

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Aleš KLADNIK

**LOKALIZACIJA GENSKE EKSPRESIJE NEKATERIH
ENCIMOV SLADKORNEGA METABOLIZMA V TKIVIH
KORUZE (*Zea mays* L.)**

DIPLOMSKA NALOGA

**GENE EXPRESSION LOCALIZATION OF CERTAIN SUGAR
METABOLISM ENZYMES IN MAIZE TISSUES (*Zea mays* L.)**

GRADUATION THESIS

LJUBLJANA, 1999

Diplomska naloga je bila opravljena na Plant Pathology Department, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, ter na Oddelku za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Marino Dermastio.

Mentorica: prof. dr. Marina Dermastia

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Maja Kovač

Član: doc. dr. Borut Štrukelj

Članica: prof. dr. Marina Dermastia

Datum zagovora: 13. 09. 1999

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK 631.52:577.15:582.542(043.2)=863

KG saharozna sintaza / invertaza / imunolokalizacija / in situ hibridizacija / koruza / *Zea mays*

KK

AV KLADNIK, Aleš

SA DERMASTIA, Marina ment.

KZ 1000 Ljubljana, SLO, Večna pot 111

ZA Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za biologijo

LI 1999

IN LOKALIZACIJA GENSKE EKSPRESIJE NEKATERIH ENCIMOV
SLADKORNEGA METABOLIZMA V TKIVIH KORUZE (*ZEA MAYS* L.)

TD diplomska naloga

OP X, 62 s., 35 sl., 31 ref.

IJ SL

JI sl / en

AI Prisotnost saharozne sintaze in invertaze iz celične stene, dveh izmed ključnih encimov sladkornega metabolizma pri rastlinah, smo določali na različnih in različno starih tkivih koruze (*Zea mays* L.). Uporabili smo dve metodi za lokalizacijo genske ekspresije na celični ravni, imunolokalizacijo proteinov in hibridizacijo mRNA *in situ*. Potrdili smo prisotnost obeh encimov v celicah, ki sestavljajo tkiva, iz katerih sta bila encima že predhodno izolirana, ali je bila v njih določena encimska aktivnost. Kot splošen encim smo saharozno sintazo zasledili v manjših količinah v vseh proučevanih tkivih, specifično pa se pojavlja v določenih območjih razvijajočega se endosperma. V nadaljevanju smo zasledili še specifično prisotnost izocima saharozne sintaze SS1 v celicah koreninske čepice in prostorsko ločeno ekspresijo saharozne sintaze in invertaze v razvijajočih se listih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn

DC 631.52:577.15:582.542(043.2)=863

CX sucrose synthase / invertase / immunolocalization / in situ hybridization / maize / *Zea mays*

CC

AU KLADNIK, Aleš

AA DERMASTIA, Marina supervisor

PP 1000 Ljubljana, SLO, Večna pot 111

PB Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Dept. of Biology

PY 1999

TI GENE EXPRESSION LOCALISATION OF CERTAIN SUGAR METABOLISM ENZYMES IN MAIZE TISSUES (*ZEA MAYS* L.)

DT graduation thesis

NO X, 62 s., 35 sl., 31 ref.

LA SL

AL sl / en

AB We determined the localization of sucrose synthase and cell wall invertase, two key enzymes of sugar metabolism, in various tissues of maize seedlings (*Zea mays* L.). We used two methods for *in situ* localization of gene expression, immunolocalization and *in situ* hybridization of mRNA. We confirmed the presence of both enzymes in tissues, from which they were previously already isolated, or enzyme activity was observed. As a general enzyme, we found sucrose synthase in all tissues examined. We observed the specific expression pattern of sucrose synthase and invertase in developing endosperm. Furthermore, we have found specific localization of sucrose synthase isozyme SS1 in the cells of root cap and spatially different expression of sucrose synthase and invertase in developing leaves.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE	X
1 UVOD	1
2 DOSEDANJE OBJAVE	2
2.1 KORUZA (<i>ZEa MAYS</i> L.)	2
2.1.1 IZVOR IN UPORABA	2
2.1.2 BOTANIČNI OPIS	3
2.1.3 MORFOLOGIJA IN HISTOLOGIJA	3
2.1.3.1 Zrno	3
2.1.3.2 Koreninski sistem	4
2.1.3.3 Steblo	5
2.1.3.4 List	5
2.2 METABOLIZEM SLADKORJEV	7
2.2.1 NASTANEK, TRANSPORT IN PORABA	7
2.2.2 SAHAROZNA SINTAZA	11
2.2.3 INVERTAZA	12
2.3 <i>IN SITU</i> LOKALIZACIJA EKSPRESIJE GENOV	13
2.3.1 IMUNOLOKALIZACIJA	13
2.3.2 <i>IN SITU</i> HIBRIDIZACIJA RNA	15
3 MATERIAL IN METODE	18
3.1 POSKUSNE RASTLINE	18
3.2 PRIPRAVA TKIVNIH REZIN	18
3.3 IMUNOLOKALIZACIJA	18
3.4 <i>IN SITU</i> HIBRIDIZACIJA	20
3.4.1 SINTEZA RNA SONDE	20
3.4.2 <i>IN SITU</i> HIBRIDIZACIJA	20
3.4.3 DETEKCIJA HIBRIDIZIRANE SONDE	21
3.5 IZDELAVA SLIK	23
4 REZULTATI	24
4.1 ZRNO	24
4.2 KORENINA	40
4.3 POGANJEK	47
5 RAZPRAVA	54
5.1 KOMENTAR METODE	54
5.2 EKSPRESIJA PROTEINOV V ZRNU	55

5.3	EKSPRESIJA PROTEINOV V KORENINI	56
5.4	EKSPRESIJA PROTEINOV V POGANJKU	57
6	POVZETEK	58
7	ZAHVALA	59
8	LITERATURA	60

KAZALO SLIK

<i>Slika I: Ena prvih objavljenih ilustracij koruze v Evropi, Leonard Fuchs, 1542.....</i>	<i>2</i>
<i>Slika II: Vzdolžni prerez zrna</i>	<i>3</i>
<i>Slika III: Shema floemskega transporta, apoplastni in simplastni način nalaganja v floem in odlaganja iz njega</i>	<i>9</i>
<i>Slika IV: Apoplastno odlaganje iz floema in sinteza škroba</i>	<i>10</i>
<i>Slika 1: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Spodnji del zrna, 12 dni po opraitvi, vzdolžni prerez.....</i>	<i>26</i>
<i>Slika 2: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Del zrna z zarodkom, 12 dni po opraitvi, vzdolžni prerez.....</i>	<i>27</i>
<i>Slika 3: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Zgornji del zrna, 12 dni po opraitvi, vzdolžni prerez.....</i>	<i>28</i>
<i>Slika 4: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Povečava dela zrna, vidi se perikarp, zarodek in endosperm, vzdolžni prerez.....</i>	<i>29</i>
<i>Slika 5: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Povečava spodnjega dela zrna, zgoraj se vidi tkivo pedicela, spodaj pa bazalni del endosperma, vzdolžni prerez</i>	<i>30</i>
<i>Slika 6: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Povečava endosperma, vidijo se celice z amiloplasti, vzdolžni prerez</i>	<i>31</i>
<i>Slika 7: In situ hibridizacija mRNA za izocim saharozne sintaze SS1. Povečava endosperma, desno spodaj del perikarpa, vzdolžni prerez</i>	<i>32</i>
<i>Slika 8: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS2. Spodnji del zrna, 12 dni po opraitvi, vzdolžni prerez.....</i>	<i>33</i>
<i>Slika 9: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS2. Zgornji del zrna, 12 dni po opraitvi, vzdolžni prerez.....</i>	<i>34</i>
<i>Slika 10: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS2. Spodnji del zrna, vidi se bazalni del endosperma in tkivo pedicela, vzdolžni prerez</i>	<i>35</i>
<i>Slika 11: Imunolokalizacija izocima invertaze iz celične stene INCW2. Spodnji del zrna, 12 dni po opraitvi, vzdolžni prerez.....</i>	<i>36</i>
<i>Slika 12: Imunolokalizacija izocima invertaze iz celične stene INCW2. Spodnji del zrna, vidi se bazalni del endosperma in tkivo pedicela, vzdolžni prerez.....</i>	<i>37</i>

<i>Slika 13: Imunolokalizacija izocima invertaze iz celične stene INCW2. Zgornji del zrna, 12 dni po opravitvi, vzdolžni prerez.....</i>	<i>38</i>
<i>Slika 14: Imunolokalizacija izocima invertaze iz celične stene INCW2. Povečava dela endosperma, vzdolžni prerez</i>	<i>39</i>
<i>Slika 15: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Terminalni del 4 dni stare korenine, vzdolžni prerez</i>	<i>41</i>
<i>Slika 16: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Terminalni del 9 dni stare korenine, vzdolžni prerez</i>	<i>42</i>
<i>Slika 17: Imunolokalizacija izocima invertaze iz celične stene INCW1. 4 dni stara korenina, vzdolžni prerez</i>	<i>43</i>
<i>Slika 18: Imunolokalizacija izocima invertaze iz celične stene INCW1. 9 dni stara korenina, vzdolžni prerez</i>	<i>43</i>
<i>Slika 19: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. 4 dni stara korenina, prečni prerez.....</i>	<i>44</i>
<i>Slika 20: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. 9 dni stara korenina, prečni prerez.....</i>	<i>44</i>
<i>Slika 21: Imunolokalizacija izocima invertaze iz celične stene INCW1. 4 dni stara korenina, prečni prerez.....</i>	<i>45</i>
<i>Slika 22: Imunolokalizacija izocima invertaze iz celične stene INCW1. 9 dni stara korenina, prečni prerez.....</i>	<i>45</i>
<i>Slika 23: In situ hibridizacija mRNA za izocim saharozne sintaze SS1. 9 dni stara korenina, prečni prerez.....</i>	<i>46</i>
<i>Slika 24: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. 4 dni star poganjek, prečni prerez.....</i>	<i>48</i>
<i>Slika 25: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. 4 dni star poganjek, prečni prerez, povečava</i>	<i>49</i>
<i>Slika 26: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. 9 dni star poganjek, prečni prerez.....</i>	<i>50</i>
<i>Slika 27: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. 9 dni star poganjek, prečni prerez, povečava</i>	<i>50</i>
<i>Slika 28: In situ hibridizacija mRNA za izocim saharozne sintaze SS1. 9 dni star poganjek, prečni prerez.....</i>	<i>51</i>

<i>Slika 29: In situ hibridizacija mRNA za izocim saharozne sintaze SS1. 9 dni star poganjek, prečni prerez, povečava.....</i>	<i>51</i>
<i>Slika 30: Imunolokalizacija izocima invertaze iz celične stene INCW1. 9 dni star poganjek, prečni prerez.....</i>	<i>52</i>
<i>Slika 31: Imunolokalizacija izocima invertaze iz celične stene INCW1. 9 dni star poganjek, prečni prerez, povečava.....</i>	<i>53</i>

OKRAJŠAVE

SS1	saharozna sintaza 1
SS2	saharozna sintaza 2
INCW1	invertaza iz celične stene 1
INCW2	invertaza iz celične stene 2
BEPC	bazalne endospermske prenosne celice
TBA	terciarni butilni alkohol
DEPC	dietil pirokarbonat
NBT	nitroblue tetrazolijev klorid
BCIP	5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat

1 UVOD

Univerzalna strategija, ki omogoča rast in preživetje vseh živih organizmov, je ustrezna porazdelitev ogljika. V zelenih listih rastlin je glavna oblika fotoasimilatskega ogljika saharoza. Transportira se v različna ponorna tkiva, vključno z razvijajočimi se semeni. Razvoj semena je zelo odvisen od presnove saharoze, saj ta ni le vir energije, temveč deluje tudi kot signal za regulacijo genov. Kljub tako pomembni vlogi saharoze, pa ne vemo praktično nič o regulatornih genih, ki nadzorujejo tok saharoze v seme, njeni izrabi v različnih presnovnih poteh in regulaciji skupin genov v rastlinah.

Namen diplomskega dela je bil spoznati teoretično podlago in praktično uporabo dveh metod za *in situ* lokalizacijo ekspresije proteinov, imunolokalizacijo in *in situ* hibridizacijo. Z omenjenima metodama sem želel potrditi podatke iz literature o lokaciji ekspresije saharozne sintaze (izocimov SS1 in SS2) in invertaze iz celične stene (izocimov INCW1 in INCW2), ter prepoznati morebitne doslej neobjavljene vzorce ekspresije teh proteinov.

2 DOSEDANJE OBJAVE

2.1 KORUZA (*Zea mays* L.)

2.1.1 IZVOR IN UPORABA

Koruza (*Zea mays* L.) izvira iz Novega Sveta, kjer so jo včasih uporabljali predvsem za prehrano ljudi, danes pa je ena od najpomembnejših rastlin, ki se uporabljajo za živalsko krmo. V nekaterih delih sveta, predvsem v Latinski Ameriki, je še vedno osnovno živilo. Indijanci v Mehiki so jo kultivirali že 5000 let pred našim štetjem, vendar so v Evropi spoznali koruzo šele s Kolumbovim odkritjem Amerike, ko so jo njegovi mornarji našli na Kubi. Razvila se je najverjetneje iz trave teozinta (*Zea diploperennis*, *Z. perennis*), ki še vedno raste v predelih Mehike in Gvatemale.



Slika I: Ena prvih objavljenih ilustracij koruze v Evropi, Leonard Fuchs, 1542 (Kiesselbach, 1949)

Uporabni so praktično vsi deli rastline, najpomembnejše pa je s škrobom bogato zrnje. Koruza je pomembna tudi kot objekt za raziskovalno delo, za razvoj moderne genetike je za botanike to, kar je za zoologe *Drosophila* (Heiser, 1990).

2.1.2 BOTANIČNI OPIS

Koruzna spada v družino trav (*Poaceae*). Steblo je razdeljeno na nodije, z enim listom na vsakem nodiju. Listi so nameščeni dvoredno, vsak list je sestavljen iz nožnice, ki objema steblo in listne ploskve. Iz zalistja izraščajo stranski poganjki, pri dnu stebela na bazi internodijev pa adventivne korenine. Koruzna je enodomna rastlina, cvetni klaski pa so ženski ali moški. Ženski cvetni klaski so združeni v bate (»storže«), ki so nameščeni v zalistjih stebelnih listov in so tesno oviti s številnimi listnimi nožnicami (»ličje«). Os socvetja je odebeljena, internodiji so močno skrajšani, klaski imajo večinoma zelo zakrnele pleve. Vratovi plodnic so dolgi nekaj 10 centimetrov in na vrhu molijo iz ovoja storža. Moški cvetovi so na vrhu stebela v prstastem socvetju, ki je sestavljeno iz več klasastih socvetij (Kiesselbach, 1949; Martinčič s sod., 1999).

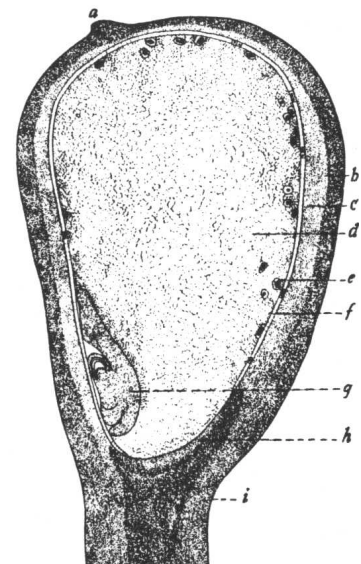
2.1.3 MORFOLOGIJA IN HISTOLOGIJA

2.1.3.1 Zrno

Koruzno zrno je orešek, nastal iz nadržale plodnice. Seme (embrio, endosperm in ostanki semenske ovojnice ter nucela) je zraslo z osemenjem (perikarp).

Perikarp (b) je preobražena stena plodnice in tvori trden zunanji ovoj, ki ščiti notranje dele. Na apikalnem delu je viden ostanek vratu plodnice (a), na bazalnem delu pa prehaja v pedicel (i).

Endosperm (d) predstavlja večji del semena, relativno manjši embrio (g) je na strani, blizu baze endosperma. Celice endosperma so napolnjene s številnimi amiloplasti s škrobnimi zrnji.



Slika II: Vzdolžni prerez zrna
(Kiesselbach, 1949)

Na bazi endosperma (najbližje pedicelu) so celice specializirane v prenosne celice (BEPC) in služijo prevajanju hrane od materinske rastline v razvijajoči se endosperm in posredno v embrio. Površinske celice nimajo škrobnih zrn, temveč sestavljajo alevronsko plast in vsebujejo alevronska zrna in olja. Alevronska plast (f) se ne porablja za prehrano embria, ampak naj bi le prispevala encime za razgradnjo škroba.

Embrio je vgreznjen v endosperm blizu njegove baze. Ima centralno os, ki se na bazalnem koncu zaključi z radikulo, na apikalnem pa z epikotilom. Kotiledon je preobražen in se imenuje *skutelum*. Služi črpanju hranil iz endosperma. Drugi list ali *koleoptila* ima zaščitno vlogo in obdaja plumulo med prodiranjem skozi zemljo. Plumulo sestavlja steblo nad koleoptilnim nodijem z nekaj listi, mlajši so zaviti v starejše in tvorijo stožec znotraj koleoptile. Med kalitvijo se internodij med skutelarnim in koleoptilnim nodijem hitro podaljšuje in dvigne koleoptilo do površja zemlje.

Tkivo pedicela ali cvetnega peclja prehaja v tkivo stene plodnice brez jasnega prehoda. Ko zrno dozori se navadno odlomi v ravnini abscizijske plasti, ki ustreza hilumu pecljatih vrst (Kiesselbach, 1949).

2.1.3.2 Koreninski sistem

Koreninski sistem sestavljata dve skupini korenin: semenske korenine, katerih zasnove so prisotne v embriu (začasne) in adventivne korenine, ki se razvijejo iz tkiva stebela po kalitvi (trajne).

Semenske korenine so radikula in različno število lateralnih korenin, ki se adventivno razvijejo na bazi prvega internodija stebela, tik nad skutelarnim nodijem. Radikula je vedno prisotna, razen v primeru poškodbe (na primer zmrzal), lahko je celo edina semenska korenina. Pri odrasli rastlini tvorijo majhen del koreninskega sistema, pomembne pa so v zgodnji fazi rasti kalic, preden se adventivne korenine višjih nodijev dobro razvijejo.

Pojem adventivne korenine se nanaša na vse tiste korenine, ki se razvijejo iz bazalnega interkalarnega meristema spodnjih internodijev stebela. Zaradi načina izraščanja iz stebela jih

imenujejo tudi kronske korenine. Prvi obroč adventivnih korenin izrašča iz baze drugega internodija.

V koreninskem vršičku so tri skupine inicialnih celic. Kaliptrogen je najbolj notranja plast koreninske čepice in oddeljuje celice naprej, v smeri rasti korenine. Te celice izdelajo koreninsko čepico (kalipetro). Celice kaliptre se povečajo, njihova stena zasluzi, nato pa počasi zaostajajo ob korenini navzad. Tako nastaja v substratu sluzast kanal, po katerem korenina lažje prodira in se meristemsko tkivo ne poškoduje. Takoj za celicami kaliptrogena je enojna plast inicialnih celic iz katerih se razvijeta povrhnjica in skorja korenine. Tik nad to plastjo pa je skupina inicialnih celic osrednjega dela korenine iz katerih se razvije stela ali prevodni cilinder (Kiesselbach, 1949).

2.1.3.3 Steblo

V razvoju embria postane stebelni vršiček viden že zelo zgodaj kot polkroglasta masa meristemskega tkiva. Inicialne celice v stebelnem vršičku pa niso tako jasno vidne kot v koreninskem vršičku. Zasnove listov se oblikujejo blizu vrha stebelnega vršička. Tako zasnove listov, kot stranskih poganjkov, se zasnujejo v zunanjih plasteh meristema, medtem ko se stranske korenine zasnujejo endogeno, v periciklu, in potem prodrejo skozi skorjo in povrhnjico. Kmalu po nastanku meristemskega tkiva se pojavijo zametki žilnega sistema, ki se kasneje nadaljuje skozi nodije in internodije. Internodiji so pri mladi rastlini zelo kratki, kasneje pa se podaljšajo z interkalarno rastjo (Kiesselbach, 1949).

2.1.3.4 List

Vsak pravi list embria se zasnuje kot greben tik pod polkroglasto rastno cono stebelnega vršička. List nato zraste nad stebelni vršiček, se razširi, robova se prekrijeta, tako da je list zvit v obliki votlega stožca, ki vsebuje stebelni vršiček in vse mlajše liste, sam pa je zvit v starejše liste in koleoptilo. V zrelem zrnju ima embrio navadno pet listnih zasnov (brez skuteluma in koleoptile). Po kalitvi že zasnovani listi nadaljujejo z rastjo, nadaljuje pa se tudi

formiranje novih listnih zasnov, ki traja dokler niso zasnovani vsi listi in se stebelni vršiček diferencira za tvorbo moškega socvetja.

List je sestavljen iz spodnje in zgornje povrhnjice, med katerima je enoten mezofil, ki ga sestavljajo v glavnem parenhimske celice s kloroplasti. V mezofilu so tudi žile dveh tipov: večje primarne, ki se izmenjujejo z večimi manjšimi sekundarnimi (največkrat je vsaka deseta žila primarna). Primarne žile zavzemajo približno tri četrtine lista, kar ostane med žilo in povrhnjico pa je sklerenhimsko tkivo. Manjših žil ne obdaja sklerenhim, temveč so popolnoma obkrožene s celicami žilne ovojnice, ki vsebujejo številne velike kloroplaste. Povrhnjica je enoplastna, celice so podaljšane vzporedno s potekom žil. Na zgornji površini so v intervalih trakovi buliformnih celic. Te z nabrekanjem povzročijo, da se mlad list razvije, ko pa v odmrlem listu izgubijo turgor, se list spet zvije (Kiesselbach, 1949).

2.2 METABOLIZEM SLADKORJEV

2.2.1 NASTANEK, TRANSPORT IN PORABA

Sinteza ogljikovih hidratov poteka s fotosintezo podnevi v listih. V listih se shranjujejo kot škrob, v druge dele rastline pa potujejo v obliki saharoze, ki je glavna transportna oblika ogljikovih hidratov v rastlini. Rastlina mora zagotoviti zaloge ogljikovih hidratov, ki ji omogočajo preživetje v neugodnih pogojih in kalitev naslednje generacije. Za ta namen se ogljikovi hidrati skladiščijo v obliki polisaharidov škroba ali fruktanov.

