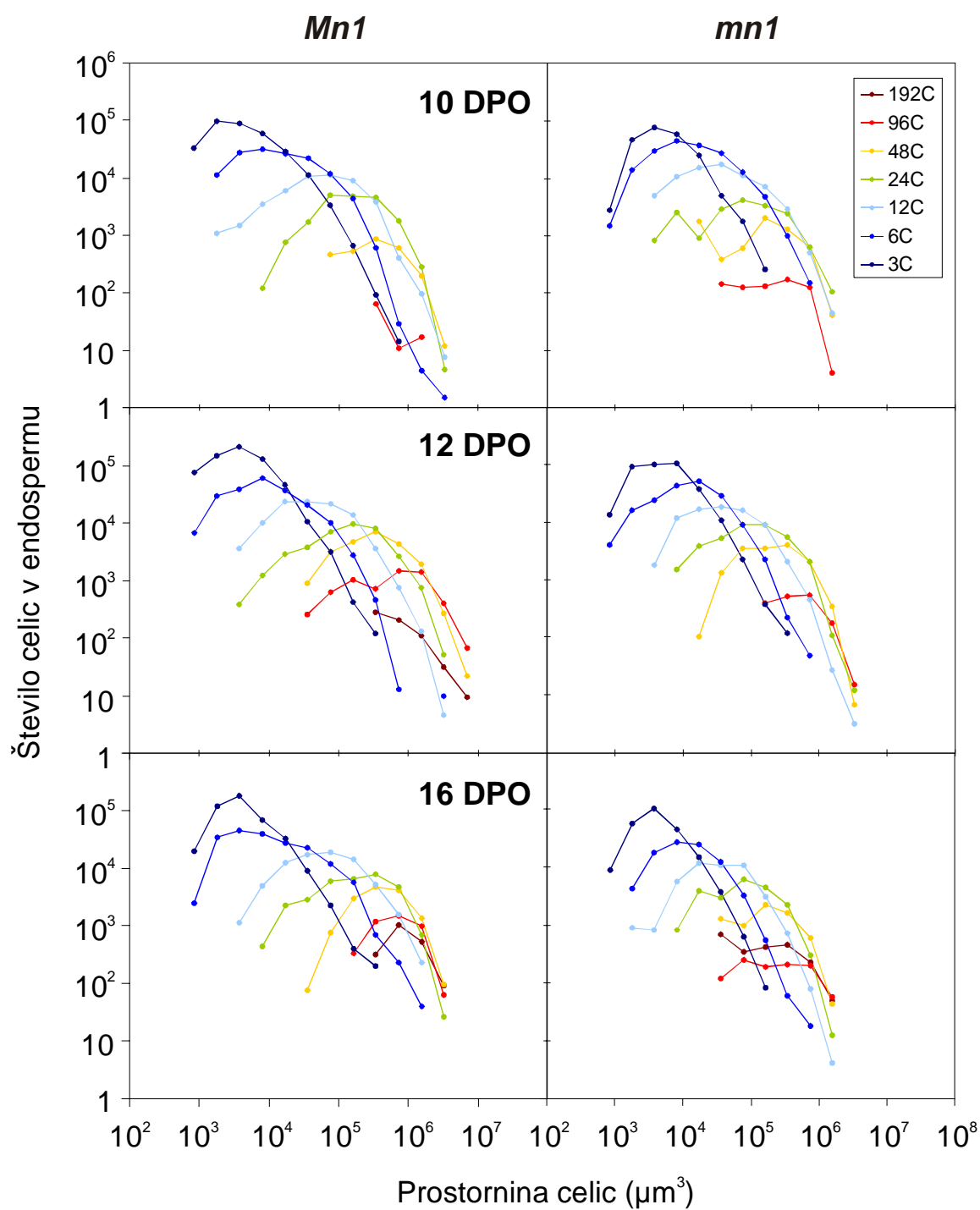
Pri 16. DPO so prikazane srednje vrednosti iz dveh izmerjenih kariops.

Celice z vsebnostjo DNA 3 C in 6 C so bile 4. in 6. DPO podobno porazdeljene glede na prostornino celic znotraj vsakega endosperma (Slika 4.42) in so zavzemale podobno prostornino v endospermu (Slika 4.43). V *Mnl* smo 8. DPO opazili celice 24 C, ki so bile porazdeljene le v razredih celic z večjo prostornino (Slika 4.42). V obdobju od 10. do 16. DPO pa smo opazili izrazit vzorec porazdelitev celic različnih stopenj endopoliploidnosti. Z vsako naslednjo stopnjo vrednosti C je bilo celic manj, njihova porazdelitev, glede na prostornino celic, pa je bila vedno bolj premaknjena k velikim prostorninam celic (Slika 4.42). Prostornina, ki so jo celice posameznih vrednosti C zavzemale v endospermu, je bila podobna od 4. do 10. DPO v obeh genotipih, 12. in 16. DPO pa smo opazili manjši prispevek prostornine celic *mnl* predvsem pri celicah z visokimi stopnjami endopoliploidnosti, 12 C in več (Slika 4.43).



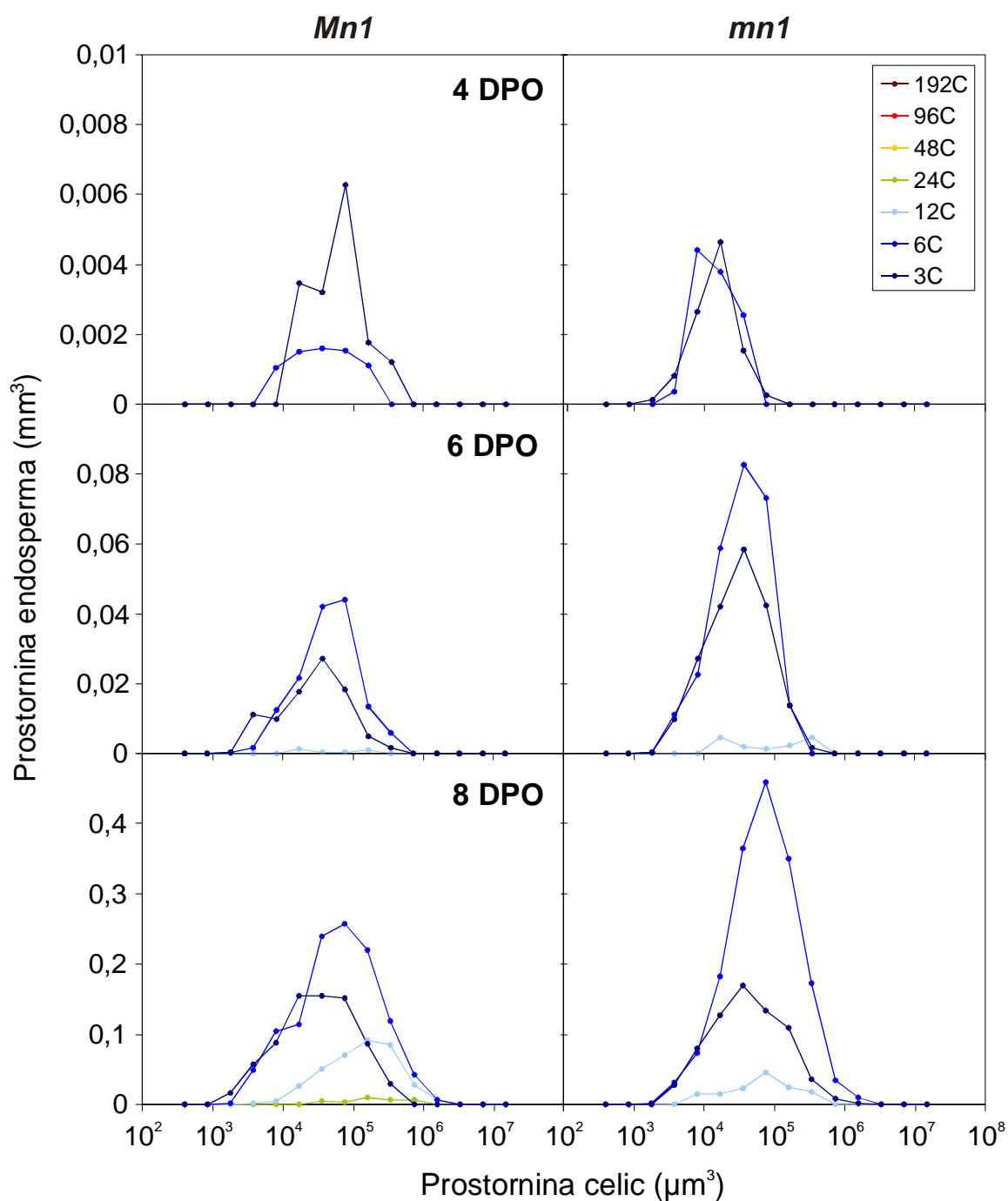
Slika 4.42. Število celic v endospermu glede na prostornino celic in stopnjo endopoliploidnosti.

(Slika se nadaljuje na naslednji strani.)



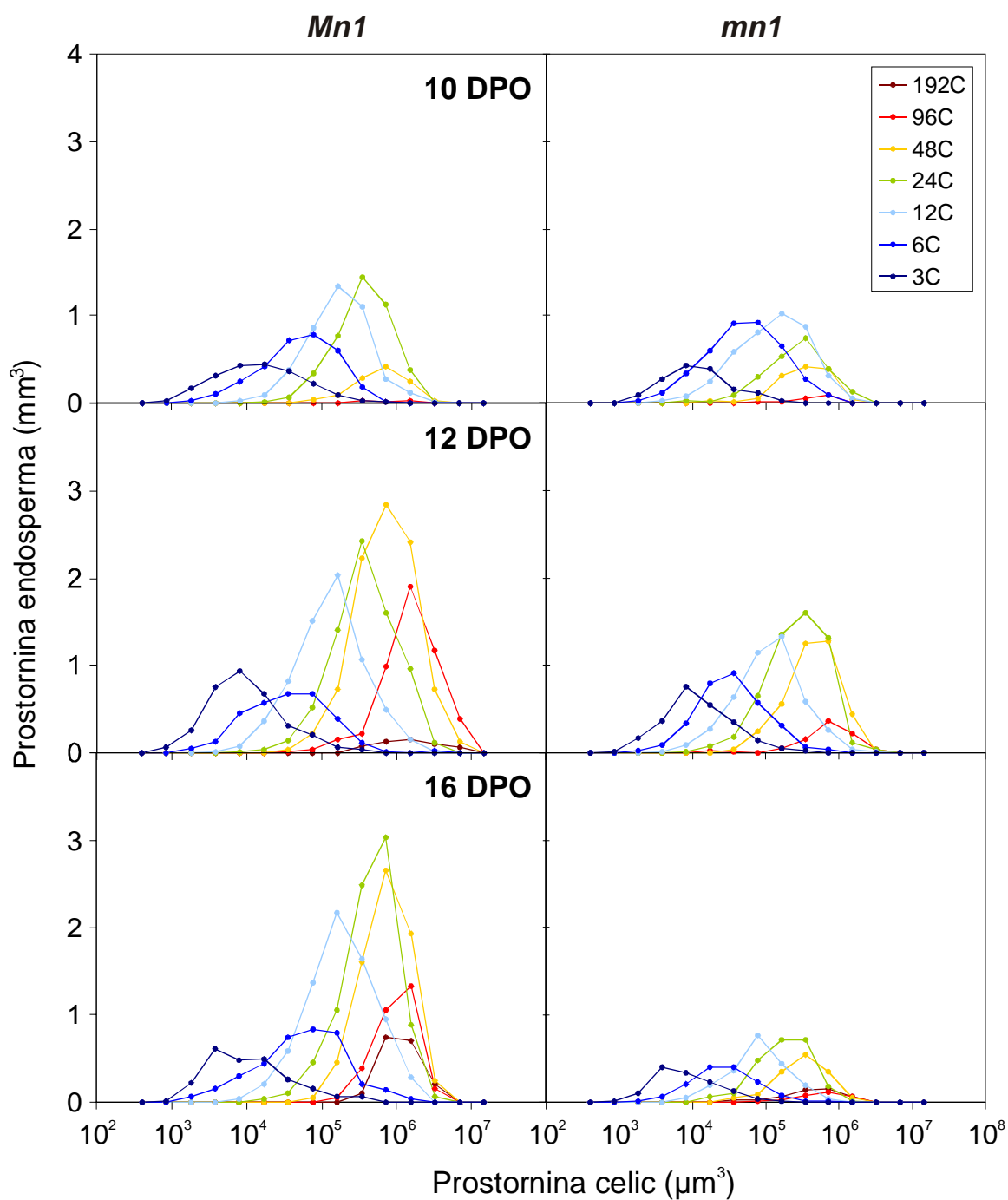
Slika 4.42. Število celic v endospermu glede na prostornino celic in stopnjo endopoliploidnosti.

(Nadaljevanje slike s prejšnje strani.) Pri 16. DPO so prikazani podatki za eno od dveh izmerjenih rezin pri obeh genotipih.



Slika 4.43. Prostornina endosperma, ki jo zavzemajo celice v razredih glede na prostornino celic in stopnjo endopoliploidnosti.

(Slika se nadaljuje na naslednji strani.)

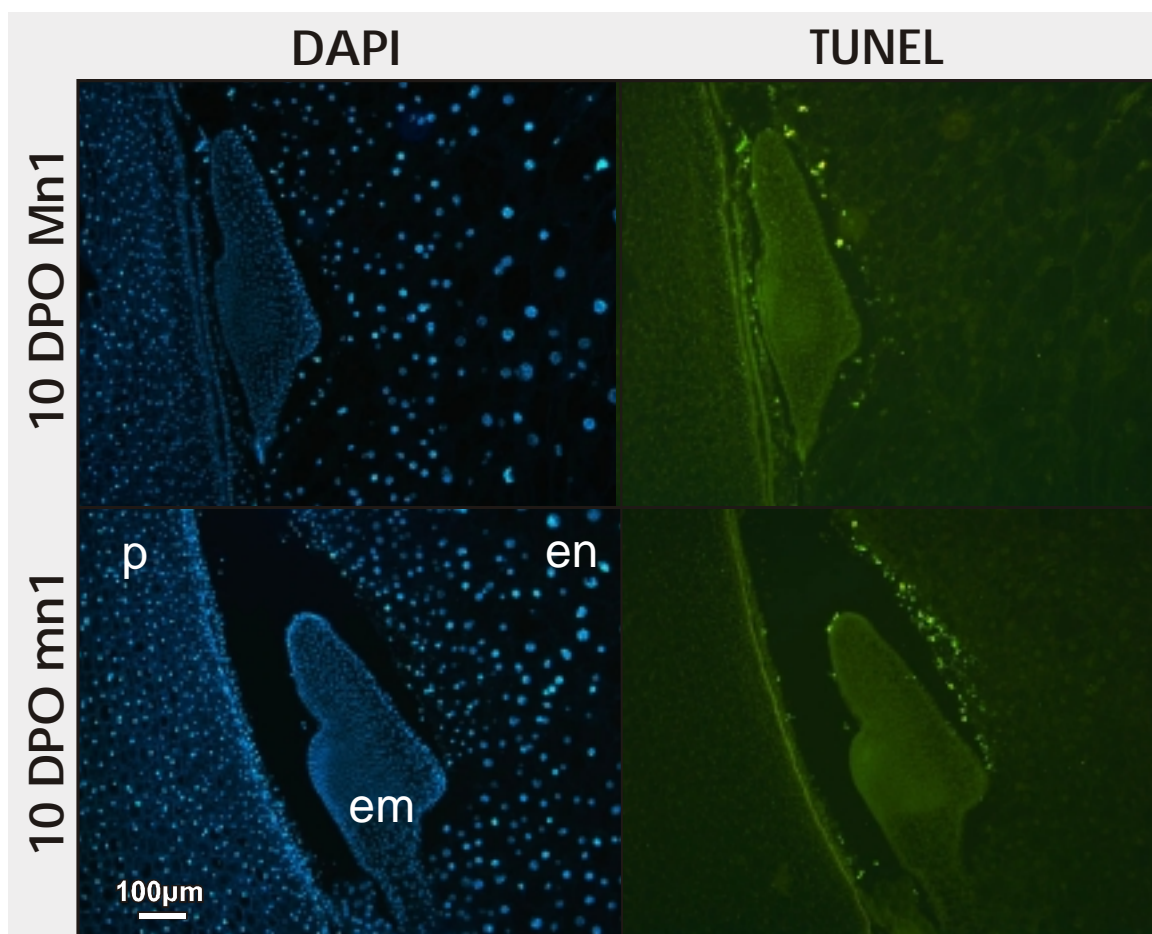


Slika 4.43. Prostornina endosperma, ki jo zavzemajo celice v razredih glede na prostornino celic in stopnjo endopoliploidnosti.

(Nadaljevanje slike s prejšnje strani.) Ploščina pod krivuljo porazdelitve pomeni prostornino, ki jo zavzemajo celice posameznega razreda vrednosti C v endospermu. Pri 16. DPO so prikazani podatki za eno od dveh izmerjenih rezin pri obeh genotipih.

4.1.3.2.4 Fragmentacija DNA v jedrih endosperma ob embriu

V zgodnjem razvoju endosperma (do 16. DPO) smo fragmentacijo DNA opazili v obeh genotipih le v jedrih endosperma, ki so bila v celicah ob embriu. Prikazana je slika vzdolžnih rezin skozi kariopsi divjega tipa *Mn1* in mutante *mn1* 10 DPO, pobarvanih z reakcijo TUNEL (Slika 4.44).



Slika 4.44. Fragmentacija DNA v jedrih celic endosperma ob embriu.

Vzdolžni rezini razvijajoče se kariopse divjega tipa *Mn1* in *mn1* mutante (*mn1*) 10 DPO. DAPI obarva vsa jedra, z reakcijo TUNEL pa močnejše svetijo jedra s fragmentirano DNA. Pomen oznak: *p* - perikarp, *em* - embrio, *en* - endosperm.

4.2 Vizualizacija celičnih procesov v koreninski čepici

Del sprejet v tisk v Canadian Journal of Botany

4.2.1 Kalitev in rast kalic

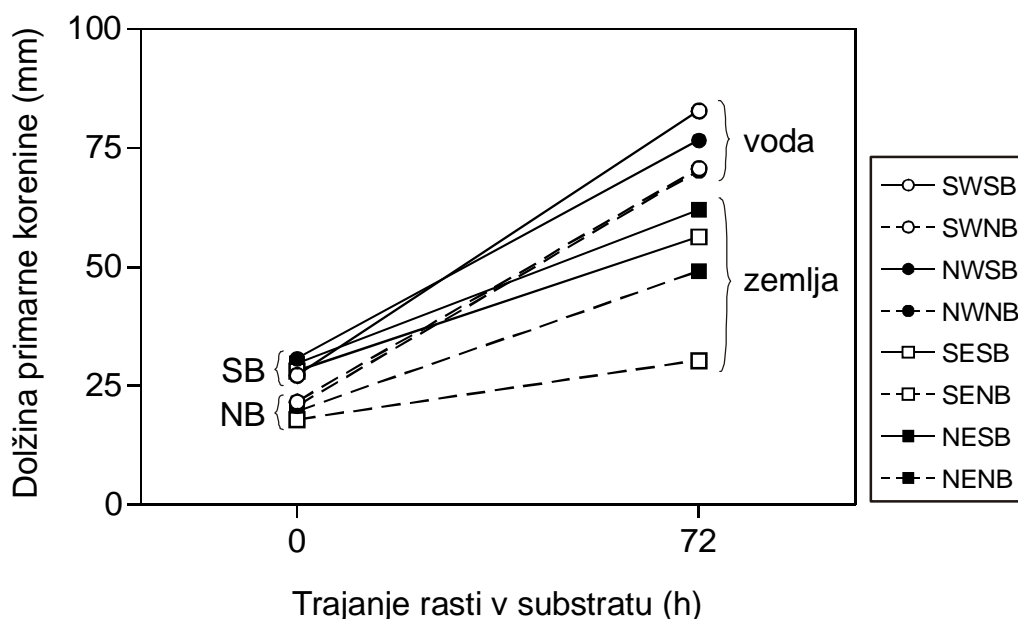
Semena koruze divjega tipa linije W22 so kalila 100-odstotno, vendar so se po kalitvi pokazale razlike v rasti med poprej steriliziranimi in nesteriliziranimi kariopsami. Primarne korenine kalic smo izmerili tri dni po kalitvi, ko so bile dolge 20 do 30 mm. Povprečna dolžina primarnih korenin iz nesteriliziranih zrn je bila 20 ± 7 mm, iz steriliziranih zrn pa 29 ± 7 mm (povprečje \pm standardna deviacija). Razlika v dolžinah primarnih korenin je bila statistično pomembna (*t* test, GraphPad Prism 3.02). Kalice smo prenesli v različne substrate, kjer so rastle še 72 ur, nato smo spet izmerili dolžino primarnih korenin (Slika 4.45). Prirastek in hitrost rasti korenin v posameznih substratih sta prikazana v Preglednici 4.2. Vpliv substrata na rast primarnih korenin smo testirali posebej za sterilizirana in nesterilizirana zrna (test ANOVA in post-test po Tukeyu, GraphPad Prism 3.02). Pri kalicah, vzgojenih iz steriliziranih zrn, ni bilo razlik v dolžini primarne korenine med kalicami vzgojenimi v sterilizirani in nesterilizirani prsti, enako je veljalo za kalice vzgojene v sterilizirani in nesterilizirani vodi. Statistično značilne razlike v dolžini primarne korenine smo opazili med kalicami vzgojenimi v vodi in prsti, ne glede na sterilizacijo substrata. Pri kalicah, vzgojenih iz nesteriliziranih zrn, pa so po dolžini primarne korenine statistično odstopale le kalice vzgojene v nesterilizirani prsti.

Preglednica 4.2. Dolžina in prirastek primarnih korenin po gojenju v različnih substratih.

| | <i>prst</i> | | | | <i>voda</i> | | | |
|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | <i>nesterilizirana</i> | | <i>sterilizirana</i> | | <i>nesterilizirana</i> | | <i>sterilizirana</i> | |
| | <i>NENB^b</i> | <i>NESB^b</i> | <i>SENB^b</i> | <i>SESB^b</i> | <i>NWNB^b</i> | <i>NWSB^b</i> | <i>SWNB^b</i> | <i>SWSB^b</i> |
| <i>začetek - 0h (mm)^a</i> | 20 ± 8 | 30 ± 8 | 18 ± 5 | 28 ± 9 | 21 ± 7 | 31 ± 6 | 22 ± 8 | 27 ± 6 |
| <i>konec - 72h (mm)^a</i> | 50 ± 16 | 62 ± 6 | 30 ± 12 | 56 ± 9 | 70 ± 21 | 77 ± 13 | 71 ± 30 | 83 ± 18 |
| <i>prirastek (mm)</i> | 30 | 32 | 12 | 28 | 49 | 46 | 49 | 56 |
| <i>hitrost rasti (mm h⁻¹)</i> | 0,41 | 0,45 | 0,17 | 0,39 | 0,69 | 0,64 | 0,68 | 0,77 |

^a Povprečna dolžina primarne korenine ± SD; porazdelitev dolžin za vse skupine je podobna normalni (Kolmogorov-Smirnov test za odklon opazovane porazdelitve od Gaussove, N=11 (NENB, SENB, SESB, SWNB) ali N=12 (NESB, NWNB, NWSB, SWSB)).

^b Oznake substratov, v katerih so rastle kalice in oznake kalic: NE – nesterilizirana prst, NW – nesterilizirana voda, SE – sterilizirana prst, SW – sterilizirana voda; SB – kalice, vzgojene iz steriliziranih zrn, NB – kalice, vzgojene iz nesteriliziranih zrn



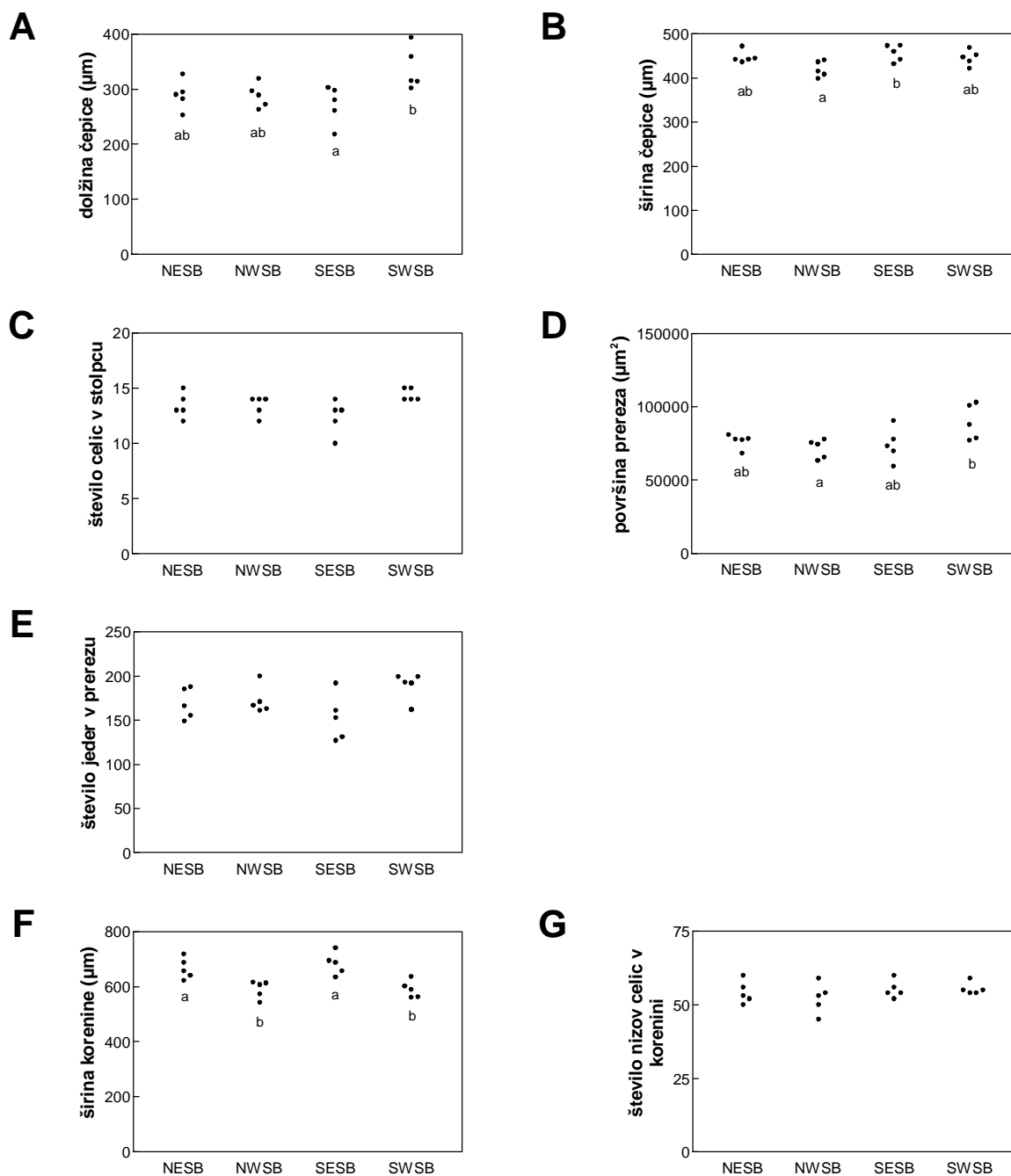
Slika 4.45. Dolžina primarne korenine kalic koruze.

Prikazano je povprečje dolžin primarnih korenin pred prenosom v ustrezen substrat in po 72 urah rasti v tem substratu. Oznake substratov, v katerih so rastle kalice: NE – nesterilizirana prst, NW – nesterilizirana voda, SE – sterilizirana prst, SW – sterilizirana voda; SB – kalice, vzgojene iz steriliziranih zrn, NB – kalice, vzgojene iz nesteriliziranih zrn

4.2.1.1 Morfološki parametri koreninskih vršičkov

Morfološke parametre koreninskih vršičkov smo izmerili v kalicah, ki so rastle v različnih substratih (nesterilizirana prst/voda, sterilizirana prst/voda).

Med koreninskimi vršički korenin kalic, gojenih v različnih substratih ni bistvenih razlik glede skoraj vseh merjenih parametrov; razlika med povprečji različnih skupin je pod mejo statistične pomembnosti (Slika 4.46 C, E in G) ali tik nad njo (Slika 4.46 A, B, in D). Zaradi malo podatkov (5) v vsaki skupini test analize variance nima velike moči. Le pri širini telesa korenine smo opazili pomembne razlike (Slika 4.46 F). Statistično značilna razlika je bila opažena med koreninami, ki so rastle v prsti, in koreninami, ki so rastle v vodi, sterilizacija gojišča pa ni vplivala. Korenine, ki so rastle v prsti, so bile širše kot korenine, ki so rastle v vodi, imele pa so enako število nizov celic v prečnem preseku (Slika 4.46 F in G).

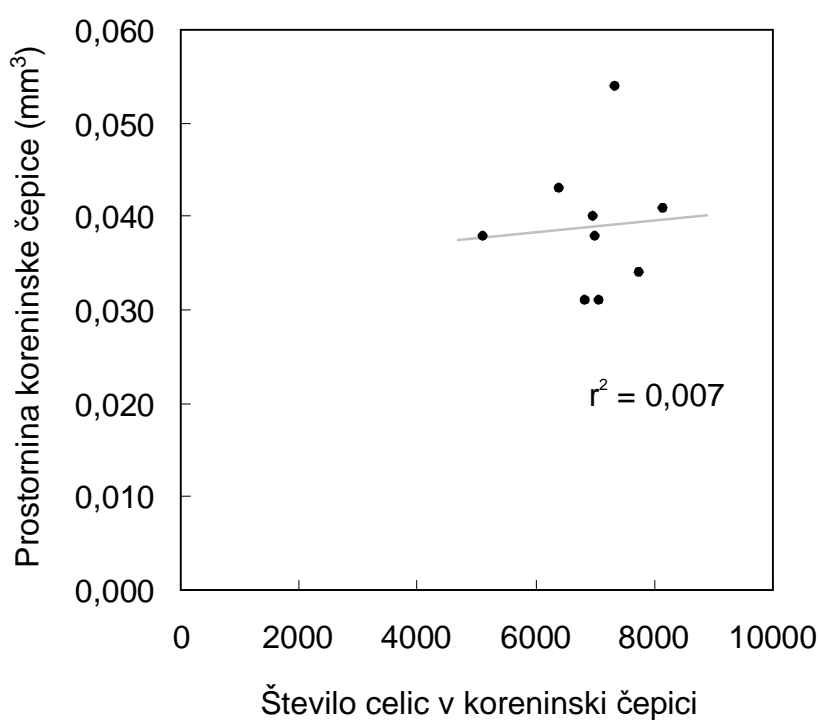


Slika 4.46. Morfološki parametri, izmerjeni v medianih longitudinalnih rezinah vršičkov korenin, gojenih v različnih substratih.