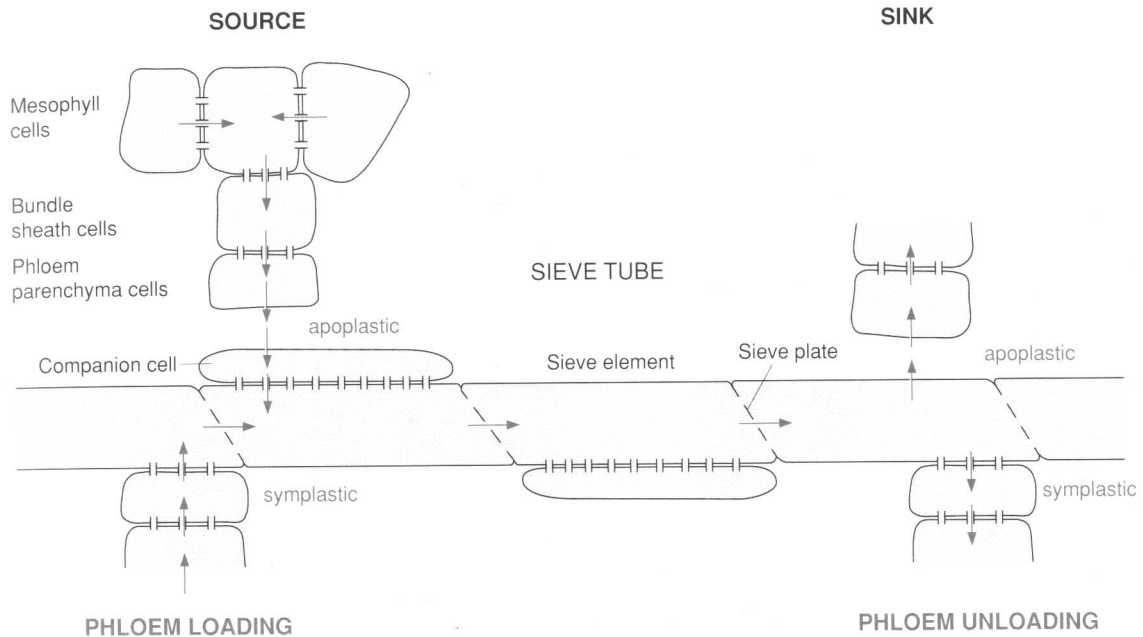
V kloroplastu se CO₂ asimilira v Calvinovem ciklu. Prejemnik CO₂ je ribuloza bisfosfat, iz enega mola ribuloze bisfosfata in CO₂ nastaneta dva mola trioze fosfata. Pet šestin nastalega trioza fosfata se porabi za regeneracijo ribuloze bisfosfata, ena šestina pa je na voljo za izvoz iz kloroplasta in fotorespiracijo. Trioza fosfat se prenaša v citosol s trioze fosfat fosfatnim translokatorjem, tam se porabi za sintezo saharoze, fosfat pa se prenese nazaj v kloroplast.

Škrob se sintetizira v kloroplastih iz ADP-glukoze, ki nastane iz intermedijata Calvinovega cikla, fruktoze 6-fosfata. Heksoze fosfat izomeraza jo pretvori v glukozo 6-fosfat, to pa fosfoglukomutaza pretvori v glukozo 1-fosfat, ki je substrat za ADP-glukoze pirofosforilazo. Z odcepom pirofosfata in vezavo ATP nastane ADP-glukoza, ki je substrat za škrobno sintazo. Ta prenese glukozni ostanek na –OH skupino na četrtem mestu zadnjega glukoznega ostanka nastajajoče polisaharidne verige.

Sinteza saharoze poteka v citosolu mezofilnih celic. Glukozni ostanek se aktivira z UDP-glukoze pirofosforilazo, iz glukozne 1-fosfata in UTP nastane UDP-glukoza. Saharozne fosfat sintaza katalizira prenos glukoznega ostanka iz UDP-glukoze na fruktozo 6-fosfat, tako da nastane saharozna 6-fosfat. Saharozne fosfat fosfataza hidrolizira saharozno 6-fosfat (odcepi fosfat) in s tem premika ravnotežje reakcije proti sintezi saharoze 6-fosfata, tako da je reakcija sinteze saharoze ireverzibilna. Sinteza saharoze je visoko reguliran proces, saj mora zagotavljati ravno pravo porabo trioze fosfata iz Calvinovega cikla, ne preveč, da je

zagotovljena zadostna regeneracija ribuloze bisfosfata, po drugi strani pa se mora porabljeni fosfat vračati nazaj v kloroplast.

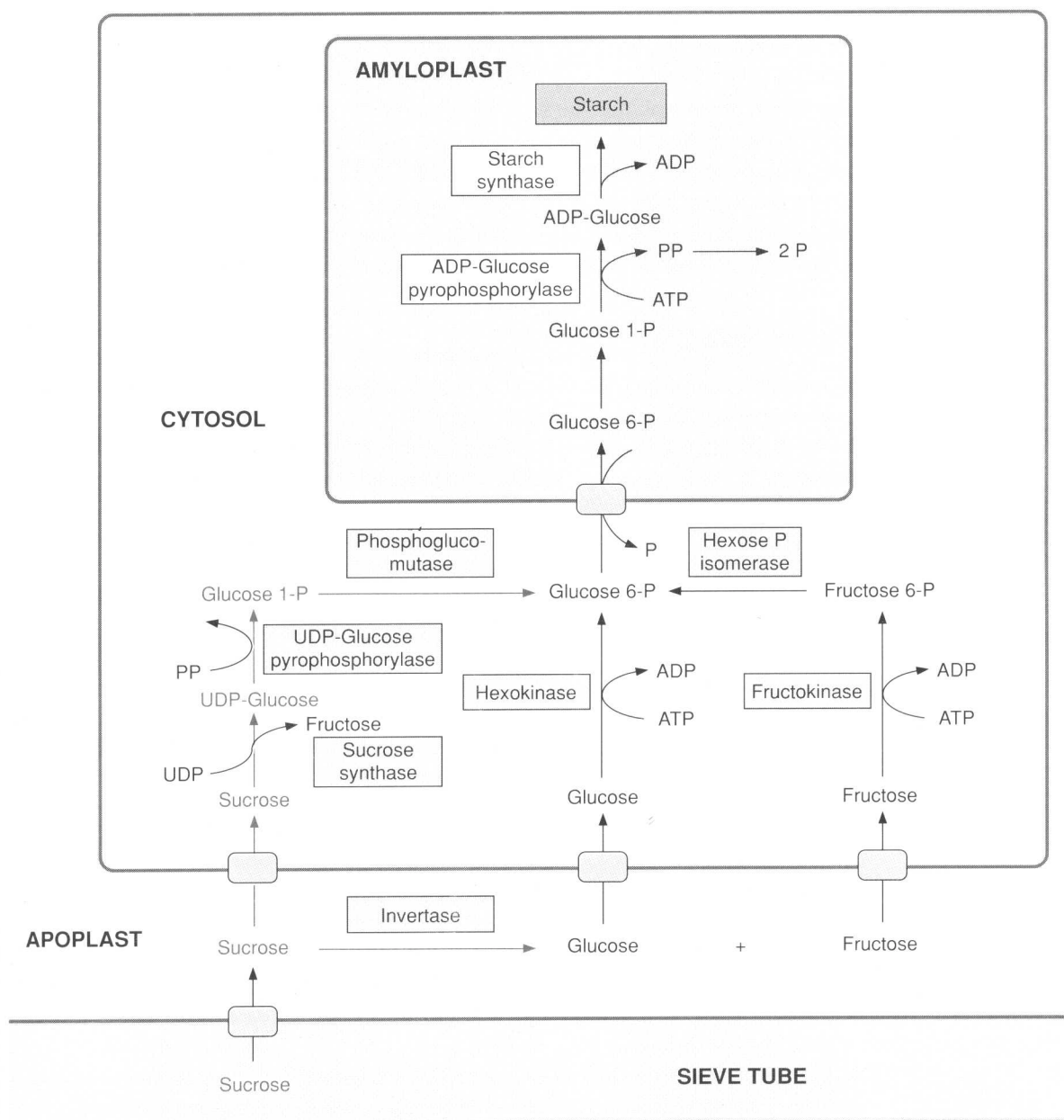
Fotoasimilati se iz listov prenašajo v druge dele rastline po floemu. Floem sestavljajo sitaste cevi iz celic sitastih cevi povezanih s sitastimi ploščami. Celice so žive, vsebujejo pa le nekaj mitohondrijev, plastidov in endoplazemskega retikla, izgubile pa so jedro, ribosome, Golgijevo telesce in vakuolo. Specializirane so le za prenos ogljikovih in dušikovih spojin na dolge razdalje v rastlini. Saharoza je v večini rastlin glavna transportna oblika ogljika, dušik pa se prenaša v obliki aminokislin. Celice sitastih cevi so obkrožene s celicami spremljevalkami, s katerimi so povezane z mnogimi plazmodezmami. Pomembne so za nalaganje v floem. Asimilati iz mezofilnih celic se prenašajo v floem prek simplasta skozi plazmodezme (predvsem oligosaharidi rafinozne skupine) ali pa prek apoplasta, kjer fotoasimilati iz celic floemskega parenhima preidejo v apoplast (npr. žitarice, sladkorna pesa, krompir). Saharoza in aminokisliline se s protonskim simportom iz apoplasta prenesejo v celice spremljevalke, od tod pa v celice sitastih cevi. Protonski gradient vzdržuje H^+ ATPaza v plazemski membrani celic spremljevalk. V rastlinah z apoplastnim tipom nalaganja floema je saharoza edina transportna oblika ogljikovih hidratov, heksoze se ne transportirajo (Heldt, 1997).



Slika III: Shema floemskega transporta, apoplastni in simplastni način nalaganja v floem in odlaganja iz njega (Heldt, 1997)

V porabniških tkivih lahko poteka odlaganje iz floema zopet na dva načina. Pri simplastnem odlaganju sahara in aminokislina preidejo v celice porabniškega tkiva neposredno prek plazmodezem. Ta način je pogost predvsem v vegetativnih tkivih, kot so korenine in rastoči poganjki. V založnih tkivih pa je pogostejši apoplastni način odlaganja, kjer spojine preidejo iz celic sitastih cevi najprej v ekstracelularni prostor, od tam pa jih privzamejo celice porabniškega tkiva. Dostavljeni ogljikovi hidrati se v celicah založnih tkiv večinoma pretvarjajo v škrob. Privzem sahara v celice poteka na dva načina. Po prvi poti sahara preide v založne celice, tam pa jo saharna sintaza cepi na UDP-glukozo in fruktozo. UDP-glukoza se naprej pretvori z UDP-glukoze pirofosforilazo v glukozo 1-fosfat, ta pa s fosfoglukomutazo v glukozo 6-fosfat. Po drugi poti pa invertaza v apoplastu cepi sahara na glukozo in fruktozo, ti dve heksozi pa se transportirata v celico, tam pa se fosforilirata s heksokinazo oz. fruktokinazo, da nastane glukozo 6-fosfat oz. fruktozo 6-fosfat. Fruktozo 6-fosfat se pretvori v glukozo 6-fosfat s heksoze fosfat izomerazo. Glukozo 6-fosfat se z glukoznim translokatorjem prenese v amiloplast, kjer se sintetizira škrob iz ADP-glukoze (Heldt, 1997).

Transport saharoze iz listov (izvor) v ponorna tkiva naj bi bil odvisen od »moči ponora«, sposobnosti ponornega organa, da privlači saharozo. Ključen proces, ki to omogoča, je ireverzibilna razgradnja saharoze z invertazo iz celične stene na mestu odlaganja iz floema (Ho, 1988, ter Eschrich, 1980).



Slika IV: Apoplastno odlaganje iz floema in sinteza škroba (Heldt, 1997)

2.2.2 SAHAROZNA SINTAZA

Saharozna sintaza (UDP-Glc:D-Fru 2-glukozil transferaza, EC 2.4.1.13) je encim, ki katalizira reverzibilno pretvorbo UDP in saharoze v UDP-glukozo in fruktozo. Čeprav je reakcija reverzibilna, je verjetno encim v glavnem vključen v razgradnjo saharoze (Wittich in Vreugdenhil, 1998). Ta encim skupaj s sintazo saharoza fosfata in invertazo igra ključno vlogo v metabolizmu saharoze v rastlini (Chen in Chourey, 1989).

Vloga saharozne sintaze naj bi bila usmerjanje saharoze v anabolne procese v metabolizmu, razporejanje saharoze med izvornimi in ponornimi organi, sodelovala pa naj bi tudi v odzivu rastline na anaerobne pogoje in mraz (Sturm in Tang, 1999).

Večina rastlin ima vsaj dve izoforni saharozne sintaze, ki imata zelo homologni zaporedji aminokislin in podobne biokemične lastnosti, vendar pa je njuna genska regulacija različna. Našli so značilne vzorce izražanja v različnih rastlinskih organih, izražanje je odvisno od organa in stopnje razvoja (Fu in Park, 1995, ter Sturm s sod., 1999)

V koruzi sta do zdaj opisana dva izocima saharozne sintaze, SS1 in SS2. Ta dva encima sta biokemično podobna in imunološko navzkrižno reaktivna. Izoforni lahko ločimo z nativno in SDS elektroforezo, razlika med njima je 6 kDa. SS1 je kodirana z *Sh1*, SS2 pa s *Sus1* genom. Oba gena sta že klonirana in imata znano nukleotidno zaporedje (Huang s sod., 1994).

Z imunocitokemičnimi metodami so ugotovili, da je izocim SS1 prisoten v citoplazmi endospermskih celic, ki skladiščijo škrob, še posebej v celicah osrednjega dela endosperma. Mutante brez tega encima ne le da nimajo škroba v tem delu, temveč celice v tem področju celo degenerirajo in se izgubijo (Chen in Chourey, 1989). Rezultati poskusov s protoplasti kažejo, da je saharozna sintaza potrebna za sintezo celične stene (Maas s sod., 1990). Oba izocima, SS1 in SS2 so našli tudi v membranski frakciji izolirani iz endosperma razvijajočih se zrn (Carlson in Chourey, 1996). Izocim SS2 so našli v večjih količinah v citoplazmi alevronskih celic, pa tudi bazalnih endospermskih prenosnih celicah (BEPC) in v razvijajočem se embriju. (Chen in Chourey, 1989). Vendar pa Wittich in Vreugdenhil (1998) nista zaznala aktivnosti saharozne sintaze v BEPC v razvijajočem se zrnju. V mladih koreninah sta oba izocima prisotna predvsem v predelu prevodnega cilindra. V razvijajočem

se zrnu je ekspresija obeh genov, *Sh* in *Sus*, ki kodirata izocima saharozne sintaze, ločena prostorsko in časovno, v koreninah pa ni (Chen in Chourey, 1989).

Saharozna sintaza ima pomembno vlogo pri biosintezi škroba, sodeluje pa tudi v respiratorni poti (Xu s sod., 1989) in pri sintezi celične stene. Kalozna sintaza in celulozna sintaza uporabljata UDP-glukozo kot substrat; membransko vezana oblika saharozne sintaze verjetno obstaja v kompleksu s kalozno in celulozno sintazo (Delmer in Amor, 1995). Citoplazemsko obliko saharozne sintaze so našli tudi v celicah spremljevalkah floema (Nolte in Koch, 1993).

V razvijajočih se bombažnih vlaknih so dokazali, da je najmanj polovica vse saharozne sintaze trdno vezana na plazemsko membrano. Ogljik iz saharoze se v veliki meri pretvarja v celulozo in kalozo (Amor s sod., 1995).

V mladih koruznih listih je aktivnost saharozne sintaze najvišja v elongacijski coni v listni nožnici. Ko so primerjali saharozno sintazo iz lista z izocimi iz zrna so ugotovili da aktivnost saharozne sintaze v listih pripada SS2 izocimu. V zrelih, fotosintetsko aktivnih listih, je aktivnost saharozne sintaze skoraj popolnoma izginila (Nguyen-Quoc s sod., 1990).

2.2.3 INVERTAZA

Encim invertaza (β -fruktofuranozidaza, EC 3.2.1.26) katalizira ireverzibilno reakcijo razpada saharoze na glukozo in fruktozo. Najmanj dve obliki, topna in na celično steno vezana oblika, sta značilni za vse invertaze. Topna oblika je najpogostejša v vakuoli in citoplazmi, druga oblika pa je ionsko vezana na celično steno (Sturm in Chrispeels, 1990; von Schaewen s sod., 1990; Weil s sod., 1994). Obe obliki invertaze imata nekaj izocimov (Jaynes in Nelson, 1971; Unger s sod., 1994). Zaporedja aminokislin obeh oblik invertaze kažejo na to, da proteina pripadata različnim razredom. Sorodnost med nukleotidnimi zaporedji ene oblike encima je večja med različnimi taksonomskimi skupinami, kot pa med obema oblikama iz iste skupine rastlin (Unger s sod., 1994; Weber s sod., 1995; Taliercio s sod., 1995).

Fiziološka vloga invertaze naj bi bila razporejanje saharoze med fotosintetskim izvorom in ponorom v rastlini (Eschrich, 1980). Koruzna mutanta s pomanjkanjem invertaze, *miniature1* (*mn1*), ima prizadet endosperm semena, ki je dosti manjše in lažje kot pri divjem tipu *Mn1* (Lowe in Nelson, 1946). *Mn1* lokus kodira za endosperm specifično obliko invertaze iz celične stene, INCW-2. INCW-2 je locirana v bazalnih endospermskih prenosnih celicah in je časovno in prostorsko prvi encim v endospermu, ki cepi prihajajočo saharozo iz rastline in s tem vzdržuje enosmeren tok ogljika. Obstajajo tudi dokazi, da se v bazalnem delu endosperma saharoza spet sintetizira, preden se uporabi za sintezo škroba. Ta mehanizem vzdržuje fiziološki gradient saharoze med floemom v pedicelu in razvijajočim se endospermom (Cheng s sod., 1996)

Koruzna ima dva izocima invertaze iz celične stene, INCW-1 in INCW-2. V tkivih koruze se INCW-2 izraža predvsem v zrnu, INCW-1 pa predvsem v poganjkih in koreninah (Carlson s sod., 1999, neobjavljeno).

2.3 IN SITU LOKALIZACIJA EKSPRESIJE GENOV

2.3.1 IMUNOLOKALIZACIJA

Imunolokalizacija je metoda, ki izkorišča specifičnost vezave protiteles na antigen, s katero lahko *in situ* lokaliziramo antigene v tkivu. Uporabimo specifično protitelo, ki je na primeren način označeno, da lahko z mikroskopijo odkrijemo mesto vezave. Pred več kot 50 leti so začeli uspešno uporabljati s fluorescentnimi markerji označena protitelesa za določanje razporeditve proteinov v celicah. Uporabljali so direktno označevanje, kjer je bil že na primarno protitelo vezan fluorokrom. Ta metoda je težavna, ker moramo na vsako vrsto primarnih protiteles posebej vezati fluorokrom ali encim, občutljivost metode pa je nizka, ker ni ojačanja. Indirektne metode so bolj občutljive, ker se signal ojača, ko se na eno primarno protitelo veže več sekundarnih protiteles. Uporaba teh metod je mnogo lažja, ker lahko eno vrsto označenih sekundarnih protiteles uporabljamo za vezavo na mnoga različna primarna protitelesa iz iste vrste živali. Danes uporabljamo komercialno dostopna sekundarna

protitelesa, ki imajo visoko specifičnost, čistost in jakost signala. Na voljo so proti primarnim protitelesom iz mnogih živali (Ausubel s sod., 1995).

Priprava tkivnih rezin je pomembna, saj lahko kemična fiksacija spremeni antigenske lastnosti. Uporaba krio rezin najbolje ohrani antigenske lastnosti, vendar pa zamrzovanje lahko poruši strukturo celic z velikimi vakuolami. Po potrebi tudi permeabiliziramo membrane, da omogočimo vstop antigenov v celice (Harris in Oparka, 1994).

Pri izbiri primarnih protiteles se lahko odločimo za uporabo poliklonskih ali monoklonskih protiteles. Poliklonska protitelesa prepoznajo več epitopov na antigenu, monoklonska pa prepoznajo le en epitop. Zato lahko pri imunolokalizaciji s poliklonskimi protitelesi dobimo močnejši signal kot z monoklonskimi, vendar pa so monoklonska protitelesa bolj specifična. Nevarnost pri uporabi monoklonskih protiteles pa je v tem, da se lahko med kemično fiksacijo preparata spremeni struktura antigena, tako da izgubi epitop za vezavno mesto monoklonskega protitelesa. Nespecifičnim vezavam poliklonskih protiteles se izognemo z afinitenim očiščenjem pred uporabo (Ausubel s sod., 1995).

Najpogostejši označevalci, ki se uporabljajo v imunolokalizaciji, so fluorescentni (različni fluorokromi) in nefluorescentni (encimi in koloidno zlato). Prednost nefluorescentnih markerjev je v tem, da lahko za opazovanje imunolokalizacijskega signala in morfologije tkiva uporabljamo isti tip osvetlitve, preparati pa so trajni in primerni za shranjevanje (Ausubel s sod., 1995).

Prednost metod s fluorokromi je, da so hitre in občutljive, vendar produkt reakcije ni trajen, zato je potrebno takojšnje fotografiranje preparatov. Najpogosteje uporabljani fluorokromi so fluorescein izotiocianat (FITC), tetrametil rodamin izotiocianat (TRITC), Texas Red in fikoeritrin.

Za encimske metode so komercialno dostopni encimsko-imunski kompleksi, kot so PAP (peroksidaza - antiperoksidaza) in APAAP (alkalna fosfataza - anti alkalna fosfataza). Najpogosteje uporabljan substrat za peroksidazo je 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB), nastane rjav precipitat, ki je netopen v organskih topilih. Substrat za alkalno fosfatazo

je kombinacija NBT (nitroblue tetrazolijev klorid) in BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat), ki da modro vijoličen precipitat, ki prav tako ni topen v organskih topilih.

Koloidno zlato je zelo uporabno v elektronski mikroskopiji, v svetlobni pa se tudi vse bolj uveljavlja, kjer delce koloidnega zlata povečamo z nalaganjem srebra nanje. Reakcija vezave srebra na koloidno zlato je zelo občutljiva, zato je najbolje uporabiti komercialno dostopne kompletne reagentov (Harris in Oparka, 1994; Ausubel s sod., 1995).

Za vse imunolokalizacijske raziskave moramo imeti kontrolo. Primarno protitelo je najbolj kritičen reagent, zato mora vsak eksperiment vsebovati tudi kontrolo, kjer raztopino primarnega protitelesa nadomestimo z neimunim serumom iz iste vrste živali, najbolje pa je uporabiti predimuni serum iz iste živali, ki je proizvedla primarna protitelesa. Druge kontrole so še: brez primarnega protitelesa, da preverimo nespecifične vezave sekundarnega protitelesa ali morebitne reakcije barvnega substrata z endogenimi encimi. Vključimo lahko tudi pozitivno in negativno tkivno kontrolo (znano tkivo, kjer je iskani antigen, oz. ga ni) (Harris in Oparka, 1994).

2.3.2 *IN SITU* HIBRIDIZACIJA RNA

In situ hibridizacija je citokemična tehnika za lokaliziranje specifičnih zaporedij nukleinskih kislin. Osnovana je na dejstvu, da med dvema polinukleotidoma s komplementarnim zaporedjem baz pride do parjenja baz, kot sta ga opisala Watson in Crick (to vezavo imenujemo hibridizacija). Označen polinukleotid ali *sonda* hibridizira s komplementarnimi zaporedji (*tarča*) v tkivu. Hibridi sonde in tarče so vidni zaradi uporabe določenih označevalcev. *In situ* hibridizacija je analogna Northern ali Southern blot-u, le da tarčnega zaporedja ne izoliramo iz tkiva, ampak ga pustimo *in situ*. Ločljivost metode je odvisna od metode, ki jo uporabljamo; lahko je od makroskopskega do ultrastrukturnega nivoja. Najbolj razširjena uporaba *in situ* hibridizacije je za lokalizacijo mRNA na nivoju svetlobne mikroskopije (Harris in Oparka, 1994).

In situ hibridizacijo so najprej uporabili za lokalizacijo določenih zaporedij DNA v kromosomih, nato pa so metodo prilagodili še za lokalizacijo RNA. Na začetku so uporabljali

s tricijem označene dvojnoverižne in enoverižne sonde DNA, občutljivost metode pa se je povečala, ko so začeli uporabljati enoverižne RNA sonde in s ^{32}P ter ^{35}S označene sonde. Slabost radioaktivnega označevanja je v delu z radiaktivnimi izotopi, zato so razvili tudi neradioaktivne metode. Občutljivost teh metod je danes že primerljiva z radiografskimi (Ausubel s sod., 1995).

Za neradioaktivno *in situ* hibridizacijo uporabljamo z biotinom ali digoksigeninom označene sonde, uporablja pa se tudi direktno označene nukleotide, kot npr. fluorescein-12-dUTP. Biotin oz. digoksigenin zaznamo z vezavo adapterske molekule, ki ima vezan fluorokrom ali encim (alkalno fosfatazo ali hrenovo peroksidazo). Hibridizirano sondo zaznamo s fluorescentno mikroskopijo oz. z inkubacijo s primernim substratom, ki da stabilen barvni precipitat. Tega nato opazujemo z mikroskopijo v svetlem polju. Za hrenovo peroksidazo uporabimo substrat diaminobenzidin (DAB), za alkalno fosfatazo pa 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat (BCIP) in nitroblue tetrazolijev klorid (NBT). Rezultat encimske detekcije je stabilen barvni precipitat, tako da lahko preparate shranimo za kasnejše pregledovanje (Ausubel s sod., 1995).

Uspeh *in situ* hibridizacije na celično RNA je odvisen od mnogih dejavnikov. Fiksacija tkiva je najbolj občutljiv korak. Mora biti zadostna, da je ohranjena celična morfologija, ne sme pa ekstrahirati RNA ali spremeniti njene lokacije. Fiksacija ne sme biti premočna, da ne ovira dostopa sonde. Najpogosteje uporabljani fiksativ je paraformaldehid. Za olajšanje dostopa sonde do RNA lahko uporabimo tudi omejeno proteolizo tkiva, ki pa mora biti nadzorovana, da ostane morfologija tkiva ohranjena (Ausubel s sod., 1995).

Najpogosteje uporabljane sonde danes so enoverižne RNA sonde, prepisane s fagnimi polimerazami iz plazmidov, ki vsebujejo SP6, T7 ali T3 promotorje. Uporaba RNA sond da večinoma manj ozadja kot primerljive DNA sonde, ker nespecifično vezane sonde odstranimo z ribonukleazo. Dolžina sonde je pomembna za uspeh hibridizacije, pokazali so da je najprimernejša dolžina sonde med 30 in 300 nukleotidi. Dolžino DNA sond zmanjšamo z obdelavo z DNazo I, RNA sonde pa skrajšamo z omejeno alkalno hidrolizo. Za zmanjšanje nespecifične vezave sonde uporabljamo acetilacijo tkiva (Ausubel s sod., 1995).

V vsakem eksperimentu je potrebna uporaba primerne kontrole. Dve skupini rezin obdelamo vzporedno po istem postopku, s to razliko, da na eno skupino rezin hibridiziramo *antisense* enoverižno RNA sondo, ki se specifično veže na komplementarno mRNA v tkivu, drugo skupino pa hibridiziramo s *sense* sondo, ki je sintetizirana iz iste predloge kot *antisense* sonda, le iz komplementarne verige (v obratni smeri). Na kontrolni skupini rezin zaznamo samo nespecifično ozadje. Lahko uporabimo še en tip kontrole, kjer pred hibridizacijo rezine obdelamo z RNazo, da dobimo signal, ki je posledica vezave sonde na druge komponente celice, kot RNA. Če iskani gen pripada multigenski družini, uporabimo še drug del gena za sintezo sonde in pričakujemo isti rezultat (Ausubel s sod., 1995).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POSKUSNE RASTLINE

Poskusni objekt so bile kalice koruze (*Zea mays* L.), Pioneer, linija 3165. Vzgojene so bile v rastlinjaku, v zemlji, v naravni osvetlitvi. Material smo nabrali dvakrat: 4 dni in 9 dni po kalitvi. Zrna, ki so bila nabrana 12 dni po opraitvi, so dar dr. Susan J. Carlson. V tem obdobju razvoja zrna poteka intenzivno nalaganje škroba v endospermu. Zrno dozori sedem tednov po oploditvi (Kiesselbach, 1949). Pri 9 dni starih rastlinah smo uporabili terminalne dele korenine, bazalne dele poganjka in liste, pri 4 dni starih rastlinah pa le korenine in poganjke, ker so bili vsi listi še v koleoptili.

3.2 PRIPRAVA TKIVNIH REZIN

Dele rastlinskih organov smo fiksirali v formalin očetni kislini (100ml FAA: 50 ml 95% etanola, 5 ml led-očetne kisline, 10 ml 37% formaldehida in 35 ml deionizirane vode) in jih nato dehidrirali v seriji razredčin terciarnega butilnega alkohola in etanola (40% etanol + 10% TBA, 50% etanol + 20% TBA, 50% etanol + 35% TBA, 45% etanol + 55% TBA, 25% etanol + 75% TBA, trikrat 100% TBA; v predzadnjem koraku je bil raztopini TBA dodan safranin, da se rastlinski material obarva za lažje rezanje na mikrotomu). Material smo nato vklopili v Paraplast Plus (Oxford Labware), ki je očiščen parafin z dodatkom DMSO za boljše prodiranje v tkivo. Na rotacijskem mikrotomu (Microm HM325) smo narezali 20 µm debele serijske rezine in jih prenesli na ProbeOn Plus objektna stekelca (FisherScientific). Ta stekelca imajo pozitivno nabito površino, ki elektrostatsko veže tkivne rezine.

3.3 IMUNOLOKALIZACIJA

Imunolokalizacijo smo izvedli z Zymed Histogold kompletom za imunolokalizacijo (Zymed Laboratories) po prirejenem protokolu, ki ga priporoča Zymed. Poliklonska protitelesa proti

SS1 in SS2 so bila pripravljena v zajcu, zato smo zanje uporabili sekundarna protitelesa proti zajčjim protitelesom. Poliklonska protitelesa proti INCW1 in INCW2 so bila pripravljena v miši, tako da smo uporabili sekundarna protitelesa proti mišjim protitelesom. Sekundarna protitelesa so bila označena s 5 nm delci koloidnega zlata. Za kontrolo smo uporabil preimuni serum zajca oz. neimuni ascites miši.

Rezine smo deparafinizirali v ksilenu, dvakrat po 5 minut in potem rehidrirali skozi serijo etanolnih razredčin do vode (100%, 70%, 30% etanol, voda), vsak korak po 5 minut. Rezine smo nato sprali v 10 mM PBS, pH 7.2 (PBS – 'phosphate buffered saline': 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,115% Na₂HPO₄, 0,02% KH₂PO₄ v bidestilirani vodi), dvakrat po 5 minut.

Celoten postopek smo izvedli pri sobni temperaturi. Rezine smo obkrožili s PAP pisalom, ki naredi hidrofoben obroč okrog rezin, da zmanjšamo porabo reagentov, preprečeno pa je tudi mešanje reagentov, ker smo poskus in kontrolo izvedli na istem stekelcu na zaporednih rezinah (da bi bil postopek čim bolj enak za poskusne in kontrolne rezine). Rezine smo prekrili s Protein Blocking Solution (10% neimuni ovčji serum, preprečimo nespecifično vezavo protiteles) in inkubirali 10 minut. Nato smo odstranili odvečno tekočino in dodali raztopino primarnega protitelesa (za vsa primarna protitelesa, preimuni serum zajca in neimuni ascites miši smo uporabili razredčino 1:200), ter inkubirali v vlažni komori 30 minut. Potem smo stekelca sprali v PBS, trikrat po 5 minut. Nato smo rezine inkubirali s sekundarnim protitelesom (ovčji IgG proti zajčjim oz. mišjim protelesom, konjugiran s koloidnim zlatom) 30 minut v vlažni komori. Stekelca smo sprali v PBS, trikrat po 5 minut. Nato smo na rezine dodali mešanico Silver Initiating in Silver Enhance raztopin. Reakcija nalaganja srebra na koloidno zlato je zelo občutljiva, hitro pride do nespecifičnega nalaganja srebra in s tem dobimo preveč ozadja. Reakcijo smo pustili teči 3 minute, nato smo jo ustavili s tem, da smo stekelca sprali z destilirano vodo. Nato smo rezine dehidrirali skozi rastočo alkoholno vrsto (voda, 30%, 70%, 100% etanol). Na tem mestu smo uporabili še FastGreen barvanje; stekelca smo pomočili v 0,5% FastGreen, nato pa sprali v 100% etanolu, dali v ksilen dvakrat po 5 minut, kanili na rezine kapljico Permounga (FisherScientific) in pokrili z 22x40mm krovnim stekelcem.

3.4 *IN SITU* HIBRIDIZACIJA

In situ hibridizacijo smo izvedli po prilagojenem postopku, ki sta ga opisali Marrison in Leech (1994).

3.4.1 SINTEZA RNA SONDE

Z digoksinom označeno RNA sondo za SS1 mRNA smo sintetizirali z *in vitro* transkripcijo 1 µg linearizirane DNA predloge. Uporabili smo DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Boehringer Mannheim) po navodilih proizvajalca. Gen za saharozno sintazo 1 je bil kloniran v pGEM-4Z vektor. Ta ima multiplo klonsko mesto, ki ima na eni strani promotor za SP6 polimerazo, na drugi pa promotor za T7 polimerazo. Z linearizacijo plazmida z restriktivnim encimom *KpnI* in uporabo T7 polimeraze, mešanice nukleotidov ATP, CTP, GTP, UTP in digoksin-11-UTP smo sintetizirali *antisense* sondo, z restrikcijo s *HindIII*, SP6 polimerazo in mešanico nukleotidov pa *sense* sondo. S tem postopkom dobimo enoverižne RNA sonde enotne dolžine. Z DNazo I smo odstranili DNA predlogo, nato pa z alkalno hidrolizo razrezali sondo na dolžino približno 150 baz. Z digoksinom označene RNA sonde smo do uporabe shranili na -20°C.

3.4.2 *IN SITU* HIBRIDIZACIJA

Vse raztopine, ki jih uporabljamo za *in situ* hibridizacijo, morajo biti brez RNaz, ki bi lahko razgradile RNA v tkivu. Zato smo za pripravo raztopin uporabljali izključno le z DEPC obdelano vodo. To pripravimo tako, da 1 ml dietil pirokarbonata (DEPC, Sigma) raztopimo v 20 ml absolutnega etanola, dodamo enemu litru bidestilirane vode, zavremo in pustimo stati čez noč, naslednji dan avtoklaviramo. Celoten postopek izvedemo v laminariju, ker je DEPC toksičen.

Rezine smo deparafinizirali in rehidrirali (100% ksilen, 50% ksilen + 50% etanol, 100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 30%, voda). Za *in situ* hibridizacijo smo jih pripravili, tako da smo jih

inkubirali v 0.2M HCl 20 minut, sprali z vodo, inkubirali v 2X SSC (1,7% NaCl + 0,9% Na-citrat v DEPC-vodi) za 20 minut. Rezine smo obdelali s proteinazo K (1 μ g/ml v 100 mM Tris pH 8,0 + 50 mM EDTA), 30 minut v 37°C vodni kopeli. Aktivnost proteinaze K smo nato blokirali z inkubacijo v 2 mg/ml glicina v 1X PBS (0,01% NaH₂PO₄ + 0,12% Na₂HPO₄ + 0,85% NaCl v DEPC-vodi). Zatem smo rezine fiksirali s 4% paraformaldehidom v PBS, 20 minut, jih acetilirali z 0,1% acetanhidridom v 0,1M trietanolamin-HCl in sprali v PBS. Nato smo jih dehidrirali v etanolni seriji (30%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100% etanol). Pripravljene sonde smo za 5 minut postavili v vrelo kopel, nato pa ohladili na ledu. Rezine smo obkrožili s PAP pisalom in izvedli hibridizacijo s sondo, *antisense* za poskus in *sense* za kontrolo, v hibridizacijskem mediju (10 μ l sonde + 40 μ l hibridizacijskega medija). Hibridizacijski medij je sestavljen iz 50% deioniziranega formamida (Sigma), 10% dekstran sulfata (Sigma), 300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 6.8, 5 mM EDTA, 10 mM natrijevega fosfat pufra, 10 mM ditiotreitola (Sigma), 1 mg/ml tRNA (GibcoBRL), 0.5 mg/ml polyA RNA (Sigma). Rezine smo prekrili s koščki parafilma, ravno toliko velikimi, da prekrijejo rezine posameznega poskusa oz. kontrole. Stekelca smo postavili v vlažno komoro in inkubirali pri 56°C za 20 ur. Parafilm smo nato previdno odstranili s pufrom za spiranje (50% deionizirani formamid, 300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 mM natrijev fosfatni pufer in 5 mM EDTA), nato pa inkubirali stekelca za 2 uri v pufri za spiranje v mešalni kopeli pri 50°C. Nespecifično vezano sondo smo odstranili s 30 minutno inkubacijo v 20 μ g/ml RNazeA v NTE (500 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) na 37°C. Nato smo stekelca sprali v NTE pri 37°C, trikrat po 10 minut in jih zatem še enkrat inkubirali v pufri za spiranje, 1 uro pri 50°C. Zadnje spiranje je bilo v PBS čez noč pri 4°C.

3.4.3 DETEKCIJA HIBRIDIZIRANE SONDE

Imunološko detekcijo vezane sonde smo izvedli po postopku, opisanem v kitu za detekcijo z digoksinom označenih nukleinskih kislin (Boehringer Mannheim), z nekaj spremembami. Rezine smo inkubirali v 0.5% blokirajočem reagentu (Blocking reagent for nucleic acid hybridization and detection, Boehringer Mannheim) v PBS za 45 minut, nato pa v 1% BSA, 0.3% Triton X-100 v PBS za 45 minut. Nato smo rezine inkubirali z 1:300 razredčino konjugata anti-digoksinovskih protiteles z alkalno fosfatazo v 100 mM Tris pH 7.5 in 150

mM NaCl za 1 uro pri sobni temperaturi. Nevezana protitelesa smo odstranili s spiranjem v 1% BSA, 0.3% Triton X-100 v PBS, dvakrat po 20 minut. Stekelca smo na hitro sprali s 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl in 50 mM MgCl₂ in inkubirali s substratom za barvno reakcijo NBT/BCIP (0.34 mg/ml nitroblue tetrazolijevega klorida in 0.175 mg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfata v 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl in 50 mM MgCl₂). Čas inkubacije je lahko različen, odvisno od pogostosti iskane mRNA v tkivu. V našem primeru smo pustili reakcijo teči 1 uro. Če reakcija poteka predolgo, izgubimo ločljivost zaradi prekomernega nalaganja kristalov nitroblue tetrazolijeve soli. Reakcijo smo ustavili z 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, nato pa rezine dehidrirali skozi etanolno vrsto do ksilena (30%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100% etanol, 100% ksilen) in z uporabo Permounta (FisherScientific) pokrili z 22x40 mm krovnim stekelcem.

3.5 IZDELAVA SLIK

Slike preparatov smo posneli v svetlem polju, z mikroskopom Zeiss Axioskop 2 MOT, opremljenem s CCD kamero Sony PowerHAD, in jih zajeli s programom KS400 3.0 (Zeiss). Barvnih parametrov zajete slike nismo spreminjali, dodali smo le merilo. Osvetlitev in kontrast smo po potrebi spreminjali le na mikroskopu.

4 REZULTATI

4.1 ZRNO

Vsi preparati so vzdolžni prerezi zrn (slika II), nabranih 12 dni po opraitvi. Signal za imunolokalizacijo je temno (crno) barvanje. Preparati so dodatno barvani še s FastGreen-om, da je morfologija boljše vidna. Signal za *in-situ* hibridizacijo je modro-vijolično barvanje, teh preparatov nismo barvali s FastGreen-om.

Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1

Slika 1: Spodnji del zrna

Slika 2: Del zrna z zarodkom

Slika 3: Zgornji del zrna

- Slike različnih delov istega preparata. Barvanje vidimo predvsem v endospermu in v območju žil v pedicelu.

Slika 4: Povečava dela zrna, vidi se perikarp, zarodek in endosperm

- Barvanje vidimo predvsem v celicah endosperma, pa tudi v alevronski plasti. Perikarp in embrio se ne barvata.

Slika 5: Povečava spodnjega dela zrna, zgoraj se vidi tkivo pedicela, spodaj pa bazalni del endosperma

- Barvanje vidimo v področju žil v pedicelu in v abscizijski plasti.

Slika 6: Povečava endosperma, vidijo se celice z amiloplasti

- Barvanje vidimo okrog amiloplastov. V sredini amiloplastov lahko vidimo razpoke v škrobnih zrnih. Značilen signal je viden tudi po obodu celic.

In situ hibridizacija mRNA za izocim saharozne sintaze SS1

Slika 7: Povečava endosperma, desno spodaj del perikarpa

- Na sliki b levo zgoraj vidimo modrovijolične pike, ki so signal za SS1 mRNA v amiloplastih.

Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS2

Slika 8: Spodnji del zrna

Slika 9: Zgornji del zrna

- Sliki različnih delov istega preparata. Vidimo barvanje v alevronski plasti, endospermu in abscizijski plasti.

Slika 10: Spodnji del zrna, vidi se bazalni del endosperma in tkivo pedicela

- Barvanje vidimo v abscizijski plasti in v področju žil v pedicelu.

Imunolokalizacija izocima invertaze iz celične stene INCW2

Slika 11: Spodnji del zrna

- Barvanje vidimo v predelu bazalnih endospermskih prenosnih celic in v endospermu.

Slika 12: Spodnji del zrna, vidi se bazalni del endosperma in tkivo pedicela

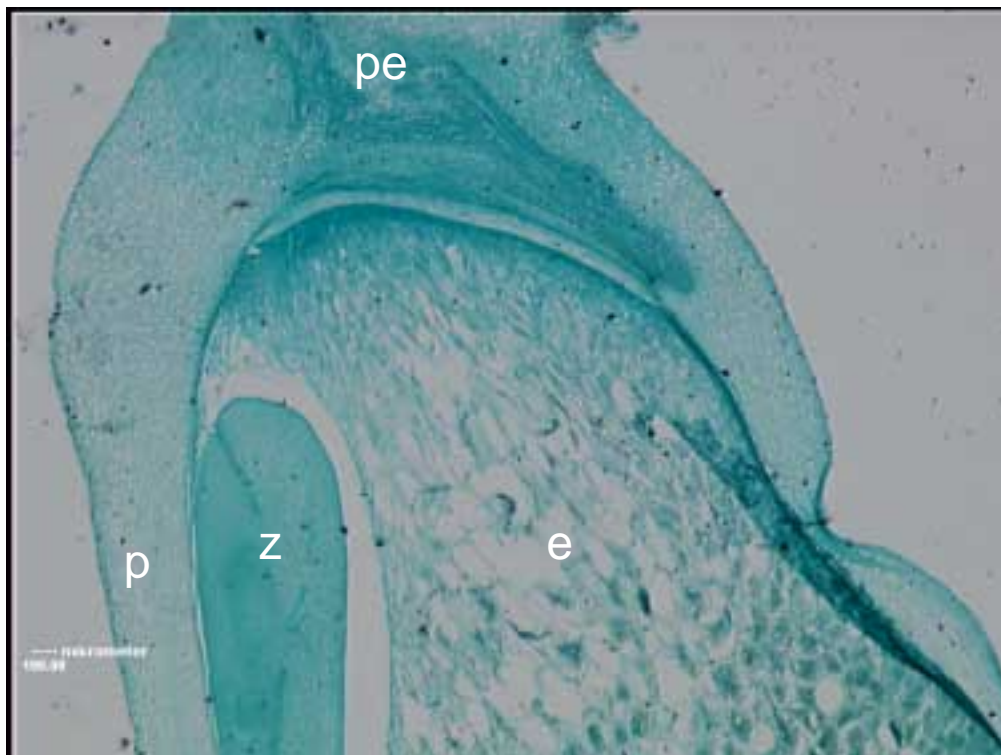
- Barvanje vidimo v bazalnih endospermskih prenosnih celicah.

Slika 13: Zgornji del zrna

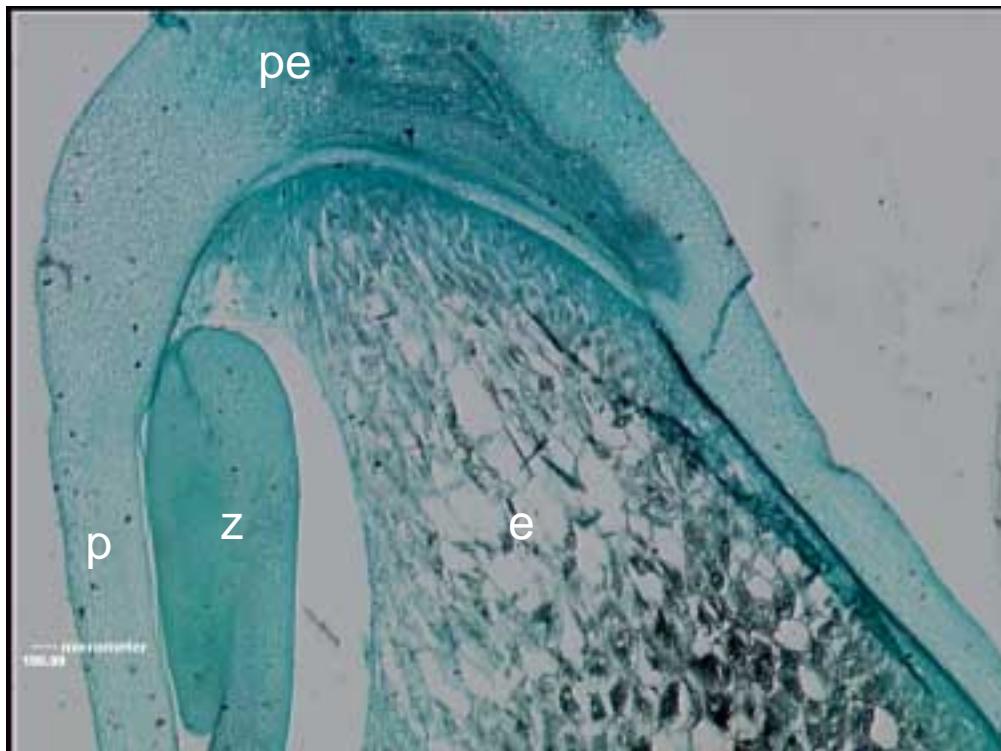
- Barvanje vidimo v osrednjem delu endosperma.

Slika 14: Povečava dela endosperma

- Izrazito barvanje vidimo na prostih amiloplastih, kjer so celice potrgane.