Razlike v parametrih med koreninami iz različnih substratov so testirane z analizo variance (ANOVA). Oznake podobnosti (a, b) so prirajene na podlagi posttesta po Tukeyju (stat. značilnost: F ***; A, B, D *, C, E, G ni stat. značilnih razlik). Oznake substratov, v katerih so rastle kalice: NE – nesterilizirana prst, NW – nesterilizirana voda, SE – sterilizirana prst, SW – sterilizirana voda; SB – kalice, vzgojene iz steriliziranih zrn. N = 5 za vsak substrat.

4.2.2 Število celic v koreninski čepici in prostornina čepice

V posameznih koreninskih čepicah smo s 3-D modelom ocenili število vseh celic in prostornino čepic devetih korenin, ki so rastle v vodi (NWSB in SWSB). Povprečno je bilo v čepici 6950 ± 290 celic, povprečna prostornina čepice pa je bila $0,039 \pm 0,005 \text{ mm}^3$ (povprečje \pm standardna napaka, $N = 9$). Med številom celic v čepici in prostornino čepice nismo opazili povezave; koeficient r^2 v linearni regresiji je bil 0,007 (Slika 4.47).



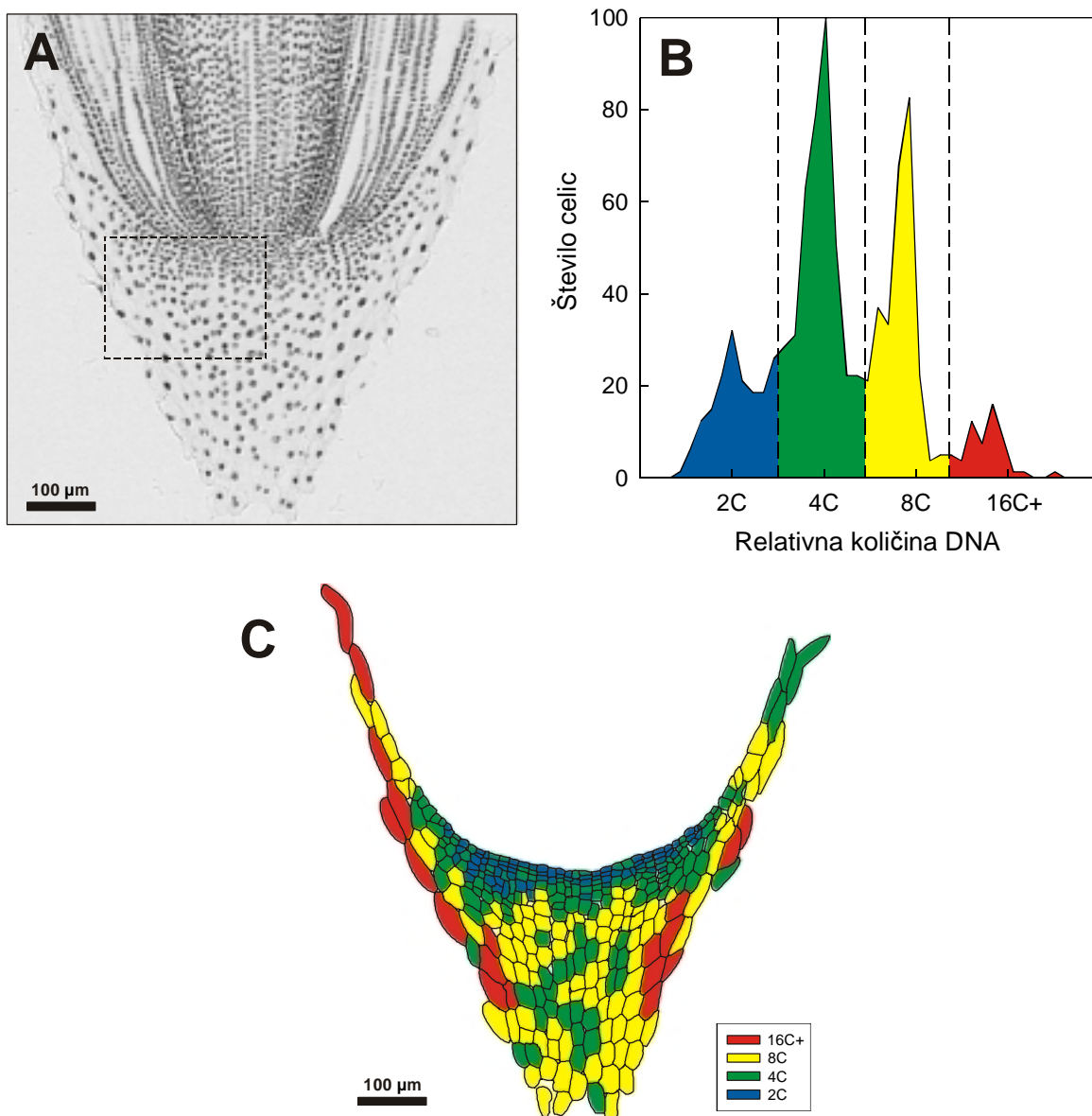
Slika 4.47. Razmerje med ocenjenim številom celic in prostornino koreninskih čepic.

r^2 je koeficient korelacije med številom celic in prostornino koreninskih čepic

4.2.3 Endopoliploidnost celic v koreninski čepici

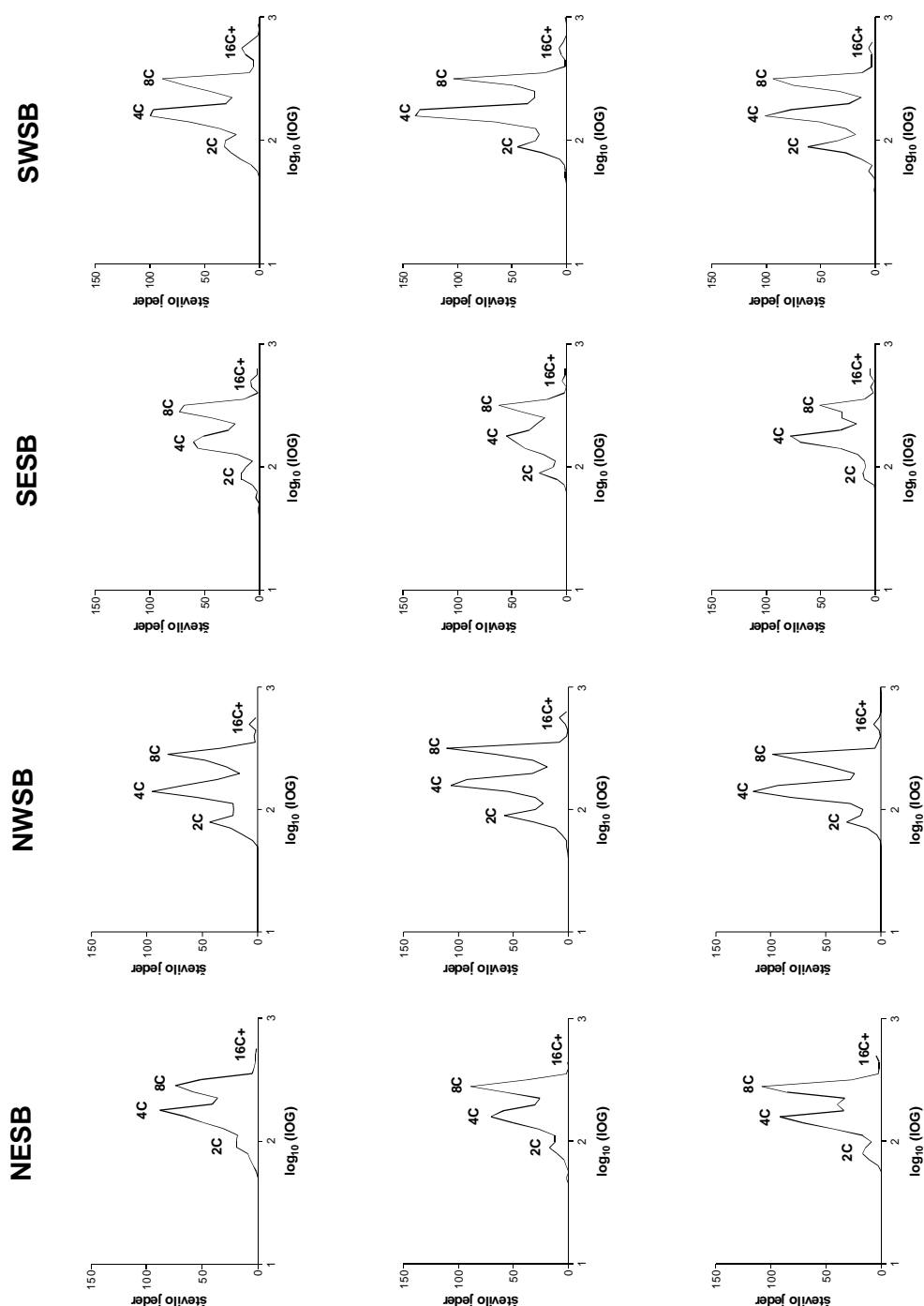
V vzdolžnih rezinah koreninskih vršičkov smo izmerili relativno količino DNA (IOG) v jedrih celic koreninske čepice. Slika 4.48 A prikazuje primer mediane rezine koreninske čepice z označeno velikostjo vidnega polja. Za vsako koreninsko čepico smo izmerili IOG v treh rezinah, mediani in obeh sosednjih. Tako smo dobili dovolj podatkov za izračun frekvenčnega poligona, na katerem so se pokazali vrhovi, v katerih so bile celice z različno količino DNA (Slika 4.48 B). Celice v območju meristema so po stopnji ploidnosti pripadale razredoma 2 C in 4 C. Osrednji del čepice so napolnjevale večinoma celice 4 C in 8 C, celice 16 C+ pa smo opazili na obrobju koreninske čepice (Slika 4.48 C).

V vseh izmerjenih koreninskih čepicah smo našli jedra s stopnjami endopoliploidnosti 2 C, 4 C, 8 C in 16 C (Slika 4.49). Jedra s stopnjo endopoliploidnosti 32 C smo opazili zelo redko. Da bi se prepričali o resničnosti podatkov (na primer, da podatek ni izmerjen na dveh prekrivajočih se jedrih), smo še enkrat pregledali preparate. Jedra na mestih podatkov 32 C so res izstopala po velikosti (Slika 4.50 A). Zaradi malo podatkov smo jedra 32 C združili z jedri 16 C v skupen razred 16C+.



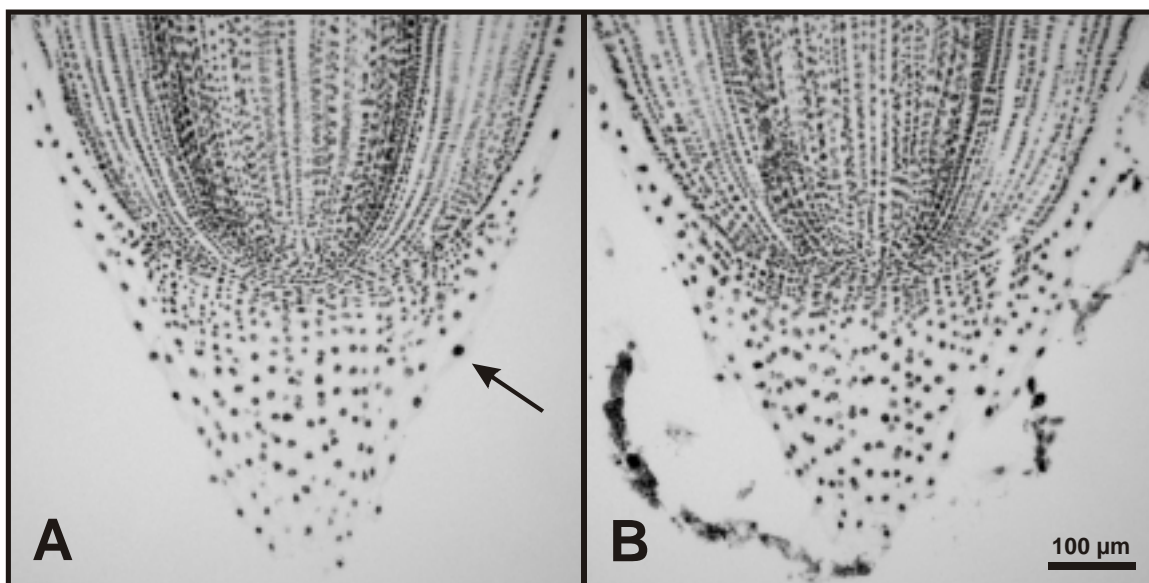
Slika 4.48. Stopnja endopoliploidnosti jeder v koreninski čepici.

(A) Siva slika ene od medianih longitudinalnih rezin, uporabljenih za merjenje IOG. Slika je bila posneta z objektivom 10×; IOG jeder je bila merjena z objektivom 40×, velikost vidnega polja je označena s črkanim pravokotnikom. (B) Frekvenčni poligon relativne količine DNA v jedrih, izražene v enotah vrednosti C. Navpične prekinjene črte označujejo razdelitev celic na razrede vrednosti C (2 C, 4 C, 8 C in 16 C+). (C) Stopnja endopoliploidnosti jeder v posameznih celicah v rezini na sliki A.



Slika 4.49. Relativna količina jedrne DNA v celicah čepic korenin, gojenih v različnih substratih.

Prikazana je frekvenčna porazdelitev logaritmirane IOG jader. Vrednost C v oznakah nad vrhovi ustreza količini DNA v nepodvojenem haploidnem genomu. Za vsakega od štirih substratov so prikazane porazdelitve log₁₀(IOG) v treh koreninskih čepicah; v vsaki čepici je bila IOG izmerjena v treh zaporednih longitudinalnih rezinah (mediana in najbližji sosedi). Oznake substratov, v katerih so rastle kalice: NE – nesterilizirana prst, NW – nesterilizirana voda, SE – sterilizirana prst, SW – sterilizirana voda; SB – kalice, vzgojene iz steriliziranih zrn.



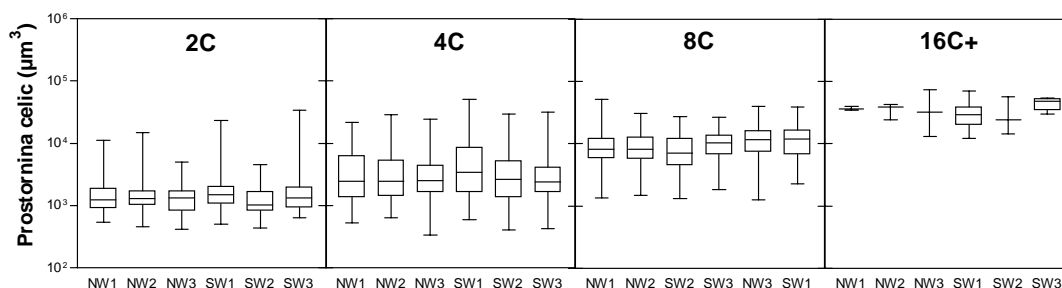
Slika 4.50. Mediani longitudinalni rezini čepic korenin, gojenih v vodi (A) in v prsti (B).

Puščica v sliki A kaže na položaj jedra 32 C. Preparata sta barvana z reakcijo po Feulgenu.

Ker so se jedra iz čepic korenin, gojenih v vodi (Slika 4.49, NWSB in SWSB), jasneje ločila na posamezne vrhove po $\log_{10}(\text{IOG})$ vrednosti, pa tudi podatki so bili popolnejši zaradi manjšega prekrivanja jeder, smo le-teh šest čepic uporabili v nadaljnjih meritvah velikosti celic. Velikost celic smo izmerili z obrisovanjem celičnih sten in nato podatke za velikost povezali s podatki za stopnjo ploidnosti celic. Nato smo podatke o prostornini in položaju celic uporabili za oceno 3-D porazdelitve celic in iz teh izračunali povprečno prostornino celic v posameznih razredih vrednosti C. Prostornine celic se znotraj istega razreda vrednosti C niso bistveno razlikovale med proučevanimi koreninskimi čepicami (Slika 4.51). Enosmerna analiza variance logaritmiranih prostornin celic znotraj razredov vrednosti C je sicer pokazala statistično značilne razlike med povprečji v vseh razredih, razen v 16 C+, vendar je šlo le za manjše odstopanje enega (2 C: SW2 in 4 C: SW1) ali dveh preparatov (8 C: NW2 in SW2), kar je pokazal posttest po Tukeyju. Analiza variance med razredi vrednosti C je pokazala statistično značilno razliko med povprečji logaritmiranih prostornin celic, statistično značilen pa je tudi linearen trend večanja prostornin ($p < 0,001$, GraphPad Prism 3.02).

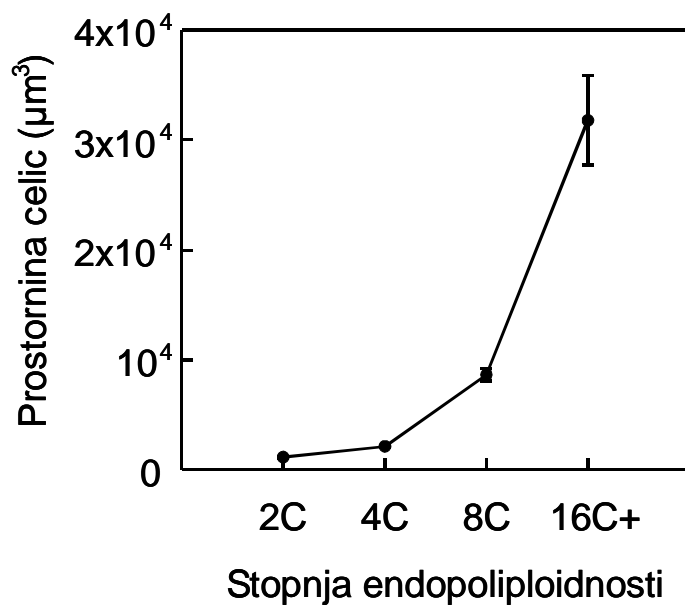
Povprečna prostornina celic se je večala s povečevanjem stopnje endopoliploidnosti (Slika 4.52). Prostornina celic 2 C je bila $1100 \pm 100 \mu\text{m}^3$, celic 4 C $2100 \pm 100 \mu\text{m}^3$, celic 8 C $8600 \pm 600 \mu\text{m}^3$ in celic 16 C+ $31800 \pm 4100 \mu\text{m}^3$ (povprečje \pm standardna napaka, N = 6).

Celice smo uredili tudi glede na to, kako se je povečevala njihova prostornina in proučili število celic, ki so pripadale posameznim razredom vrednosti C, in prostornino, ki so jo celice zavzemale v koreninski čepici (Slika 4.53). Celice z najmanjšo prostornino so večinoma pripadale razredu 2 C. Z večanjem prostornine pa se je povečevala zastopanost celic z relativno večjo vsebnostjo DNA v jedrih. Največje celice so imele v jedrih 16 C in več DNA (Slika 4.53 A). Čeprav je celic z visoko stopnjo endopoliploidnosti relativno malo, te veliko prispevajo k prostornini koreninske čepice (Slika 4.53 B). Celic 2 C in 4 C je $76 \% \pm 2 \%$ vseh celic v čepici (povprečje \pm standardna napaka, N = 6), vendar prispevajo le $44 \% \pm 4 \%$ prostornine koreninske čepice. Po drugi strani pa endoreduplicirane celice s stopnjo endopoliploidnosti 8 C in več predstavljajo le $24 \% \pm 2 \%$ vseh celic, vendar napolnjujejo $56 \% \pm 4 \%$ prostornine čepice.



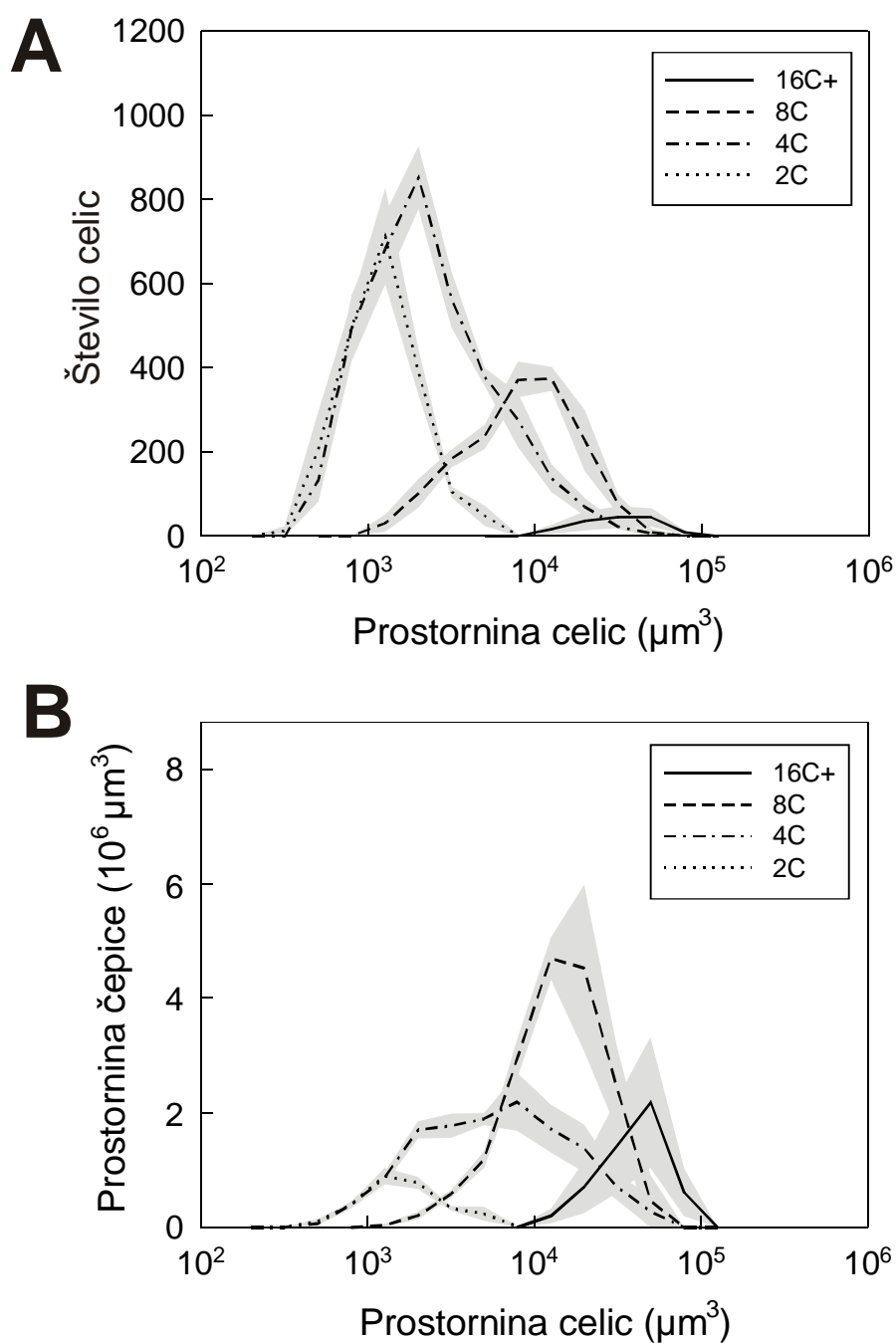
Slika 4.51. Prostornina celic različnih stopenj endopoliploidnosti v koreninskih čepicah.

Prikazana je mediana, minimum, 1. kvartil, 3. kvartil in maksimum prostornine celic, izmerjene v preparatih šestih koreninskih čepic (NW1-3 in SW1-3; NW – kalice so rastle v nesterilizirani vodi in SW – v sterilizirani vodi). Podatki so ocenjeni s 3-D modelom.



Slika 4.52. Povprečna prostornina celic glede na stopnjo endopoliploidnosti.

Prikazano je povprečje ± standardna napaka (N = 6) medianih prostornin celic v vsakem razredu vrednosti C v šestih koreninskih čepicah. Podatki so ocenjeni s 3-D modelom.

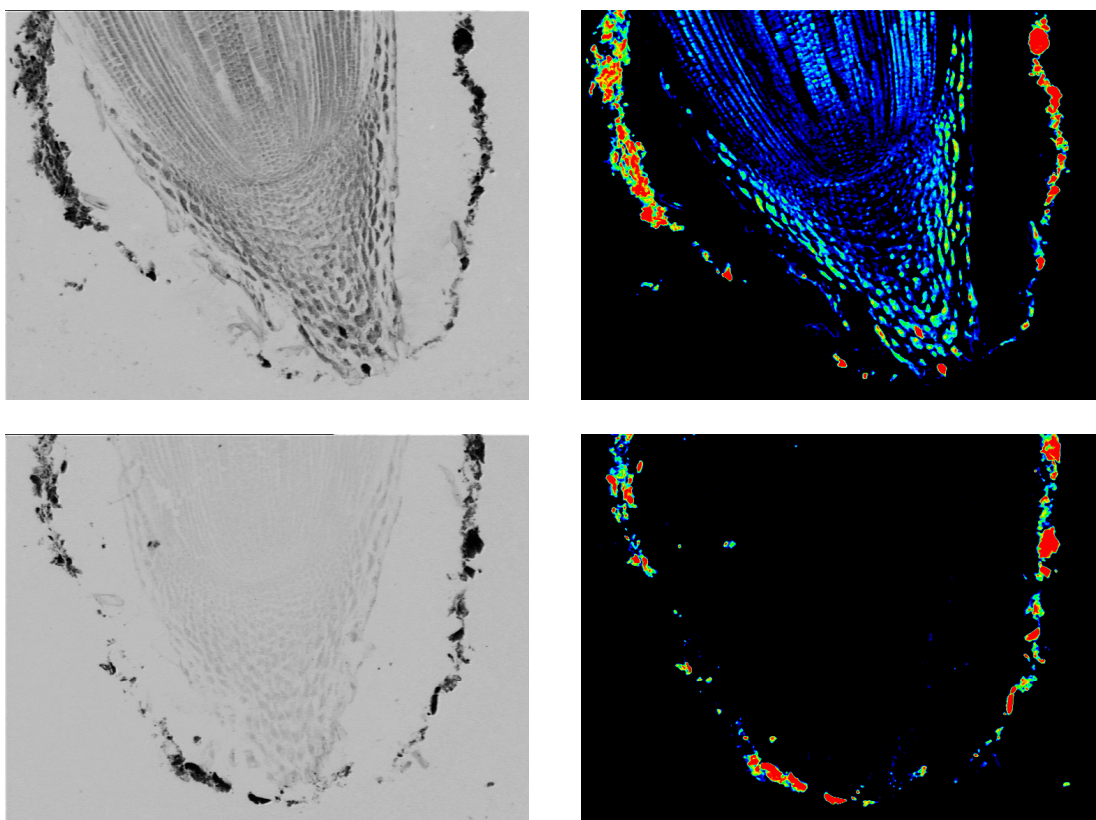


Slika 4.53. Frekvenčna porazdelitev celic v koreninski čepici glede na prostornino celic in stopnjo endopoliploidnosti.

Porazdelitev števila celic z različnimi stopnjami endopoliploidnosti (A). Prispevek celic z različnimi stopnjami endopoliploidnosti k celotni prostornini koreninske čepice (B). Prikazano je povprečje \pm standardna napaka (N = 6).

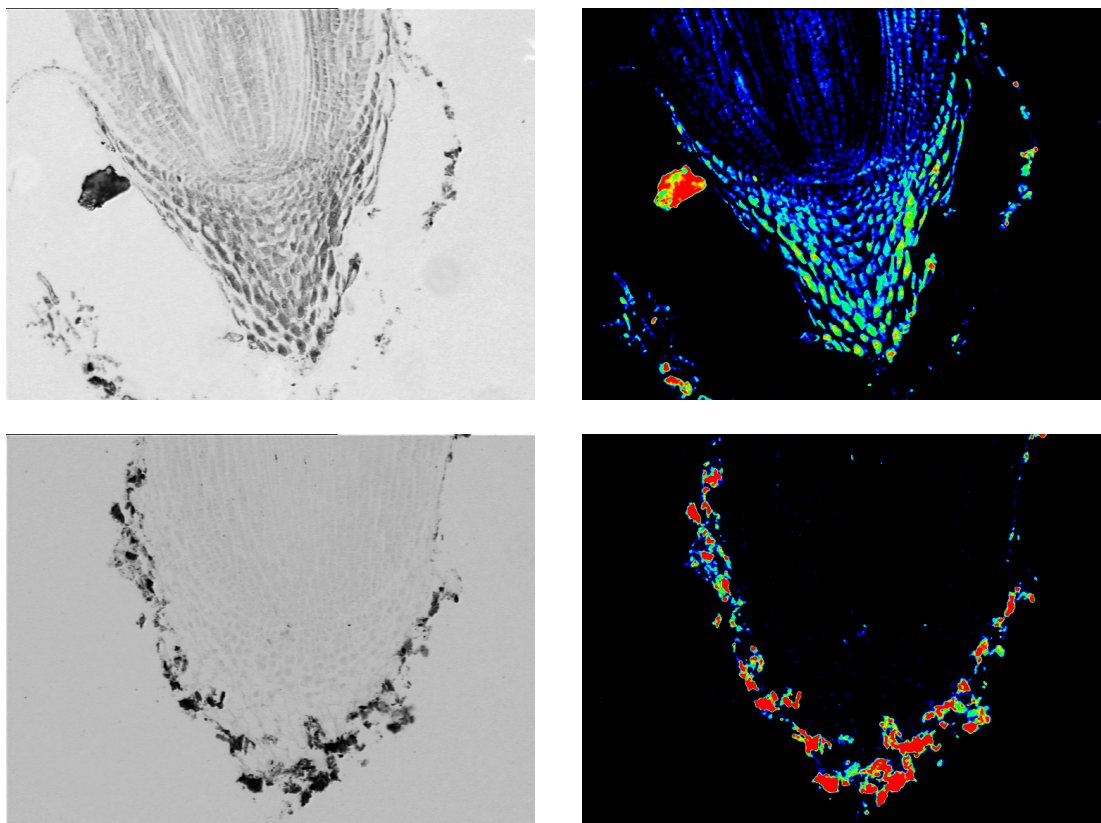
4.2.4 Imunolokalizacija izocima saharoza sintaze SUS1

V koreninski čepici smo opazili značilen vzorec porazdelitve encima saharoza sintaze. Imunolokalizacijski signal je bil najšibkejši v območju meristema in vedno močnejši v smeri proti zunanjim, starejšim plastem čepice. Med vzorci porazdelitve imunolokalizacijskega barvanja v vršičkih korenin gojenih v nesterilizirani prsti (Slika 4.54), sterilizirani prsti (Slika 4.55), nesterilizirani vodi (Slika 4.56) in sterilizirani vodi (Slika 4.57) ni bilo večjih razlik. V paru so prikazane izvirne zajete sive slike in iste slike, prikazane v psevdobarvah. Rezine koreninskih vršičkov, gojenih v prsti, obkrožajo delci prsti, ki jih s previdnim spiranjem ni bilo mogoče odstraniti.