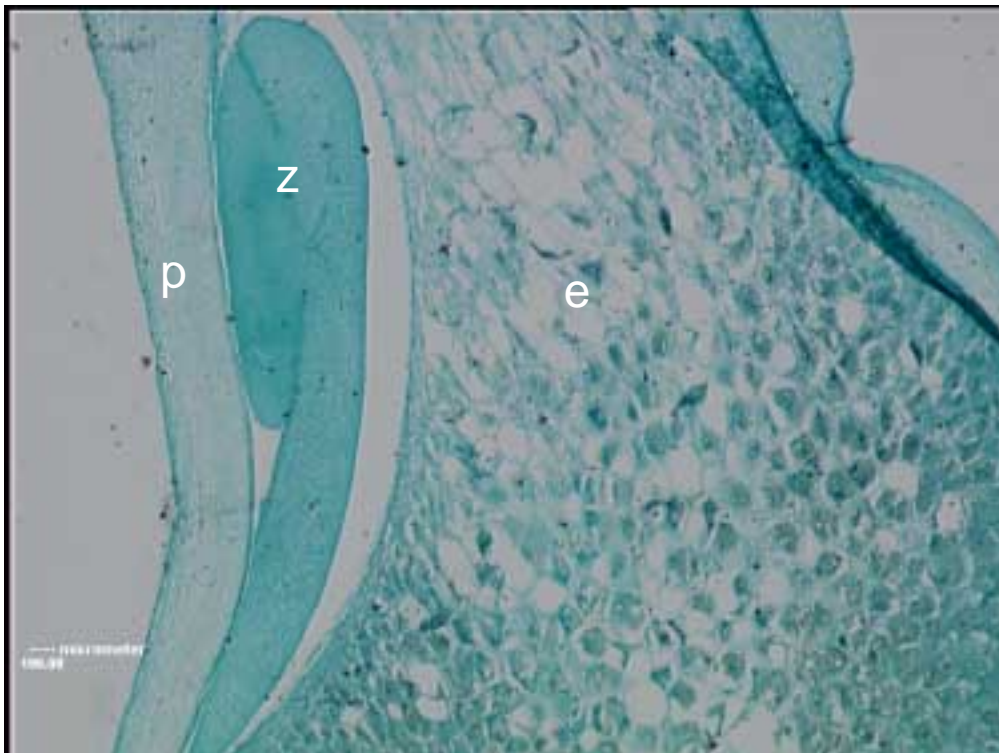


a

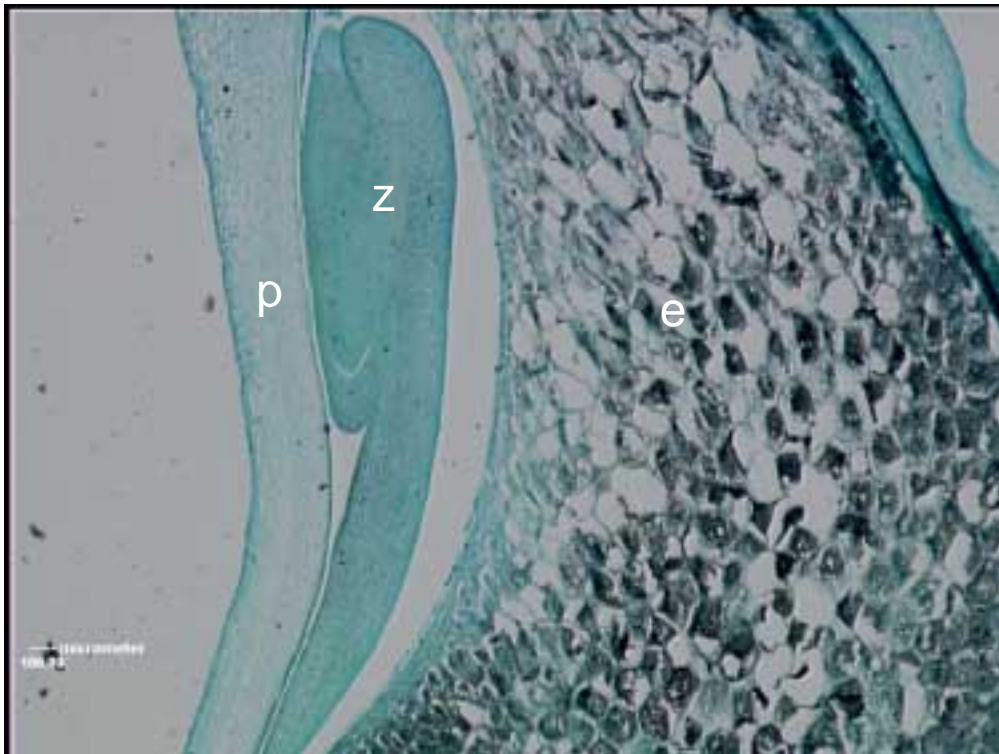


b

Slika 1: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Na sliki je spodnji del zrna, 12 dni po oprašitvi, vzdolžni prerez. Vidi se endosperm (e), perikarp (p), zarodek (z), pedicel (pe); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS1, signal je črno barvanje.

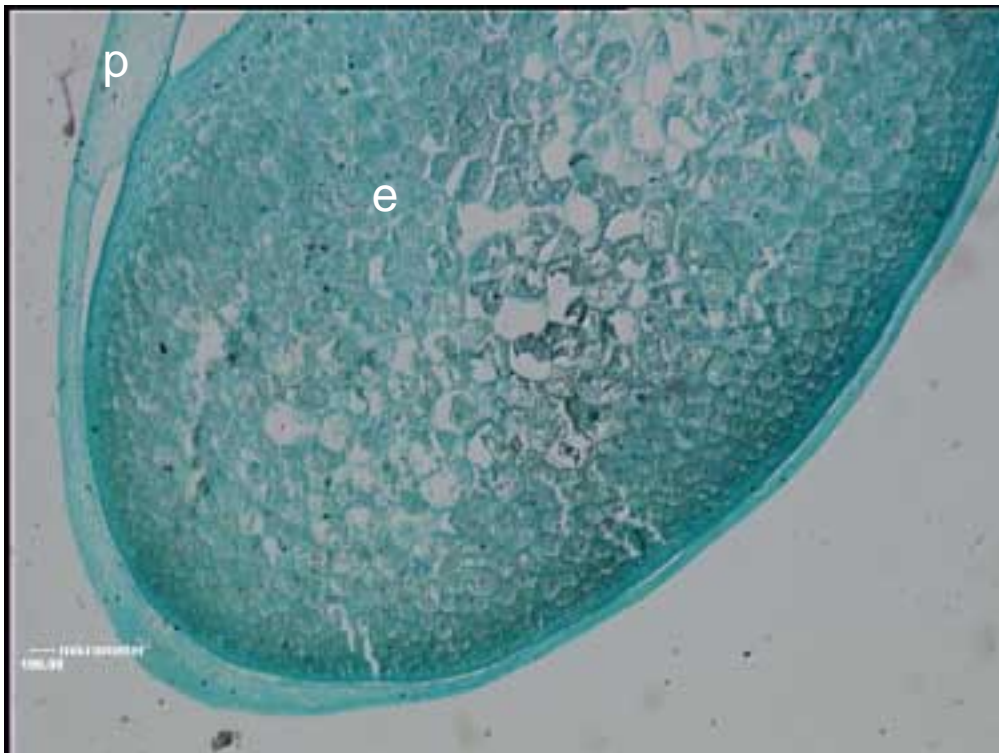


a

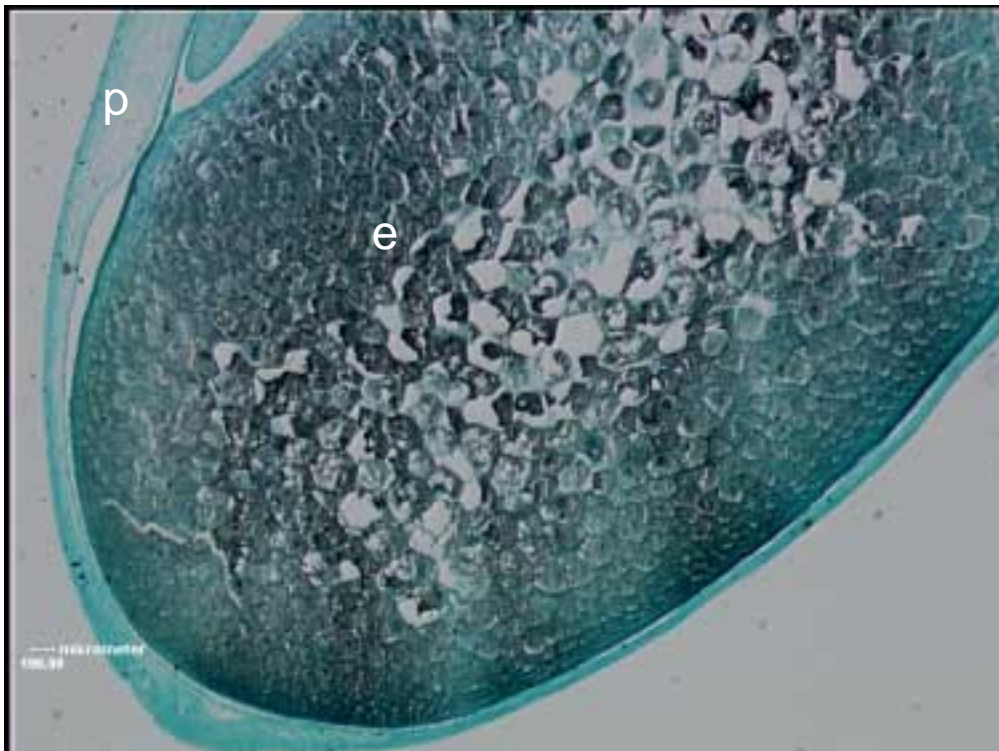


b

Slika 2: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Na sliki je del zrna z zarodkom, 12 dni po oprašitvi, vzdolžni prerez. Vidi se endosperm (e), perikarp (p), zarodek (z); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS1, signal je črno barvanje.

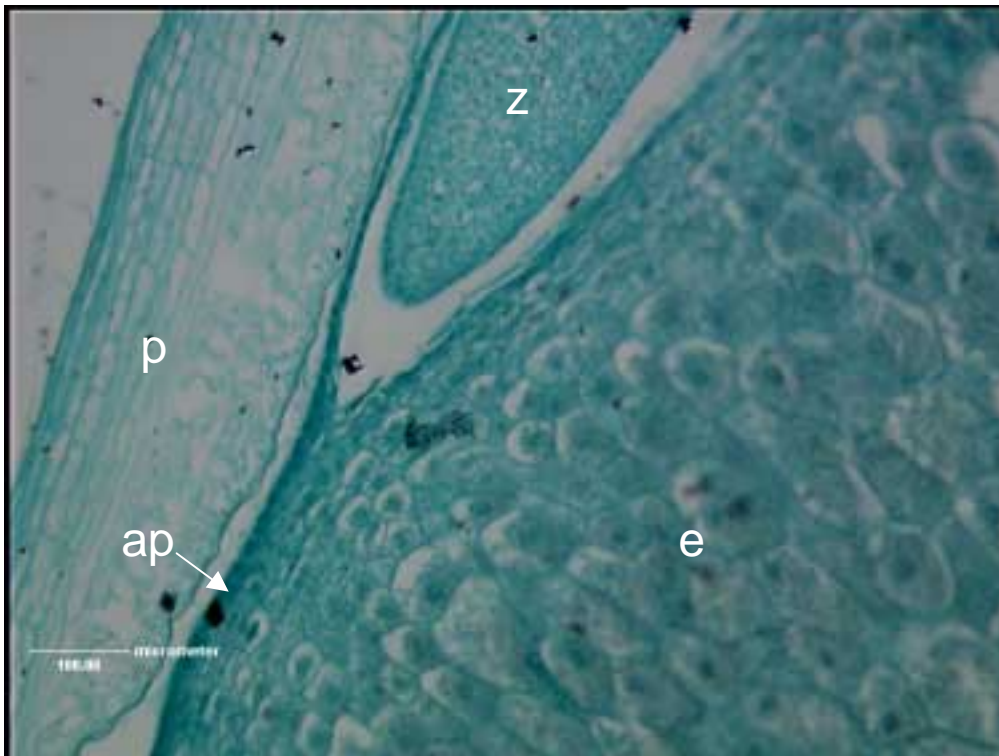


a

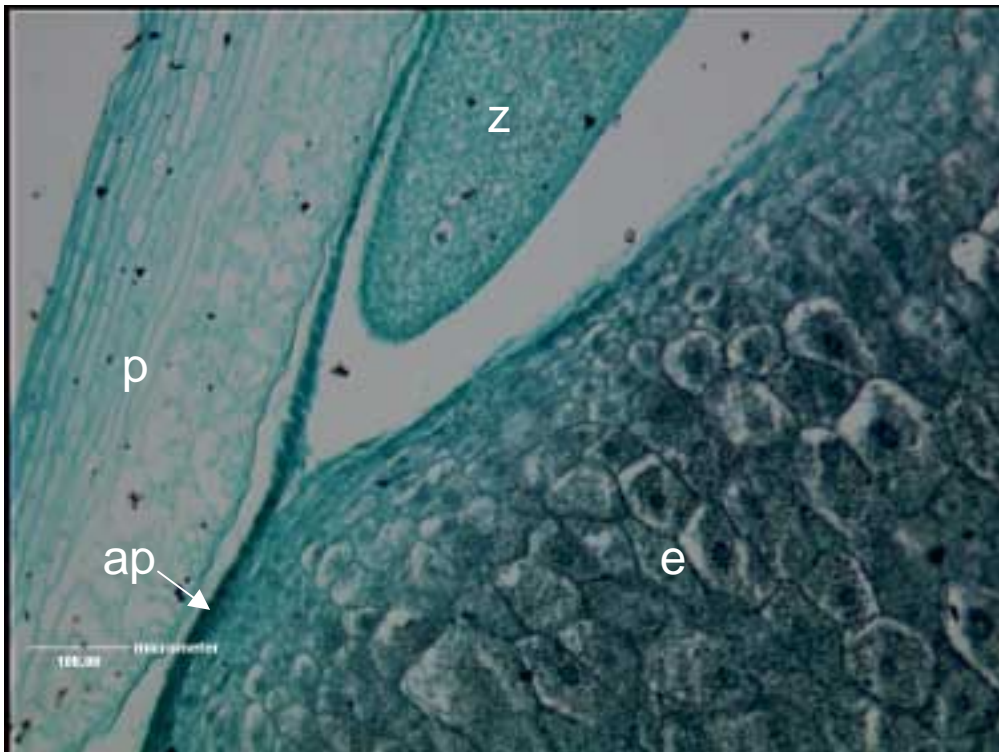


b

Slika 3: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Zgornji del zrna, 12 dni po oprašitvi, vzdolžni prerez. Vidi se endosperm (e) in perikarp (p); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS1, signal je črno barvanje.

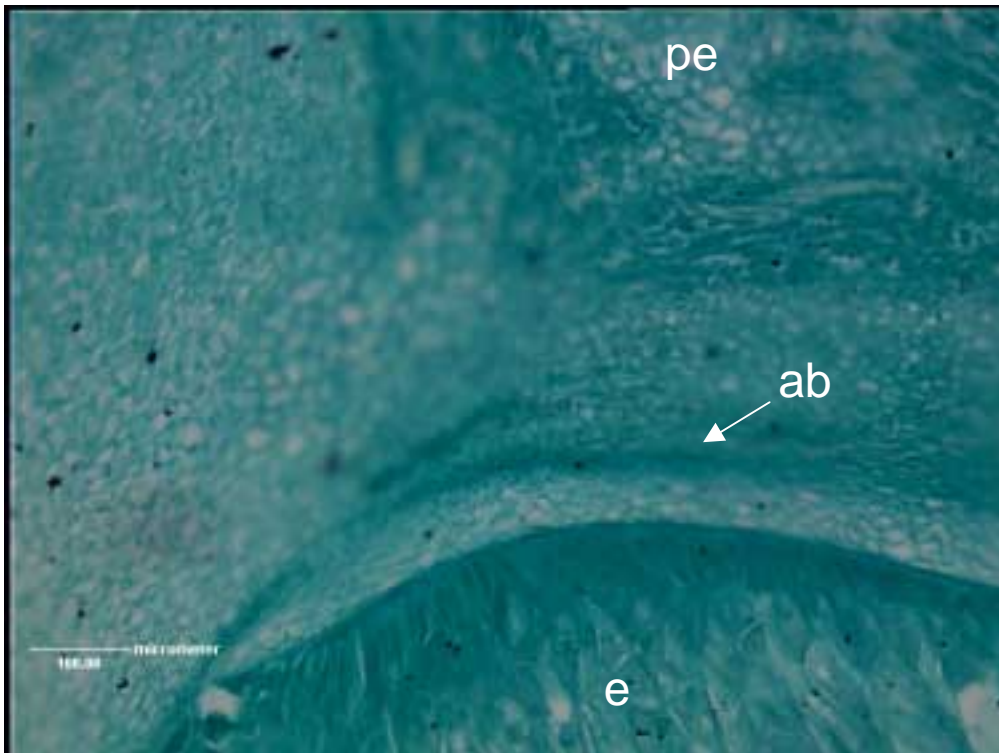


a

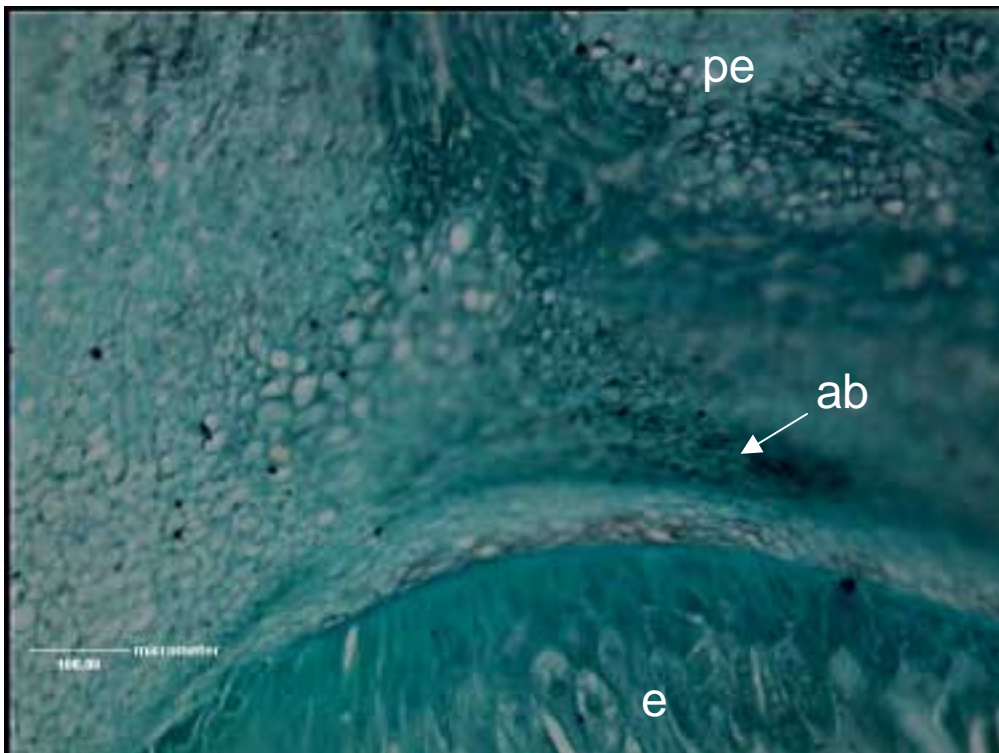


b

Slika 4: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Povečava dela zrna, vidi se perikarp, zarodek in endosperm, vzdolžni prerez. Vidi se endosperm (e), perikarp (p), zarodek (z) in alevronska plast (ap); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS1, signal je črno barvanje.

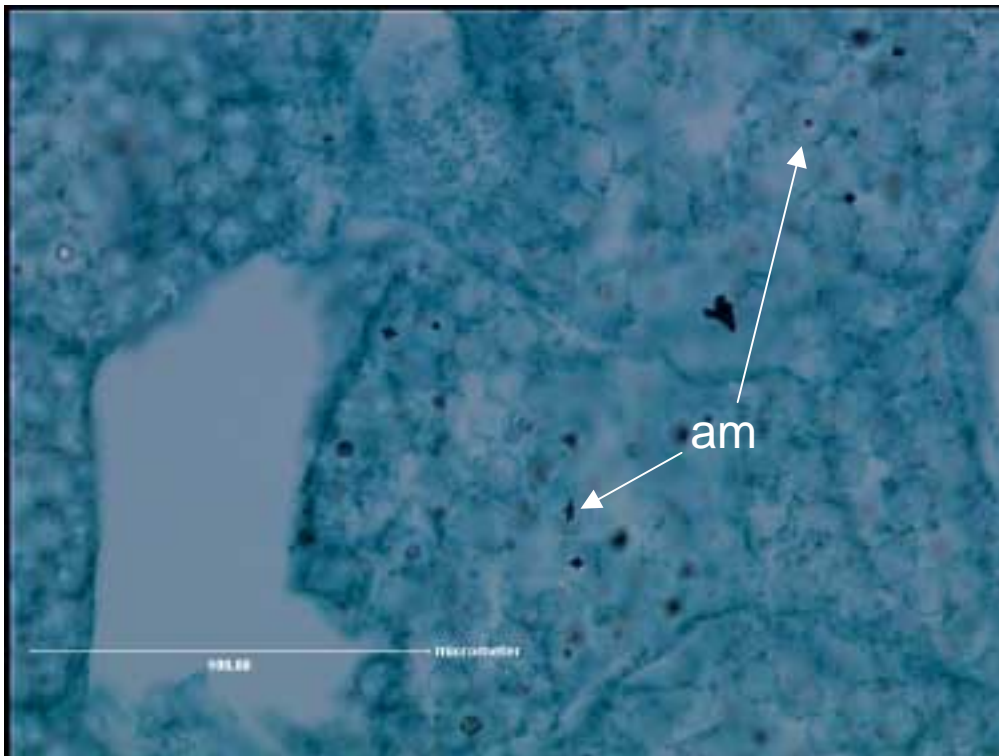


a

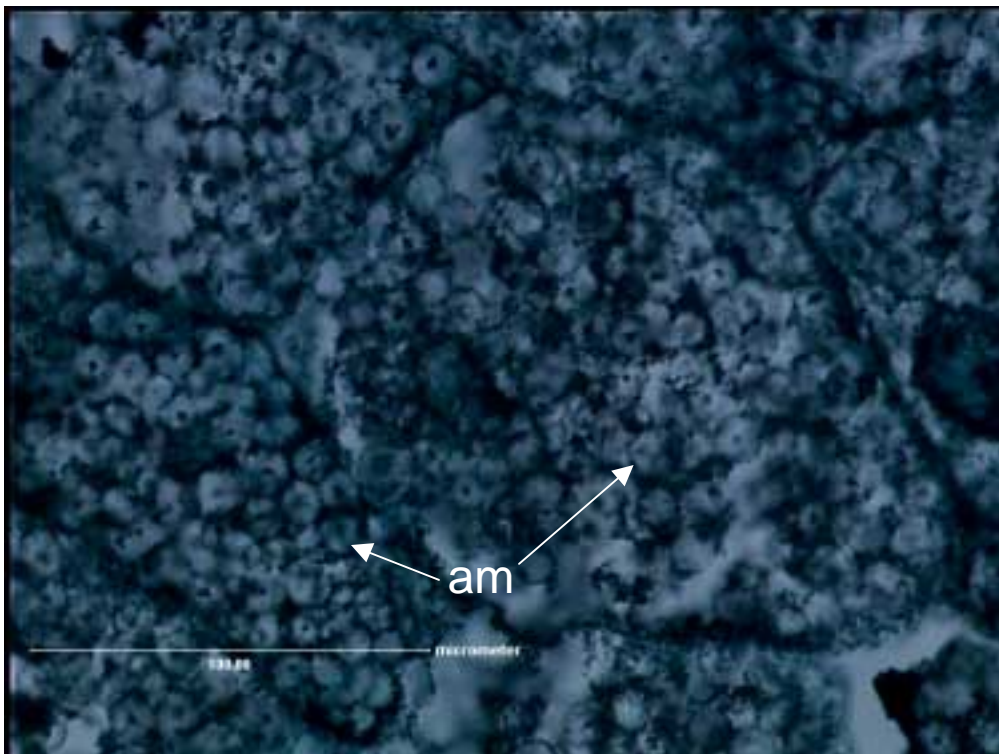


b

Slika 5: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Povečava spodnjega dela zrna, vzdolžni prerez. Zgoraj se vidi tkivo pedicela (pe), spodaj pa bazalni del endosperma (e), vidi se tudi abscizijska plast (ab); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS1, signal je črno barvanje.