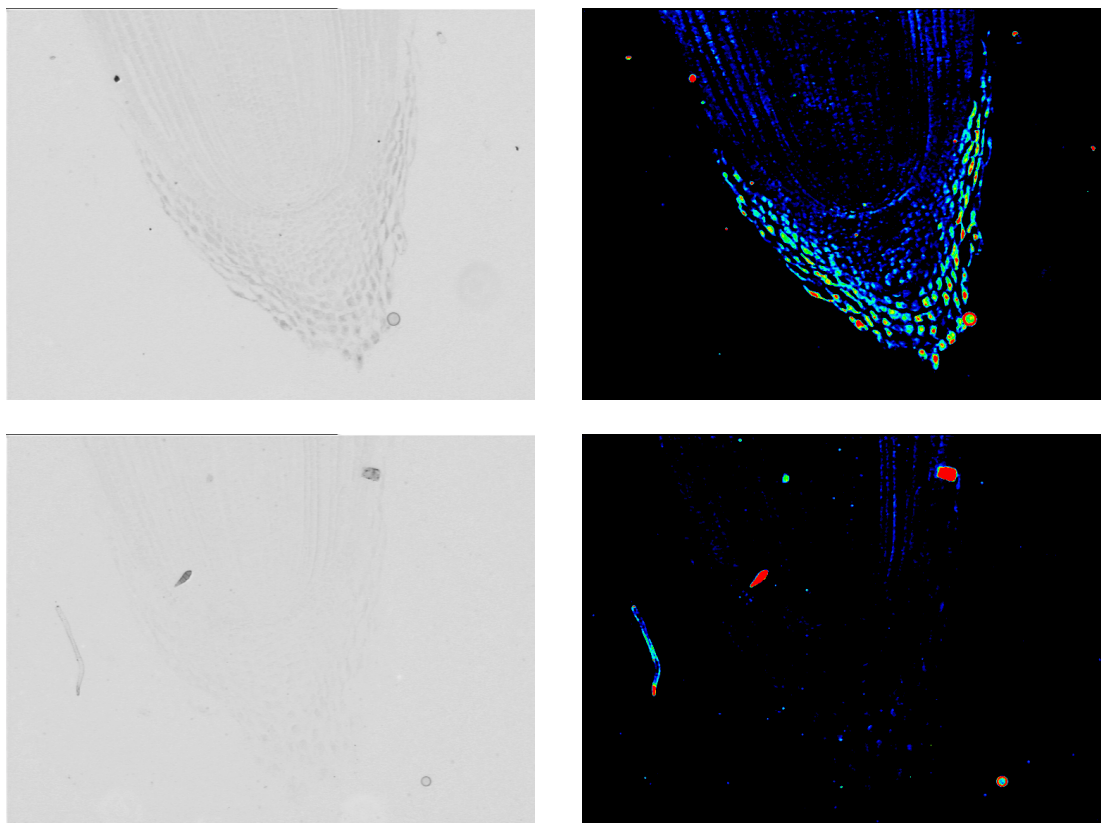
Slika 4.54. Imunolokalizacija izocima saharoza sintaze SUS1 v vršičkih primarnih korenin, gojenih v nesterilizirani prsti.

Imunolokalizacija, izvedena s sekundarnimi protitelesi, označenimi z zlatom, signal ojačan s srebrom. Zgoraj – rezina, inkubirana s primarnimi protitelesi proti SUS1 (1:500); spodaj – negativna kontrola z neimunim serumom. Levo – zajeta siva slika; desno – siva slika, pretvorjena v psevdoobarve.



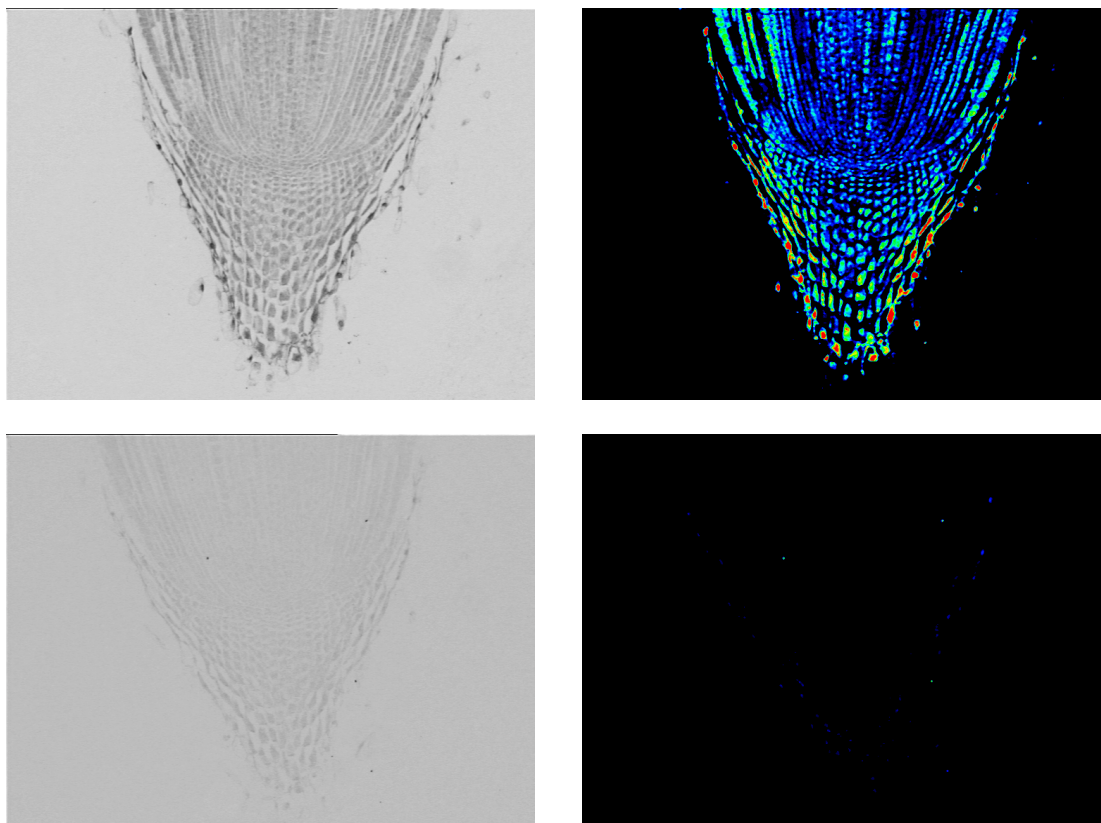
Slika 4.55. Imunolokalizacija izocima saharoza sintaze SUS1 v vršičkih primarnih korenin, gojenih v sterilizirani prsti.

Imunolokalizacija, izvedena s sekundarnimi protitelesi, označenimi z zlatom, signal ojačan s srebrom. Zgoraj – rezina, inkubirana s primarnimi protitelesi proti SUS1 (1:500); spodaj – negativna kontrola z neimunim serumom. Levo – zajeta siva slika; desno – siva slika, pretvorjena v psevdoobarve.



Slika 4.56. Imunolokalizacija izocima saharoza sintaze SUS1 v vršičkih primarnih korenin, gojenih v nesterilizirani vodi.

Imunolokalizacija, izvedena s sekundarnimi protitelesi, označenimi z zlatom, signal ojačan s srebrom. Zgoraj – rezina, inkubirana s primarnimi protitelesi proti SUS1 (1:500); spodaj – negativna kontrola z neimunim serumom. Levo – zajeta siva slika; desno – siva slika, pretvorjena v psevdoobarve.

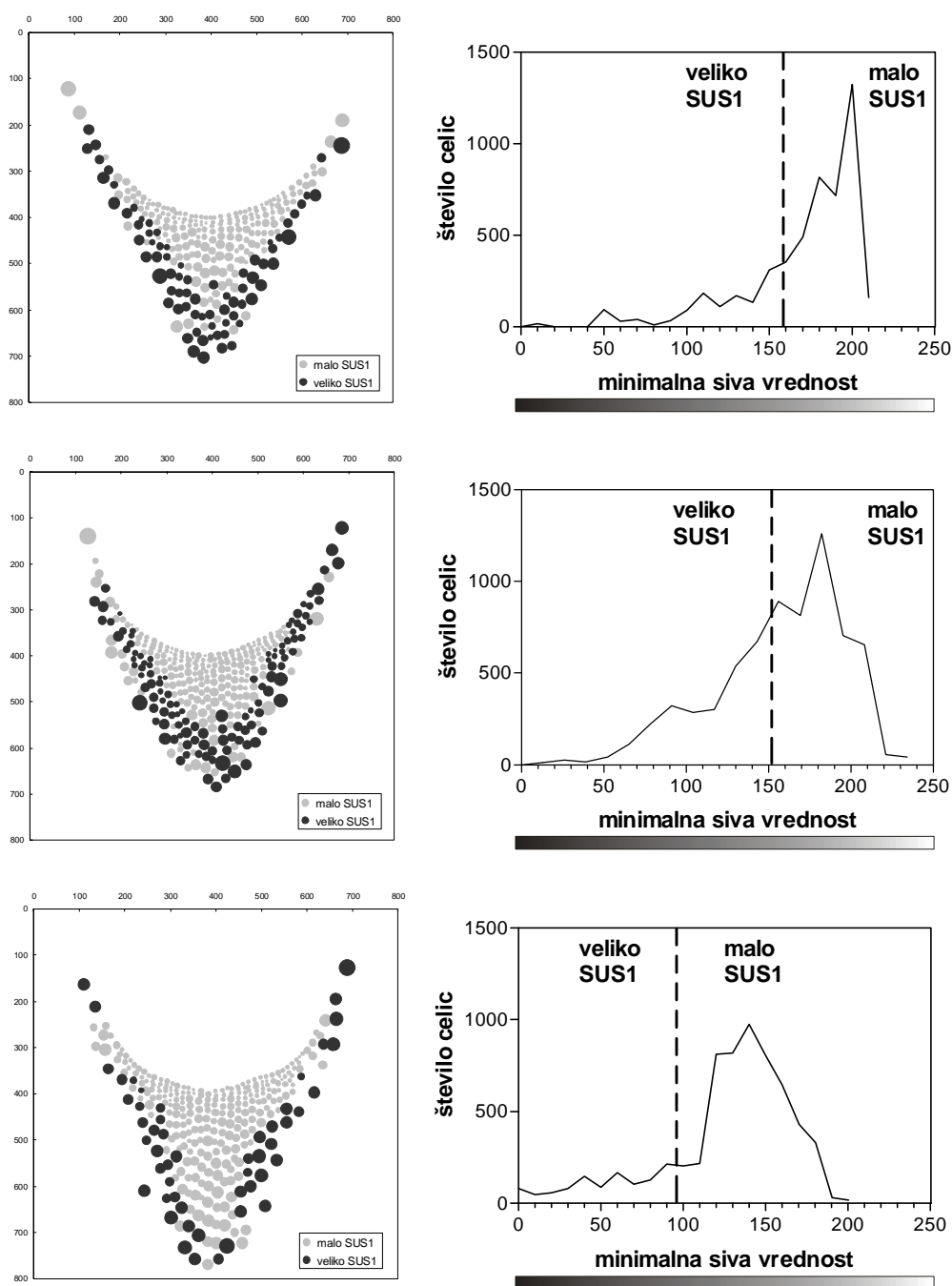


Slika 4.57. Imunolokalizacija izocima saharoza sintaze SUS1 v vršičkih primarnih korenin, gojenih v sterilizirani vodi.

Imunolokalizacija, izvedena s sekundarnimi protitelesi, označenimi z zlatom, signal ojačan s srebrom. Zgoraj – rezina, inkubirana s primarnimi protitelesi proti SUS1 (1:500); spodaj – negativna kontrola z neimunim serumom. Levo – zajeta siva slika; desno – siva slika, pretvorjena v psevdoobarve.

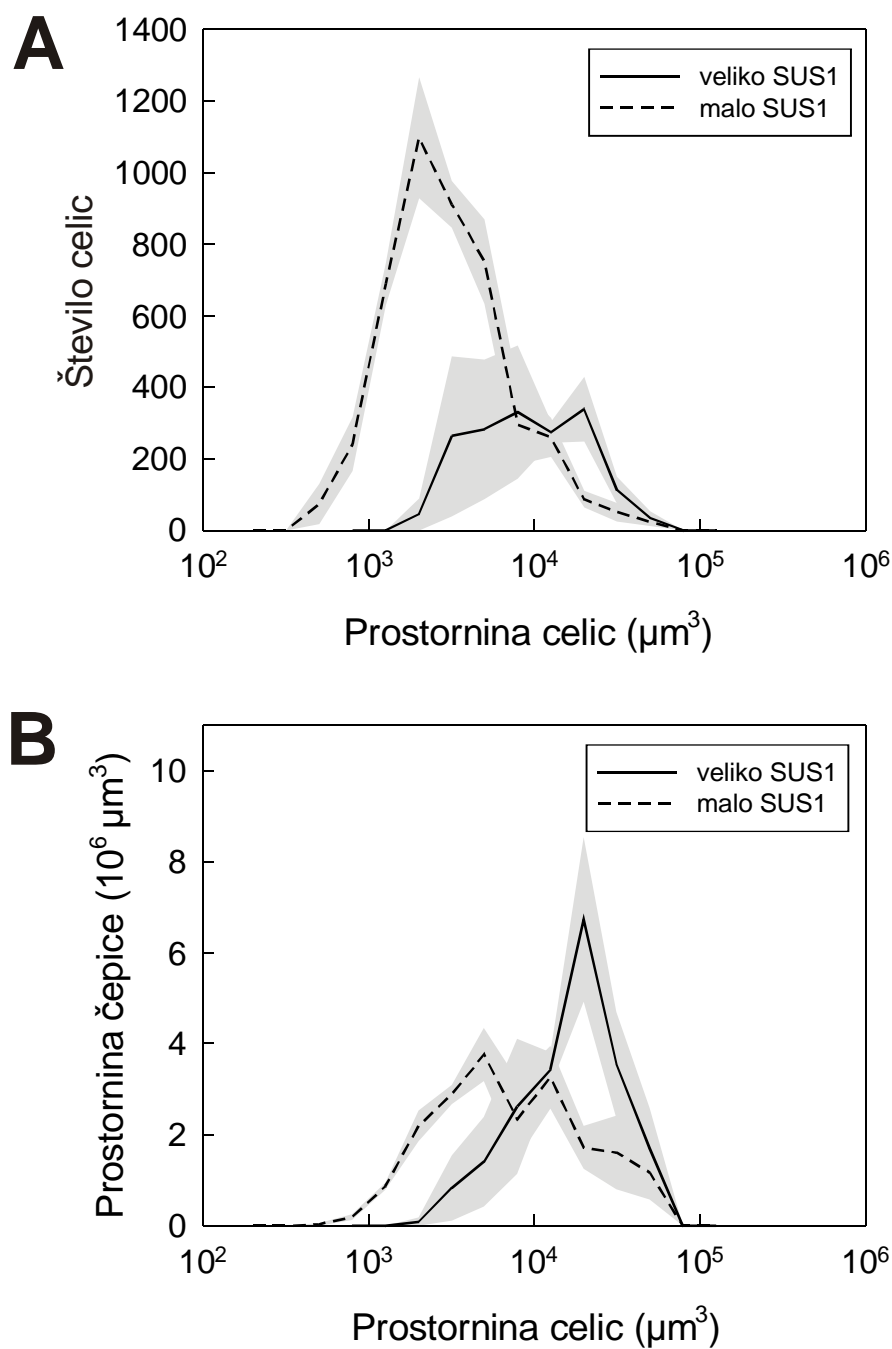
4.2.5 Kvantifikacija imunolokalizacijskega barvanja

Celice v koreninski čepici smo razdelili v dva razreda (»veliko SUS1« in »malo SUS1«) glede na jakost imunolokalizacijskega barvanja, ki smo jo ocenili iz sivih vrednosti v posameznih celicah. Za razdelitev smo uporabili merilo, po katerem naj bi celice vsakega razreda zavzemale polovico prostornine cele čepice. Na tak način smo se izognili težavam z interpretacijo sivih vrednosti, ki so v slikah vsakega preparata drugače razporejene zaradi različno močnega obarvanja preparata in zaradi razlik v zajemu slike (Slika 4.58, frekvenčni poligoni). Ker imunolokalizacijsko barvanje ni stehiometrično, ne moremo sklepati na pravo količino SUS1 proteina v celicah, lahko pa vidimo, v katerih celicah je količina SUS1 nad neko izbrano mejo, in predvsem, kje točno so te celice (Slika 4.58, levo). Svetle celice z majhno jakostjo barvanja za SUS1 so vrh v frekvenčnem poligonu sivih vrednosti, temne celice z visoko jakostjo barvanja za SUS1 pa so v dolgem levem repu vrha (Slika 4.58, desno). Povprečna prostornina »malo SUS1« celic je bila $2700 \pm 200 \mu\text{m}^3$, prostornina »veliko SUS1« celic pa je bila $12100 \pm 3800 \mu\text{m}^3$ (povprečje \pm standardna napaka, $N = 3$, izračunano iz medianih prostornin v posameznih čepicah). Celice z majhno prostornino so večinoma pripadale »malo SUS1« razredu, s povečevanjem prostornine celic pa se je povečevala zastopanost celic z močnim imunolokalizacijskim signalom za SUS1 (Slika 4.59 A). V razredu »veliko SUS1« je bilo $28 \% \pm 7 \%$ celic od vseh celic v čepici, napolnjevale pa so polovico prostornine čepice (Slika 4.59 B), v skladu z našo razdelitvijo celic v dva razreda.



Slika 4.58. Razporeditev celic, ki vsebujejo malo ali veliko SUS1 antigena, v koreninski čepici.

Prikazane so razporeditve celic obeh razredov imunolokalizacijskega barvanja v čepicah treh korenin, gojenih v destilirani vodi. Na grafih koreninske čepice (levo) je premer simbolov, ki označujejo položaje celic, v sorazmerju z ocenjenim premerom celic. Na frekvenčnih poligonih (desno) je prikazana meja razdelitve celic v razreda »malo SUS1« in »veliko SUS1« glede na minimalno sivo vrednost v celici. Meja je postavljena tako, da celice vsakega razreda zavzemajo polovico prostornine celotne čepice; na osi y je prikazano ocenjeno število celic v celotni čepici.

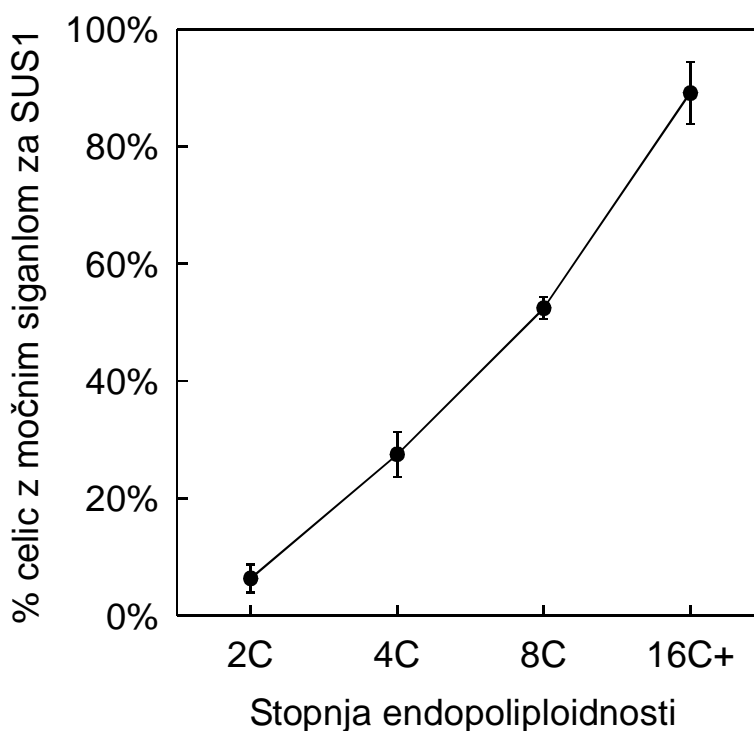


Slika 4.59. Frekvenčna porazdelitev celic v koreninski čepici glede na prostornino celic in jakost imunolokalizacijskega signala za SUS1.

Porazdelitev števila celic z močnim (veliko SUS1) ali šibkim (malo SUS1) signalom za SUS1 (A). Prispevek celic z močnim ali šibkim signalom za SUS1 k celotni prostornini koreninske čepice (B). Prikazano je povprečje \pm standardna napaka (N = 3).

4.2.6 Povezava imunolokalizacijskega signala za SUS1 s stopnjo endopoliploidnosti celic

Zastopanost celic z visoko jakostjo imunolokalizacijskega signala za SUS1 se je večala s povečevanjem prostornine celic podobno, kot se je večala zastopanost celic z vedno višjo stopnjo endopoliploidnosti (Slika 4.59 in Slika 4.53). Prav tako se je tudi prostorska razporeditev »veliko SUS1« celic (Slika 4.58 levo) prekrivala predvsem z razporeditvijo celic z visoko vsebnostjo DNA jedrih (Slika 4.48 C). Z iskanjem prostorsko najbližjih podatkov za jakost imunolokalizacijskega barvanja in relativno količino DNA v celicah v različnih rezinah smo ocenili, da bi imelo okrog 90 % 16 C+ celic tudi močan signal za SUS1 (»veliko SUS1«), v nasprotju z le 5 % 2 C celic (Slika 4.60).



Slika 4.60. Razmerje med stopnjo endopoliploidnosti in jakostjo imunolokalizacijskega signala za SUS1 v celicah koreninske čepice.

Število celic v celotni čepici je ocenjeno z modelom, ki so ga opisali Bengough in sod. (2001). Stopnja endopoliploidnosti in jakost imunolokalizacijskega signala za SUS1 sta bili izmerjeni v različnih rezinah in povezani na podlagi položaja celic v rezinah koreninske čepice. Povprečen delež celic z močnim signalom za SUS1 je bil izračunan za vsako stopnjo endopoliploidnosti v devetih čepicah; prikazano je povprečje \pm standardna napaka.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 Razprava

5.1.1 Metode

Že v preteklosti so natančno opazovali razvoj kariopse koruze (Kiesselbach, 1949) in razvoj mutante *mn1* (Lowe in Nelson, 1946), vendar so šele novejšje tehnologije omogočile res kvantitativne raziskave razvoja organov. Povezava svetlobne mikroskopije in računalniške analize slike v metodi slikovne citometrije je omogočila meritve različnih morfoloških parametrov in meritve različnih barvanj v preparatih. Natančno umerjen merilni sistem (mikroskop in kamera) lahko uporabljamo za kvantitativne denzitometrične metode. Takšna je na primer merjenje količine DNA v jedrih (Vilhar in sod., 2001), ki omogoča natančne meritve, ker lahko izbiramo jedra v posameznih fazah celičnega cikla, izognemo pa se tudi meritvam poškodovanih jeder.

V naši raziskavi smo uporabili metodo slikovne citometrije za merjenje relativne količine DNA v jedrih. V vsakem preparatu kariopse smo izmerili IOG (ki je sorazmerna s količino DNA), nato pa smo podatke preračunali v vrednosti C glede na notranji standard. Kot standardno vrednost smo vzeli prvi vrh razporeditve IOG v embriu in mu priredili vrednost 2 C. Embrio je zagotovo diploidno tkivo z neredupliciranim genomom, saj v njem potekajo intenzivne mitoze. V zgodnjih stopnjah razvoja kariopse je bil embrio sestavljen še iz maloštevilnih celic, zato smo kot standard 2 C vzeli prvi vrh razporeditve IOG v perikarpu, ki je prav tako diploidno tkivo. Položaj vrha 2 C v frekvenčni porazdelitvi IOG jeder v perikarpu se je ujema s položajem vrha 2 C v embriu starejših razvojnih stopenj. Jedra v endospermu so triploidna, zato so bili vrhovi vrednosti C 3, 6, 12 in tako naprej. Diploidno stanje embria in triploidno stanje endosperma je bilo potrjeno s štetjem kromosomov. V jedrih embria je 20 kromosomov, v jedrih endosperma pa 30 (Kiesselbach, 1949). Kowles in sod. (1990) so kot standard za določitev relativne količine DNA v jedrih endosperma prav tako uporabili jedra embria. Za določitev absolutne količine DNA so uporabili tudi piščančje eritrocite, vendar to ni bilo preveč natančno zaradi variabilnih podatkov o vsebnosti DNA v piščančjih eritrocitih. Premer jeder s stopnjo endopoliploidnosti 24 C in

več je bil enak debelini rezine ali celo večji (Slika 4.31), zato v rezinah nismo zajeli celotnih jeder. V jedrih je bilo zato vedno manj DNA glede na pričakovano vrednost. Kljub temu jih je bilo še vedno mogoče ločiti na posamezne vrhove v frekvenčnih porazdelitvah relativne vsebnosti DNA, le da so bili vrhovi pri višjih vrednostih C vedno bližje skupaj (Slika 4.29).

V preparatih smo izmerili tudi velikosti celic in nato s 3-D modelom ocenili število vseh celic v endospermu. Število vseh celic v endospermu koruze so ocenili že s pretočno citometrijo in hemocitometrom, vendar se z omenjenima metodama izgubi informacija o razporeditvi celic v tkivu, ker je treba tkivo razstaviti na posamezne celice. Velika prednost slikovne citometrije je prav v tem, da omogoča tudi zapisovanje prostorske informacije, ko celične parametre merimo na specifično pobarvanih histoloških rezinah skozi tkivo. S pretočno citometrijo so število celic v endospermu ocenili nenavadno nizko (Kowles in sod., 1990) v primerjavi z metodo štetja celic s hemocitometrom (Jones in sod., 1985) in našimi rezultati.

Ko izmerimo podatke na histološki rezini skozi tkivo, moramo za pregled nad stanjem v celotnem tkivu matematično oceniti število celic v treh dimenzijah. Zakaj je treba ovrednotiti podatke v treh dimenzijah? Samo iz preseka skozi tkivo ne moremo oceniti, kakšna so resnična razmerja med posameznimi skupinami celic v celotnem organu. Razlika je vidna ob primerjavi števila jeder posameznih vrednosti C, izmerjenih v endospermu v vzdolžni rezini (Slika 4.28), in ocenjenega števila vseh celic v endospermu (Slika 4.37). V prerezu je bilo podcenjeno število majhnih celic na robu endosperma. Tridimenzionalno strukturo tkiv je treba oceniti po stereoloških metodah, vendar ker je veliko rastlinskih tkiv radialno simetričnih, lahko tridimenzionalno strukturo ocenimo z vrtenjem podatkov okoli osi tkiva (Bengough in sod., 2001). Koreninska čepica je idealno radialno simetrična, zato smo njeno strukturo ocenili z vrtenjem celotnih podatkov okoli mediane osi vzdolžne rezine, kot to opisujejo Bengough in sod. (2001). Da bi lahko primerjali zgradbo endosperma divjega tipa in mutante *mn1*, smo izpeljali prilagojen matematični model. Ker celotno tkivo endosperma ni radialno simetrično, smo podatke o celicah v endospermu vrteli po posameznih vrsticah podatkov in nato sešteli posamezne krožne preseke. V modelu smo upoštevali tudi drugačno strukturo endosperma v predelu, kjer v njem ali ob njem raste embrio.

Slaba stran uporabljene metode slikovne citometrije je njena zamudnost. Za vsako kariopso je treba pregledati celotno vzdolžno rezino po zaporednih vidnih poljih (približno 320 vidnih polj za preparat *Mn1* 12 DPO) in označiti vsa jedra, ki jih je bilo v pregledanih preparatih od 5000 do 8000, nato pa še ročno obrisati stene celic v endospermu, ki jih je bilo v preparatih od 100 (*Mn1* 4 DPO) do 6000 (*Mn1* 12 DPO). Zato smo si najprej s pregledovanjem preparatov ustvarili vtis o poteku razvoja pri endospermu *Mn1* in *mn1* in nato izbrali po eno tipično kariopso za vsak genotip za vsako stopnjo razvoja od 4. do 12. DPO, 16. DPO pa dve. Nato smo na vzdolžnih rezinah ovrednotili velikost celic in zastopanost jeder posameznih razredov vrednosti C. Težava metode je v tem, da podatki za zaporedne razvojne stopnje niso bili izmerjeni na istih kariopsah, ker meritev vključuje njihovo žrtvovanje. Ker je bilo podatkov premalo za statistične analize, smo si pri ovrednotenju podatkov pomagali z dejstvom, da smo opazovali razvojni proces skozi čas. Podatki, za katere je veljalo časovno odvisno padanje, večanje ali nespremenjeno stanje, so najverjetneje predstavljali resnične procese v razvoju kariopse.