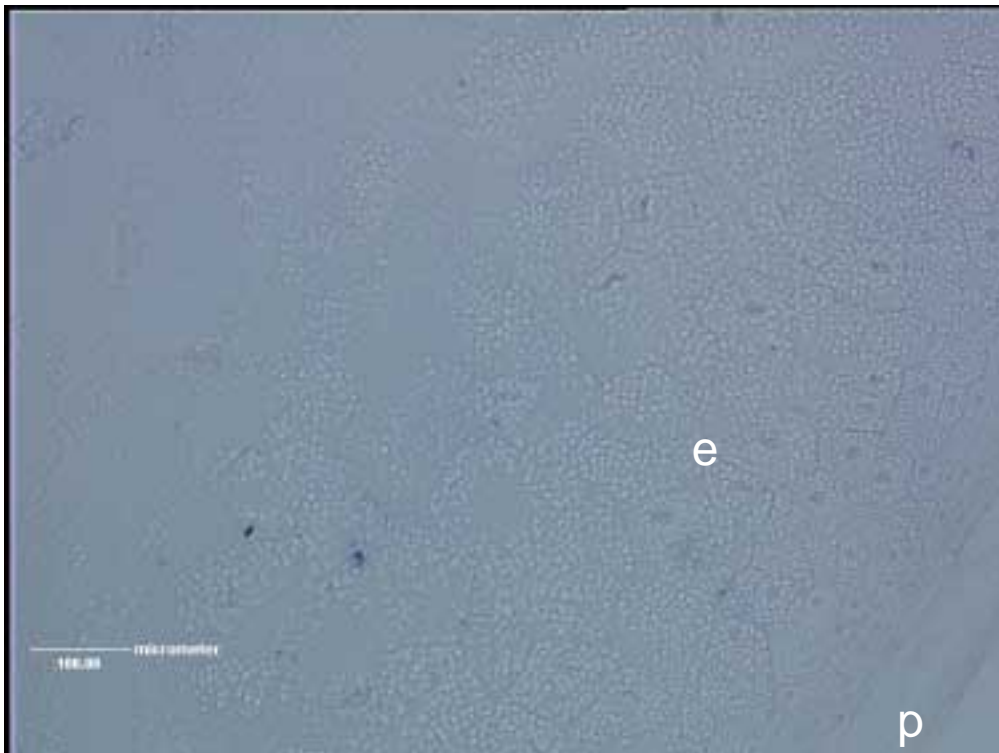


a

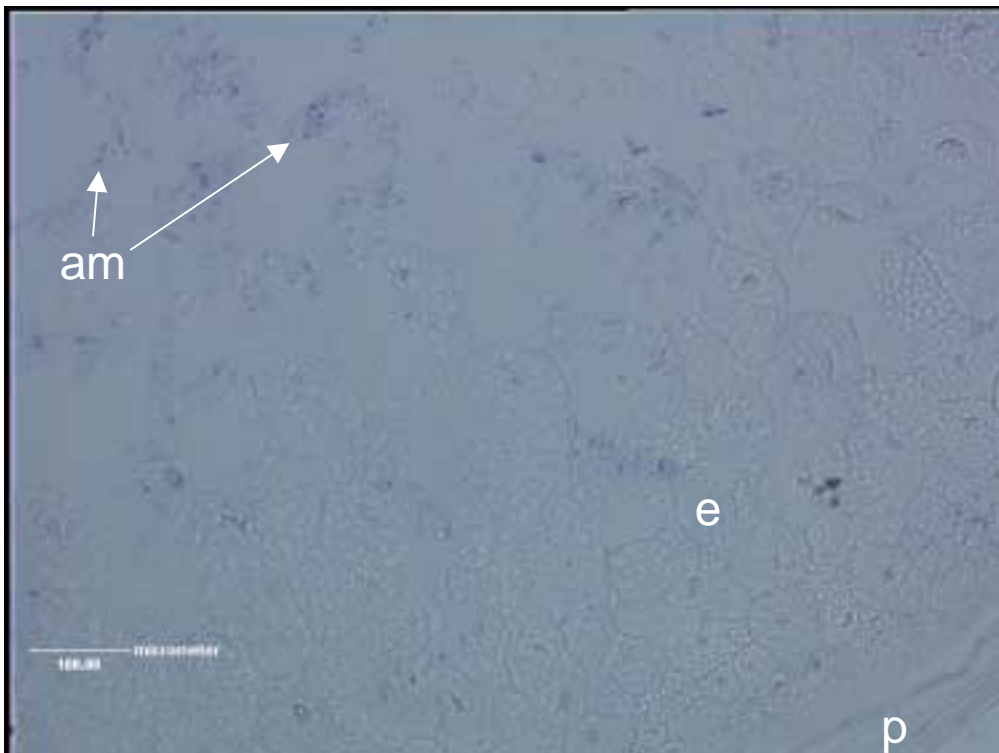


b

Slika 6: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Povečava endosperma, vzdolžni prerez, vidijo se celice z amiloplasti (am); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS1, signal je črno barvanje.

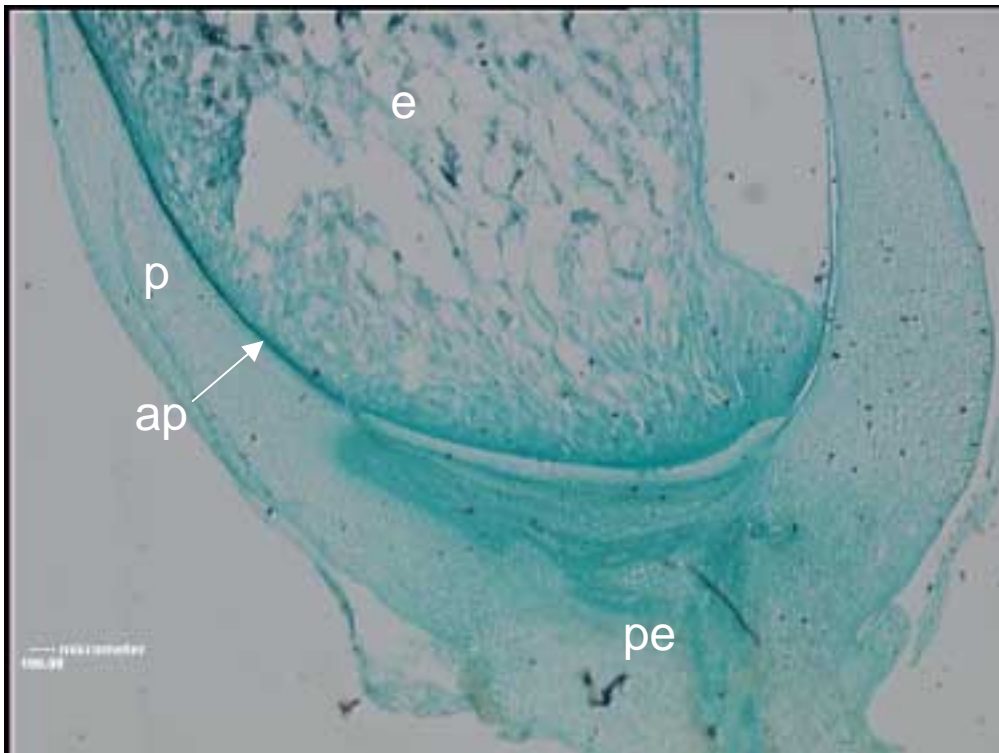


a

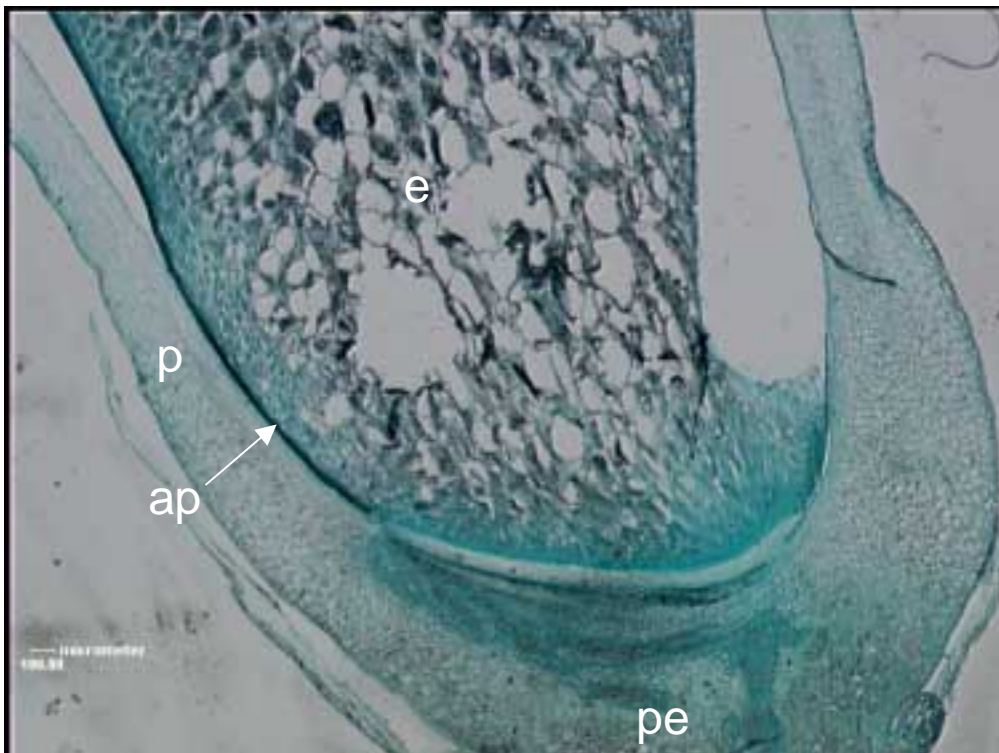


b

Slika 7: In situ hibridizacija mRNA za izocim saharozne sintaze SS1. Povečava endosperma, desno spodaj del perikarpa, vzdolžni prerez. Barvanje se vidi v amiloplastih (am), vidijo se tudi celice endosperma (e) in perikarp (p); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s sense sondo, b – antisense sonda za SS1 mRNA, signal je modrovijolično barvanje.

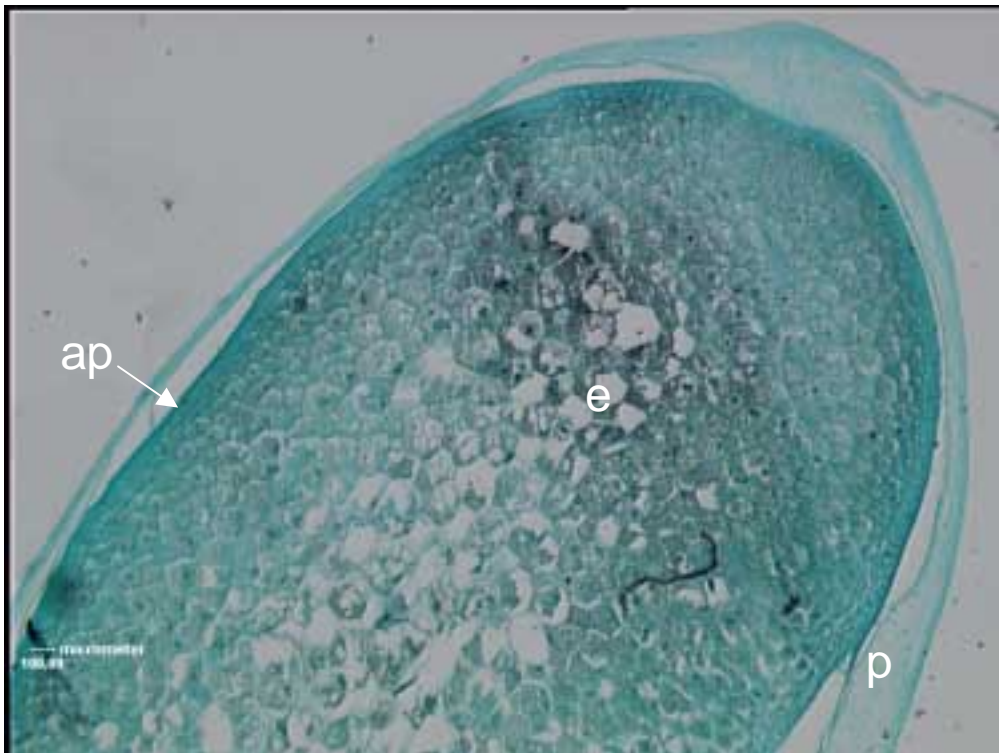


a

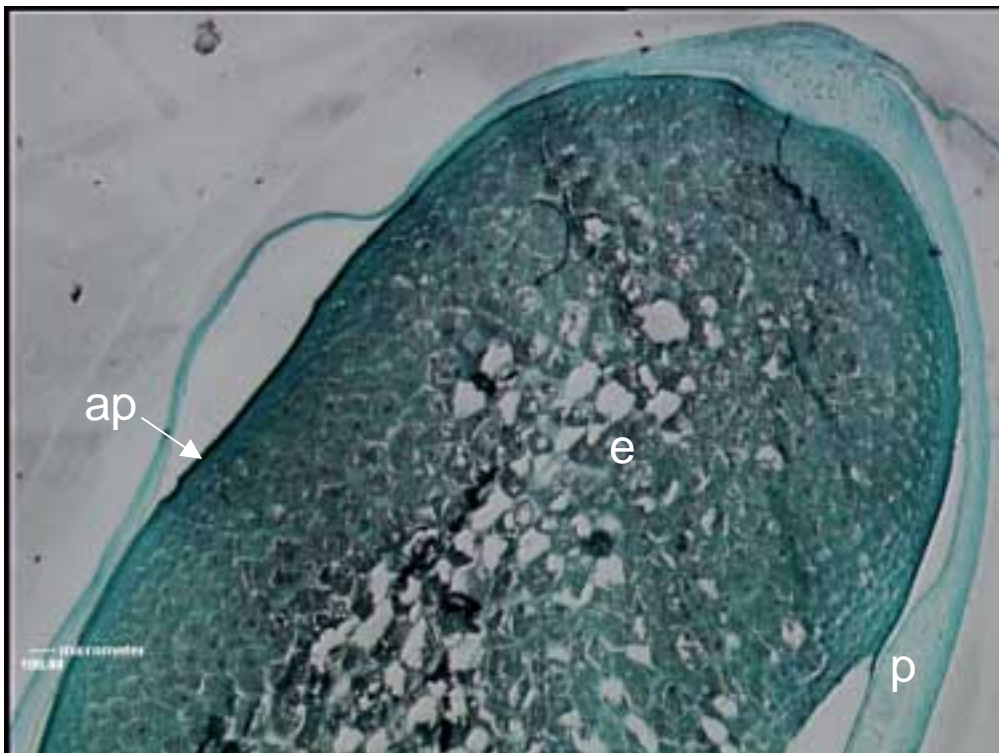


b

Slika 8: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS2. Spodnji del zrna, 12 dni po oprašitvi, vzdolžni prerez. Vidi se endosperm (e), perikarp (p), alevronska plast (ap), pedicel (pe); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS2, signal je črno barvanje.

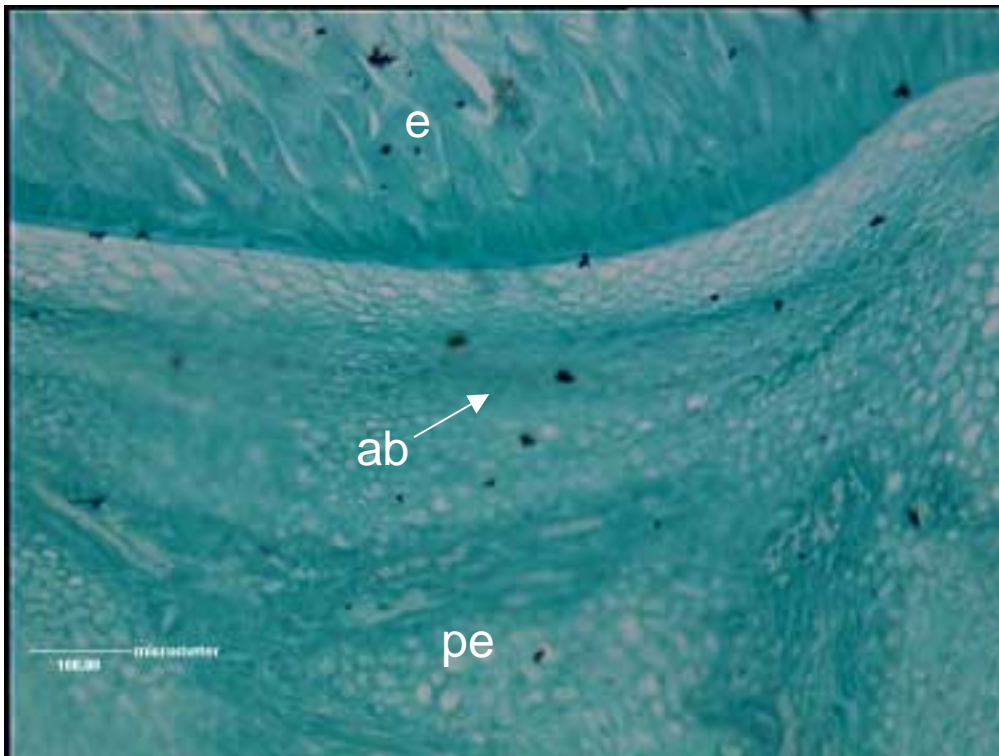


a

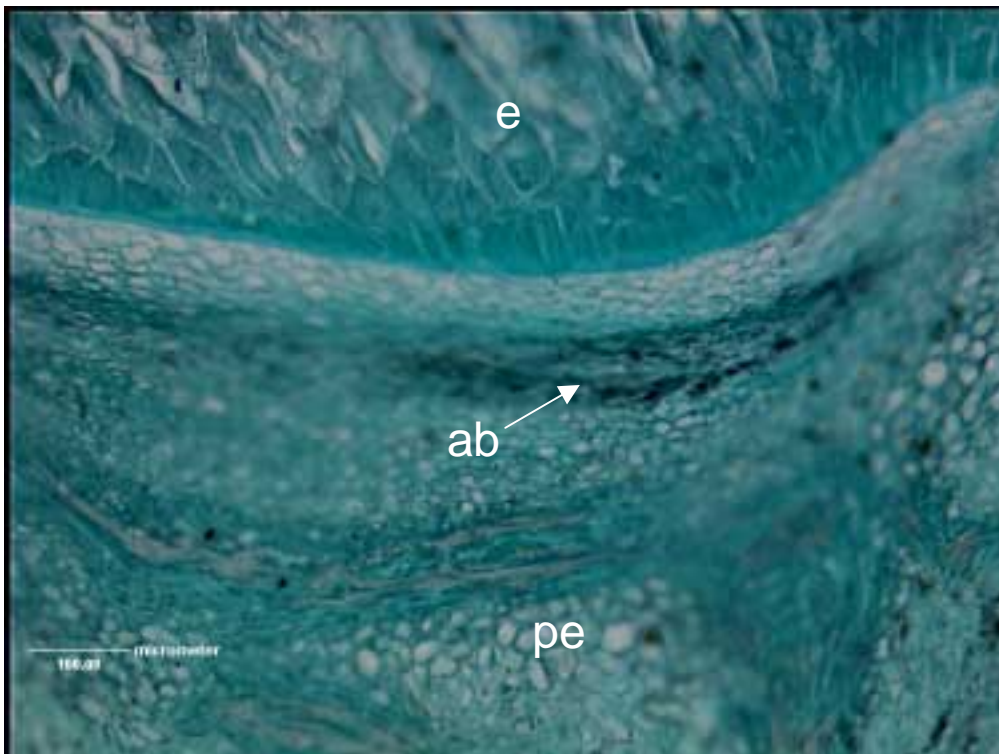


b

Slika 9: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS2. Zgornji del zrna, 12 dni po opraitvi, vzdolžni prerez. Vidi se endosperm (e), perikarp (p), alevronska plast (ap); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS2, signal je črno barvanje.

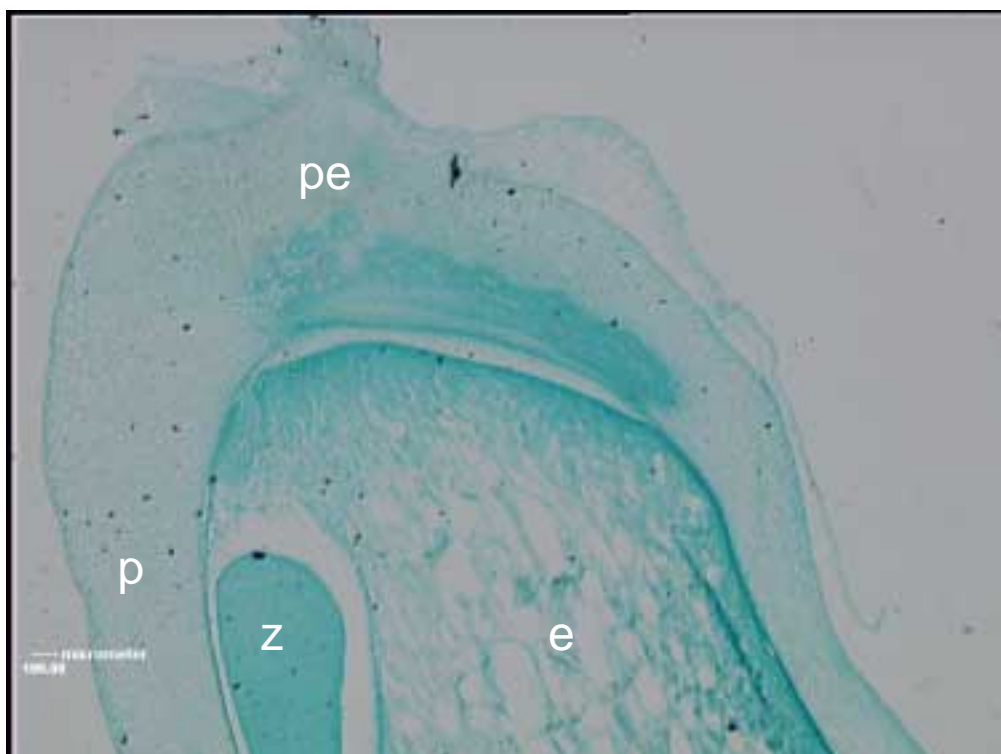


a

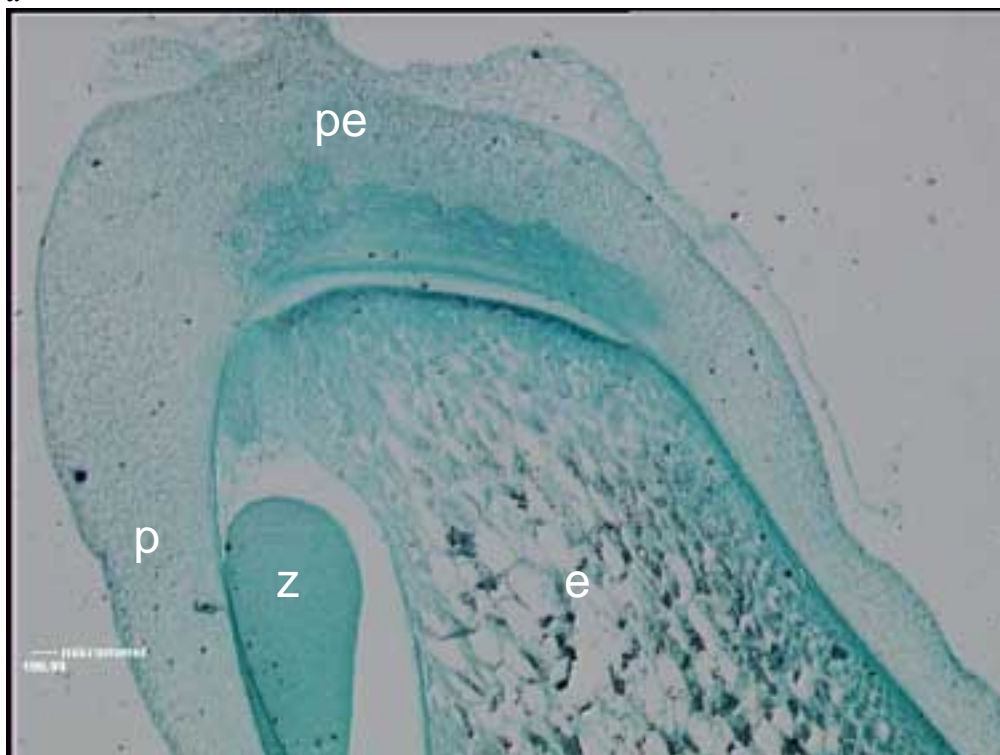


b

Slika 10: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS2. Spodnji del zrna, vzdolžni prerez. Vidi se bazalni del endosperma (e), tkivo pedicela (pe) in abscizijska plast (ab); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS2, signal je črno barvanje.