V koreninski čepici smo poleg kvantitativnega ovrednotenja količine DNA in velikosti celic tudi semikvantitativno ovrednotili količino imunolokalizacijskega barvanja saharoza sintaze. Ker reakcija imunolokalizacije ni stehiometrična, tako kot je bila uporabljena metoda barvanja DNA, smo celice v čepici na podlagi sivih vrednosti v sliki celic razdelili le na dva razreda: močno in šibko pobarvane celice. Kljub temu nam je že takšna groba razdelitev podatkov omogočila vpogled v odvisnost med nalaganjem saharoza sintaze, stopnjo endoploidnosti celic in velikostjo celic.

Še natančnejše analize razvoja organov pa bodo mogoče, ko bodo razvite tehnike, ki bi omogočale neinvazivno preiskovanje intaktnih organov na ravni posameznih celic. Tehnologije, ki bi to lahko omogočale, so na primer računalniško podprta tomografija (Stuppy in sod., 2003), nuklearna magnetna resonanca (Roscher in sod., 1998) in morda tudi snemanje bioluminiscence (Chaerle in Van Der Straeten, 2001).

5.1.2 Zakaj je endosperm *mn1* majhen?

Šestnajst dni po oprahitvi je bila prostornina endosperma divjega tipa 32 mm^3 , sestavljalo ga je 740.000 celic. Prostornina enako starega endosperma mutante *mn1* pa je bila približno 8 mm^3 , sestavljalo ga je 410.000 celic. Velika razlika v prostornini, v našem primeru je imel endosperm mutante *mn1* le 25 % prostornine endosperma divjega tipa, je že pred pol stoletja belila glave raziskovalcev. Mutanto *mn1* z zelo prizadetimi semeni sta že leta 1946 opisala Lowe in Nelson, a šele nova kvantitativna mikroskopska tehnika nam je omogočila pojasnitev nekaterih morfoloških posebnosti mutantine kariopse. Naši rezultati o zmanjšani prostornini endosperma *mn1* in zmanjšanem številu celic v primerjavi z *Mn1* 16 DPO nakazujejo, da sta v endospermu mutante prizadeta tako delitev celic kot tudi njihovo povečevanje.

Da bi ugotovili, kdaj in zakaj pride do prizadetega razvoja endosperma mutante *mn1*, smo raziskali zgodnji razvoj kariopse pri divjem tipu in mutanti *mn1*.

5.1.2.1 Razvoj materinskega tkiva

Pregled vzdolžnih rezin kariops je pokazal, da je materinsko tkivo perikarpa 4. DPO že skoraj v celoti oblikovano. V vseh razvojnih stopnjah v obeh genotipih je bilo število jeder približno enako (Slika 4.11). Da je bilo v perikarpu *Mn1* 16 DPO izmerjenih manj jeder (Slika 4.11) je verjetno posledica metodološke ovire. Tudi če bi bilo v obeh genotipih približno enako število jeder, bi v rezini kariopse *mn1* zajeli večji delež vseh jeder v perikarpu, ker je kariopsa divjega tipa večja kot kariopsa mutante. Ker se kariopsa v razvoju od 4. do 16. DPO povečuje (Slike 4.1 do 4.6), smo v vzdolžni rezini vedno zajeli manjši delež vseh jeder v perikarpu. V celotnem perikarpu se torej število jeder med razvojem kariopse verjetno povečuje, vendar z relativno majhnim prirastkom. S 40 % manj jeder od povprečja v preostalih kariopsah divjega tipa je izstopal perikarp *Mn1* 10 DPO, kar bi bilo lahko povezano z drugačnim genotipom endosperma. Kariopsa *Mn1* 10 DPO se je razlikovala od drugih kariops divjega tipa po tem, da je bila vzgojena na rastlini *Mn1*, oprášeni s pelodom *mn1* (genotip perikarpa je bil enak kot pri drugih: *Mn1Mn1*, genotip

endosperma pa je bil *Mn1Mn1mn1*), medtem ko so bile preostale kariopse s fenotipom divjega tipa homozigoti.

V perikarpu smo 6. DPO opazili pojav prvih endopoliploidnih jeder z vsebnostjo DNA 8 C. Jedra z vrednostjo 8 C so bila od pojava naprej, še zlasti pa 12 DPO in pozneje, v perikarpu ves čas prisotna (Sliki 4.5 in 4.6). Čas skokovitega povečanja števila jeder 8 C 12. DPO se sklada z intenzivnim povečanjem prostornine endosperma (Preglednica 4.1). Povečanje vsebnosti jedrne DNA zaradi endoreduplikacije spremlja ustavitev mitotske aktivnosti in povečanje celice (Joubès in Chevalier, 2000). Z endopoliploidizacijo celic perikarpa in s tem povezanim povečanjem celic bi se perikarp povečal brez dodatnih delitev celic in tako sledil povečevanju površine endosperma. Na ta način se povečujejo celice v povrhnjici listov v *Arabidopsis* (Melaragno in sod., 1993). Povečanje stopnje endopoliploidnosti celic v perikarpu je bilo enako v *Mn1* in v *mn1*, kar kaže, da za sprožitev endoreduplikacije ni potreben normalen razvoj filialnega tkiva. Posledično normalen razvoj perikarpa vodi do nastanka »prevelikega« prostora, znotraj katerega se razvija prizadeti endosperm mutante *mn1*.

Po metodi, ki jo opisujeta Barow in Meister (2003), smo za perikarp izračunali vrednost cikla 0,55. To je več od postavljene zgornje meje za nepoliploidna tkiva 0,1. Na tej osnovi lahko perikarp koruze uvrstimo med endopoliploidna tkiva. Domnevamo, da je vrednost cikla 0,55 nekoliko previsoka, saj zaradi uporabljene metode na preparatih gotovo nismo izmerili vseh jeder, prekrivanje jeder pa je problematično predvsem pri majhnih jedrih. Posledično izračunano razmerje med posameznimi razredi vrednosti C ni povsem točno. V izvorni metodi je bila namesto slikovne citometrije uporabljena pretočna citometrija (Barow in Meister, 2003).

V nadaljevanju smo v obeh genotipih pregledali materinsko tkivo nucela, znotraj katerega se razvija filialna generacija. Nucel napolnjuje velik del prostornine kariopse do 8. DPO, čeprav se število opaženih jeder zmanjšuje že od 4. DPO. 12. DPO v območju nucela z našo tehniko nismo več zasledili jeder, smo pa ostanke brezjedrne nucelarne membrane lahko videli na mikroskopskih preparatih med endospermom in perikarpom (Slika 4.20). V nucelu smo opazili tudi nekaj endopoliploidnih jeder z vsebnostjo DNA 8 C, kar po izračunani vrednosti cikla (Barow in Meister, 2003) 0,8 tudi nucel uvršča med endopoliploidna tkiva. Razmerje vrhov, ki je v prid jedrom z večjo stopnjo

endopoliploidnosti v *Mn1* v primerjavi z *mn1* (Slika 4.8), kaže na intenzivnejšo endoreduplikacijo v *Mn1* v primerjavi z *mn1*. Vzrok temu je najverjetneje variacija med dvema populacijama rastlin znotraj linije W22. Endosperm med svojo rastjo izpodriva celice nucela. V njih se sproži programirana celična smrt. Ta je apoptotične narave, na kar kaže fragmentacija DNA v jedrih, ki smo jo zasledili z reakcijo TUNEL (Slika 4.10). Enak signal z reakcijo TUNEL v jedrih obeh genotipov kaže na enak proces umiranja celic nucela. Podobne avtolitične procese so opazili med embriogenezo v razvijajoči se kariopsi koruze tudi v drugih tkivih, ki ne prispevajo k odrasli rastlini koruze (Giuliani in sod., 2002).

5.1.2.2 Razvoj embria

Za rastlino najpomembnejši del kariopse je diploidni embrio, iz katerega se razvije hčerinska rastlina. Oplojena jajčna celica se začne deliti precej pozneje kot prvo jedro endosperma. Tudi mladi embrio se v zgodnjih fazah razvija precej počasneje kot endosperm. Ob prvi delitvi zigote, približno 40 ur po oploditvi, ima endosperm od 8 do 32 prostih jeder (Bommert in Werr, 2001). Prva delitev je orientirana pravokotno na os mikropila-halaza, tako da nastaneta majhna apikalna in velika bazalna celica (Bommert in Werr, 2001). Iz slednje se razvije suspensor, ki pozneje odmre v procesu programirane smrti (Giuliani in sod., 2002). Majhna apikalna celica se razvije v embrio. Okrog 4. DPO embrio nima več kot 12 celic (Bommert in Werr, 2001). Glede na število jeder v vzdolžni rezini, so celične delitve v embriu od začetka spremljanja 4 DPO do 16 DPO pogoste, tako da je rast eksponentna. Večanje števila jeder v vzdolžni rezini je do 12. DPO enako pri obeh genotipih, 16. DPO pa je v *mn1* bistveno manj jeder (Slika 4.25). Iz tega sklepamo, da je 16. DPO v embriu manj celic, zaradi česar je bil embrio *mn1* tudi veliko manjši od embria *Mn1* (Slika 4.6). Embrio je na tej stopnji prehransko že odvisen od endosperma (Kiesselbach, 1949) in ker je bil endosperm *mn1* zelo prizadet, je bila slabša tudi rast embria.

5.1.2.3 Razvoj endosperma

Del objavljen v Plant Physiology 129 (2002) 23-30. (Priloga A)

Ker v materinskem tkivu divjega tipa in mutante nismo zasledili razlik v procesih in ker embrio bistveno ne prispeva k velikosti kariopse, smo predpostavili, da je opažen majhen fenotip kariopse mutante izključno posledica metabolizma v samem endospermu. Razlike smo nato raziskali na celični ravni.

Prve tri jedrne delitve v triploidnem endospermu sledijo dokaj predvidljivim ravninam celičnih delitev, ki oblikujejo bolj ali manj organizirana delitvena območja. Sledijo hitre sinhronne delitve, ki vodijo do nastanka sincicijskega tkiva. Nato jedra potujejo na obrobje in se poravnajo vzdolž plazmaleme (Bommert in Werr, 2001). Celularizacija se začne s posebno obliko citokineze na stopnji do 1000 jeder in se nadaljuje centripetalno, dokler celotna endospermska votlina ne vsebuje jasno razločenih celic. Ponavadi je proces končan 4 DPO. Med celularizacijo se že oblikujejo trije glavni endospermski celični tipi: bazalne prenosne celice; območje, ki obdaja embrio; škrobni endosperm in alevronska plast (Bommert in Werr, 2001). Končani celularizaciji sledijo asinhronne mitotske delitve enojedrnih celic.

Štiri dni po opranitvi smo v endospermu divjega tipa izmerili okrog 700 celic, v endospermu mutante pa okrog 2000 celic (Preglednica 4.1). V času 6 DPO je bil endosperm *Mn1* dvakrat manjši od *mn1*, tako po številu celic kot tudi po prostornini endosperma, v času 8 do 10 DPO pa je bil endosperm obeh genotipov približno enake velikosti (Slika 4.33 B in D). Več celic v zgodnjih fazah razvoja endosperma mutante je lahko posledica hitrejšega prehoda iz sincicijske faze v celularizacijsko. Mogoče je, da se je glede na število celic 4 DPO celularizacijska faza v divjem tipu šele končala. Sočasno bi bila lahko v *mn1* celularizacija končana že prej in bi celice že prešle v prvi cikel mitotskih delitev. Iz dinamike rasti endosperma *Mn1* in *mn1* je razvidno, da je bil prirastek celic 6 DPO v *mn1* precej manjši kot v divjem tipu, kar je povzročilo izenačenje števila celic in prostornine 8 DPO. Ali je hitrejši zgodnji razvoj endosperma mutante vezan na konkretni natančno izmerjeni osebek ali pa se endosperm *mn1* v začetku vedno razvija hitreje, ni

jasno. Iz mikroskopskega pregleda več kariops pa lahko sklepamo, da je taka rast endosperma mutante običajna pri proučevani liniji rastlin.

Število celic endosperma se skoraj eksponentno veča od 4. do 10. DPO (Slika 4.33), vendar je bila rast najhitrejša od 4. do 6. DPO. Pričakovali bi, da je pogostost mitoz največja na začetku razvoja endosperma, vendar Kowles in Phillips (1985) poročata o vrhu mitotske aktivnosti šele 8 do 10 DPO. Deset dni po opraitvi se logaritemska krivulja števila celic ukrivlja navzdol. To pomeni upočasnjeno povečevanje števila celic pri obeh genotipih (Slika 4.33), čeprav je bil manjši prirastek števila celic v *mn1* bistveno bolj izražen in sočasen s pojavom majhnega fenotipa kariopse mutante *mn1* (Slika 4.4). Kowles in Phillips (1985) sta po desetem dnevu po opraitvi izmerila hitro zmanjšanje mitotskega indeksa. 14 DPO in pozneje sta v osrednjem delu endosperma izmerila le eno mitotsko jedro na 413 opazovanih.

Z našim 3-D modelom smo ocenili, da je 12 DPO v endospermu divjega tipa okrog 1.000.000 celic in v endospermu mutante okrog 700.000 celic. To število je približno podobno ugotovitvam Jonesa in sod. (1985), ki so pri tej starosti kariopse prav tako izmerili od 700.000 do 900.000 celic v križancu A619 x W64a. O precej manj celicah endosperma v enako starih kariopsah, le 200.000 po oceni s pretočno citometrijo, pa poročajo Kowles in sod. (1990).

V primerjavi z divjim tipom se po dokaj izenačeni rasti med 6. in 8. DPO, deset dni po opraitvi število celic primerjalno zmanjšuje v mutanti, ki ima 12. DPO le še 68 % celic *Mn1* in 16. DPO celo le 55 %. Še očitnejše je zmanjšanje prostornine endosperma mutante, ki se iz podobne prostornine okrog 10. DPO zmanjša na 57 % 12. DPO in 16. DPO zavzema le še 24 % prostornine divjega tipa (Preglednica 4.1). Navedeni rezultati kažejo, da k majhnosti endosperma prispeva tako manjša mitotska aktivnost kot tudi manjše celice.

Kljub zmanjšanju mitoz v osrednjem delu (Kowles in Phillips, 1985) so mitotsko aktivnost zasledili na obrobju endosperma do 20. DPO ali v nekaterih primerih še pozneje (Kowles in sod., 1990). Znatno število jeder z vsebnostjo DNA 3 C in 6 C na obrobju endosperma divjega tipa in mutante v času do 16 DPO (Slika 4.36) kaže, da se celice delijo tudi v tem primeru. Sočasno z zmanjševanjem mitoz se v posameznih jedrih celic osrednjega območja začne zelo povečevati količina DNA v procesu endoreduplikacije. Take celice se praviloma ne delijo več, temveč zelo zrastejo (Kondorosi in sod., 2000), s čimer se poveča

njihova prostornina (Slika 4.39). Spremembe v vsebnosti DNA so asinhrono, tako da je v jedrih sosednjih celic lahko zelo različna vsebnost DNA. Potek ciklov endoreduplikacije in sočasno povečevanje prostornine celic smo zasledili v obdobju 8 do 16 DPO (Slike 4.36, 4.32 in 4.39).

V času od 8 do 12 DPO je bilo v osrednjem območju velikosti celic približno enako število celic. Opazna pa je bila težnja, ki se je stopnjevala do 16. DPO, zmanjševanja števila celic v *mn1* v najmanjših in največjih razredih celic (Slika 4.35). Najmanjše celice so bile le na obrobju endosperma (Slika 4.32) in zmanjšanje njihovega števila v *mn1* je tako lahko posledica manj delitev v primerjavi z divjim tipom. Manj največjih celic v *mn1* pa nakazuje možnost, da je bilo v endospermu mutante prizadeto širjenje največjih celic. Ker so bile take velike celice predvsem v osrednjem endospermu, je bilo s prizadetim širjenjem celic v resnici prizadeto širjenje osrednjega dela endosperma. Čeprav v endospermih obeh genotipov večino prostornine zavzemajo velike celice (Slika 4.34), pa njihovo manjše število v osrednjem delu endosperma *mn1* povzroči ekstremno zmanjšano prostornino po dvanajstem dnevu po opraitvi (Preglednica 4.1). Ohranjene mitoze v perifernem delu endosperma (Slika 4.36, Kowles in Phillips, 1985) omogočajo širitev tkiva, ki je nujna zaradi velike širitve celic v osrednjem delu (Slika 4.32). Ker širjenje celic v endospermu *mn1* ni tako izrazito, tudi ni nujno povečevanje površine endosperma. Opaženo manjše število obrobni celic je morda neposredna posledica manjših celic v sredini. Morebitna posledica takih procesov je tudi različna oblika endosperma obeh genotipov. Sploščen apikalno-dorzalni del endosperma *mn1* kaže, da je periferna plast endosperma »pripravljena« na širjenje, ker pa ni povečevanja celic osrednjega dela endosperma, površina ni »napeta«.

Dejavnik, ki je povezan z velikostjo celic, je tudi količina DNA v jedrih (Kondorosi in sod. 2000). Zanimalo nas je, ali je ta v endospermu *mn1* ohranjena. Tako v endospermu divjega tipa kot v mutanti smo prvi cikel endoreduplikacije zasledili 6. DPO, 16 DPO pa je bilo v obeh genotipih zaključenih vsaj 6 ciklov endoreduplikacije (Slika 4.29), kar kaže, da proces endoreduplikacije v mutanti ni prizadet. Štirje do pet ciklov endoreduplikacije v endospermu je splošnih pri večini pregledanih linij koruze, čeprav posamezna jedra nekaterih genotipov lahko dosežejo tudi do osem ciklov (Kowles in Phillips, 1985). Kowles in sod. (1992) poročajo o pregledu 35 mutant koruze, ki so imele manj celic in

zmanjšano stopnjo endoreduplikacije, razen ene mutante, ki je imela manj celic, a ohranjeno endoreduplikacijo. Kaže, da je mutanta *mn1* primer podoben slednjemu. Iz tega lahko sklepamo, da ni splošnega pravila o neposredni povezanosti endoreduplikacije in mitoze v endospermu koruze, kot so iz pregleda mutant zaključili Kowles in sod. (1992).

V obeh genotipih je bilo zelo podobno število jeder posameznih stopenj endopoliploidnosti (Slika 4.28, izmerjeno v vzdolžnih rezinah). Tudi ko smo podatke s 3-D modelom ocenili v vsem endospermu, so se sicer spremenila razmerja med celicami različnih vrednosti C, vendar so bili deleži celic posameznih vrednosti C v vsem endospermu podobni v obeh genotipih (Slika 4.37). Od 10. DPO naprej je bilo največ celic v obeh genotipih v razredu celic 3 C. Število celic se je zmanjševalo s povečevanjem stopnje endopoliploidnosti. Največji del prostornine endosperma so v obeh genotipih zavzemale celice visokih vrednosti C, z vrhom pri enakih C vrednostih v obeh genotipih (Slika 4.38). Premer jeder se je večal s stopnjo endopoliploidnosti, med jedri *Mn1* in *mn1* pa ni bilo večjih razlik v velikosti (Slika 4.31). Število celic različnih stopenj endopoliploidnosti je bilo različno pri obeh genotipih, vendar je bila razlika sorazmerna z razliko v številu celic pri obeh genotipih (Slika 4.33 B). Razlika je najbolj izrazita 16. DPO, kjer je bila pri vsaki stopnji endopoliploidnosti v *mn1* le približno polovica celic v *Mn1* (Slika 4.41 A). V endospermu *mn1* je bilo v času od 8 do 16 DPO predvsem na obrobju manj celic 3 C kot v *Mn1*, kar je lahko znak za manj celičnih delitev (Slika 4.41 A). Več celic visokih stopenj endopoliploidnosti 10. DPO je verjetno posledica metodološke napake pri izbiri preparata/meritvi, saj je takšnih celic pri obeh naslednjih stopnjah (12 in 16 DPO) manj v *mn1* kot v *Mn1*.

Iz naših rezultatov lahko ugotovimo, da je korelacija med prostornino celic in stopnjo endopoliploidnosti celic (Slika 4.39 in Slika 4.42). Kowles in Phillips (1985) sta poročala tudi o statistično visoko značilni korelaciji med vsebnostjo DNA in prostornino jeder. S poznejšimi meritvami (Kowles in sod. 1990) so pozitivno korelacijo sicer potrdili, a kljub temu ugotovili, da ni tolikšna kot so poprej sklepali. Ne glede na to pa so še vedno opazili jasno težnjo, v kateri se med razvojem do 20. DPO večja delež večjih jeder. Čeprav je bila pozitivna povezava med prostornino celic in endopoliploidnostjo jasna tudi v celicah endosperma mutante *mn1*, pa so bile celice v vseh razredih vrednosti C v *mn1* praviloma manjše od celic v *Mn1* (Slika 4.40). Z napredovanjem endoreduplikacijskih ciklov se je

razlika še povečevala, kar kaže, da je bilo širjenje celic še posebno prizadeto pri višjih stopnjah endopoliploidnosti. 10. in 16. DPO je bila prostornina celic od 12 C do 192 C v *mn1* le 30 do 50 % prostornine celic v *Mn1*. Dvanajst dni po opraitvi smo prav tako opazili manjše celice, vendar v manjšem obsegu. Celice *mn1* od 24 C do 96 C so imele 70 % prostornine celic *Mn1* (Slika 4.41 C). Največji del endosperma so napolnjevale celice visokih vrednosti C (Slika 4.38 in Slika 4.43). Rezultati naše raziskave kažejo, da je prostornina, ki jo zavzemajo celice visokih vrednosti C v endospermu *mn1*, zelo zmanjšana v primerjavi z *Mn1* v času od 10 do 16 DPO zaradi skupnega učinka manjše prostornine celic in manjšega števila celic (Slika 4.38 in Slika 4.43, razmerje: Slika 4.41).

Sliki 4.42 in 4.43 prikazujeta razmerje med prostornino celic, stopnjo endopoliploidnosti in številom celic oziroma prostornino celic, ki jo zavzemajo v endospermu. Vzorec porazdelitev je podoben pri obeh genotipih, od 10. do 16. DPO pa lahko opazimo manj največjih celic (Slika 4.42, skrajni desni konec frekvenčnih porazdelitev je pri *mn1* potisnjen malce v levo). Čeprav je bilo malo celic visokih stopenj endopoliploidnosti, zavzemajo večji del prostornine v endospermu (Slika 4.43). Na primer v endospermu divjega tipa 12. in 16. DPO celice 3 C in 6 C predstavljajo 80 % vseh celic in zavzemajo le 20 % prostornine endosperma, celice s stopnjo endopoliploidnosti 24 C in več pa predstavljajo le 7 % vseh celic in zavzemajo kar 60 % prostornine endosperma.

Splošna razporeditev celic različnih velikosti (Slika 4.32) in različnih stopenj endopoliploidnosti (Slika 4.36) v endospermu je bila podobna v obeh genotipih. V času od 10 do 16 DPO so bile celice visokih vrednosti C v osrednjem delu endosperma, celice z nizkimi vrednostmi C pa so bile le v zunanjih plasteh endosperma. Ta opažanja so v skladu z opažanji drugih raziskovalcev, ki poročajo o večanju velikosti jeder in velikosti celic od alevronske plasti proti notranjosti endosperma (Tschermak-Woess in Enzenberg-Kunz, 1965; Kowles in Phillips, 1988; Larkins in sod., 2001). V času 4 do 8 DPO so bile celice različnih vrednosti C enakomerno razporejene v endospermu, celice v zunanji plasti pa so bile že v tem času opazno manjše od celic v notranjosti endosperma.

Obrobne celice na bazi endosperma so celice alevronske plasti spremenjene v bazalne prenosne celice z značilnimi labirintskimi stenami. V prenosne celice se preoblikujejo še dve do tri naslednje plasti endosperma. Območje označuje specifično izražanje genov, ki je sledljivo od 12. DPO naprej (Bommert in Werr, 2001). V obeh proučevanih genotipih v

bazalnem delu endosperma ni bilo celic s količino jedrne DNA 3 C (razen pri 16a DPO, vendar so v tem primeru celice v bazalnem delu propadale; njihova jedra so bila zelo skrčena). Odsotnost celic 3 C potrjuje ugotovitve, da se prenosne celice nehajo deliti že zelo kmalu (Kiesselbach, 1949). Jedra celic v bazalnem delu endosperma *mn1* pa so imela opazno nižje vrednosti C kot v *Mn1* (Slika 4.36). V razvijajočih se kličnih listih boba (*Vicia faba*) so ugotovili, da sladkorji neposredno vplivajo na oblikovanje prenosnih celic. Morfologija prenosnih celic v kličnih listih se je razvila le na gojišču, ki je vsebovalo glukozo in fruktozo, ne pa, če je bila v gojišču samo saharoza (Offler in sod., 1997). Spremenjeno stanje sladkorjev bi lahko vplivalo tudi na diferenciacijo celic v bazalnem delu endosperma. Ker je mutanta *mn1* označena z odsotnostjo encima invertaze celične stene v prenosnih celicah, v endospermu *mn1* ni visoke koncentracije glukoze in fruktoze, ki ju v divjem tipu proizvaja ta encim. Zaradi odsotnosti invertaze celične stene v bazalnih prenosnih celicah *mn1* pa je v endospermu več saharoze (Shannon, 1972; Miller in Chourey, 1992; Zhou 2000). Ali je spremenjeno stanje sladkorjev v endospermu mutante povezano z zmanjšano stopnjo endoreduplikacije celic v bazalnem delu endosperma, ni znano.

Celice endosperma v bližini embria oblikujejo jasno določeno celično območje endospermskega žepa, znotraj katerega se razvija embrio. Celice, ki na endospermu predstavljajo površino žepa, so majhne, imajo gosto citoplazmo in imajo povsem ločeno izražanje genov (Opsahl-Ferstad in sod. 1997). Take majhne celice smo zasledili v času od 4 do 8 DPO, v času od 10 do 16 DPO, predvsem 16. DPO pa so bile celice v območju žepa večje in so imele višje vrednosti C, kot so jih imele celice v zunanjih plasteh na dorzalni strani endosperma (Sliki 4.32 in 4.36). O nastanku žepa je malo znanega. Ni znano, ali je sposobnost oblikovanja žepa notranja lastnost endosperma ali pa je zanj potrebna povezava z embriem (Olsen in sod., 1999). Kakor koli, naši rezultati kažejo, da v celicah, ki sestavljajo žep, poteka fragmentacija DNA, kar smo 6. DPO opazili kot zeleno fluorescenco jeder, barvanih z reakcijo TUNEL (Slika 4.44). Od kod prihaja signal za začetek programirane smrti, ni jasno. Proces programirane celične smrti v območju endospermskega žepa je bil enak v divjem tipu in v mutanti. Podobno propadanje celic endosperma, ki mejijo na rastoči embrio, so 7. DPO z elektronsko mikroskopijo opazili tudi Schel in sod. (1984). Pri kariopsi divjega tipa 16 DPO je skupna prostornina

endosperma in embria skoraj enaka skupni prostornini 12 DPO (Preglednica 4.1). V času od 12 do 16 DPO se embrio poveča trikrat, rast endosperma pa je že skoraj ustavljena. Zaradi umiranja celic v žepu bi se dejanska prostornina endosperma v nadaljnjem razvoju lahko celo zmanjševala.

V procesu rasti endosperma mora biti povečevanje celic osrednjega dela endosperma usklajeno s povečevanjem površine endosperma, ki raste z antiklinimi delitvami celic v najbolj zunanjih plasteh endosperma (Kiesselbach, 1949). Rast je podobna pri obeh genotipih do 8. DPO, ko je vir hranil za rastoči endosperm še tkivo nucela. Kaže, da v tem času delitve celic v zunanji plasti endosperma sledijo enakemu razvojnemu programu. Po tem času pa začne rast endosperma mutante zaostajati v primerjavi z divjim tipom.

Iz primerjave morfologije endospermov *Mn1* in *mn1* 16 DPO bi lahko izpeljali morebiten scenarij razvoja endosperma mutante. Površina endosperma, ocenjena s 3-D modelom, je bila 45 mm² v *Mn1* in 17 mm² v *mn1*. Ker je bila prostornina najmanjših celic približno enaka v obeh genotipih, lahko sklepamo, da je bilo v zunanji plasti endosperma *mn1* trikrat manj celic kot v *Mn1*. Vzrok za manj celic bi bila lahko zmanjšana mitotska aktivnost v zunanjih plasteh. Površinsko manjši periferni del endosperma bi bil tako lahko fizična ovira za širjenje endosperma in signal za zmanjšano širitev osrednjega dela. Osrednje celice v endospermu *mn1* so sicer imele enake stopnje endopoliploidnosti, vendar so dosegle manjše prostornine kot v *Mn1*.

Vendar pa zgradba endosperma *mn1* 10 in 12 DPO ne podpira te fizikalne hipoteze. V primeru njene veljavnosti bi pričakovali podobno koordinirane dogodke širitve in delitev, kot jih vidimo v *Mn1*. Ker so celice v osrednjem delu 10 DPO že v veliki večini endopoliploidne in se ne morejo več deliti (Barlow, 1978), se od te faze razvoja naprej endosperm povečuje z delitvami le v zunanjih plasteh. Sodeč po videzu zunanje plasti endosperma *mn1* 10 in 12 DPO, v njej še vedno poteka dovolj delitev, ki bi zagotavljale širjenje osrednjih celic. Širjenje celic osrednjega dela bi moralo tudi v endospermu *mn1* voditi do »napete« zunanje plasti endosperma, ker bi nanjo pritiskale od znotraj (Slika 4.32). Endosperm *mn1* je 10 in 12 DPO na apikalno-dorzalnem delu sploščen, v nasprotju z obliko pri *Mn1*, kjer je v tem delu zaobljena masa celic. Za delitve celic v perifernih plasteh se zdi, kot da so predprogramirane za širitev osrednjega dela. Posledično je zunanja plast endosperma *mn1* videti, kot bi bila prevelika za prostornino osrednjega dela

endosperma. V osrednjem delu endosperma *mn1* se celice očitno ne širijo toliko kot v divjem tipu. Zdi se, kot da ne dosegajo prostornine, za katero imajo potencial glede na njihovo stopnjo endopoliploidnosti (Traas in sod., 1998). Iz tega sklepamo, da signal za neširjenje notranjih celic verjetno ni fizično manjše obrobje endosperma.