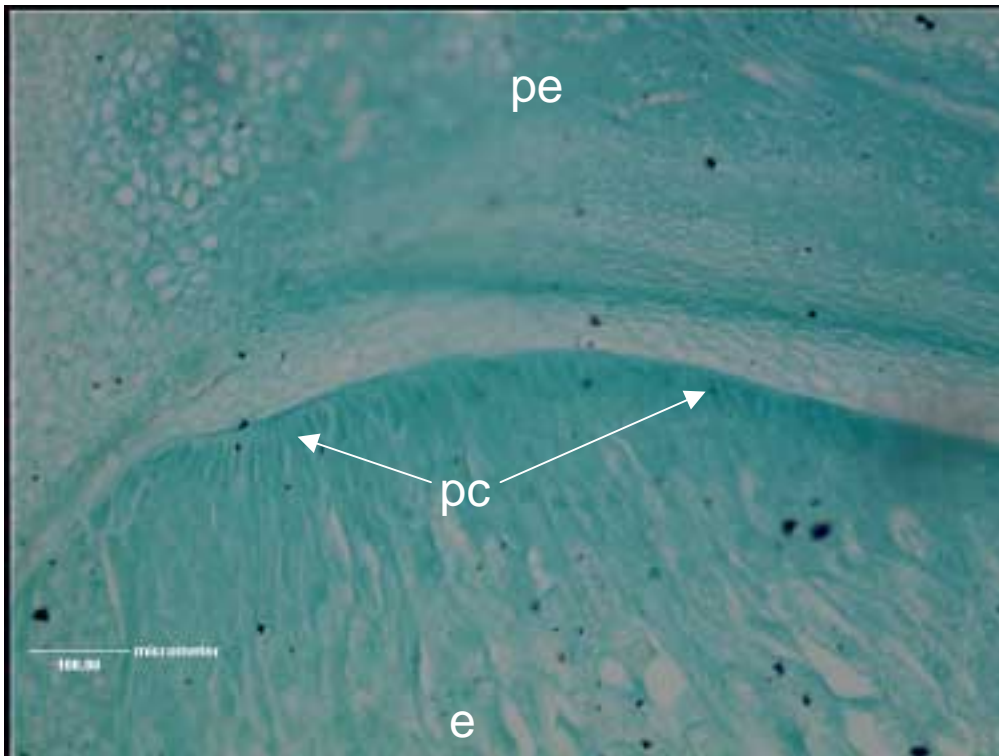


a

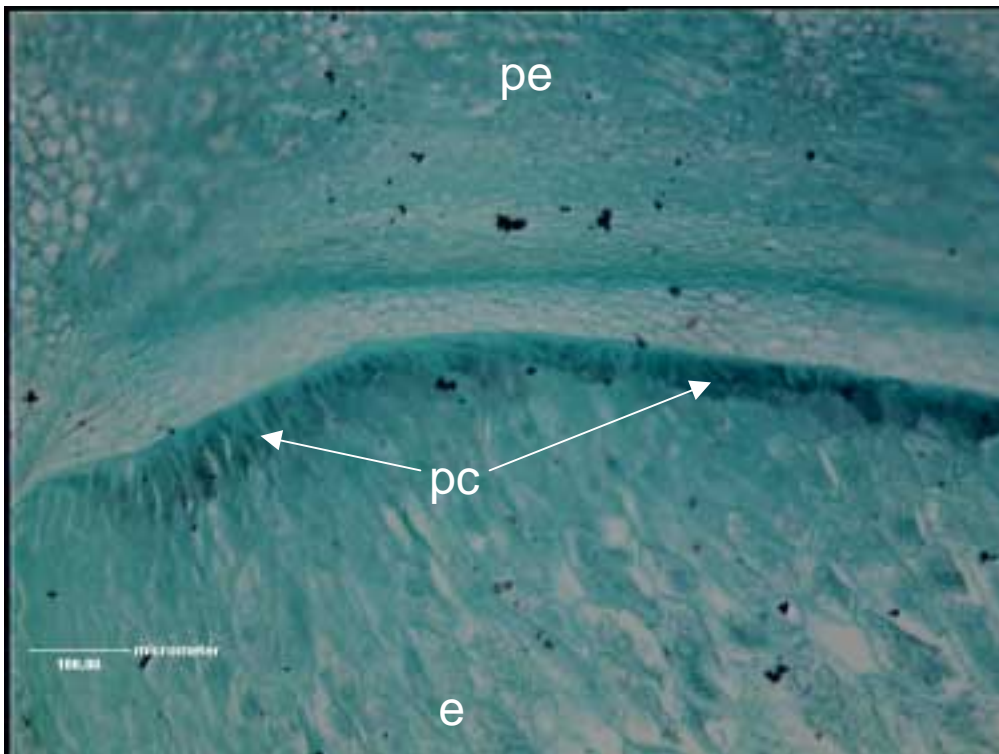


b

Slika 11: Imunolokalizacija izocima na celično steno vezane invertaze INCW2. Spodnji del zrna, 12 dni po opraitvi, vzdolžni prerez. Vidi se endosperm (e), perikarp (p), zarodek (z), pedicel (pe); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti INCW2, signal je črno barvanje.

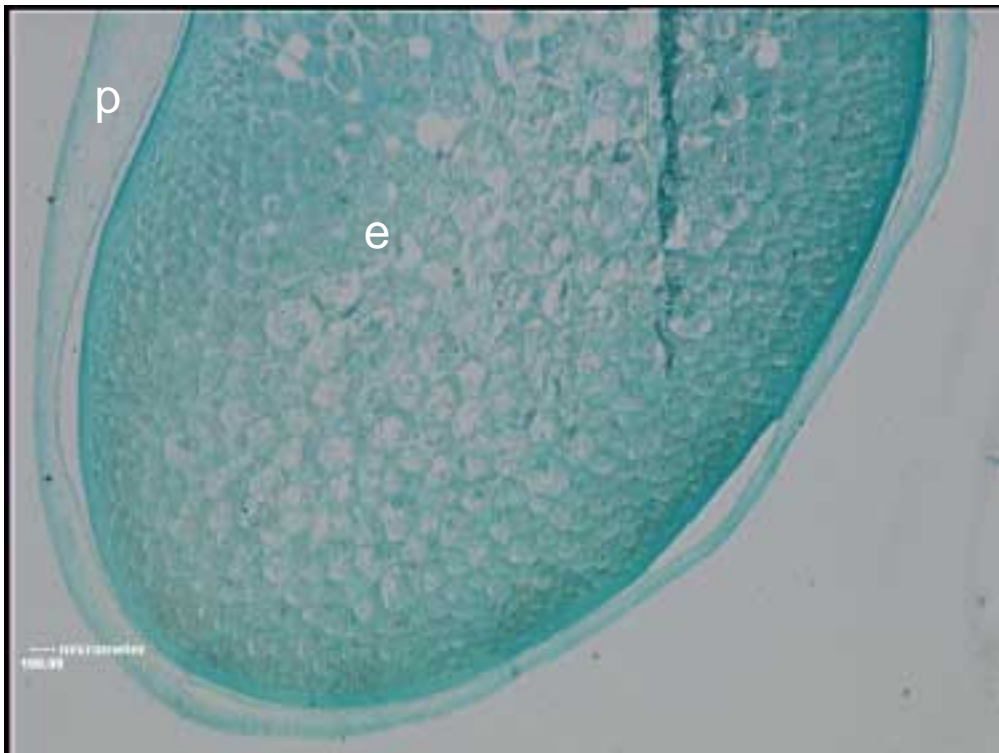


a

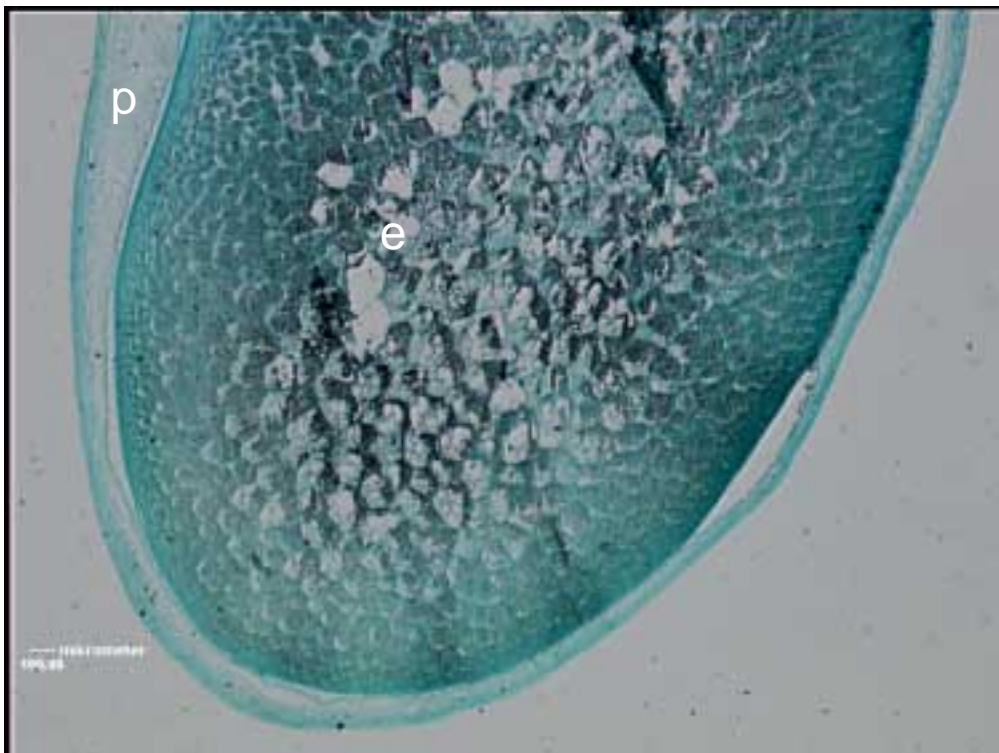


b

Slika 12: Imunolokalizacija izocima na celično steno vezane invertaze INCW2. Spodnji del zrna, vzdolžni prerez. Vidi se bazalni del endosperma (e) in tkivo pedicela (pe), obarvane so predvsem bazalne endospermske prenosne celice (pc); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti INCW2, signal je črno barvanje.

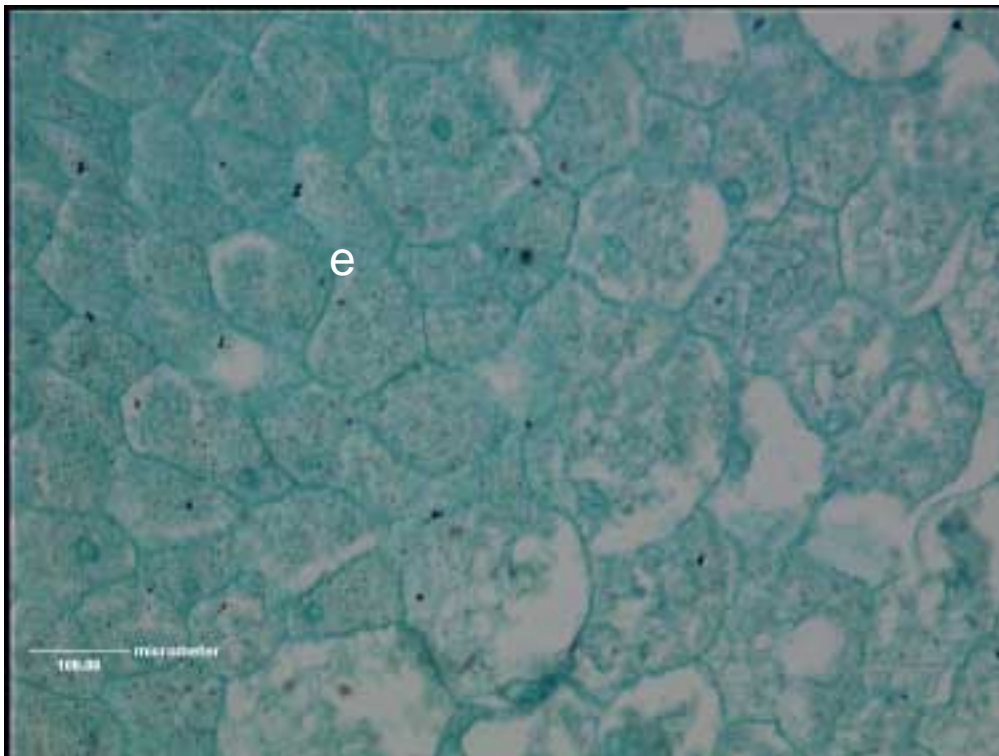


a

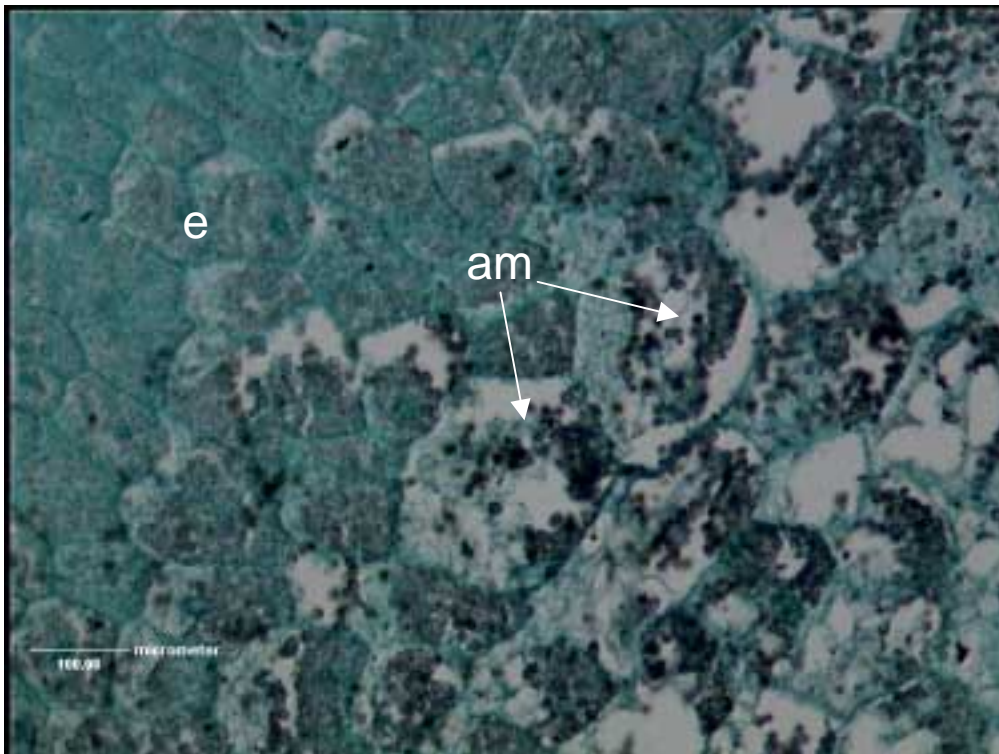


b

Slika 13: Imunolokalizacija izocima na celično steno vezane invertaze INCW2. Zgornji del zrna, 12 dni po opraitvi, vzdolžni prerez. Vidi se endosperm (e) in perikarp (p); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti INCW2, signal je črno barvanje.



a



b

Slika 14: Imunolokalizacija izocima na celično steno vezane invertaze INCW2. Povečava dela endosperma, vzdolžni prerez. Vidijo se celice endosperma (e), barvanje vidno v območju amiloplastov (am); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti INCW2, signal je črno barvanje.

4.2 KORENINA

Preparati so vzdolžni in prečni prerezi korenin, nabranih 4 ali 9 dni po kalitvi. Signal za imunolokalizacijo je temno (črno) barvanje. Preparati so dodatno barvani še s FastGreen-om, da je morfologija boljše vidna. Signal za *in-situ* hibridizacijo je modro-vijolično barvanje, teh preparatov nismo barvali s FastGreen-om.

Slika 15: Imunolokalizacija za SSI. Terminalni del 4 dni stare korenine, vzdolžni prerez

Slika 16: Imunolokalizacija za SSI. Terminalni del 9 dni stare korenine, vzdolžni prerez

- Močno barvanje vidimo v koreninski čepici, dokaj enakomerno barvanje tudi v višjem tkivu 9 dni stare korenine.

Slika 17: Imunolokalizacija za INCW1. 4 dni stara korenina, vzdolžni prerez

Slika 18: Imunolokalizacija za INCW1. 9 dni stara korenina, vzdolžni prerez

- Vidimo lahko le nekoliko obarvane celice v koreninski čepici.

Slika 19: Imunolokalizacija za SSI. 4 dni stara korenina, prečni prerez

Slika 20: Imunolokalizacija za SSI. 9 dni stara korenina, prečni prerez

- Opazimo lahko trend splošnega temnejšega barvanja.

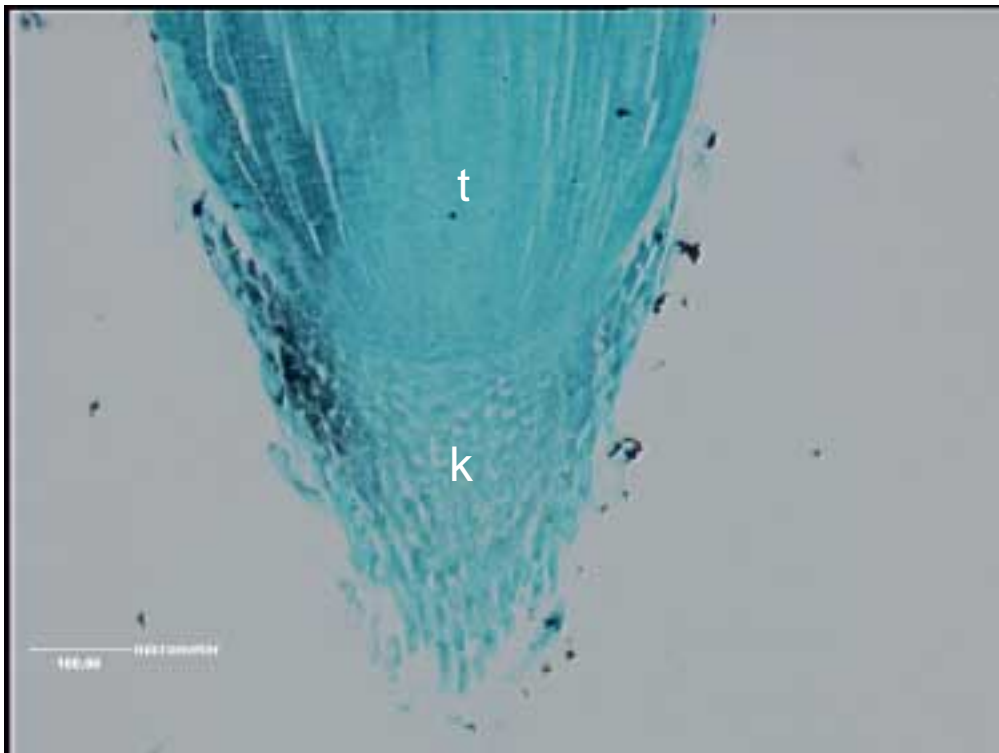
Slika 21: Imunolokalizacija za INCW1. 4 dni stara korenina, prečni prerez

Slika 22: Imunolokalizacija za INCW1. 9 dni stara korenina, prečni prerez

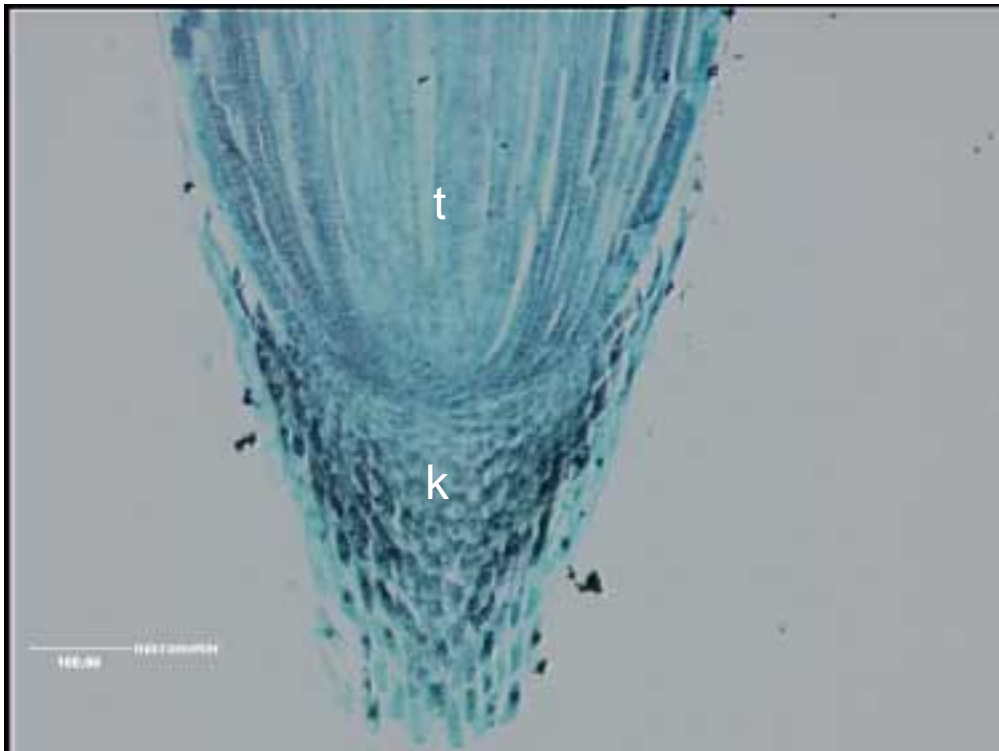
- Opazimo lahko le nekoliko močnejši splošen signal v poskusnem preparatu.

Slika 23: In situ hibridizacija za SSI mRNA. 9 dni stara korenina, prečni prerez

- Vidimo lahko močan signal v osrednjem parenhimskem delu prevodnega cilindra glavne in stranske korenine. Signal je viden tudi v periciklu in skorji.