Po drugem morebitnem scenariju razvoja endosperma *mn1* je vzrok za majhnost endosperma mutante v manjšem širjenju celic osrednjega dela kot posledici spremenjenega metabolizma. V času 8 DPO začne delovati invertaza iz celične stene, ki je lokalizirana v bazalnem delu endosperma in vrh aktivnosti doseže 12. DPO (Cheng in sod., 1996). Invertaza iz celične stene je prostorsko in časovno prvi encim, ki hidrolizira v endosperm vstopajočo saharozo. Iz tega sklepajo, da so v reakciji sproščene heksoze tisti fiziološki sladkorji, ki so vključeni v zaznavanje sladkorjev, izražanje metabolnih genov in normalen razvoj semen (Cheng in Chourey, 1999; Jang in Sheen, 1997). Ob delovanju invertaze iz celične stene endosperm *Mn1* postane močan ponor za fotoasimilate, endosperm *mn1*, ki nima invertaze iz celične stene, pa začne zaostajati v rasti (Cheng in sod., 1996). Za sladkorje so že dokazali, da regulatorno vplivajo na celični cikel. Weber in sod. (1998) so opazili več celičnih delitev v kličnih listih boba v delih, kjer je bila večja koncentracija heksoz, v delih z večjo koncentracijo saharoze pa so opazili endoreduplikacijo in založne procese. V *mn1* še vedno prihajajo asimilati po floemu in se pasivno prenašajo v rastoči endosperm (Zhou, 2000). Vendar pa je zaradi odsotnosti invertaze več sladkorjev v obliki saharoze kot v obliki heksoz. Če bi bil razvoj podoben kot pri bobu, bi v *mn1* ob večji koncentraciji saharoze pričakovali manjšo stopnjo delitev in večjo stopnjo endoreduplikacije ter več nalaganja škroba kot pri divjem tipu. Iz naših rezultatov ugotavljamo, da je endoreduplikacija potekala enako pri obeh genotipih (Slika 4.8). Prav tako sta v endospermu mutante podobna količina škroba na celico (Cheng in Chourey, 1999; Zhou, 2000) in raven ključnega encima biosinteze škroba, ADP-glukoza pirofosforilaze (Cheng in Chourey, 1999). Ne glede na zmanjšano koncentracijo heksoz v endospermu *mn1* – kot posledici odsotnosti invertaze iz celične stene – pa tudi ni nujno, da bi bile delitve v *mn1* zelo prizadete, saj so pokazali, da tudi saharoza lahko pozitivno vpliva na celični cikel (Riou-Khamlichi in sod., 2000). Iz naših rezultatov tako lahko sklepamo, da zmanjšana raven heksoz zaradi odsotnosti invertaze iz celične stene v prvi

vrsti vpliva na proces širjenja/rasti celic in v manjši meri na delitve ter kopičenje založnega škroba.

Oblika *mn1* endosperma kaže, da organizemska teorija celičnih delitev – torej da organ raste, celice pa le posledično razdeljujejo nastali prostor (Kaplan, 1992) – ne pojasni dobro razvoja endosperma mutante *mn1*. Razvoj endosperma mutante *mn1* še najbolj pojasnjuje »neocelična hipoteza« (Tsukaya, 2002; Beemster in sod., 2003), po kateri sta delitev posameznih celic in rast sicer avtonomni, vendar uravnani s signali na ravni organa. Tako se v endospermu *mn1* celice v zunanjih plasteh delijo po svojem razvojnem programu, po katerem mitoze vodijo širjenje tkiva (Jacobs, 1997). Zaradi odsotnosti invertaze iz celične stene je v mutanti *mn1* širjenje celic v osrednjem delu endosperma prizadeto zaradi primankljaja sladkorjev kot gradnikov celic, saj so heksoze potrebne za metabolizem celic in kot prekursorji za biosintezo celičnih sten. Ko pa površina endosperma postane prevelika glede na majhno prostornino celic v notranjosti, celice, ki se delijo v perifernih plasteh endosperma, dobijo signal, da jih je že preveč in pogostost celičnih delitev se posledično zmanjša.

Zakaj so endospermi 16 DPO manjši kot 12 DPO? Kariopse 16 DPO so bile vzgojene v drugi poskusni seriji na polju. Ker so rastline opraševali izkušeni raziskovalci, je bila velika večina semenskih zasnov oplojenih, zato so kariopse rastle na storžih tesno ena zraven druge; od tod sploščena oblika endosperma s strani (Slika 4.6). Tudi tekmovanje za hranila je bilo večje med posameznimi kariopsami. Rastline, iz katerih smo dobili kariopse 4 do 12 DPO, smo opraševali neizkušeni mladi raziskovalci, zato je bilo veliko semenskih zasnov neoplojenih. Ker kariopse niso bile stisnjene ena ob drugo, je bil endosperm *Mn1* 12. DPO bolj ovalne oblike v primerjavi s 16. DPO in, verjetno zaradi manjšega tekmovanja za hranila, tudi nekoliko večji. Večja razlika pa je bila pri endospermu *mn1*, kjer je bil 16. DPO endosperm *mn1* celo manjši kot je bil 10. DPO. Ker je endosperm *mn1* šibak ponor za fotoasimilate, je vpliv manjšega tekmovanja za hranila verjetno veliko bolj očiten in je lahko pozitivno vplival na razvoj kariops *mn1* iz serije 4 do 12 DPO.

5.1.3 Nastanek razpoke med endospermom in materinskim tkivom v kariopsi *mn1*

Rokopis pripravljen za objavo.

Značilen znak, po katerem se kariopsa *mn1* razlikuje od kariopse *Mn1* je, poleg ohlapnega perikarpa tudi pojav razpoke med materinskim tkivom placento-halazne plasti (PHP) in endospermom *mn1* po 9. DPO (Lowe in Nelson, 1946). Miller in Chourey (1992) sta nastanek razpoke pojasnila z domnevnim propadom celic materinskega tkiva PHP zaradi osmotskega šoka, ki naj bi bil posledica velike koncentracije saharoze v tem delu zaradi odsotnosti invertaze.

Da bi natančneje raziskali domnevni proces propadanja celic, smo pregledali razvoj bazalnega dela kariopse v času od 0 do 28 DPO na vzdolžnih rezinah skozi razvijajoče se kariopse genotipov *Mn1* in *mn1* (Slika 4.14). Začetek izginjanja jeder v celicah materinskega tkiva tik pod endospermom smo opazili 4. DPO v obeh genotipih. O podobnem pojavu poročajo Shannon in sod. (1986), le da so začetek odmiranja celic v tej plasti opazili približno 7. DPO.

S časom se je izginjanje jeder v celicah razširilo v naslednje plasti celic v bazalni smeri (proti pedicelu) in tudi proti dorzalnemu delu kariopse (Slika 4.14). Število plasti mrtvih celic se ni bistveno razlikovalo med *Mn1* in *mn1* (Slika 4.16), v obeh genotipih je bilo 28. DPO (zadnja pregledana razvojna stopnja) od 20 do 25 plasti celic brez jeder. Ko smo celice brez jeder v PHP pregledali z elektronsko mikroskopijo, smo videli, da so v njih le ostanki citoplazme v trakovih, od celic so ostale le celične stene (Slika 5.1 A).

Kljub enakemu številu plasti celic pa je bila oblika mrtvih celic v PHP drugačna v *Mn1* kot v *mn1*. Prazne celice v *Mn1* so bile podolgovate oblike in stisnjene v bazalno-apikalni smeri, celice v *mn1* pa so bile bolj nepravilnih oblik in niso bile stisnjene (Slika 4.15). Morebiten vzrok razlike je v normalnem razvoju perikarpa in prizadetem razvoju endosperma in embria v mutanti *mn1*. Ohlapne celice v PHP in opažena razpoka bi bile tako lahko posledica premajhnega endosperma, ki ni napolnjeval prostora znotraj perikarpa in zato ni pritiskal na celice PHP. Razpad celic v PHP, kot ga opisujeta Miller in Chourey (1992) v kariopsi *mn1*, gotovo ni vzrok za nastanek razpoke.

Razpoko smo opazili v kariopsah *mm1* od 8. DPO naprej do 16. DPO, 28. DPO pa je ni bilo več (Slika 4.14). To se je zgodilo zato, ker so kariopse rastle na storžih, s katerih smo odstranili ovojne liste, da smo lahko izrezovali kariopse, in so bili pokriti le s poveščeno papirnato vrečko. Ker kariopse niso bile tesno pokrite, se je perikarp sušil bolj kot pri kariopsah, ki so rastle v nedotaknjenih storžih. Do 28. DPO se je perikarp že toliko posušil in skrčil, da je endosperm spet pritisnil ob materinsko tkivo PHP.

5.1.4 Poseben transportni sistem v placento-halazni plasti in nastanek abscizijske plasti

Rokopis pripravljen za objavo.

Izgubljanje jeder in posledično umiranje celic v PHP smo opazili v oplojeni semenski zasnovi, medtem ko v neoplojeni semenski zasnovi na istem storžu v času 12 DPO tega pojava ni bilo (Slika 4.17). Iz tega smo sklepali, da proces umiranja povzroči razvijajoča se filialna generacija. Kako pa se signal prenese iz filialnega v materinsko tkivo, ostaja snov za nadaljnje raziskave. Proces je bil zelo podoben tako v kariopsi divjega tipa kot mutante, kar nakazuje, da je to verjetno splošen razvojni proces.

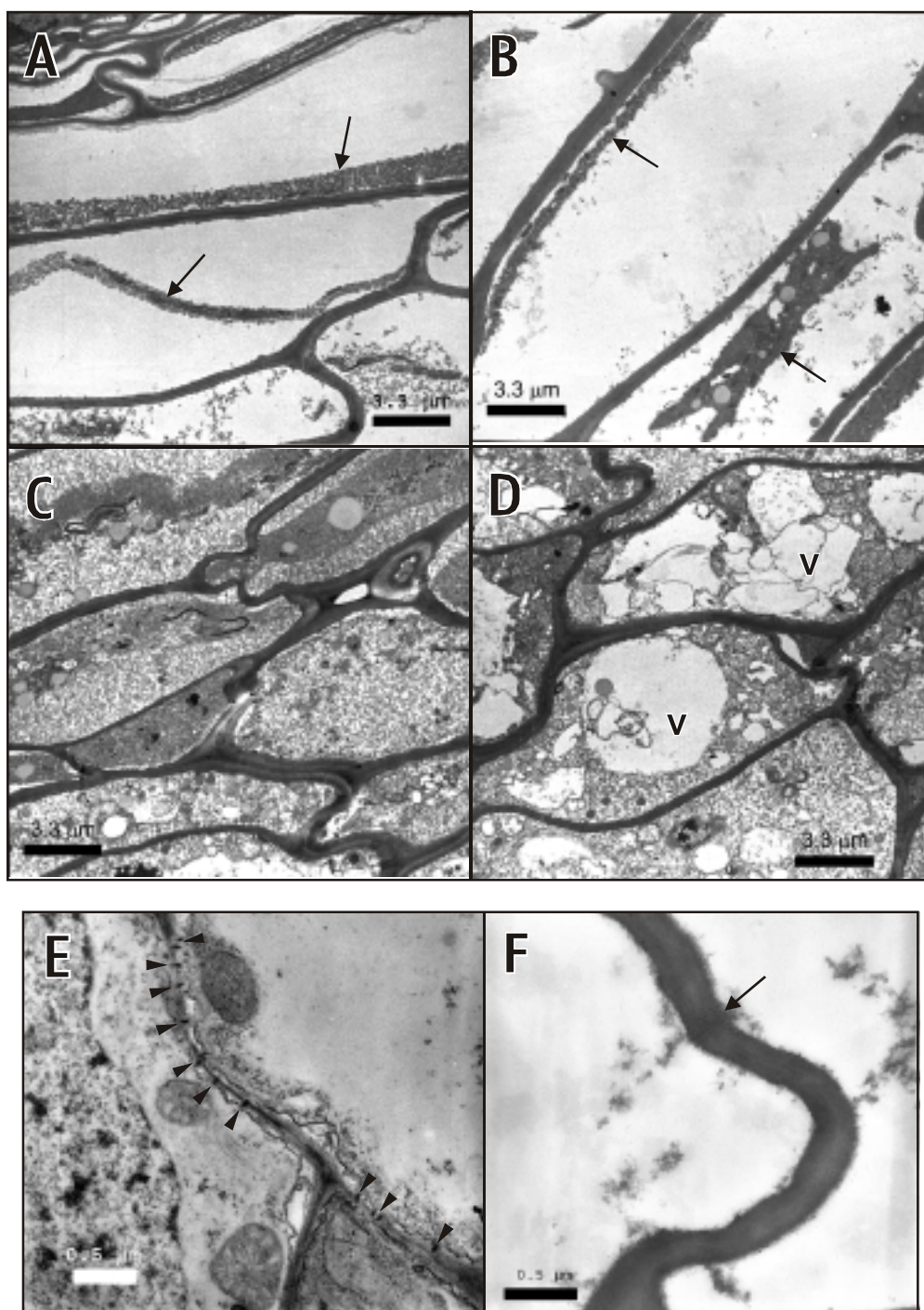
Kakšen je pomen takšnega obsežnega odmiranja celic v materinskem tkivu? Eden od ključnih podatkov za razumevanje procesa je mesto, kjer poteka. Plast, kjer celice odmrejo, je med delom pedicela, kjer se končujejo žile, in med ponorom za hranila, ki pridejo po žilah, endospermom. PHP naj bi imela pomembno vlogo v prenosu vode, sladkorjev in drugih hranil v razvijajoče se seme (Felker in Shannon, 1980). To območje kariopse je transportno aktivno, na kar kaže več lokaliziranih proteinov s transportnimi nalogami. V bazalnem delu endosperma koruze in v pedicelu, ne pa tudi v sami PHP, so našli v membrano vgrajen akvaporin (Barrieu in sod., 1998). Na bazi endosperma sta izražena transporter saharoze (Carlson in sod., 2002) in invertaza iz celične stene, ki poganja reakcije pretvorbe saharoze in s tem ustvarja močan koncentracijski gradient za transport heksoz v endosperm (Cheng in Chourey, 1999). Sistem, ki vključuje vse te proteine, bi lahko regulatorno vplival na silo za vlek vode in asimilatov skozi PHP iz žil, ki se končujejo v pedicelu, v endosperm.

V prenosni plasti v materinskem tkivu so se razvile različne strukturne prilagoditve v različnih vrstah rastlin (Thorne, 1985). Najbolje je razvita pri tropskih poljščinah, kot sta koruza in sirek (*Sorghum bicolor* L.), kjer poteka prenos asimilatov le skozi bazo kariopse. V sirku je prenosna plast v obliki placentnega mešička (Manes in McBee, 1986). V poljščinah zmernega pasu poteka transport po celotni dolžini kariopse skozi snop žil, ki je vgnuzden v perikarp, prenosna plast pa je omejena le na podaljšek nucela (Thorne, 1985; Olsen in sod., 1999). Transport asimilatov v seme uravnavajo aktivni transportni sistemi v filialnem tkivu (Thorne, 1985; Weber in sod., 1997; Thompson in sod., 2001; Rosche in

sod., 2002). Razvoj prenosne plasti v materinskem tkivu velikokrat vključuje smrt celic. V sirku celice v PHP odmrejo, nato se PHP loči od endosperma, da nastane votlina (Manes in McBee, 1986). Avtolitične procese so opazili v podaljšku nucela v ječmenu (Linnestad in sod., 1998) in pšenici (Dominguez in sod., 2001) ter v parenhimskih celicah s tankimi stenami v razvijajočih se kličnih listih boba (Weber in sod., 1997). Za nekatere od omenjenih procesov je že bilo dokazano, da potekajo po poti programirane celične smrti (Linnestad in sod., 1998; Young in Gallie, 2000).

Dejstvo, da je bil proces odmiranja celic v PHP enak v vseh pregledanih kariopsah, kaže, da je odmiranje celic v PHP programirano tudi pri koruzi. Da bi ga bolje razumeli, smo pregledali nekaj ključnih citoloških značilnosti programirane celične smrti. Na osnovi pregleda zaporednih stopenj razvoja PHP lahko sklepamo, da programirana celična smrt v razvoju PHP poteka v dveh stopnjah, ki vključujeta dva različna programa umiranja.

Začetek prvega programa celične smrti smo zasledili že 4. DPO. Jedra v celicah, ki so odmrle v tej fazi, niso pozitivno reagirala z reakcijo TUNEL, ki je značilen pokazatelj fragmentacije DNA. V celicah PHP smo z elektronsko mikroskopijo 9. DPO opazovali gradient odmiranja celic. Celice v plasti, ki je bila najbolj oddaljena od endosperma, so še imele vakuole, vendar je bila v zgornji plasti že vidna fragmentacija vakuole (Slika 5.1 D). V naslednjih plasteh v smeri proti endospermu so bile celice brez vakuole in niso imele vidnih razločnih celičnih organelov (Slika 5.1 C). Od celic v plasteh PHP še bližje endospermu pa so ostale vidne samo še celične stene in zelo skrčena vsebina celic v obliki trakov (Slika 5.1 A in B). Podobne celice v PHP sta 22. DPO opisala tudi Felker in Shannon (1980). Število plazmodezem med celicami v PHP se je zmanjševalo s časom razvoja kariopse. V času 5 DPO so bile v živih celicah še vidne plazmodezme, nato pa 9. DPO v istem območju med celicami ni bilo več plazmodezemskih povezav (Slika 5.1 E in F).



Slika 5.1. Propadanje vsebine celic v placento-halazni plasti *Mn1*, 9 DPO (A–D) in zmanjšanje števila plazmodezem v celicah tik pod endospermom, 5 DPO (E) in 9 DPO (G).

Prikazane so celice v materinskem tkivu tik pod endospermom (A–D), A – najbližje endospermu, D – najbolj oddaljena od endosperma (v bazalni smeri). V – vakuola; puščice v A in B označujejo ostanke citoplazme. Konice puščic v E označujejo plazmodezme, v F puščica kaže mesto, kjer je bila plazmodezma. Slike posnela Karen Chamusco (Department of Plant Pathology, University of Florida, Gainesville, ZDA).

Celična smrt z razpadom vakuole tako zelo spominja na programirano celično smrt, po poti katere odmirajo celice bodočih elementov ksilema. V diferenciaciji trahejnih elementov se v vakuoli nakopičijo hidrolitski encimi, ki se ob razpadu vakuole sprostijo in zelo hitro razgradijo vsebino celice (Fukuda, 2000). Tudi po klasifikaciji programirane celične smrti, ki so jo opisali Krishnamurthy in sod. (2000), bi lahko smrt celic PHP uvrstili v isto kategorijo kot smrt trahejnih elementov: celice, ki odmrejo po diferenciaciji v specializirane celične tipe. Prav tako kot za trahejne elemente bi lahko trdili za celice PHP, da svojo funkcijo opravljajo šele po smrti. Od trahejnih elementov pa se celice v PHP ločijo po tem, da v njih nismo opazili obsežnega nalaganja sekundarne celične stene, ki poteka v diferenciaciji trahejnih elementov (Fukuda, 2000). Čeprav v stenah celic v PHP nismo opazili lignina (Slika 4.21), pa smo opazili prisotnost nekaterih hidroksicimetnih kislin (Slika 4.23 in Slika 4.24), ki so prekurzorji v sintezi lignina (Croteau in sod., 2000).

Drugi val odmiranja celic se je začel 8. DPO v plasteh tik pod praznimi celicami. V jedrih teh celic smo zasledili fragmentacijo DNA. Na obodu nekaterih celic pri *mn1* 10 DPO smo opazili točke, ki so pozitivno reagirale z reakcijo TUNEL (Slika 4.19). Točke bi lahko bila telesca s fragmentirano DNA, ki so podobna apoptotskim telescem v živalskih celicah (Bursch in sod., 1990). Med raziskovalci še ni enotnega mnenja o prisotnosti pravih apoptotskih telesc pri rastlinah zaradi prisotnosti celične stene, ki onemogoča fagocitozo snovi umrlih celic. Kljub temu pa so zbiranje vsebine celice v manjša telesca opazili tudi v nekaterih tipih rastlinskih celic, v katerih so dokazali programirano celično smrt (Wang in sod., 1996; Gunawardena in sod., 2001). Domnevamo, da je bila prisotnost teh telesc le v PHP pri mutanti naključna in bi jih pri načrtnem iskanju podobnih struktur v različnih preparatih našli tudi v divjem tipu. V plasti celic tik pod celicami, ki so bile že mrtve, smo opazili kondenzacijo kromatina v jedrih (Slika 4.18). Od 8. do 10. DPO smo v območju PHP opazili tudi veliko endopoliploidnih jeder z vsebnostjo DNA 8 C (glej 4.1.2.3.1). Endopoliploidizacija je značilna za programirano celično smrt med diferenciacijo trahejnih elementov, vendar tam vsebnost DNA v jedrih doseže vrednosti C do 64 (Krishnamurthy, 2000). Kondenzacija jedra in fragmentacija DNA nista del procesa programirane celične smrti pri trahejnih elementih (Fukuda, 2000), sta pa znak za drug tip celične smrti, za apoptozi podobno celično smrt. Pri tem tipu smrti je prva tarča napada jedro, po razpadu

jedra pa se hitro razgradijo tudi drugi deli celice, vendar pogosto nepopolno (Wang in sod., 1996, Fukuda, 2000).

Ker predvidevamo, da je PHP v zgodnjem razvoju kariopse predvsem prevajalno tkivo, nas je zanimalo, ali se v teh celicah sintetizirajo kakšne posebne sekundarne spojine, značilne na primer za sekundarne stene trahejnih elementov. Z različnimi barvanji smo v stenah celic PHP dokazali prisotnost različnih fenolnih spojin. Z opazovanjem avtofluorescence celičnih sten v alkalnem mediju smo opazili dve različno obarvani plasti v PHP. Zgornja plast, tik pod endospermom, je v alkalnem mediju oddajala zeleno fluorescenco, celice pod njo pa svetlo modro (Slike 4.22–4.24). Zgornja plast se je ujemala s celicami, ki so odmrle v prvem valu programirane celične smrti. Opazili smo največ okoli 10 plasti celic, ki so oddajale zeleno fluorescenco (Slike 4.22–4.24); to število plasti celic v PHP odmre že do 8. DPO (Slika 4.16). Take ugotovitve potrjujejo domnevo o drugem valu programirane smrti, ki se v PHP začne 8 DPO. Premik avtofluorescence z UV ekscitacijo iz modre v svetlo modro do zelene v alkalnem mediju je značilen za hidroksicimetne kisline, ki spadajo med fenolne kisline. Premik iz modre v zeleno je značilen za sinapinsko kislino, vendar v literaturi ni podatkov o prisotnosti te kisline v koruzi. Zato bi bile potrebne dodatne kemijske analize, da bi ugotovili pravo naravo fenolne spojine v zgornji plasti PHP. Premik iz modre v svetlo modro pa je značilen za kavno in ferulno kislino (Harborne, 1998). Ferulna kislina je še posebno v družini *Poaceae*, v primerjavi z dvokaličnicami, v večjih količinah kovalentno vezana na sladkorje v celičnih stenah (Lichtenthaler in Schweiger, 1998). Opažene hidroksicimetne kisline bi lahko bile del posebnih ligninov, ki se pojavljajo v neolesenelih rastlinah, sestavljajo pa jih monolignoli in hidroksicimetne kisline (Croteau, 2000). V PHP nižje od celic, kjer smo opazili premik avtofluorescence celičnih sten v zeleno, smo dokazali prisotnost flavonoidov z barvanjem z Naturstoffreagenz A (Slika 4.23, Slika 4.24, NST). V preparatih so sicer pobarvane celične stene, vendar pa ni znano, ali so flavonoidi v živih celicah prisotni v vakuolah ali v stenah, saj se pri fiksaciji membrane poškodujejo in vsebina se lahko sprosti iz celic. Flavonoidi naj bi imeli pomembno vlogo pri zaščiti rastline, pomembni pa so tudi kot pigmenti in signalne molekule (Croteau, 2000).

V območju PHP se ob zrelosti kariopse razvije temno obarvana abscizijska plast (Kiesselbach, 1949). Verjetno je obarvanje posledica fenolnih snovi, saj se te ob oksidaciji

temno obarvajo (Croteau in sod., 2000). Serna in sod. (2001) so v PHP koruze našli peptid s protiglivišnim delovanjem BAP 2 (*»basal layer type antifungal protein 2«*), ki se izloča iz celic na bazi endosperma in se nalaga v materinskem tkivu PHP med 12. in 15. DPO in naj bi bil vključen v protimikrobno zaščito razvijajočega se semena. Abscizijska plast v kariopsi koruze nima vloge v odpadanju zrelih kariops, saj te ostanejo pritrjene na karpelnem socvetju, ampak naj bi predvsem preprečevala vstop mikroorganizmov v filialno tkivo. Na zaščitno vlogo kaže tudi prisotnost flavonoidov. Obširno območje celic v PHP, v katerih so bili flavonoidi, je bilo vidno že 6. DPO (Slika 4.23), pred fazo, ko se začne intenzivno nalaganje hranil v endospermu (10-12 DPO, Kowles in sod., 1988).

Abscizijska plast plodov ima podobno zgradbo in naloge kot abscizijska plast listov. Lahko se oblikuje že zgodaj v razvoju kot plast celic s tankimi stenami, ki je orientirana prečno čez pedicel. V listih je abscizijska plast sestavljena iz dveh delov: ločitvene in zaščitne plasti. V ločitveni plasti so celice s tankimi stenami, kjer se odpadajoči list odlomi. Zaščitna plast vsebuje celice, katerih naloga je zapečatenje rane, ki ostane na rastlini, ko list odpade (Mauseth, 1988). Če potegnemo vzporednice v zgradbi abscizijske plasti v listih in kariopsi koruze, lahko predpostavimo, da ločitveni plasti listov ustreza približno deset plasti celic v PHP, ki odmrejo do 8. DPO. Zaščitni plasti pa ustrezajo plasti celic v PHP, v katerih se naložijo flavonoidi. Glede tega bi bilo zanimivo raziskati razvoj abscizijske plasti v koruznem divjem sorodniku teozintu (Dorweiler in sod., 1993) ali v mutanti koruze *tasselseed*, pri kateri se kariopse razvijajo tudi v prašničnih cvetovih, v katerih pa so pecljate in niso tesno obdane z materinskim tkivom (Neuffer in sod., 1997).

5.1.5 Razvoj koreninske čepice

V raziskavi procesov v koreninski čepici smo najprej analizirali rast korenin v različnih substratih. Izbrati smo želeli take razmere za gojenje kalic, ki bi bile zanimive za nadaljnje ovrednotenje procesov v razvoju koreninske čepice. Proučili smo zgradbo koreninske čepice glede na stopnjo endopoliploidnosti celic in prisotnost izocima saharoza sintaze SUS1 v celicah. Kopičenje SUS1 v zunanjih celicah koreninske čepice bi bilo lahko povezano s povečano metabolno sposobnostjo endopoliploidnih celic. SUS1 v teh celicah pa bi bila lahko vključena v dostavo monosaharidnih prekurzorjev za sintezo polisaharidov sluzi.

5.1.5.1 Vpliv substrata na rast korenin

Da bi izbrali ustrezen substrat in način gojenja za nadaljnje analize, smo kalice vzgojili iz kariops koruze, ki so bile pred kalitvijo površinsko sterilizirane ali pa ne. Ko so kariopse vzkalile, smo jih prenesli v različne substrate: nesterilizirano prst (NE), sterilizirano prst (SE), nesterilizirano vodo (NW) in sterilizirano vodo (SW). Primarne korenine kalic smo izmerili pred prenosom v ustrezen substrat. Kalice smo tri dni gojili v substratu in nato spet izmerili dolžino primarne korenine. Zaradi okužb je bila variabilnost dolžin korenin iz nesteriliziranih kariops po koncu rasti v ustreznem substratu (Preglednica 4.2, NB) večja kot pri površinsko steriliziranih kariopsah (Preglednica 4.2, SB) v vseh substratih (Preglednica 4.2, NE, SE, NW, SW).

Prirastek in hitrost rasti primarnih korenin smo izračunali iz povprečnih dolžin korenin v vsakem substratu (Preglednica 4.2). Izstopajoče majhen prirastek pri nesteriliziranih zrnih, ki so rastle v sterilizirani prsti (Preglednica 4.2, *SENB*), je bil posledica večje okužbe kalic. S sterilizacijo morda uničimo normalne populacije mikrobov v prsti, nato pa z nesteriliziranimi semeni vnesemo patogene. Na Sliki 4.45 je razvidno, da sta bila prirastek in hitrost rasti odvisna predvsem od substrata v katerem so rastle kalice (prst ali voda), ne pa od sterilizacije kariops ali substrata (Slika 4.45). Mediani prirastek primarnih korenin, gojenih v prsti, je bil 29 mm, v vodi pa 49 mm. Mediana hitrost rasti primarnih korenin, gojenih v prsti, je bila 0,40 mm h⁻¹, v vodi pa 0,69 mm h⁻¹.

Da bi ovrednotili rast primarnih korenin v različnih substratih, smo izmerili določene morfološke parametre na koreninskih vršičkih kalic. Za meritve morfoloških parametrov smo zaradi manjše variabilnosti uporabili samo kalice, vzgojene iz steriliziranih zrn. Pomembne razlike smo opazili pri širini telesa korenine (Slika 4.46 F), razlike pri drugih parametrih pa so bile tik nad mejo statistične značilnosti (dolžina, širina in površina prereza koreninske čepice; Slika 4.46) ali pa pod njo (število celic v stolpcu v čepici, število jeder v prerezu čepice in število nizov celic v telesu korenine; Slika 4.46).

Korenine, ki so rastle v prsti, so bile širše, imele pa so enako število nizov celic v prečnem preseku (Slika 4.46 F in G). Celice v telesu korenine so bile torej širše (v smeri pravokotno glede na os korenine), hitrost rasti korenin pa je bila manjša kot pri koreninah iz vode. To lahko pomeni, da je bilo v prsti ovirano podaljševanje celic v telesu korenine.

Pilet (1986) je opisal obratno sorazmerno zvezo med dolžino koreninske čepice in hitrostjo rasti korenin. Dolžine čepic skupaj z oceno hitrosti rasti korenine smo uporabili za klasifikacijo korenin (Preglednica 5.1). Korenine kalic, ki so rastle v vodi, spadajo po klasifikaciji korenin po Piletu (1986) v kategorijo srednje hitro rastočih korenin. Korenine iz prsti pa odstopajo od opisanih vrednosti, saj imajo enako dolge čepice kot korenine, ki so rastle v vodi, njihova hitrost rasti pa je manjša (po Piletu bi pričakovali večjo). Vendar je Pilet obratno zvezo dokazal za korenine, ki so rastle v enakih razmerah (v vlažnem ozračju), tu pa primerjamo rast korenin v različnih substratih. V tem poskusu je bila torej dolžina čepice neodvisna od substrata, hitrost rasti primarne korenine pa je bila manjša v prsti kot v vodi. Povezava med hitrostjo rasti korenine in dolžino koreninske čepice je bila celo pozitivna (Preglednica 5.1).

Preglednica 5.1. Povprečna dolžina koreninske čepice in hitrost rasti primarne korenine.

| | <i>NESB</i> ^a | <i>NWSB</i> ^a | <i>SESB</i> ^a | <i>SWSB</i> ^a |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Povprečna dolžina koreninske čepice ± SD (µm) | 290 ± 30 | 290 ± 20 | 270 ± 30 | 340 ± 40 |
| Hitrost rasti primarne korenine (mm h ⁻¹) ^b | 0,45 | 0,64 | 0,39 | 0,77 |

^a Označe substratov, v katerih so rastle kalice: NE – nesterilizirana prst, NW – nesterilizirana voda, SE – sterilizirana prst, SW – sterilizirana voda; SB – kalice vzgojene iz steriliziranih zrn.

^b Hitrost rasti izračunana kot razlika med povprečno dolžino primarnih korenin pred rastjo in po rasti v ustreznem substratu, deljena s časom rasti (72 h).

5.1.5.2 Stopnja endopoliploidnosti celic v koreninski čepici

Celice koreninske čepice nastajajo v kaliptro genu, ki je distalni del apikalnega meristema korenine (Kiesselbach, 1949). V tem območju smo opazili največ celic z vsebnostjo DNA 2 C in 4 C (Slika 4.48 C), ki ustrezata fazam G1 in G2 celičnega cikla. Celice, ki so zunaj meristemskega območja, se ne delijo več, vendar so v njih prav tako opazili sintezo DNA (Barlow, 1976). V jedrih teh celic se DNA podvaja v ciklih endoreduplikacije. Nastanejo celice s stopnjo endopoliploidnosti 8 C in več. V zunanjih celicah kolumele (osrednji steber tkiva v čepici) se razvijejo jedra z vsebnostjo DNA do 16 C (Barlow, 1977). V kolumeli smo opazili celice s količino DNA do 16 C (Slika 4.48 C), v perifernem delu čepice pa smo opazili tudi jedra 32 C (Slika 4.50 A). Jeder 32 C je bilo zelo malo, zato smo jih v analizah združili z jedri 16 C v skupen razred 16 C+.

Stopnjo endopoliploidnosti jeder smo izmerili v koreninskih čepicah korenin, gojenih v različnih substratih, opisanih v prejšnjem poglavju (5.1.5.1). V vseh proučevanih čepicah smo opazili jedra s količino DNA od 2 C do 16 C (Slika 4.49). Jedra iz čepic korenin, gojenih v vodi (Slika 4.49, NWSB in SWSB), so se jasneje ločila na posamezne vrhove vrednosti C. Tudi podatki so bili popolnejši zaradi manjšega prekrivanja jeder, zato smo le teh šest čepic uporabili v nadaljnjih meritvah velikosti celic.

Iz podatkov o položaju in prostornini celic smo ocenili 3-D strukturo koreninske čepice, ki smo jo izračunali za šest čepic, v katerih smo izmerili stopnjo endopoliploidnosti, in za tri čepice, v katerih smo ocenili imunolokalizacijsko barvanje (5.1.5.3). Ocenjeno število celic (6950 ± 290 , povprečje \pm standardna napaka, $N = 9$) je primerljivo z rezultati drugih študij. Clowes (1976) je v koreninskih čepicah kultivarja »Golden Bantam« naštel povprečno 7900 celic (v razponu 3900–20900), Bengough in sod. (2001) pa 8870 ± 390 celic v kultivarju »Mephisto« (povprečje \pm standardna napaka, $N = 6$). Ocenjeno število celic je sicer manjše od objavljenih vrednosti, kar lahko pripišemo razmeram gojenja kalic v vodi, kjer se celice stalno luščijo s površine čepice (Hawes in sod., 2000).

Prostornina celic znotraj vsakega razreda vrednosti C se ni razlikovala med proučenimi čepicami (Slika 4.51), in se je večala s stopnjo endopoliploidnosti celic (Slika 4.52). To se sklada s prevladujočo hipotezo, da je velikost celic odvisna od količine DNA v njihovih jedrih (Melaragno in sod., 1993; Kondorosi in sod., 2000; Kudo in Kimura, 2002). Celice z

visoko stopnjo endopoliploidnosti, so bile v čepici maloštevilne, vendar so zaradi njihove velikosti prispevale velik delež k prostornini čepice (Slika 4.53).

5.1.5.3 Lokalizacija saharoza sintaze v koreninski čepici

Lokacijo izocima saharoza sintaze SUS1 v koreninski čepici smo določili z imunolokalizacijo na preparatih koreninskih čepic korenin, gojenih v prej opisanih substratih (5.1.5.1, Slike 4.54 do 4.57). Jakost barvanja je bila spremenljiva, vendar smo z uporabo prikaza s psevdobarvami opazili vedno enak vzorec porazdelitve imunolokalizacijskega signala. V predelu meristema je bilo barvanje za SUS1 šibko, na obrobju koreninske čepice pa močnejše.

Imunolokalizacijsko barvanje za SUS1, v povezavi z velikostjo celic, smo ovrednotili s 3-D modelom na treh preparatih čepic korenin, gojenih v vodi (Slika 4.58). V celicah z majhno prostornino smo izmerili večinoma majhno količino barvanja za SUS1, velike celice pa so vsebovale veliko SUS1 (Slika 4.59). Povprečna prostornina celic z visoko vsebnostjo SUS1 je bila štirikrat večja od prostornine celic z majhno količino SUS1 (4.2.5).

Pristnost izocima saharoza sintaze SUS1 (ne pa SH1) v koreninski čepici koruze so potrdili na ravni izražanja genov in ravni proteinov (Rowland in sod., 1989). Encim naj bi bil vključen v odgovor rastline na pomanjkanje kisika (Chen in Chourey, 1989; Rowland in sod., 1989; Koch in sod., 1992; Zeng in sod., 1998). Vendar še ni študije, ki bi pokazala porazdelitev saharoza sintaze znotraj koreninske čepice. Guerin in Carbonero (1997) sta predlagala, da naj bi bila saharoza sintaza v koreninski čepici ječmena vključena v sintezo škroba v celicah osrednjega dela čepice. Vendar naša opažanja kažejo, da je saharoza sintaza v koreninski čepici koruze pomembna predvsem v celicah zunanjih plasti čepice. Te vsebujejo hipertrofirane Golgijeve vezikle (Moore in Jones, 1976), ki so napolnjeni s polisaharidi, bogatimi s fukozo (Roy in sod., 2002). Saharoza sintaza je lahko vezana na membrano Golgijevih veziklov (Buckeridge in sod., 1999) ali na plazemsko membrano (Carlson in Chourey, 1996). Zagotavljala naj bi UDP-glukozo za sintezo polisaharidov. Saharoza sintaza v zunanjih celicah koreninske čepice bi torej lahko zagotavljala UDP-glukozo za sintezo polisaharidov sluzi, lahko pa bi zagotavljala tudi proste heksoze.

5.1.5.4 Povezava med endopoliploidnostjo in količino SUS1 proteina ter morebitna vloga saharoza sintaze v koreninski čepici

Porazdelitev celic glede na nizko/visoko vsebnost saharoza sintaze SUS1 je bila podobna kot porazdelitev celic z nizko/visoko vsebnostjo DNA, in sicer tako prostorsko (Slika 4.48 in Slika 4.58) kot tudi glede na prostornino celic (Slika 4.53 in Slika 4.59). S povezavo podatkov o stopnji endopoliploidnosti celic in vsebnosti SUS1, glede na lokacijo celic v rezinah, smo ugotovili, da ima približno 90 % celic 16 C tudi močan signal za SUS1, v nasprotju z le 5 % 2 C celic (Slika 4.60). Mogoče je tudi, da v 2 C celicah sploh ni močnega signala za SUS1 in je vrednost 5 % le posledica metodološkega šuma, povezanega z metodo povezave obeh podatkov (vrednosti C in SUS1) s polaganjem podatkov iz različnih rezin eno na drugo. Glede na prostorsko porazdelitev celic v čepici so celice z visoko vsebnostjo SUS1 prevladoval v delu čepice, kjer je bila stopnja endopoliploidnosti celic 8 C in več (Slika 4.48 in Slika 4.58).

Podobno razporeditev v koreninski čepici kot saharoza sintaza ima še nekaj s sluzjo povezanih proteinov. GDP-D-manoza-4,6-dehidrataza se izraža v zunanjem delu čepice (Ponce in sod., 2000). Ta encim katalizira prvi korak v *de novo* sintezi GDP-L-fukoze (Bonin in sod., 1997), ki je glavni in specifični sestavni del polisaharidne sluzi v koruzi (Harris in Northcote, 1970; Bacic in sod., 1986; Osborn in sod., 1999). Gen *zmGRP4*, ki kodira z glicinom bogat protein, se močno izraža v perifernem delu koreninske čepice in šibko tudi v epidermidi korenine (Matsuyama in sod., 1999; Ponce in sod., 2000). Arabinogalaktanski protein, ki je sestavni del sluzi (Bacic in sod., 1986), se prav tako specifično izraža v celicah zunanjega dela koreninske čepice (Ponce in sod., 2000). Čeprav v omenjenih primerih niso merili stopnje endopoliploidnosti, lahko na podlagi podobnosti zgradbe koreninske čepice v različnih kultivarjih koruze (Bengough in sod., 2001; ta študija) sklepamo, da so se naštetih proteini prav tako pojavljali v območju celic z visoko stopnjo endopoliploidnosti.

Samo stopnja endopoliploidnosti verjetno ni edini dejavnik, ki vpliva na kopičenje SUS1 proteina v zunanjih celicah koreninske čepice. Tudi pozicijska informacija je verjetno zelo pomembna. Vendar je višja stopnja endopoliploidnosti lahko prednostna za celico, saj ima tako lahko večjo sposobnost za izražanje encima, njegovo kopičenje ali aktivnost. V metabolno aktivnih tkivih naj bi endoreduplikacija zagotovila povečano število genov zato,

da bi se lahko povečalo izražanje genov (Baluška in Kubica, 1992; Edgar in Orr-Weaver, 2001; Joubès in Chevalier, 2000) in da bi omogočila povečano prepisovanje jedrnih genov, ki so potrebni za sestavljanje več organelov na celico (Joubès in Chevalier, 2000). Število organelov na celico se v koreninski čepici res veča, ko se veča razdalja med celico in meristemom v procesu diferenciacije (Juniper in Clowes, 1965). Več Golgijevih veziklov (Moore in Jones, 1967), z vezano saharoza sintazo na membrani, bi tako lahko omogočalo intenzivno sintezo polisaharidov sluzi.

Našteta dejstva kažejo, da je izražanje določenih proteinov, povezanih s sluzjo (Matsuyama in sod., 1999; Ponce in sod., 2000; ta študija), povečano s pomočjo endoreduplikacije, vendar pa še ne ponujajo končnega dokaza, da endoreduplikacija omogoča večje izražanje proteinov prek povečanega števila genov, povezanih s sluzjo. Zato bi bilo zanimivo raziskati še sintezo sluzi v rastlinah, ki v koreninski čepici nimajo endopoliploidnih celic.

5.2 Sklepi

Postavili smo model, ki omogoča oceno tridimenzionalne strukture endosperma. Model bi lahko uporabili tudi za oceno strukture drugih rastlinskih tkiv, ki so na prečnem prerezu približno radialno simetrična.

S slikovno citometrijo smo ocenili prostorsko razporeditev nekaterih celičnih parametrov v preiskovanih tkivih: velikost celic, količino DNA v jedrih, velikost jeder in stopnjo imunolokalizacijskega barvanja. To tehniko je mogoče uporabiti za kvantitativno oceno razporeditve katere koli druge lastnosti celic v tkivu, ki jo je mogoče izmeriti z uporabo različnih mikroskopskih tehnik in barvanj.

S spremljanjem razvoja kariopse smo ugotovili, da je endosperm *mn1* majhen zaradi manjše rasti celic, zaradi katere je v endospermu tudi manj delitev. V endospermu je pri obeh genotipih do 10. DPO podobno število celic, nato je 12. DPO v endospermu *mn1* le še 68 % celic v primerjavi z *Mn1*, 16. DPO pa celo le 55 %. Kljub zmanjšanemu številu delitev celic pa je bil ohranjen proces endoreduplikacije. V enakem času je poteklo v *mn1* enako število endociklov kot v endospermu divjega tipa. Prostornina celic se je povečevala v skladu z vsebnostjo DNA v njihovih jedrih. Celice višjih stopenj endopoliploidnosti (24 C in več) so imele v *mn1* manjšo prostornino v primerjavi s celicami enakih stopenj v *Mn1*, kar je bistveno prispevalo k manjši prostornini endosperma *mn1* od 10. DPO naprej.

Razpoka v kariopsi *mn1* med endospermom in materinskim tkivom placento-halazne plasti ni posledica razpada celic materinskega tkiva, temveč je le posledica odmika premajhnega endosperma *mn1* od normalno razvite placento-halazne plasti, v kateri pa poteka programirano odmiranje celic v obeh genotipih.

V materinskem tkivu placento-halazne plasti med žilami v pedicelu in filialnim endospermom je bilo opaziti obsežno odmiranje celic v plasteh v času od 4 do 20 dni po opraitvi. Celice odmrejo po poti programirane celične smrti, od njih pa ostanejo le celične stene. Potek odmiranja ni odvisen od genotipa. V *Mn1* se mrtve celice zaradi pristiska endosperma stisnejo, v *mn1* pa ostanejo široke. V placento-halazni plasti naj bi mrtve celice v začetnem razvoju kariopse služile transportu hranilnih snovi v endosperm, v

poznejšem obdobju pa se v tem območju razvije abscizijska plast. V placento-halazni plasti smo opazili nalaganje različnih fenolnih spojin – hidroksicimetnih kislin in flavonoidov, zato ima plast verjetno vlogo tudi v protimikrobni zaščiti razvijajočega se zrna.

V celicah zunanje plasti koreninske čepice smo opazili relativno večjo količino saharoza sintaze SUS1 kot v osrednjih celicah. Celice v zunanji plasti koreninske čepice koruze so velike, endopoliploidne in proizvajajo polisaharidno sluz. Glede na vlogo saharoza sintaze v zagotavljanju sladkornih monomerov pri sintezi različnih polisaharidov sklepamo, da bi bila lahko vključena tudi v sintezo sluzi.

6 POVZETEK

V koruzi (*Zea mays* L.) smo na citološki ravni pregledali nekatere razvojne procese v endospermu in koreninski čepici.

Razvoj celotne kariopse smo spremljali v času od 4 do 16 dni po opraitvi (DPO). Glede na število jeder v vzdolžnih rezinah skozi kariopso se je število celic v embriu v tem času eksponentno večalo, število celic v nucelu se je zmanjševalo, število celic v perikarpu pa je v proučevanem obdobju ostalo približno enako. V perikarpu, v katerega se v zrelem plodu razvije stena plodnice, smo našli poliploidna jedra z vsebnostjo DNA do 8 C. Endopoliploidna postanejo tudi jedra nucela. V času rasti endosperm nadomešča tkivo nucela, v katerem potekajo avtolitični procesi. Nucel kmalu propade in se ohrani le kot nucelarna membrana z redkimi jedri. Razvoj endosperma smo proučili s pomočjo 3-D modela, ki je omogočil oceno tridimenzionalne strukture endosperma na podlagi podatkov, izmerjenih v mediani vzdolžni rezini skozi kariopso. V endospermu smo izmerili velikost celic z obrisovanjem njihovih celičnih sten, nato pa smo vsaki celici priredili še stopnjo endopoliploidnosti, izmerjeno s kvantitativno denzitometrično meritvijo relativne vsebnosti DNA v jedrih, pobarvanih z reakcijo po Feulgenju. V času od 4 do 8 DPO je bila porazdelitev jeder z različno vsebnostjo DNA v endospermu enakomerna, nato pa je postal endosperm jasno razdeljen na obrobni del, kjer so bile majhne celice z nizko vsebnostjo DNA, in osrednji del, kjer so bile velike celice z visoko stopnjo endopoliploidnosti.

Razvoj kariopse divjega tipa smo primerjali z razvojem kariopse mutante *mn1*, ki je brez izocima invertaze iz celične stene INCW2. Izocim se izraža v prenosnih celicah na bazi endosperma in ustvarja močan vlek asimilatov v razvijajoče se seme. Mutanta ima zelo prizadet endosperm, ki ima v zreli kariopsi lahko le petino mase endosperma divjega tipa. V mutanti je bila od 10. DPO naprej prizadeta rast celic v osrednjem delu endosperma, kjer so bile celice z največjo prostornino in stopnjo endopoliploidnosti. Celice z enako stopnjo endopoliploidnosti so imele v *mn1* manjšo prostornino v primerjavi z divjim tipom. Čeprav je bilo celic z visoko stopnjo endopoliploidnosti malo, so prispevale bistven del prostornine endosperma. Zato je bila prostornina endosperma *mn1* manjša prav zaradi manjše širitve/rasti velikih celic. Sam proces endoreduplikacije v *mn1* ni bil prizadet, saj smo v obeh genotipih opazili enako število vrhov v frekvenčnih porazdelitvah relativne

količine DNA v jedrih; 16 DPO je bila najvišja stopnja endopoliploidnosti v obeh genotipih 192 C. Zaradi prizadete ekspanzije/rasti celic v osrednjem delu se je verjetno zmanjšala tudi pogostost delitev celic v zunanjih plasteh endosperma *mn1*. V endospermu *mn1* je bilo 10 DPO še približno enako število celic kot v *Mn1*, 12 DPO je bilo v *mn1* 68 % celic, 16 DPO pa le 55 % celic v primerjavi z *Mn1*.

Okrog 9. DPO nastane med endospermom *mn1* in materinskim tkivom placento-halazne plasti razpoka. Da bi ugotovili, zakaj nastane, smo pregledali razvoj bazalnega dela kariopse divjega tipa in mutante *mn1* v času od 0 do 28 DPO. V obeh genotipih smo opazili odmiranje celic v materinskem tkivu, ki se je začelo že 4 DPO. Ker je bil proces vedno enak, ugotavljamo, da je vanj vključena programirana celična smrt. Najprej je odmrlo nekaj celic v placento-halazni plasti pod dorzalno stranjo endosperma (ki je 4 DPO zavzemal le majhen prostor na ventralni strani kariopse), nato pa se je odmiranje razširilo v plasteh v smeri proti bazalnemu delu kariopse (proti žilam v pedicelu) in skupaj z rastočim endospermom proti dorzalnemu delu kariopse. V času od 4 do 20 DPO je odmrlo okrog 20 do 25 plasti celic materinskega tkiva v obeh genotipih. Razpoka v *mn1* je le posledica odmika premajhnega endosperma, ki se ne razvija več v skladu z normalno razvitim materinskim tkivom perikarpa in pedicela. Odmrle celice so se skoraj popolnoma izpraznile, od njih so ostale le celične stene in ostanki citoplazme v obliki trakov. Predvidevamo, da je odmiranje celic del procesa, v katerem nastane poseben transportni sistem, prek katerega se iz žil, ki se končujejo v pedicelu, hranila transportirajo v rastoči endosperm. Glede na značilnosti celic in poteka njihove programirane smrti je bila placento-halazna plast časovno in prostorsko razdeljena na dve območji. V prvem območju, ki je bilo tik pod endospermom, se je programirana celična smrt začela 4 DPO, v jedrih celic pa nismo opazili fragmentacije DNA. Do 8 DPO je odmrlo približno 10 plasti celic, v celičnih stenah pa so se pred smrtjo naložile fenolne kisline (hidroksicimetne kisline), ki so po barvi avtofluorescence v alkalnem mediju spominjale na sinapinsko kislino. Programirana smrt celic v drugem območju, ki je tik pod prvim območjem, se je začela 8 DPO. Zanj je bila značilna fragmentacija DNA in kondenzacija jeder, v celičnih stenah pa so se naložile fenolne kisline, ki so po barvi avtofluorescence v alkalnem mediju spominjale na ferulno in kavno kislino. V celicah v tem območju so se že zelo zgodaj naložili tudi flavonoidi. Fenolne kisline in flavonoidi so bili naloženi v obeh območjih že 8

DPO, njihova količina pa se v nadaljnjem razvoju ni več bistveno spremenila. Morebitna vloga flavonoidov bi bila lahko protimikrobna zaščita razvijajoče se kariopse. V tem območju se pri vrstah s pecljatiimi plodovi razvije abscizijska plast, pri koruzi pa se ob zrelosti kariopse le naložijo snovi, ki obarvajo placento-halazno plast črno in naj bi prekinile prenos vode in hranil v zrelo kariopso.

Tudi zgradbo koreninske čepice smo ocenili v treh dimenzijah. Kvantitativno smo ocenili razmerje med velikostjo celic, njihovo stopnjo endopoliploidnosti in količino izocima saharoza sintaze SUS1. Mediane vzdolžne rezine vršičkov primarnih korenin smo analizirali z imunolokalizacijo, kvantitativnim DNA barvanjem in slikovno citometrijo. Signal imunolokalizacije SUS1 v celicah in njihova stopnja endopoliploidnosti sta se večala od meristemskega območja do obrobja koreninske čepice in sta bila najvišja v celicah v zunanji plasti čepice. Vsebnost DNA v jedrih takih celic je bila 8 C in več, prostornina celic pa je bila največja v vsej čepici. Visoka vsebnost SUS1 v zunanjih, endopoliploidnih celicah nakazuje povezavo med endoreduplikacijo in povečanim nalaganjem tega encima v celicah. Naloga zunanjih celic je sinteza sluzi, zato predvidevamo, da je saharoza sintaza vključena v zagotavljanje monosaharidnih prekurzorjev za sintezo sluzi.

7 SUMMARY

The development of maize (*Zea mays* L.) endosperm and root cap was analyzed on the cytological level using quantitative image analysis of histological tissue sections.

Development of the whole caryopsis was monitored from 4 to 16 days after pollination (DAP). On the basis of the number of nuclei in median longitudinal sections of caryopsis, we concluded that the number of cells in the embryo increased exponentially, the number of cells in the nucellus decreased, while the number of cells in the pericarp remained approximately the same. Endopolyploid nuclei with DNA content 8 C (1 C is the amount of DNA in an unreplicated haploid genome) were found in the pericarp which develops from the ovary wall. The nucellus also contained endopolyploid nuclei. During the development of the caryopsis, endosperm replaces the nucellar tissue. Consequently, autolytic processes occur in the nucellus, which degenerates and remains in the form of a nucellar membrane with only a few nuclei. We studied the development of endosperm using a model that allowed us to estimate a three-dimensional structure for endosperm from parameters measured in the median longitudinal sections of caryopsis. Cell size was measured by outlining the cell walls. The level of endopolyploidy, which was estimated by quantitative densitometric measurement of relative DNA content in nuclei stained by Feulgen reaction, was then assigned to each cell. The nuclei, which contained different amounts of DNA, were randomly distributed throughout the whole endosperm during 4 to 8 DAP. However, at later developmental stages, the endosperm structure differentiated to the outer part, where small cells with a low DNA content prevailed, and to the central part, with large cells containing nuclei of high levels of endopolyploidy.

We compared the development of wild-type caryopsis with the development of *mn1* (*miniature 1*) mutant caryopsis that lacks INCW2, an isozyme of cell wall invertase. The isozyme is expressed specifically in transfer cells at the base of the endosperm and is believed to generate a steep concentration gradient for the transport of assimilates in the developing seed. Mutant *mn1* is characterized by the greatly reduced size of the endosperm, which weighs only a fifth of the wild-type endosperm in the mature caryopsis. From 10 DAP onwards, growth of cells in the central part of *mn1* endosperm was impaired. Cells with the same level of endopolyploidy had a smaller volume in *mn1* than in

the wild-type. The number of cells with high levels of endopolyploidy was low, but they contributed a major part of the endosperm volume. The volume of *mn1* endosperm was reduced because of the lower expansion of these large cells. The process of endoreduplication was not affected in *mn1*. In both genotypes we observed, at the same developmental stages, the same number of peaks in the frequency distribution of relative DNA amount in nuclei. The highest level of endopolyploidy observed was 192 C at 16 DAP in both genotypes. The frequency of cell division in the peripheral layers of endosperm was probably also reduced as a consequence of the impaired expansion of the central cells in *mn1* endosperm. At 10 DAP, the *mn1* endosperm contained approximately the same number of cells as the wild-type endosperm; however at 12 DAP the number of cells in *mn1* was 68% and at 16 DAP only 55% of the cells in wild-type.

Around 9 DAP, a physical gap is known to appear between *mn1* endosperm and maternal tissue of the placento-chalazal layer. In order to determine its origin, we examined the development of the basal part of wild-type and *mn1* caryopses between 0 and 28 DAP. In both genotypes we observed the death of cells in maternal tissue, starting at 4 DAP. The regular progression of this process in both genotypes and in different caryopses indicates that programmed cell death is involved. In the beginning only a few cells died in the placento-chalazal layer underneath the dorsal side of the endosperm (at 4 DAP, endosperm occupied a relatively small space on the ventral side of caryopsis). The death of cells later increased in layers towards the basal part of caryopsis, in the direction of vascular endings in the pedicel, and towards the dorsal part of caryopsis, and was correlated with endosperm expansion. Approximately 20 to 25 layers of cells in maternal tissue died in the period from 4 to 20 DAP in both genotypes. The gap in *mn1* was just the consequence of a diminutive endosperm that did not develop in coordination with normally developed maternal tissue of pericarp and pedicel. Dead cells became almost completely empty, containing only the cell walls and cytoplasmic remains in the form of ribbons. We infer that the programmed death of cells is part of a process that leads to the formation of a special transport system that serves for transport of nutrients from vascular endings in the pedicel to the developing endosperm. In the placento-chalazal layer we observed two zones that were distinguished spatially and temporally by the substances in the cells and the mode of programmed cell death. Programmed cell death in the first zone, located directly

underneath the endosperm, started at 4 DAP, although DNA fragmentation in the nuclei of dying cells was not detectable. Up to 8 DAP, approximately 10 layers of cells died. These cells deposited a special class of hydroxycinnamic acid in their cell walls. These phenolic acids resembled sinapic acid, judged by the colour shift from blue to green of the UV induced autofluorescence in alkaline medium. Programmed cell death in the second zone (underneath the first zone, away from endosperm) started at 8 DAP. In dying cells we observed DNA fragmentation and condensation of nuclei. In the cell walls of these cells a shift in UV induced autofluorescence in alkaline medium from blue to bright blue was seen, characteristic of ferulic and caffeic acid. Very early in development we also observed deposition of flavonoids in the cells of the second zone. Phenolic acids and flavonoids were already deposited in the cells at 8 DAP, in amounts that did not change significantly during later development. Flavonoids could have a role in antimicrobial protection of the developing caryopsis. The pedicellate seed species are known to develop an abscission layer in the placento-chalazal region of caryopsis; however, in maize, this layer no longer has an abscission function in caryopsis. Special substances are deposited in this region that give the placento-chalazal layer a black colour and are thought to terminate transfer of water and nutrients in the mature caryopsis.

The three-dimensional structure of the maize root cap was studied to evaluate quantitatively the relationship between the size of the cells, their endopolyploidy level and the abundance of the sucrose synthase isozyme SUS1. Median longitudinal root cap sections were analysed using immunolocalization, quantitative DNA staining and image cytometry. Both the immunolocalization signal for the SUS1 protein and the endopolyploidy level increased from calyptrogen (root cap meristem) towards the root cap periphery, and were thus highest in the outer cells. Most of these cells had a nuclear DNA content of 8 C or higher, and the largest volumes of all root cap cells. The high amount of SUS1 protein in the outer, endopolyploid cells suggests an association between endoreduplication and the abundance of this enzyme. The outer cells are involved in mucilage production, leading to the proposal that sucrose synthase provides monosaccharide precursors for mucilage synthesis.

8 VIRI

- Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M, Delmer DP. 1995. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 9353-9357.
- Bacic A, Moody SF, Clarke AE. 1986. Structural analysis of secreted root slime from maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiology* 80: 771-777.
- Baluška F, Kubica Š. 1992. Relationship between the content of the basic nuclear proteins, chromatin structure, rDNA transcription and cell size in different tissues of the maize root apex. *Journal of Experimental Botany* 252: 991-996.
- Baker JR, Jordan BJ. 1953. Miscellaneous contributions to microtechnique. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 94: 237-242.
- Barcellona ML, Cardiel G, Gratton E. 1990. Time-resolved fluorescence of DAPI in solution and bound to polydeoxynucleotides. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 170: 270-280.
- Barlow PW. 1975. The root cap. V: *The development and function of roots*. Torrey JG, Clarkson DT (ur.). London, Academic Press: 21-54.
- Barlow PW. 1976. The integrity and organization of nuclear DNA in cells of the root cap of *Zea mays* probed by terminal deoxynucleotidyl transferase and microdensitometry. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 80: 271-278.
- Barlow PW. 1977. The time-course of endoreduplication of nuclear DNA in the root cap of *Zea mays*. *European Journal of Cell Biology* 16: 98-105.
- Barlow PW. 1978. Endopolyploidy: towards an understanding of its biological significance. *Acta Biotheoretica* 27: 1-18.
- Barow M, Meister A. 2003. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy, and genome size. *Plant, Cell and Environment* 26: 571-584.
- Barrieu F, Chaumont F, Chrispeels MJ. 1998. High expression of the tonoplast aquaporin ZmTIP1 in epidermal and conducting tissues of maize. *Plant Physiology* 117: 1153-1163.
- Bedi KS, Goldstein DJ. 1976. Apparent anomalies in nuclear Feulgen-DNA contents. Role of systematic microdensitometric errors. *Journal of Cell Biology* 71: 68-88.
- Beemster GTS, Fiorani F, Inze D. 2003. Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends in Plant Science* 8: 154-158.