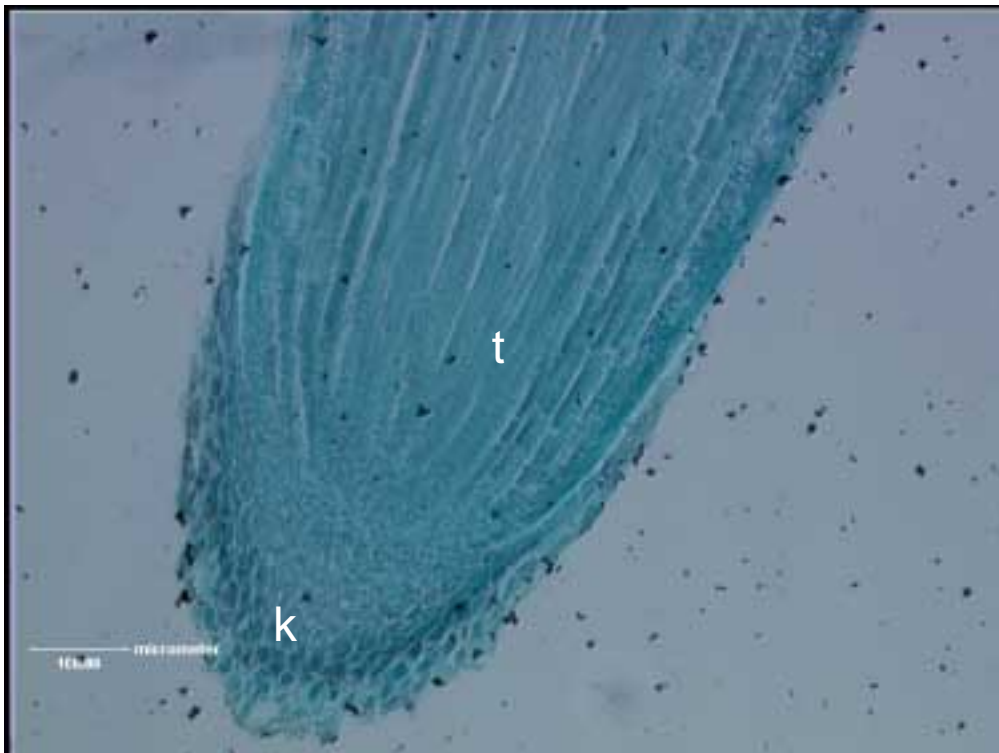


a

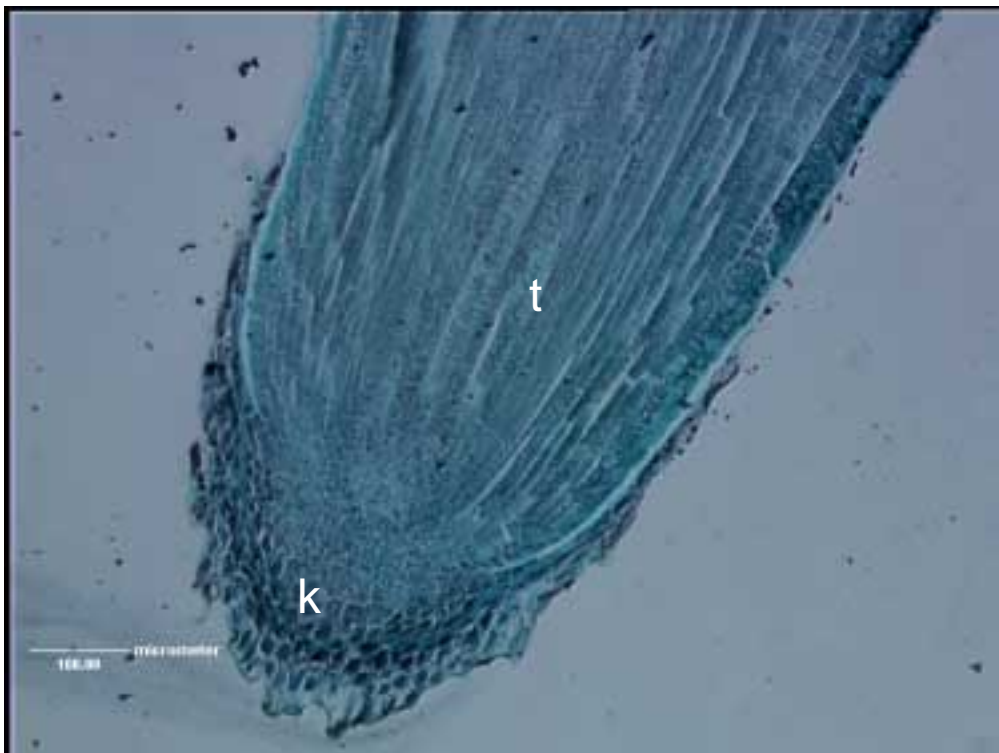


b

Slika 15: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Terminalni del 4 dni stare korenine, vzdolzni prerez. Vidi se koreninska čepica (k) in telo korenine (t); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS1, signal je črno barvanje.

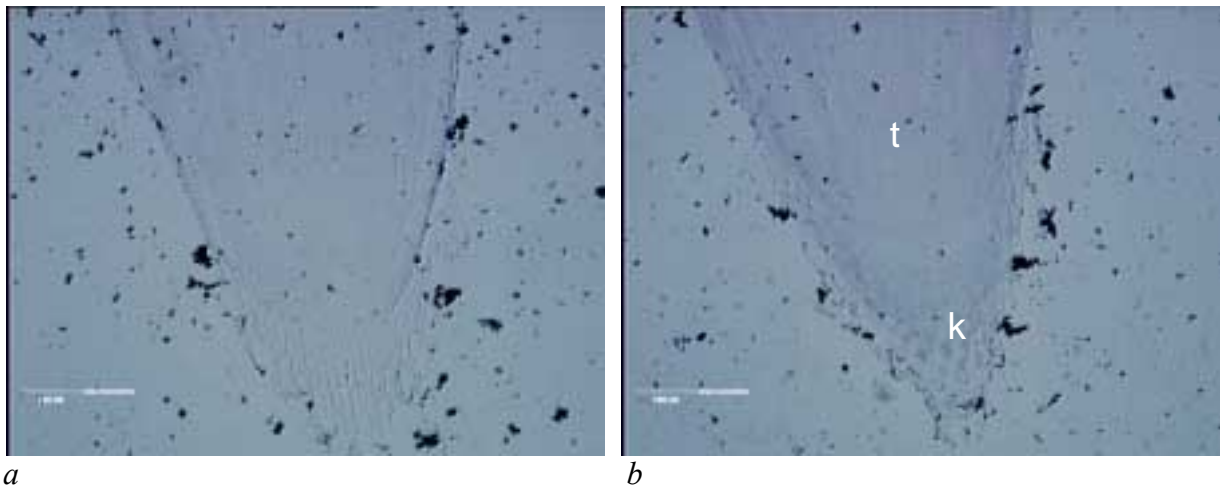


a

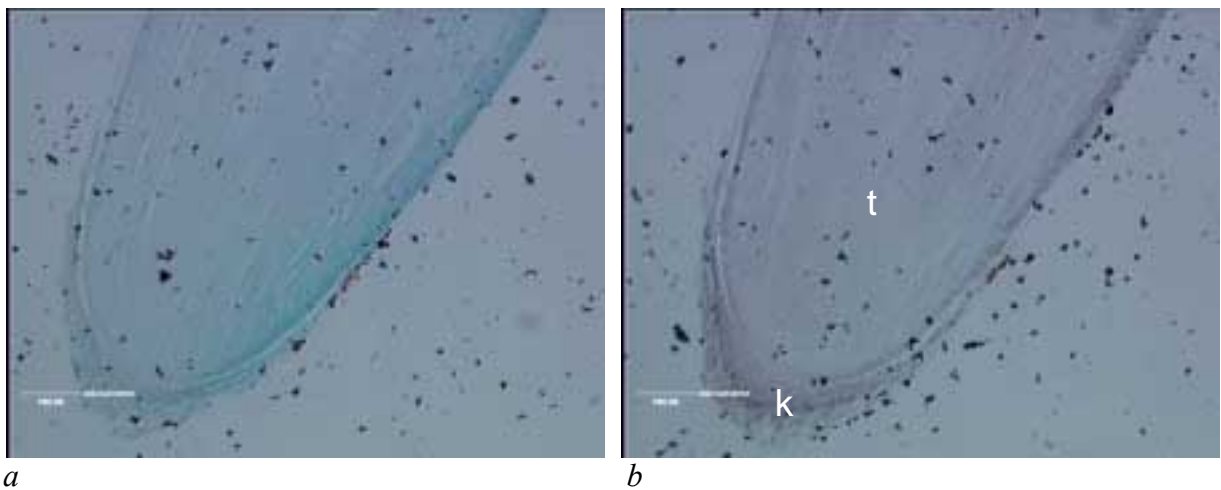


b

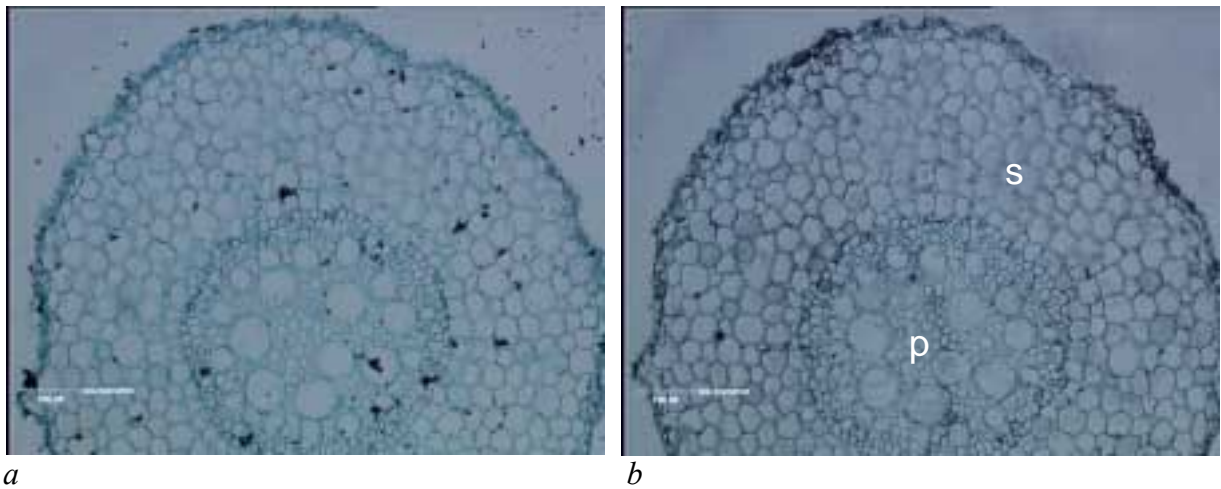
Slika 16: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. Terminalni del 9 dni stare korenine, vzdolžni prerez. Vidi se koreninska čepica (k) in telo korenine (t); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS1, signal je črno barvanje.



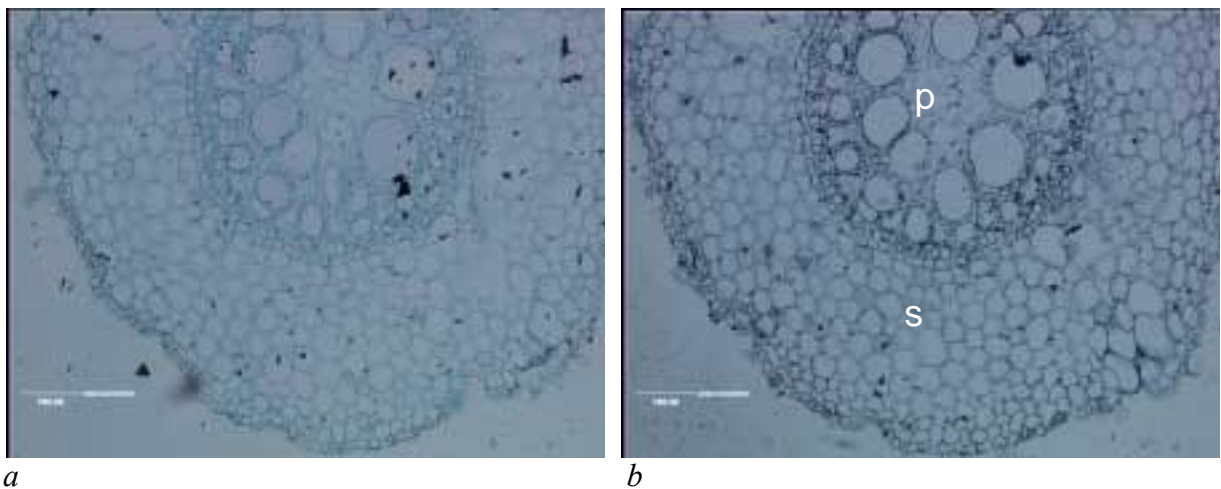
Slika 17: Imunolokalizacija izocima na celično steno vezane invertaze INCW1. 4 dni stara korenina, vzdolžni prerez. Vidi se koreninska čepica (k) in telo korenine (t); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti INCW1, signal je črno barvanje.



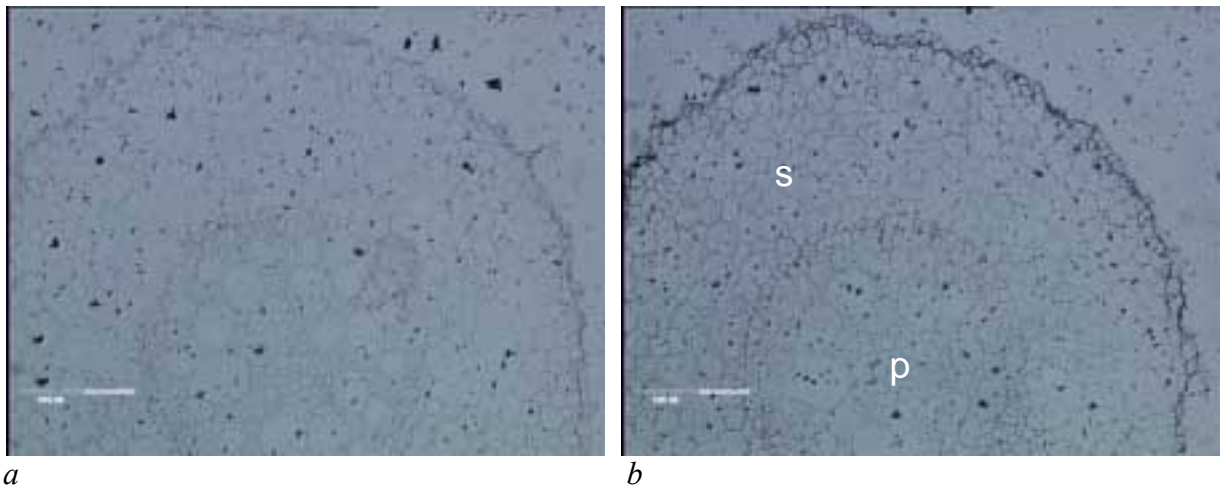
Slika 18: Imunolokalizacija izocima na celično steno vezane invertaze INCW1. 9 dni stara korenina, vzdolžni prerez. Vidi se koreninska čepica (k) in telo korenine (t); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti INCW1, signal je črno barvanje.



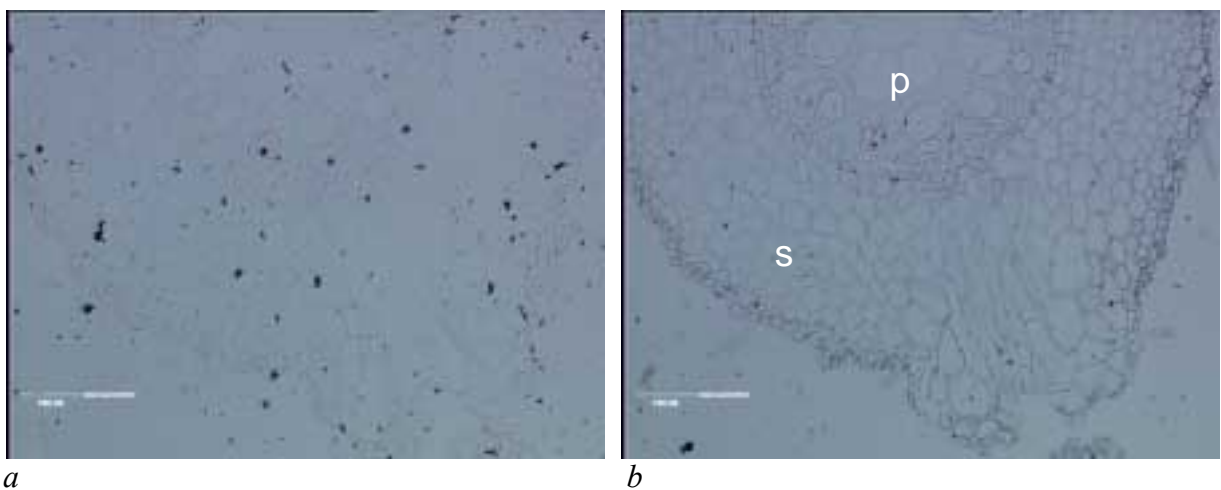
Slika 19: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. 4 dni stara korenina, prečni prerez. Barvanje je enakomerno porazdeljeno po prevodnem cilindru (p) in skorji (s); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS1, signal je črno barvanje.



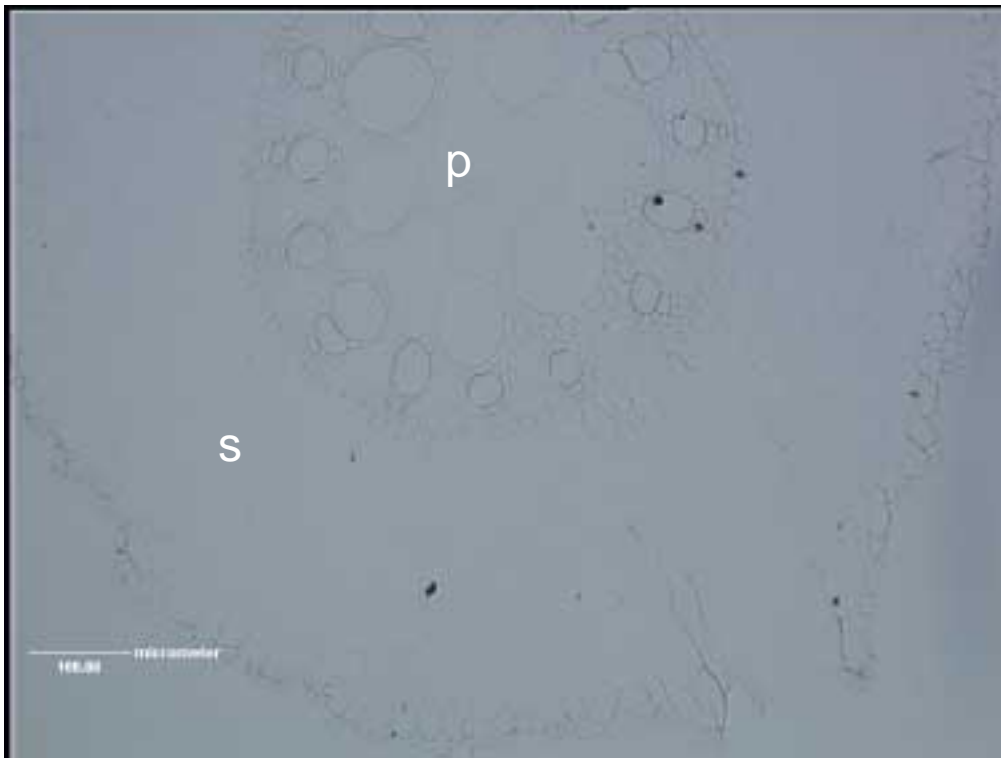
Slika 20: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. 9 dni stara korenina, prečni prerez. Barvanje je enakomerno porazdeljeno po prevodnem cilindru (p) in skorji (s); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS1, signal je črno barvanje.



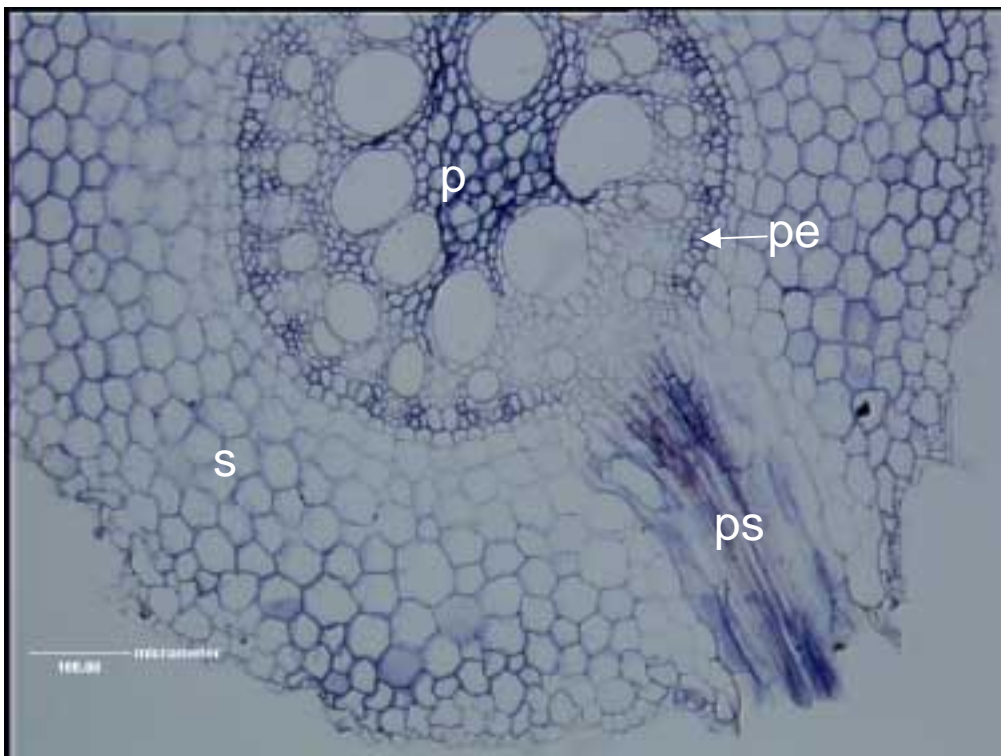
Slika 21: Imunolokalizacija izocima na celično steno vezane invertaze INCW1. 4 dni stara korenina, prečni prerez. Barvanje je enakomerno porazdeljeno po prevodnem cilindru (p) in skorji (s); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti INCW1, signal je črno barvanje.



Slika 22: Imunolokalizacija izocima na celično steno vezane invertaze INCW1. 9 dni stara korenina, prečni prerez. Barvanje je enakomerno porazdeljeno po prevodnem cilindru (p) in skorji (s); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti INCW1, signal je črno barvanje.



a



b

Slika 23: In situ hibridizacija mRNA za izocim saharozne sintaze SS1. 9 dni stara korenina, prečni prerez. Barvanje je najmočnejše v osrednjem delu prevodnega cilindra glavne korenine (p) in stranske korenine (ps), barvanje vidno tudi v periciklu (pe) in v skorji (s) glavne korenine; črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s sense sondo, b – antisense sonda za SS1 mRNA, signal je modrovijolično barvanje.