- Bengough AG, Iijima M, Barlow PW. 2001. Image analysis of maize root caps – estimating cell numbers from 2-D longitudinal sections. *Annals of Botany* 87: 693-698.
- Bengough AG, McKenzie BM. 1997. Sloughing of root cap cells decreases the frictional resistance to maize (*Zea mays* L.) root growth. *Journal of Experimental Botany* 48: 885-893.
- Bennet MD, Snith JB. 1976. Nuclear DNA amounts in Angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 274 (933): 227-274.
- Berger F. 1999. Endosperm development. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 28-32.
- Bommert P, Werr W. 2001. Gene expression patterns in the maize embryo: clues to decisions in embryo and endosperm development. *Gene* 271: 131-142.
- Bonin PC, Potter I, Vanzin GF, Reiter W-D. 1997. The *MUR1* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalysing the first step in de novo synthesis of GDP-L-fucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 2085-2090.
- Borisjuk L, Walenta S, Weber H, Mueller-Klieser W, Wobus U. 1998. High-resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger. *Plant Journal* 15: 583-591.
- Buckeridge MS, Vergara CE, Carpita NC. 1999. The mechanism of synthesis of a mixed-linkage (1→3),(1→4) β -D-glucan in maize. Evidence for multiple sites of glucosyl transfer in the synthase complex. *Plant Physiology* 120: 1105-1116.
- Bursch W, Paffe S, Putz P, Barthel G, Schultehermann R. 1990. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 11: 847-853.
- Carlson SJ, Chourey PS. 1996. Evidence for plasma membrane-associated forms of sucrose synthase in maize. *Molecular and General Genetics* 252: 303-310.
- Carlson SJ, Chourey PS, Helentjaris T, Datta R. 2002. Gene expression studies on developing kernels of maize sucrose synthase (SuSy) mutants show evidence for a third SuSy gene. *Plant Molecular Biology* 49: 15-29.
- Chaboud A. 1983. Isolation, purification and chemical composition of maize root cap slime. *Plant and Soil* 73: 395-402.
- Chaerle L, Van Der Straeten D. 2001. Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. *Biochimica et Biophysica Acta* 1519: 153-166.
- ChemFinder.Com. 2003. <http://chemfinder.cambridgesoft.com>. Iskalni niz: »TBA«. Zadnji dostop: 24.10.2003.

- Cheng W-H, Taliercio EW, Chourey PS. 1996. The *Miniature1* seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. *The Plant Cell* 8: 971-983.
- Chen YC, Chourey PS. 1989. Spatial and temporal expression of the two sucrose synthase genes in maize: immunohistological evidence. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 553-559.
- Cheng W, Chourey PS. 1999. Genetic evidence that invertase-mediated release of hexoses is critical for appropriate carbon partitioning and normal seed development in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 485-495.
- Chourey PS, Taliercio EW, Carlson SJ, Ruan YL. 1998. Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Molecular and General Genetics* 259: 88-96.
- Clowes FAL. 1976. Cell production by root caps. *New Phytologist* 77: 399-407.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. 2000. Natural products (secondary metabolites). V: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan B, Grissem W, Jones R (ur.). Rockville, American Society of Plant Physiologists: 1250-1318.
- Currier HB. 1957. Callose substance in plant cells. *American Journal of Botany* 44: 478-488.
- Dangl JL, Dietrich RA, Thomas H. 2000. Senescence and programmed cell death. V: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan B, Grissem W, Jones R (ur.). Rockville, American Society of Plant Physiologists: 1044-1100.
- Danon A, Delorme V, Mailhac N, Gallois P. 2000. Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant physiology and Biochemistry* 38: 647-655.
- Deng GR, Wu R. 1983. Terminal transferase – use in the tailing of DNA and for invitro mutagenesis. *Methods in Enzymology* 100: 96-116.
- Doehlert DC, Smith LJ, Duke ER. 1994. Gene expression during maize kernel development. *Seed Science Research* 4: 299-305.
- Dominguez F, Moreno J, Cejudo FJ. 2001. The nucellus degenerates by a process of programmed cell death during the early stages of wheat grain development. *Planta* 213: 352-360.
- Doonan J. 2000. Social controls on cell proliferation in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 482-487.
- Dorweiler J, Stec A, Kermicle J, Doebley J. 1993. Teosinte *glume architecture 1*: a genetic locus controlling a key step in maize evolution. *Science* 262: 233-235.

- Echt CS, Chourey PS. 1985. A comparison of two sucrose synthase isozymes from normal and *shrunk* maize. *Plant Physiology* 79: 530-536.
- Edgar BA, Orr-Weaver TL. 2001. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* 105: 297-306.
- Eschrich W. 1980. Free space invertase: its possible role in phloem unloading. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 93: 363-378.
- Fath A, Bethke P, Lonsdale J, Meza-Romero R, Jones R. 2000. Programmed cell death in cereal aleurone. *Plant Molecular Biology* 44: 255-266.
- Felker FC, Shannon JC. 1980. Movement of ¹⁴C-labeled assimilates into kernels of *Zea mays* L. III. An anatomical examination and microautoradiographic study of assimilate transfer. *Plant Physiology* 65: 864-870.
- Feulgen R, Rossenbeck H. 1924. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure von Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 135: 203-248.
- Fox DP. 1969. Some characteristics of the cold hydrolysis technique for staining plant tissues by the Feulgen reaction. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 17: 266-272.
- Fu H, Park WD. 1995. Sink- and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. *The Plant Cell* 7: 1369-1385.
- Fukuda H. 2000. Programmed cell of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Molecular Biology* 44: 245-253.
- Galitski T, Saldanha AJ, Styles CA, Lander ES, Fink GR. 1999. Ploidy regulation of gene expression. *Science* 285: 251-254.
- Greilhuber J, Ebert I. 1994. Genome size variation in *Pisum sativum*. *Genome* 37: 646-655.
- Greilhuber J, Temsch EM. 2001. Feulgen densitometry: some observations relevant to best practice in quantitative nuclear DNA content determination. *Acta Botanica Croatica* 60: 285-298.
- Guerin J, Carbonero P. 1997. The spatial distribution of sucrose synthase isozymes in barley. *Plant Physiology* 114: 55-62.
- Giuliani C, Consonni G, Gavazzi G, Colombo M, Dolfini S. 2002. Programmed cell death during embryogenesis in maize. *Annals of Botany* 90: 287-292.
- Gunawardena AHLAN, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR, Evans DE. 2001. Characterization of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta* 212: 205-214.

- Haberlandt G. 1884. *Physiologische Pflanzenanatomie*. Leipzig, W. Engelmann.
- Harborne JB. 1998. *Phytochemical methods. 3rd edition*. London, Chapman and Hall: 302 str.
- Harris PJ, Northcote DH. 1970. Patterns of polysaccharide biosynthesis in differentiating cells of maize root-tips. *Biochemical Journal* 120: 479-491.
- Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao X. 2000. The role of root border cells in plant defense. *Trends in Plant Science* 5: 128-133.
- Heiser CB. 1990. *Seed to civilization, the story of food*. Harvard University Press: 240 str.
- Jacobs T. 1997. Why do plant cells divide? *Plant Cell* 9: 1021-1029.
- Jang J, Sheen J. 1997. Sugar sensing in higher plants. *Trends in Plant Science* 2: 208-214.
- Jensen WA. 1962. *Botanical Histochemistry – principles and practice*. University of California, Berkeley. W. H. Freeman and Company: 408 str.
- Johansen DA. 1940. *Plant Microtechnique*. New York, McGraw-Hill.
- Jones RJ, Roessler J, Ouattar S. 1985. Thermal environment during endosperm cell-division in maize – effects on number of endosperm cells and starch granules. *Crop Science* 25: 830-834.
- Jork H, Funk W, Fischer W, Wimmer H. 1989. *Dünnschicht-Chromatographie, Reagenzien und Nachweismethoden (Band 1a)*. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft: 468 str.
- Joubès J, Chevalier C. 2000. Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology* 43: 735-745.
- Juniper BE, Clowes FAL. 1965. Cytoplasmic organelles and cell growth in root caps. *Nature* 208: 864-865.
- Kaplan DR. 1992. The relationship of cells to organisms in plants: Problems and implications of an organismal perspective. *International Journal of Plant Science* 153: S28-S37.
- Kiesselbach TA. 1949. The structure and reproduction of corn. *University of Nebraska Agricultural Experiment Station Research bulletin* 161: 1-96.
- Kladnik A. 1999. Lokalizacija genske ekspresije nekaterih encimov sladkornega metabolizma v tkivih koruze (*Zea mays* L.). Diplomsko naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.
- Koch KE, Nolte KD, Duke ER, McCarthy DR, Avigne WT. 1992. Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *The Plant Cell* 4: 59-69.

- Koch KE. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 509-540
- Kondorosi E, Roudier F, Gendreau E. 2000. Plant cell-size control: growing by ploidy? *Current Opinion in Plant Biology* 3: 488-492.
- Kowles RV, Phillips RV. 1985. DNA amplification patterns in maize endosperm nuclei during kernel development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82: 7010-7014.
- Kowles RV, Phillips RV. 1988. Endosperm development in maize. *International Review of Cytology* 112: 97-136.
- Kowles RV, Srienc F, Phillips RL. 1990. Endoreduplication of nuclear DNA in the developing maize endosperm. *Developmental Genetics* 11: 125-132.
- Kowles RV, McMullen MD, Yerk G, Phillips RL, Kraemer S, Srienc F. 1992. Endosperm mitotic activity and endoreduplication in maize affected by defective kernel mutations. *Genome* 35: 68-77.
- Krishnamurthy KV, Krishnaraj R, Chozhavendan R, Samuel Christopher F. 2000. The programme of cell death in plants and animals – A comparison. *Current Science* 79: 1169-1181.
- Kubista M, Akerman B, Norden B. 1987. Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry* 26: 4545-4553.
- Kudo N, Kimura Y. 2002. Nuclear DNA endoreduplication during petal development in cabbage: relationship between ploidy levels and cell size. *Journal of Experimental Botany* 53: 1017-1023.
- Larkins BA, Dilkes BP, Dante RA, Coelho CM, Woo YM, Liu Y. 2001. Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *Journal of Experimental Botany* 52: 183-192.
- Lichtenthaler HK, Schweiger J. 1998. Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *Journal of Plant Physiology* 152: 272-282.
- Linnestad C, Doan DNP, Brown RC, Lemmon BE, Meyer DJ, Jung R, Olsen OA. 1998. Nucellain, a barley homolog of the dicot vacuolar-processing protease, is localized in nucellar cell walls. *Plant Physiology* 118: 1169-1180.
- Lowe J, Nelson OE, Jr. 1946. Miniature seed – a study in the development of a defective caryopsis in maize. *Genetics* 31: 525-533.
- Maness NO, McBee GG. 1986. Role of placental sac in endosperm carbohydrate import in sorghum caryopses. *Crop Science* 26: 1201-1207.

- Martinčič A, Wraber T, Jogan N, Ravnik V, Podobnik A, Turk B, Vreš B. 1999. *Mala Flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 845 str.
- Matérn B. 1960. *Medd Statens Skogsforskningsinst* 49: 1-144.
- Matsuyama T, Satoh H, Yamada Y, Hashimoto T. 1999. A maize glycine-rich protein is synthesized in the lateral root cap and accumulates in the mucilage. *Plant Physiology* 120: 665-647.
- Mauseth JD. 1988. *Plant Anatomy*. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.: 560 str.
- Melaragno JE, Mehrotra B, Coleman AW. 1993. Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of Arabidopsis. *Plant Cell* 5: 1661-1668.
- Miller ME, Chourey PS. 1992. The maize invertase-deficient *miniature-1* seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development. *Plant Cell* 4: 297-305.
- Moore DJ, Jones DD. 1967. Golgi apparatus mediated polysaccharide secretion by outer root cap cells of *Zea mays*. *Planta* 74: 286-301.
- Motulsky H. 1995. *Intuitive Biostatistics*. Oxford University Press: 386 str.
- Nagl W. 1976. DNA endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies. *Nature* 261: 614-615.
- Neuffer MG, Coe EH, Wessler SR. 1997. *The Mutants of Maize*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 468 str.
- Obara K, Kuriyama H, Fukuda H. 2001. Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in zinnia. *Plant Physiology* 125: 615-626.
- Olsen OA, Linnestad C, Nichols SE. 1999. Developmental biology of the cereal endosperm. *Trends in Plant Science* 4: 253-257.
- Offler CE, Liet E, Sutton EG. 1997. Transfer cell induction in cotyledons of *Vicia faba* L. *Protoplasma* 200: 51-64.
- Opsahl-Ferstad H-G, Le Deunff E, Dumas C, Rogowsky PM. 1997. *ZmEsr*, a novel endosperm-specific gene expressed in a restricted region around the maize embryo. *Plant Journal* 12: 235-246.
- Osborn HMI, Lochey F, Mosley L, Read D. 1999. Analysis of polysaccharides and monosaccharides in the root mucilage of maize (*Zea mays* L.) by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 831: 267-276.
- Pennel RI, Lamb C. 1997. Programmed cell death in plants. *Plant cell* 9: 1157-1168.

- Pilet PE. 1986. Importance of the cap in maize root growth. *Planta* 169: 600-602.
- Pirard E, Lebrun V, Nivart J-F. 1999. Optimal acquisition of video images in reflected light microscopy. *European Microscopy and Analysis*, July 1999: 9-11.
- Ponce G, Lujan R, Campos ME, Reyes A, Nieto-Sotelo J, Feldman LJ, Cassab GI. 2000. Three maize root-specific genes are not correctly expressed in regenerated caps in the absence of the quiescent center. *Planta* 211: 23-33.
- Porter GA, Knievel DP, Shannon JC. 1985. Sugar efflux from maize (*Zea-mays*-L) pedicel tissue. *Plant Physiology* 77: 524-531.
- Promega Enzyme resource guide, Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. 2003. http://www.promega.com/guides/polym_guide/tdt.pdf. Zadnji dostop: 24.10.2003
- Puech M, Giroud F. 1999. Standardisation of DNA quantitation by image analysis: quality control of instrumentation. *Cytometry* 36: 11-17.
- Raghavan V. 2003. Some reflections on double fertilization, from its discovery to the present. *New Phytologist* 159: 565-583.
- Ricard B, VanToai T, Chourey P, Saglio P. 1998. Evidence for the critical role of sucrose synthase for anoxic tolerance of maize roots using a double mutant. *Plant Physiology* 116: 1323-1331.
- Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JMS, Murray JAH. 2000. Sugar control of the plant cell cycle: Differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Molecular and Cellular Biology* 20: 4513-4521.
- Rosche E, Blackmore D, Tegeder M, Richardson T, Schroeder H, Higgins TJV, Frommer WB, Offler CE, Patrick JV. 2002. Seed-specific overexpression of a potato sucrose transporter increases sucrose uptake and growth rates of developing pea cotyledons. *Plant Journal* 30: 165-175.
- Roscher A, Emsley L, Raymond P, Roby C. 1998. Unidirectional steady state rates of central metabolism enzymes measured simultaneously in a living plant tissue. *Journal of Biological Chemistry* 273: 25053-25061.
- Rowland LJ, Chen YC, Chourey PS. 1989. Anaerobic treatment alters the cell specific expression of *Adh-1*, and *Sus* genes in roots of maize seedlings. *Molecular and General Genetics* 218: 33-40.
- Roy SS, Mitra B, Sharma S, Das TK, Babu CR. 2002. Detection of root mucilage using an anti-fucose antibody. *Annals of Botany* 89: 293-299.
- Ruan Y-L, Chourey PS, Delmer DP, Perez-Grau L. 1997. The differential expression of sucrose synthase in relation to diverse patterns of carbon partitioning in developing cotton seed. *Plant Physiology* 115: 375-385.

- Russ JC. 1999. *The image processing handbook, third edition*. CRC Press in Springer-Verlag: 771 str.
- Schel JHN, Kieft H, Van Lammeren AAM. 1984. Interactions between embryo and endosperm during early developmental stages of maize caryopsis (*Zea mays*). *Canadian Journal of Botany* 62: 2842-2853.
- Schweizer L, Yerk-Davis GL, Phillips RL, Srienc F, Jones RJ. 1995. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 7070-7074.
- Serna A, Maitz M, O'Connell T, Santandrea G, Thevissen K, Tienens K, Hueros G, Falieri C, Cai G, Lottspeich F, Thompson RD. 2001. Maize endosperm secretes a novel antifungal protein into adjacent maternal tissue. *Plant Journal* 25: 687-698.
- Setter TL, Flannigan BA. 2001. Water deficit inhibits cell division and expression of transcripts involved in cell proliferation and endoreduplication in maize endosperm. *Journal of Experimental Botany* 52: 1401-1408.
- Shannon JC. 1968. Carbon-14 distribution in carbohydrates of immature *Zea mays* kernels following $^{14}\text{CO}_2$ treatment of intact plants. *Plant Physiology* 43: 1215-1220.
- Shannon JC. 1972. Movement of ^{14}C -labeled assimilates into kernels of *Zea mays*. L. I. Pattern and rate of sugar movement. *Plant Physiology* 49: 198-202.
- Shannon JC, Porter GA, Knievel DP. 1986. Phloem unloading and transfer of sugars into developing corn endosperm. V: *Phloem transport*. Cronshaw J, Lucas WJ in Giaquinta RT (ur.). Alan R. Liss, Inc.: 265-277.
- Sievers A, Braun M. 1996. The root cap: structure and function. V: *Plant Roots: The Hidden Half, second edition*. Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (ur.). Marcel Dekker Inc.: 31-49.
- Smeekens S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 49-81.
- Stals H, Inze D. 2001. When plant cells decide to divide. *Trends in Plant Science* 6: 359-364
- Stuppy WH, Maisano JA, Colbert MW, Rudall PJ, Rowe TB. 2003. Three-dimensional analysis of plant structure using high-resolution X-ray computed tomography. *Trends in Plant Science* 8: 2-6.
- Sturm A. 1999. Invertase. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* 121: 1-7.
- Sturm A, Tang G-Q. 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science* 4: 401-407.

- Swift H. 1950. The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 36: 643-654.
- Thompson RD, Hueros G, Becker H-A, Maitz M. 2001. Development and functions of seed transfer cells. *Plant Science* 160: 775-783.
- Thorne JH. 1985. Phloem unloading of C and N assimilates in developing seeds. *Annual Reviews of Plant Physiology* 36: 317-343.
- Traas J, Hülskamp M, Gendreau E, Höfte H. 1998. Endoreduplication and development: rule without dividing? *Current Opinion in Plant Biology* 1: 498-503.
- Tsai CY, Salamini F, Nelson OE. 1970. Enzymes of carbohydrate metabolism in the developing endosperm of maize. *Plant Physiology* 46: 299-306.
- Tschermak-Woess E, Enzenberg-Kunz U. 1965. Die Struktur der hoch endopolyploiden Kerne im Endosperm von *Zea mays*, das auffallende Verhalten der Nukleolen und ihr Endopolyploidiegrad. *Planta* 64: 149-169.
- Tsukaya H. 2002. Interpretation of mutants in leaf morphology: Genetic evidence for a compensatory system in leaf morphogenesis that provides a new link between cell and organismal theories. *International Review of Cytology – A Survey of Cell Biology* 217: 1-39.
- Vilhar B, Dermastia M. 2002. Standardisation of instrumentation in plant DNA image cytometry. *Acta Botanica Croatica* 61: 11-26.
- Vilhar B, Greilhuber J, Dolenc Koce J, Tensch EM, Dermastia M. 2001. Plant genome size measurement with DNA image cytometry. *Annals of Botany* 87: 719-728.
- Wang H, Li J, Bostock RM, Gilchrist DG. 1996. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell* 8: 375-391.
- Weatherwax, 1954. *Indian corn in old America*. New York, The MacMillan Company: 253 str.
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. 1996. Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. *Plant Journal* 10: 823-834.
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. 1997. Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in Plant Science* 2: 169-174.
- Young TE, Gallie DR, DeMason DA. 1997. Ethylene-mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild type and *shrunk2* genotypes. *Plant Physiology* 115: 737-751.

- Young TE, Gallie DR. 2000. Programmed cell death during endosperm development. *Plant Molecular Biology* 44: 283-301.
- Zeng Y, Wu Y, Avigne WT, Koch KE. 1998. Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses. *Plant Physiology* 116: 1573-1583.
- Zhou Y. 2000. Development and assimilate partitioning in wildtype and *miniature* phenotype maize kernels. Doktorska disertacija. *The Pennsylvania State University, College of Agricultural Sciences, ZDA.*

9 ZAHVALA

Za odlično mentorstvo se zahvaljujem prof. dr. Marini Dermastia.

Doc. dr. Barbari Vilhar se zahvaljujem za izdelavo 3-D modela endosperma, poučevanje mikroskopije, neprecenljivo pomoč pri delu in dobre diskusije.

Zahvaljujem se prof. dr. Premu Choureyu, da me je gostil v svojem laboratoriju in mi omogočil dobiti veliko novega znanja.

Za pomoč v laboratoriju 'čez lužo' se zahvaljujem Karen Chamusco, Susan Carlson, Earlu Talierciu, Melanie Cash, Rupali Datta in Wayneu Juricku.

Zahvaljujem se dr. Andreju Blejcu za pomoč pri 3-D modeliranju, dr. Nejcu Joganu za pomoč pri botanični terminologiji in vsem na Katedri za Botaniko za dobro sodelovanje.

Hvala Lukatu za stoično prenašanje vseh mojih zahtev po kemikalijah in prostoru za delo v histološkem laboratoriju.

Hvala Švabu, Janji in Matevžu za kratkočasne pogovore, vzpodbude in pomoč.

Pozdrav svima Balkancima iz Gejnsvila, še posebej pa sem hvaležen Aleksi Obradoviću in njegovi družini.

Zahvaljujem se svoji in Sanjini familiji, da so mi dajali streho nad glavo, spodbudo v glavo in hrano v želodec.

Hvala moji najdražji Sanji, da si me vedno znova spominjala, da je treba tudi uživati!

10 PRILOGE

Priloga A

Objavljen znanstveni članek:

Vilhar B, Kladnik A, Blejec A, Chourey PS, Dermastia M. 2002. Cytometrical evidence that the loss of seed weight in the *miniature1* seed mutant of maize is associated with reduced mitotic activity in the developing endosperm. *Plant Physiology* 129: 23-30.

Cytometrical Evidence That the Loss of Seed Weight in the *miniature1* Seed Mutant of Maize Is Associated with Reduced Mitotic Activity in the Developing Endosperm¹

Barbara Vilhar, Aleš Kladnik, Andrej Blejec, Prem S. Chourey, and Marina Dermastia*

Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Vecna pot 111, SI-1001 Ljubljana, Slovenia (B.V., A.K., M.D.); National Institute of Biology, Vecna pot 111, SI-1001 Ljubljana, Slovenia (A.B.); and University of Florida and United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Gainesville, Florida, 32611-0680 (P.S.C.)

"If you know a thing only qualitatively, you know it no more than vaguely. If you know it quantitatively—grasping some numerical measure that distinguishes it from an infinite number of other possibilities—you are beginning to know it deeply." (C. Sagan, *Billions and Billions*, 1997).

Using new approaches to quantitative image analysis, we provide the first direct evidence, to our knowledge, that loss of seed weight in the maize (*Zea mays*) *miniature1* (*mn1*) seed mutant is associated with reduced mitotic activity and inhibited cell expansion, whereas there are no alterations in the progress of endoreduplication in the mutant compared with the wild-type endosperm. Furthermore, we contribute substantial new information about the spatial distribution of various developmental processes at the cellular level in the maize endosperm.

Enlargement of the maize endosperm relies upon two cellular processes: cell division and cell expansion, which is in turn related to endoreduplication of nDNA (Kondorosi et al., 2000; Larkins et al., 2001). Intense mitotic activity occurs between 8 and 14 DAP (days after pollination; Kowles and Phillips, 1985; Schweizer et al., 1995). Cell division ceases in the central endosperm by about 12 DAP, but continues until late developmental stages in the peripheral cell layers, away from the embryo (Kiesselbach, 1949; Kowles and Phillips, 1985, 1988). Endoreduplication begins at 10 DAP (Kowles and Phillips, 1985; Schweizer et al., 1995). The highest nDNA amount, expressed as C value, is typically 96C to 192C, as quantified by measurements of the nuclear volume (Tschermak-Woess and Enzenberg-Kunz, 1965), Feulgen cytophotometry (Kowles and Phillips, 1985),

and flow cytometry (Kowles et al., 1992; Schweizer et al., 1995; Larkins et al., 2001; Settler and Flannigan, 2001). In the period between 12 and 15 DAP, storage products start to accumulate (Tsai et al., 1970). The total number of endosperm cells at 16 DAP has been measured with flow cytometry (Kowles et al., 1992; Schweizer et al., 1995; Settler and Flannigan, 2001) or with nuclei counts after digestion of the endosperm with cell wall degrading enzymes (Jones et al., 1985) and is estimated to be 54,000 to 700,000.

The *mn1* seed mutant shows a drastic reduction in endosperm size compared with that of the wild type, *Mn1*, with the weight of the mature *miniature* endosperm being only 20% that of the wild type (Lowe and Nelson, 1946). The causal basis of the *mn1* seed phenotype is the loss of cell wall invertase, INCW2, encoded by the *Mn1* gene (Miller and Chourey, 1992; Cheng et al., 1996), which is specifically expressed at the base of the endosperm (Cheng et al., 1996). In both maize and fava bean (*Vicia faba*), cell wall invertase cleavage of Suc during the early stages of seed development is believed to play a critical role in providing hexose sugars to maintain mitotic division and only a minor role in providing substrates for starch biosynthesis (Weber et al., 1997; Cheng and Chourey, 1999). Indirect evidence suggests that in the maize endosperm, the peak of INCW2 activity at 12 DAP temporally coincides with the phase of intense cell divisions in the endosperm (Cheng et al., 1996; Cheng and Chourey, 1999). However, it has never been directly demonstrated that INCW2 deficiency in the *mn1* maize endosperm is associated with reduced mitotic activity.

To investigate whether the small size of the *mn1* endosperm is a consequence of impaired mitosis, cell expansion, or endoreduplication, we compared cytological parameters in homozygous *Mn1* (wild-type) and *mn1* (*miniature*) kernels of the W22 inbred line of maize harvested at 16 DAP. We analyzed the spatial distribution of cells by sizes and endopolyploidy levels (C values) in longitudinal sections of the endosperm using image cytometry. On the basis of the longitudinal sections, we constructed a three-dimensional (3-D) model of the endosperm.

¹ This work was supported by the USA-Slovenia cooperation in science and technology grant no. 331-01-838050 and Mercator d.d. (travel grant). A.K. is a recipient of a PhD grant from the Ministry of Education, Science, and Sport (Republic of Slovenia; grant no. S1-487-001/20070/99). This paper is Florida Agricultural Experimental Journal Series no. R-08656.

* Corresponding author; e-mail marina.dermastia@uni-lj.si; fax 386-12573390.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.001826.

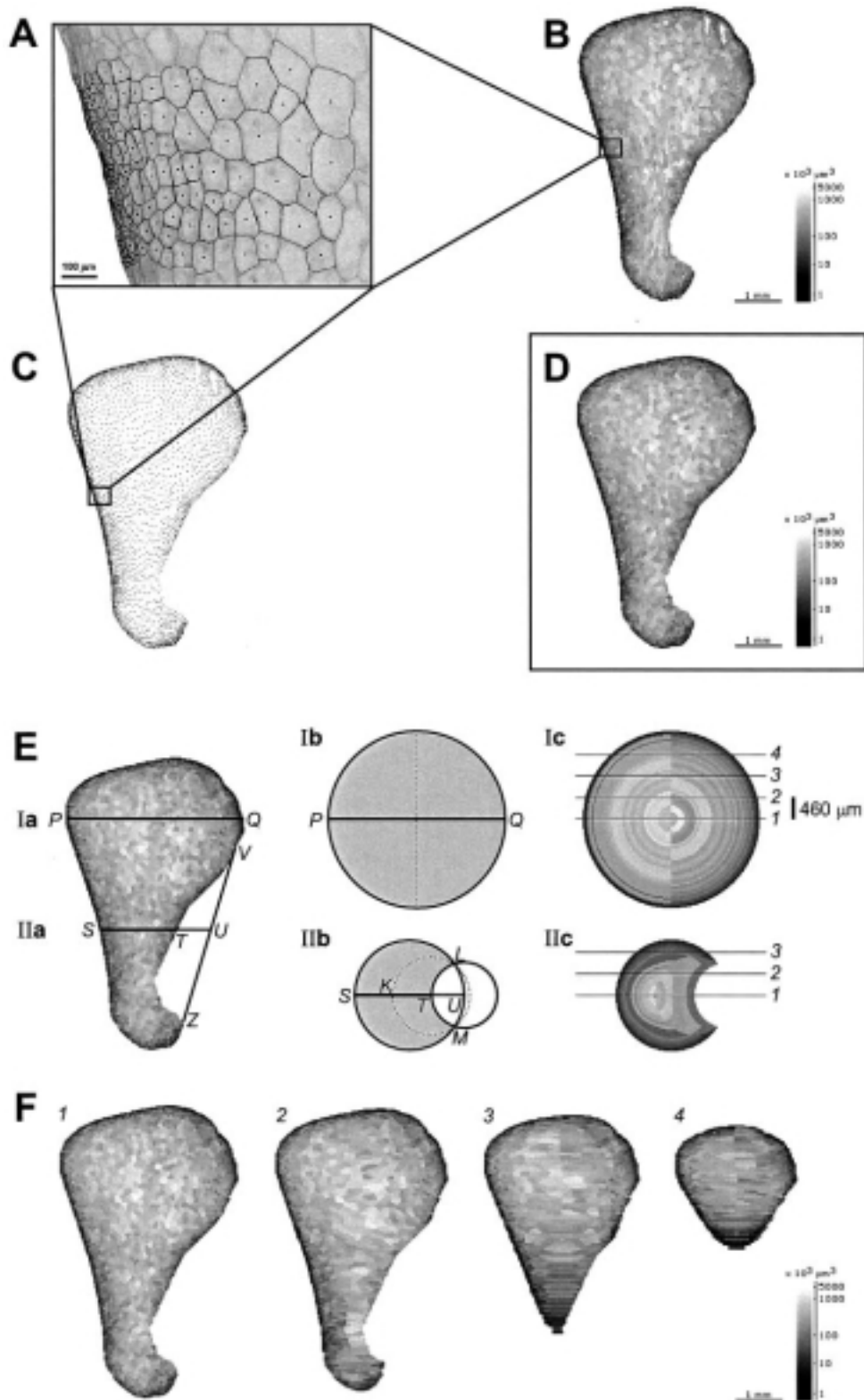


Figure 1. Construction of the 3-D model of the endosperm. A through D, Estimation of cell volume and nDNA amount on the 2-D longitudinal section. E and F, Extrapolation from 2-D data to the 3-D endosperm model. For explanation of figures, see “The 3-D Model of the Endosperm.”

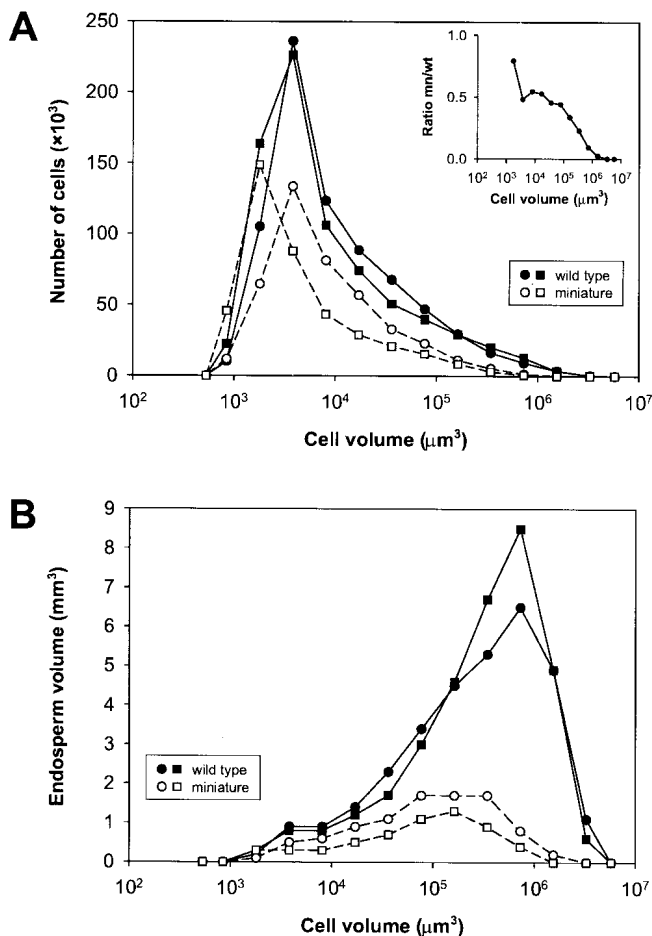


Figure 2. Structure of the wild type and the *miniature* endosperm in relation to the cell volume. Two 16-DAP kernels of each genotype were compared using the 3-D model of the endosperm. A, Distribution of cell volumes in the endosperm. Inset shows the ratio between the mean number of cells in the *miniature* and in the wild-type endosperm at respective cell volume classes. B, Volume of endosperm occupied by cells with different cell volumes. A and B, Wild-type kernel no. 1 (●; total number of cells 738,000; total endosperm volume 31.4 mm^3); wild-type kernel no. 2 (■; 751,000 cells; 33.2 mm^3); *miniature* kernel no. 1 (○; 422,000 cells; 9.3 mm^3); and *miniature* kernel no. 2 (□; 404,000 cells; 6.0 mm^3). Cell volume is shown in logarithmic scale.

THE 3-D MODEL OF THE ENDOSPERM

The endosperm model was based on measurement of the cell area and nDNA amount on the endosperm median longitudinal section. The same Feulgen-stained section was used for cell area and nDNA amount measurements. Image analysis instrumentation was as by Vilhar et al. (2001). For all described measurements, we developed macros based on the KS400 image analysis software package (Carl Zeiss Vision, Munich).

To estimate the cell volume and nDNA amount on the two-dimensional (2-D) longitudinal section (Fig. 1, A–D), we interactively outlined the cell walls of individual cells on the image grabbed from a microscope (Fig. 1A). For each cell, we recorded its posi-

tion (centroid coordinates shown as dots in Fig. 1A) and measured the cell area. The cell volume was estimated from the cell area, assuming that each cell was a sphere. The cell volume data were shown as gray values on the image (Fig. 1B). To overcome the problem of missing data (areas where no cells have been outlined; white regions in Fig. 1B), the image of the longitudinal section was reconstructed with the virtual cellularization method (Fig. 1D), an adapted version of the random sets mosaic method (Matérn, 1960). Each pixel in the endosperm was assigned to its nearest cell outline centroid (Fig. 1C), which led to separation of the endosperm into virtual cells. To each virtual cell, the cell volume of its respective centroid was assigned. The cell volumes were displayed as gray values (Fig. 1D; note the almost identical pattern of gray values in B and D and the absence of areas with missing data in D compared with B). A similar procedure, based on C-value data instead of cell area, was used to construct the image showing nDNA amounts. Hence, using virtual cellularization, both the cell volume and the C value were assigned to each virtual cell on the analyzed section.

The next step of model construction was extrapolation from 2-D data to the 3-D endosperm model (Fig. 1, E and F). The image shown in Figure 1D was the 2-D basis for estimation of distribution of cells in 3-D. The longitudinal section was, in essence, rotated around its longitudinal axis. To correct for the irregular 3-D shape of the endosperm, the endosperm was not rotated as a whole. Instead, the image of the longitudinal section was sliced along the y axis, with slice thickness of 1 pixel. For each pixel line (Fig. 1E, Ia line PQ and IIa line ST), a virtual cross-section composed of voxels was created (Fig. 1E, Ib and IIb). The area of the virtual cross-section was filled in with gray values (Fig. 1E, Ic and IIc) on the basis of the gray-value profile along the selected pixel line. For pixel lines in the regions without the embryo pocket, the assumed cross section was a circle with the diameter equal to distance PQ (Fig. 1E, Ia and Ib). The gray-value profile was rotated for $\pm 90^\circ$, resulting in concentric bands of voxels with the same gray value (Fig. 1E, Ic). For pixel lines in the region with the embryo pocket, the extreme points at the top and bottom of the embryo pocket were first connected with a straight line (Fig. 1E, line VZ). The distance TU was assumed to be the radius of the embryo pocket circle, whereas the distance SU corresponded to the diameter of the endosperm circle (Fig. 1E, IIa and IIb). The sizes of cells surrounding the embryo pocket were different from the outer layers of the endosperm bordering with the pericarp (Fig. 5A). Hence, the "region of embryo influence" was defined as a circle based on three points (Fig. 1E, IIb, dashed line): the midpoint of the gray-value profile (K) and the intercepts between the endosperm circle

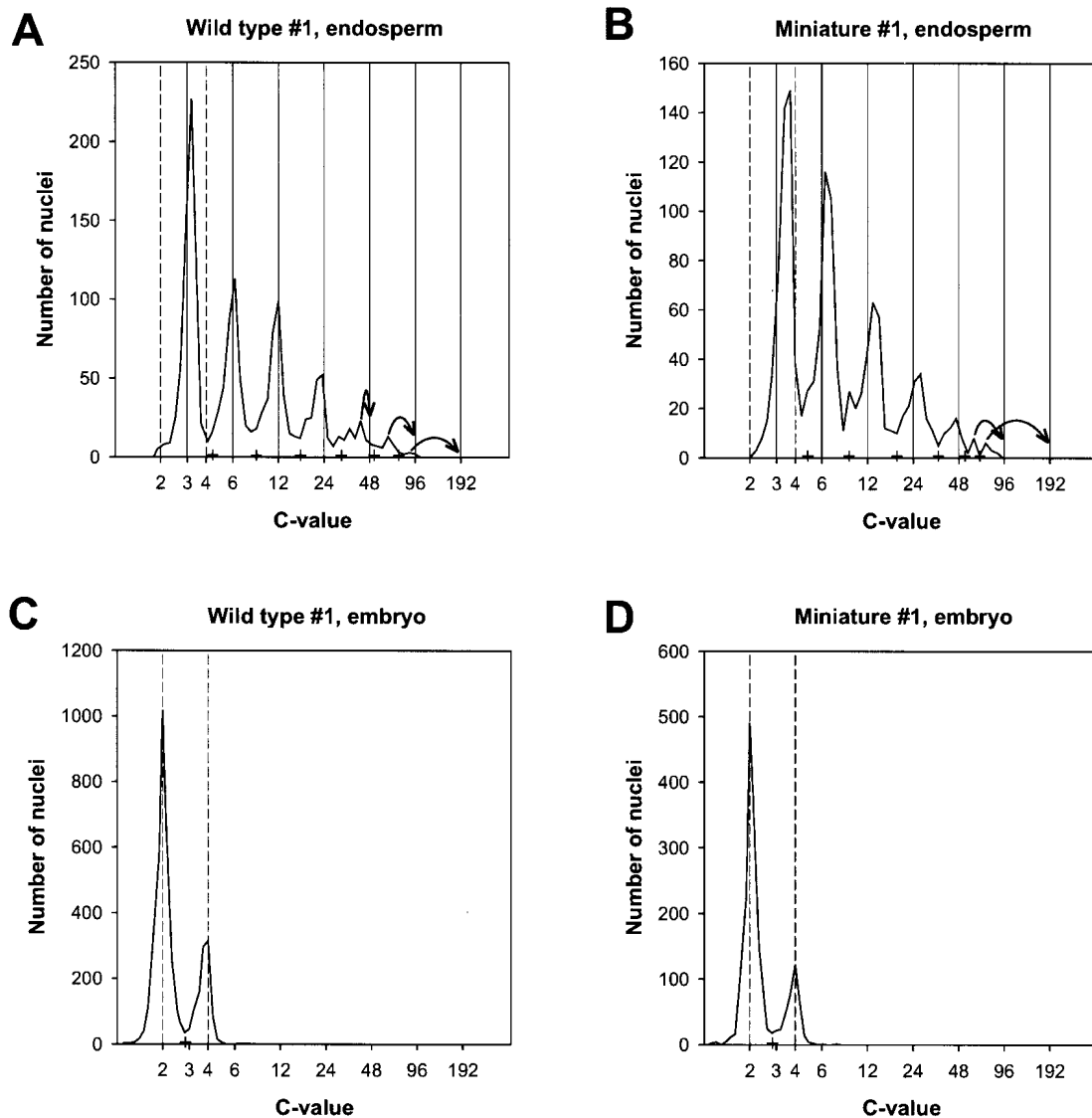


Figure 3. Frequency distribution of nDNA amounts in longitudinal sections of the wild type (A and C) and the *miniature* mutant (B and D) in endosperm (A and B) and in embryo (C and D) of 16-DAP kernels. DNA was quantitatively stained with the Feulgen reaction (Greilhuber and Ebert, 1994), and permanent slides were prepared (Vilhar et al., 2001; the KS400 protocol). For each nucleus, tissue type (embryo or endosperm), position (centroid coordinates of the nucleus), nuclear area, and nDNA amount were recorded. nDNA amount was measured with DNA image cytometry following the interphase-peak method (Vilhar et al., 2001; Vilhar and Dermastia, 2002). The distribution of nDNA amounts for the embryo cells (C and D) showed two peaks, corresponding to the 2C and 4C value (dashed lines). The mode of the embryo 2C peak was used as an internal calibration standard for conversion of the nDNA amount data from arbitrary units to C values. The limits between two consecutive peaks were set at midpoint between their modes (crosses on the x axis), allowing each nucleus to be assigned to a certain DNA replication level (C-value class). Arrows on A and B indicate misplacing of the high C-value peaks. At high C values, a part of the nucleus was not contained on the section, because the nuclear diameter was larger than section thickness (20 μm). A, 1,658 nuclei; B, 1,331 nuclei; C, 4,231 nuclei were measured; and D, 1,862 nuclei.

and the embryo pocket circle (*L* and *M*). The gray-value bands were fitted into the virtual cross section (example in Fig. 1E, IIc). The gray values from *KT* were used for voxels within the region of embryo influence, and those from *SK* were used for all other endosperm voxels. Examples of virtual serial longitudinal sections generated with the described 3-D model are presented in Figure 1F (1, 2, 3, and 4

correspond to respective labels in Fig. 1E). The described 3-D model of the endosperm enabled construction of frequency distribution of the voxel gray values, which was used to estimate the total number of cells in the endosperm. The number of cells at different endopolyploidy levels was calculated according to the above procedure, using the images shown in Figure 5B as the basis for 3-D modeling.

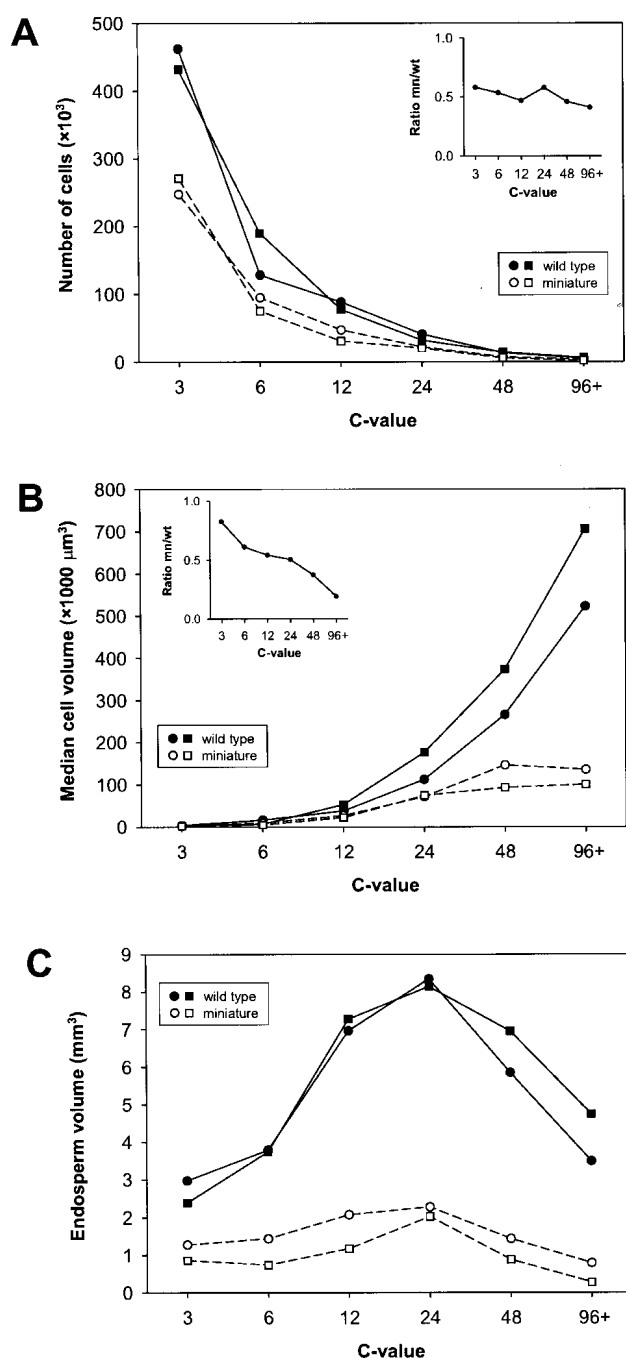


Figure 4. Structure of the wild type and the *miniature* endosperm in relation to DNA replication levels. Two 16-DAP kernels of each genotype were compared using the 3-D model of the endosperm. A, Distribution of cells belonging to different C-value classes; inset shows the ratio between the number of cells in the *miniature* and in the wild-type endosperm at respective C-value classes. B, The median cell volume of cells belonging to different C-value classes; inset shows the ratio between the median cell volume in the *miniature* and in the wild-type endosperm at respective C-value classes. The ratio shown in insets was calculated on the basis of the mean value of the respective parameters for each genotype. C, Volume of endosperm occupied by cells belonging to different C-value classes. A through C, Wild-type kernel nos. 1 and 2 (● and ■); *miniature* kernel nos. 1 and 2 (○ and □). The data for the 96C and the 192C class were pooled together due to a small number of cells. C value is shown in logarithmic scale.

CYTOLOGICAL PARAMETERS IN THE WILD TYPE AND *MINIATURE* ENDOSPERM

The total endosperm volume, estimated with the 3-D model, was 31 mm^3 consisting of 740,000 cells in the wild-type kernel and 8 mm^3 with 410,000 cells in the *miniature* kernel. Compared with the wild type, the number of cells in the *miniature* endosperm was 55%, whereas the endosperm volume was only 25%, indicating that in addition to impaired cell proliferation, there is also a reduction in the cell size contributing to the smallness of the *mn1* endosperm (Fig. 2).

The distribution of cell volumes was asymmetrical in both genotypes, with the majority of cells having a relatively small cell volume (Fig. 2A). However, compared with wild type, the *miniature* endosperm was deficient in the number of large cells (Fig. 2A, inset). Although most of the endosperm was occupied by large cells in both genotypes, increasing deficiency in the number of cells at increasing cell size resulted in the severely decreased total volume of the *miniature* endosperm (Fig. 2B).

At least six endoreduplication cycles were completed by 16 DAP in the endosperm of both genotypes (Fig. 3), showing that the progress of endoreduplication was not affected in the *miniature* endosperm compared with the wild type. The distribution of cells at a certain endopolyploidy level (C-value class) showed the same pattern in both genotypes (Fig. 4A), except that the number of cells in each C-value class in the *miniature* endosperm was only 40% to 60% that of the wild type (Fig. 4A, inset), in agreement with the overall deficiency in the total number of cells in the *miniature* endosperm (Fig. 2). In a previous study, 35 defective kernel mutants in maize (Kowles et al., 1992) were found to have both reduced cell numbers and reduced endopolyploidy levels, with the exception of one mutant that had a reduced cell number but functional endoreduplication. The *miniature* mutant is another example of the latter type of defective kernel mutation. Reduced number of cells together with functional endoreduplication in the *miniature* endosperm demonstrates that mitosis and endoreduplication are not directly coupled processes in the maize endosperm, as previously noted by Kowles et al. (1992).

A positive correlation between the cell volume and the amount of nDNA in both genotypes showed that cell enlargement and endoreduplication are interdependent processes (Fig. 4B). However, the median cell volume at each endopolyploidy level was smaller in the *miniature* than in the wild-type endosperm. The ratio between the cell volume in the *miniature* and the wild-type endosperm decreased with increasing endopolyploidy level (Fig. 4B, inset), indicating that in the *miniature* mutant cell expansion was particularly impaired at high endopolyploidy levels. Cells at 12C to 48C values occupied the largest part of the endosperm volume in both genotypes. Nevertheless, the absolute endosperm volume belonging to each

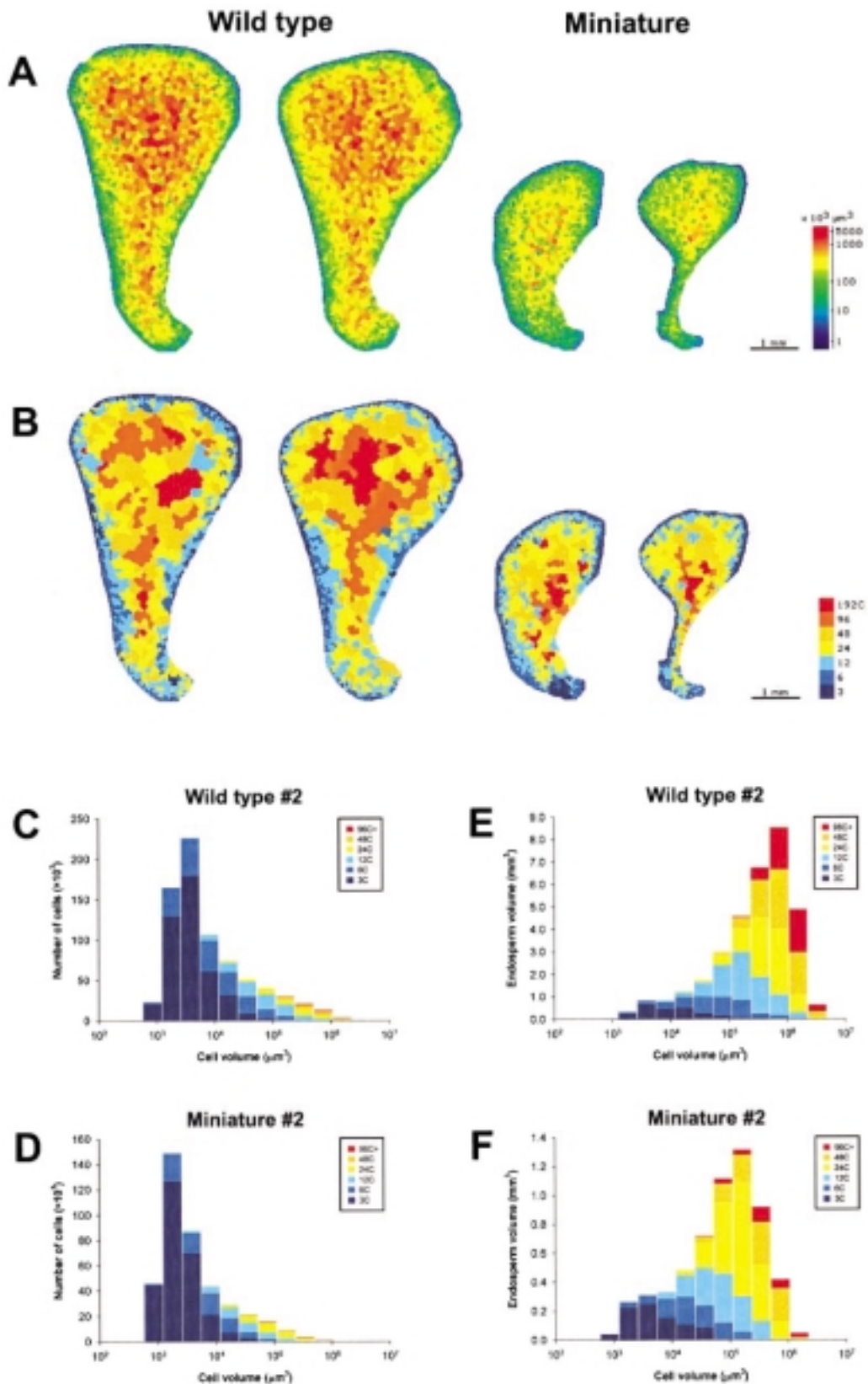


Figure 5. Structure of the wild-type and the *miniature* endosperm. Two 16-DAP kernels of each genotype were compared. A, Spatial distribution of cells with different volumes on the longitudinal section of the endosperm; images generated with the virtual cellularization method; for better visual perception, cell volumes calculated as gray values (see Fig. 1D) are shown (Legend continues on facing page.)

Figure 5. (Legend continued from facing page.)

in pseudocolor scale. Sections from left to right, Wild-type kernel no. 1 (3,788 cells were outlined on the longitudinal section), wild-type kernel no. 2 (3,592 cells), *miniature* kernel no. 1 (2,974 cells), and *miniature* kernel no. 2 (2,660 cells). B, Spatial distribution of cells at different DNA replication levels on the longitudinal section of the endosperm; images generated with the virtual cellularization method; C values are shown in pseudocolor scale; sequence of sections is the same as in A. C and D, Stacked histograms showing the number of cells in relation to the cell volume and the DNA replication level. E and F, Stacked histograms showing the endosperm volume occupied by cells with different cell volumes and the DNA replication levels. C through F, Data obtained with the 3-D model of the endosperm; the data for the 96C and the 192C class were pooled together due to a small number of cells.

endopolyploidy level was smaller in the *miniature* than in the wild-type kernel (Fig. 4C), due to a combined effect of a reduced number of cells and a reduced cell size.

The histograms in Figure 5, C through F, show the complex relationship among the number of cells, the cell size, and the endopolyploidy level in the maize endosperm. The structural patterns were similar in both investigated genotypes with two exceptions: The *miniature* endosperm was characterized by smaller cells at respective endopolyploidy levels than the wild type, and by the absence of the largest cells. Although large cells at higher endopolyploidy levels were not numerous in either genotype, they contributed most to the final volume of the endosperm and were, thus, essential for endosperm enlargement. For example, only 7% of cells in the wild-type kernel had the nDNA amount of 24C value or higher, but these cells comprised 60% of the total endosperm volume (Fig. 5, C and E). The cells with 3C and 6C nDNA amounts had a share of 80% in the total number of cells; yet, they only contributed 20% to the total endosperm volume.

In both genotypes, the smallest cells were located in the outer layers of the endosperm, whereas larger cells occupied the central region (Fig. 5A), in agreement with previous observations that the sizes of both the nuclei and the cells increase from the aleurone layer to the central endosperm in different maize lines (Tschermak-Woess and Enzenberg-Kunz, 1965; Kowles and Phillips, 1988; Larkins et al., 2001). The layers of endosperm cells lining the embryo pocket contained larger cells at higher endopolyploidy levels than the outer endosperm layers away from the embryo in both genotypes (Fig. 5, A and B).

The central endosperm cells can only expand rapidly during crown development if cell growth is coordinated with enlargement of the endosperm surface, sustained by anticlinal divisions of the peripheral cells (Kiesselbach, 1949). The surface of the endosperm, without the embryo pocket and the basal region, was about 40 mm² in the wild-type kernel but only 15 mm² in the *miniature*, as estimated from the 3-D model. Because the size of cells in the outer most layer was similar in both genotypes, the estimated number of these outer cells was about three times lower in the *miniature* than in the wild-type endosperm. Thus, it seems likely that impaired mitosis in the peripheral layers of the *miniature* en-

dosperm imposes physical constraints upon expansion of the central cells. Indeed, regarding the same pattern of endoreduplication process in the *miniature* endosperm and in the wild type (Fig. 3), *miniature* cells at respective endopolyploidy levels were smaller than expected (Fig. 4B).

The lower levels of metabolically released, osmotically active sugars (hexoses) and precursors for cell wall biosynthesis available to the *miniature* endosperm due to the INCW2 deficiency may lead to a reduced cell expansion in the peripheral region. This may, in turn, cause a reduced mitotic activity in the outer cell layers through cell size control mechanisms, in agreement with the hypothesis of "expansion leads mitosis" (Jacobs, 1997). INCW2 deficiency may also result in a premature high ratio of Suc to hexose in the endosperm, which may favor cell differentiation and starch accumulation over cell division, as has been shown for fava bean (Weber et al., 1997). Although the mechanisms involved in regulation of cell cycle and differentiation in relation to sugar levels are presently largely unknown, the presented results support the hypothesis that the role of cell wall invertase in control of seed development in maize is similar to its regulatory role described in fava bean (Weber et al., 1997).

ACKNOWLEDGMENTS

In memoriam of Profs. Elisabeth Tschermak-Woess (1917–2001) and Oliver E. Nelson (1920–2001).

Received December 18, 2001; returned for revision January 23, 2002; accepted February 7, 2002.

LITERATURE CITED

- Cheng WH, Chourey PS (1999) Theor Appl Genet **98**: 485–495
 Cheng WH, Taliercio EW, Chourey PS (1996). Plant Cell **8**: 971–983
 Greilhuber J, Ebert I (1994) Genome **37**: 646–655
 Jacobs T (1997) Plant Cell **9**: 1021–1029
 Jones RJ, Roessler J, Quattar S (1985) Crop Sci **25**: 830–834
 Kiesselbach TA (1949) Research Bulletin 161. Agricultural Experiment Station, University of Nebraska, Lincoln
 Kondorosi E, Roudier F, Gendreau E (2000) Curr Opin Plant Biol **3**: 488–492

- Kowles RV, McMullen MD, Yerk G, Phillips RL, Kraemer S, Srien F** (1992) *Genome* **35**: 68–77
- Kowles RV, Phillips RL** (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 7010–7014
- Kowles RV, Phillips RL** (1988) *Int Rev Cytol* **112**: 97–136
- Larkins BA, Dilkes BP, Dante RA, Coelho CM, Woo Y, Liu Y** (2001) *J Exp Bot* **52**: 183–192
- Lowe J, Nelson OE Jr** (1946) *Genetics* **31**: 525–533
- Matérn B** (1960) *Medd Statens Skogsforskningsinst* **49**: 1–144
- Miller ME, Chourey PS** (1992) *Plant Cell* **4**: 297–305
- Sagan C** (1997) *Billions and Billions*. Headline Book Publishing, London
- Schweizer L, Yerk-Davis GL, Phillips RL, Srien F, Jones RJ** (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7070–7074
- Settler TL, Flannigan BA** (2001) *J Exp Bot* **52**: 1401–1408
- Tsai CY, Salamini F, Nelson OE** (1970) *Plant Physiol* **46**: 299–306
- Tschermak-Woess E, Enzenberg-Kunz U** (1965). *Planta* **64**: 149–169
- Vilhar B, Dermastia M** (2002) *Acta Bot Croat* **61**: 11–25
- Vilhar B, Greilhuber J, Dolenc Koce J, Temsch EM, Dermastia M** (2001) *Ann Bot* **87**: 719–728
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U** (1997) *Trends Plant Sci* **2**: 169–174