4.3 POGANJEK

Preparati so prečni prerezi poganjkov, nabranih 4 ali 9 dni po kalitvi. Signal za imunolokalizacijo je temno (črno) barvanje. Preparati so dodatno barvani še s FastGreen-om, da je morfologija boljše vidna. Signal za *in-situ* hibridizacijo je modro-vijolično barvanje, teh preparatov nismo barvali s FastGreen-om.

Slika 24: Imunolokalizacija za SSI. 4 dni star poganjek, prečni prerez

Slika 25: Imunolokalizacija za SSI. 4 dni star poganjek, prečni prerez, povečava

- Barvanje vidno predvsem v pravih listih, ki so spiralno zaviti, pa tudi v žili koleoptile.

Slika 26: Imunolokalizacija za SSI. 9 dni star poganjek, prečni prerez

Slika 27: Imunolokalizacija za SSI. 9 dni star poganjek, prečni prerez, povečava

- Razlike v barvanju med kontrolo in poskusom skoraj ni.

Slika 28: In situ hibridizacija za SSI mRNA. 9 dni star poganjek, prečni prerez

Slika 29: In situ hibridizacija za SSI mRNA. 9 dni star poganjek, prečni prerez, povečava

- Signal le v prvem pravem listu in v žili koleoptile.

Slika 30: Imunolokalizacija za INCW1. 9 dni star poganjek, prečni prerez

Slika 31: Imunolokalizacija za INCW1. 9 dni star poganjek, prečni prerez, povečava

- Močno barvanje najmlajših listov. Starejši listi imajo signal izražen predvsem v območju prevodnih tkiv.

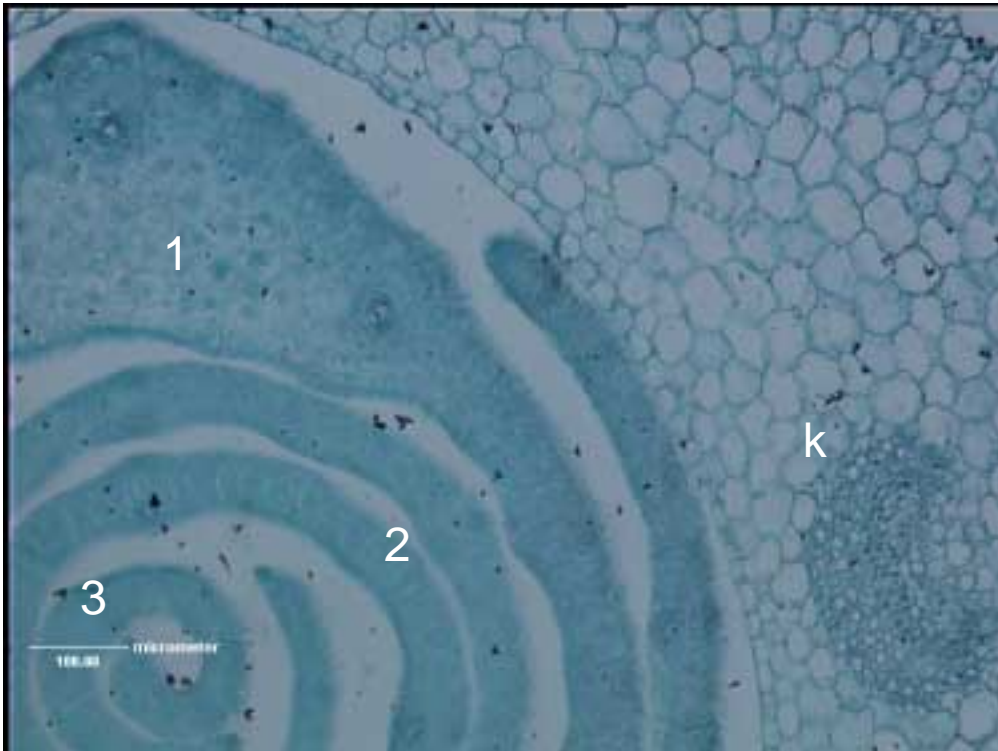


a

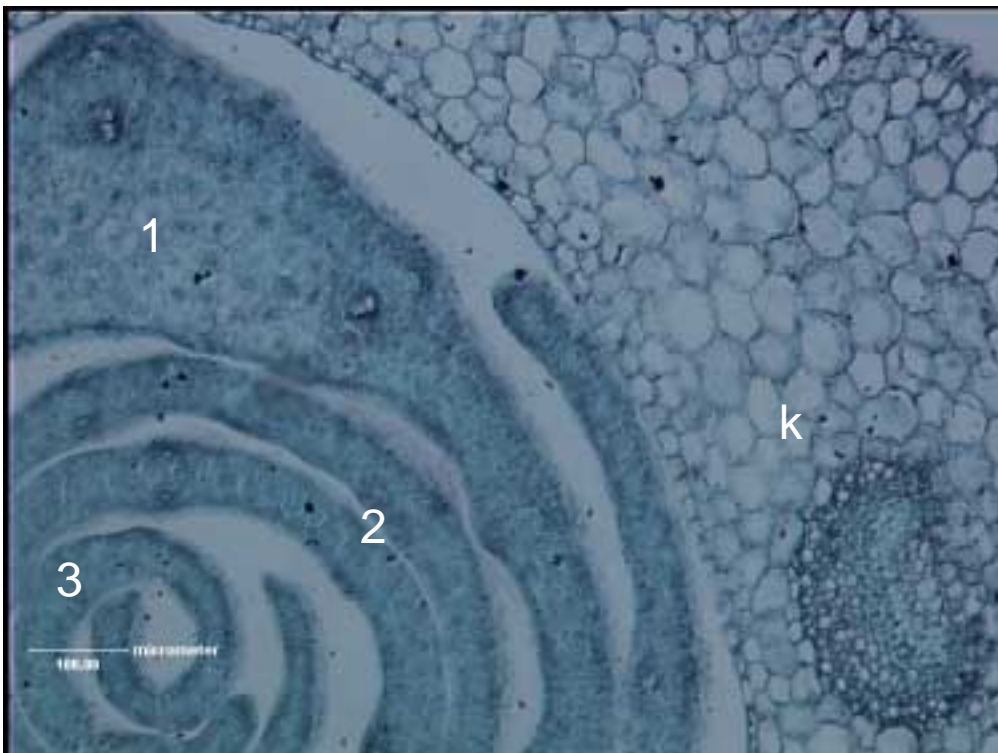


b

Slika 24: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. 4 dni star poganjek, prečni prerez. Vidi se koleoptila (*k*) in pravi listi (*l*); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS1, signal je črno barvanje.

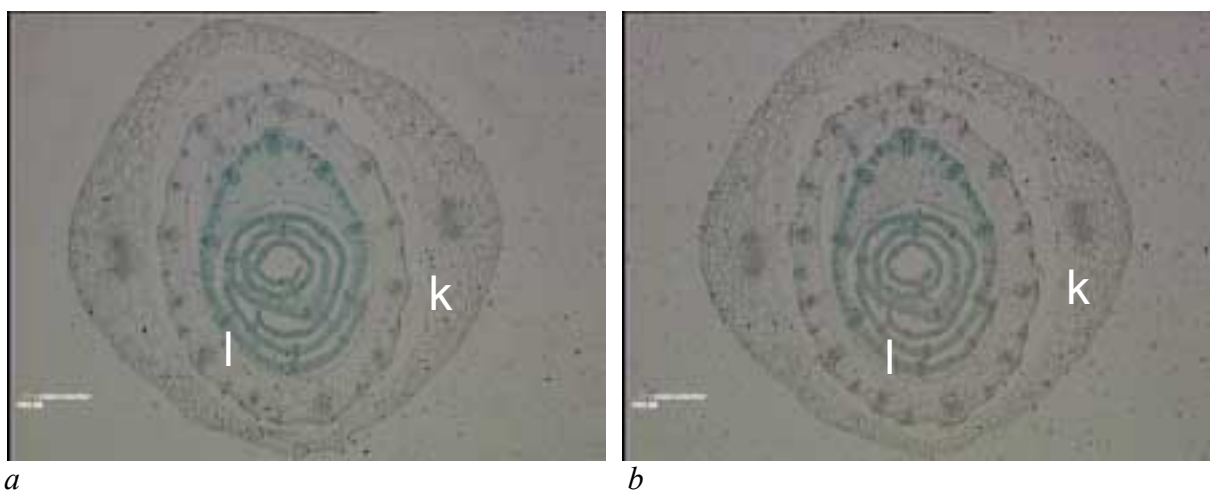


a

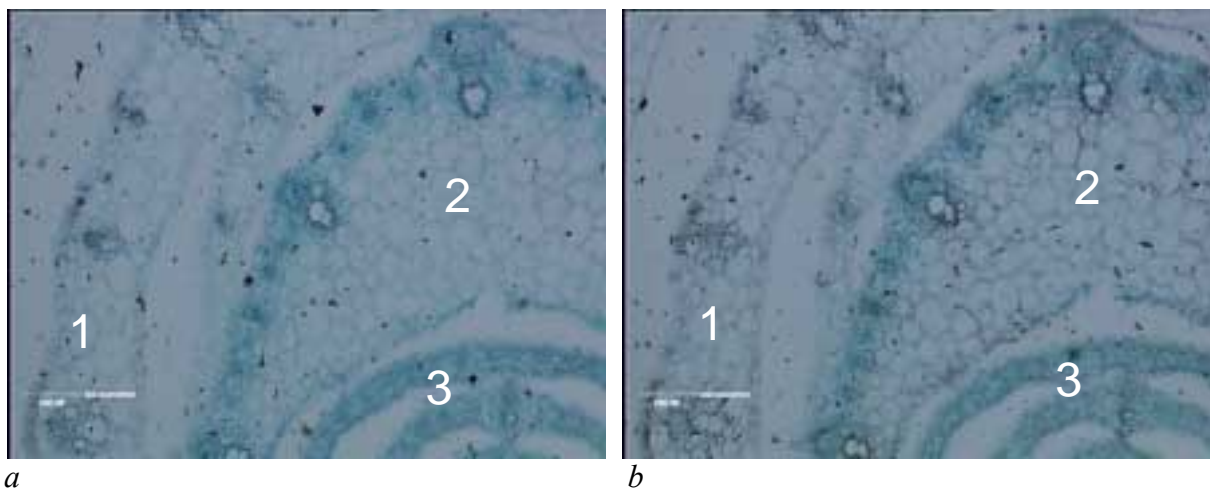


b

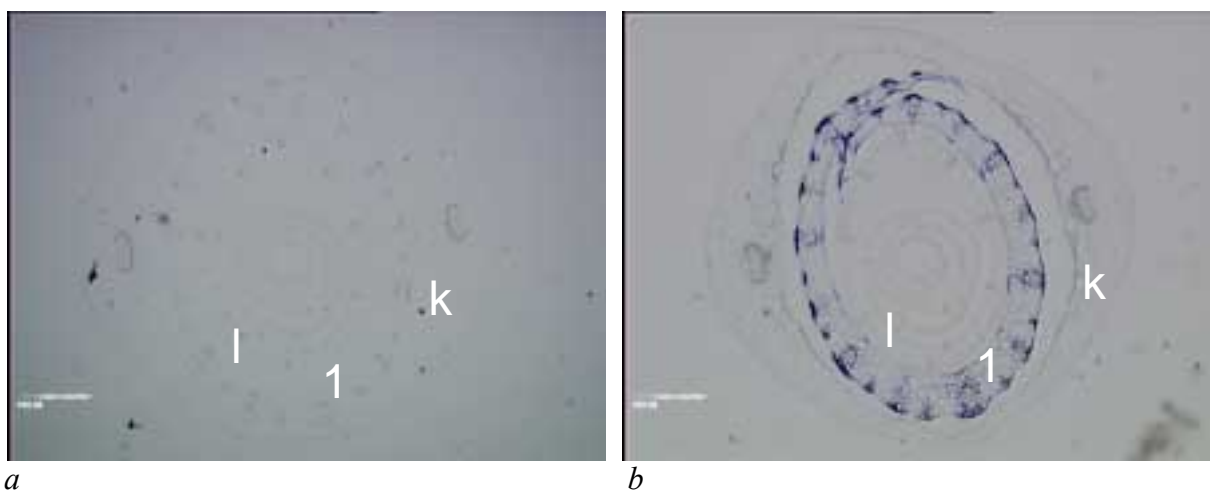
Slika 25: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. 4 dni star poganjek, prečni prerez. Vidi se koleoptila (k) z žilo in prvi (1), drugi (2) ter tretji pravi list (3); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS1, signal je črno barvanje.



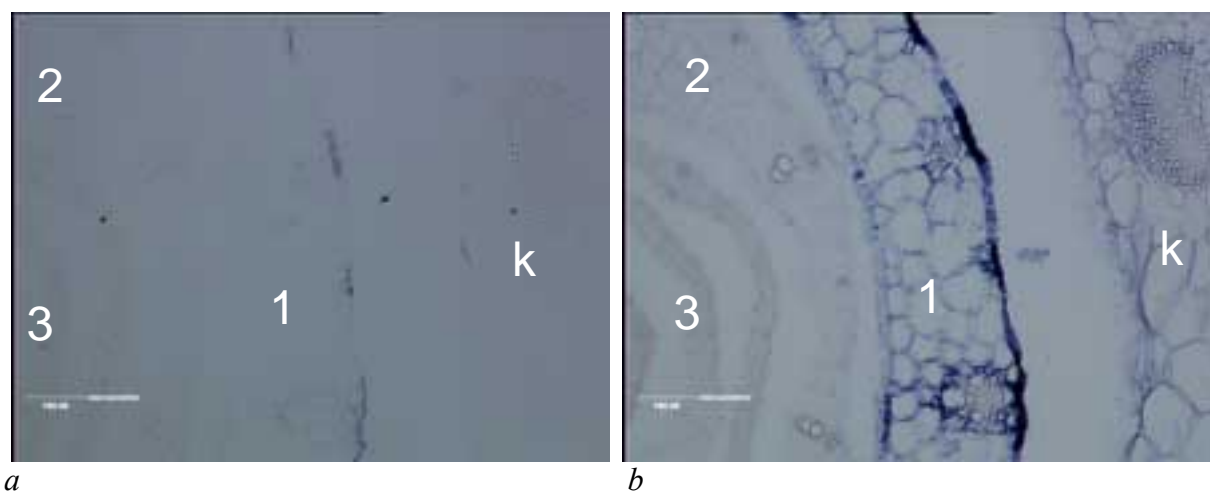
Slika 26: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. 9 dni star poganjek, prečni prerez. Vidi se koleoptila (k) in prvi listi (l); črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS1, signal je črno barvanje.



Slika 27: Imunolokalizacija izocima saharozne sintaze SS1. 9 dni star poganjek, prečni prerez, povečava. Vidijo se prvi (1), drugi (2) in tretji (3) prvi list; črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti SS1, signal je črno barvanje.



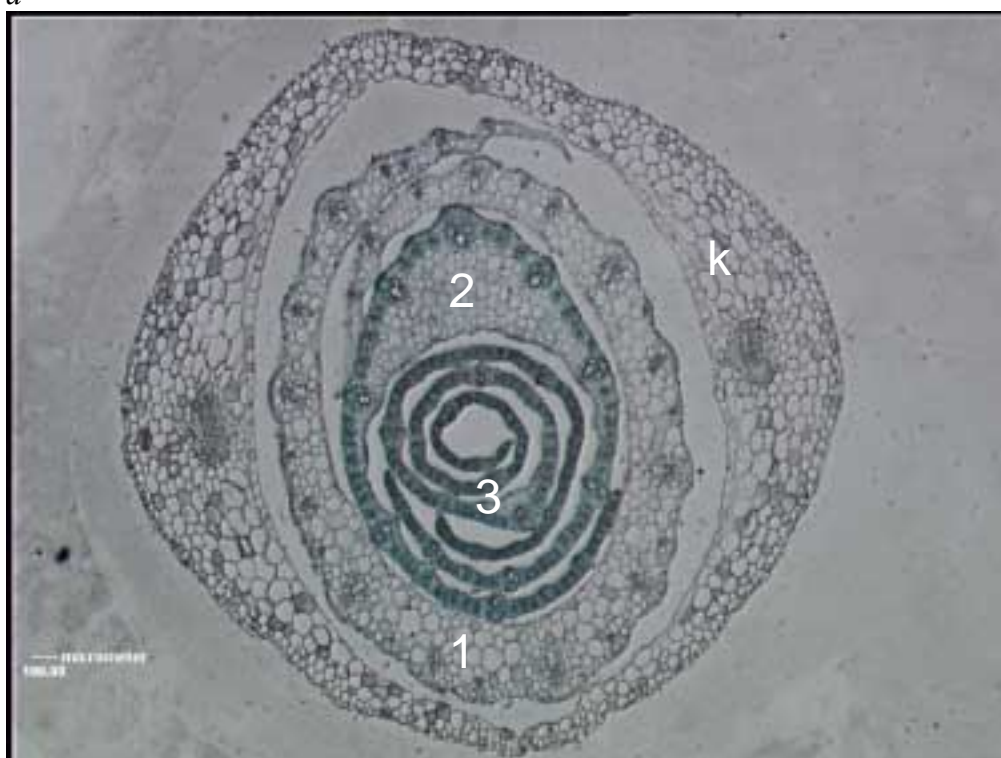
Slika 28: *In situ* hibridizacija mRNA za izocim saharozne sintaze SS1. 9 dni star poganjek, prečni prerez. Vidi se koleoptila (*k*) in pravi listi (*l*), barvanje predvsem v prvem pravem listu (*1*); črta predstavlja 100 mikrometrov; *a* – kontrola s sense sondo, *b* – antisense sonda za SS1 mRNA, signal je modrovijolično barvanje.



Slika 29: *In situ* hibridizacija mRNA za izocim saharozne sintaze SS1. 9 dni star poganjek, prečni prerez, povečava. Vidi se del koleoptile (*k*) z žilo, prvi (*1*), drugi (*2*) in tretji (*3*) pravi list; črta predstavlja 100 mikrometrov; *a* – kontrola s sense sondo, *b* – antisense sonda za SS1 mRNA, signal je modrovijolično barvanje.

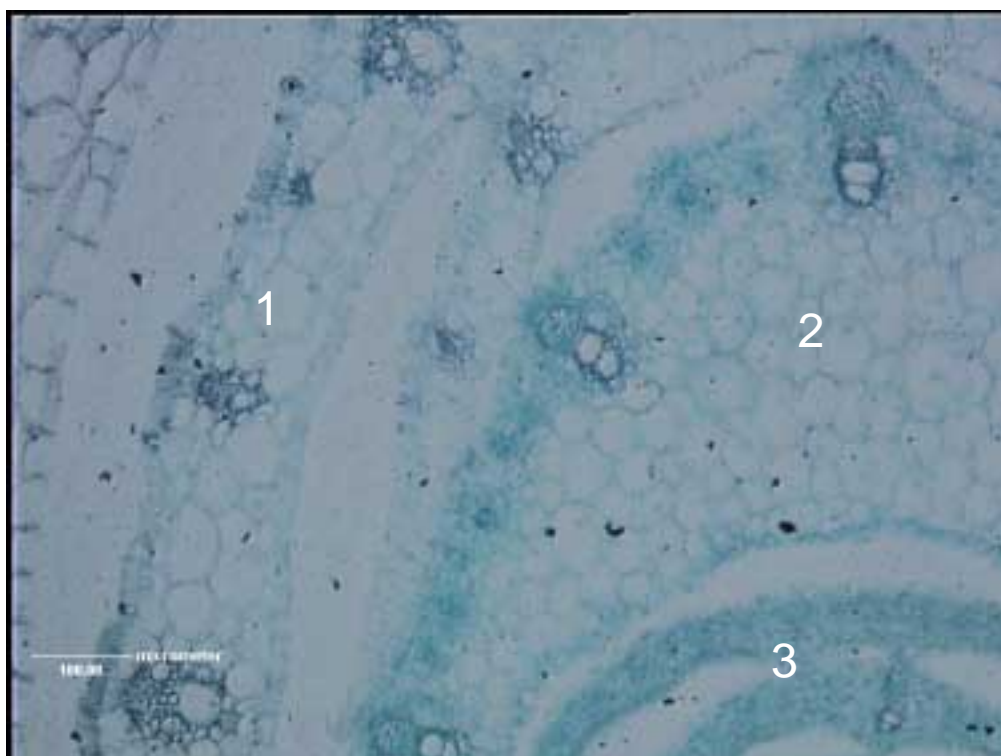


a

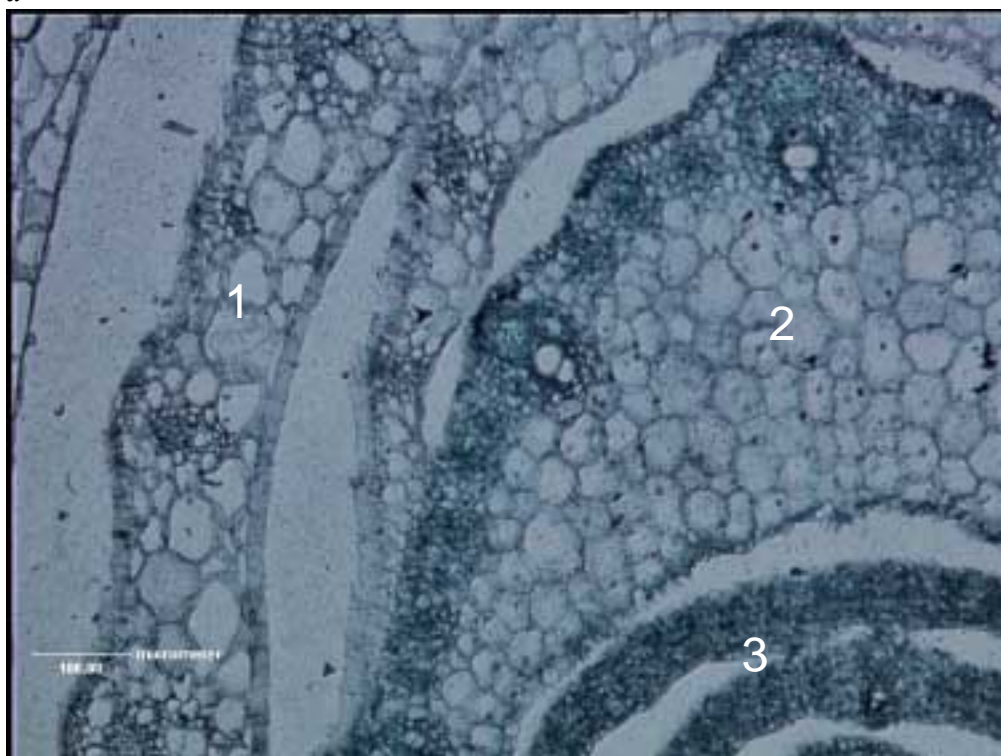


b

Slika 30: Imunolokalizacija izocima na celično steno vezane invertaze INCW1. 9 dni star poganjek, prečni prerez. Vidi se koleoptila (k), prvi (1), drugi (2) in tretji (3) pravi list; črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti INCW1, signal je črno barvanje.



a



b

Slika 31: Imunolokalizacija izocima na celično steno vezane invertaze INCW1. 9 dni star poganjek, prečni prerez, povečava. Vidijo se prvi (1), drugi (2) in tretji (3) pravi list; črta predstavlja 100 mikrometrov; a – kontrola s preimunim serumom, b – primarno protitelo proti INCW1, signal je črno barvanje.

5 RAZPRAVA

5.1 KOMENTAR METODE

Uporabljali smo tkivne rezine v parafinu, ki smo jih pripravili tako, da smo tkivo fiksirali, dehidrirali in vklopili v parafin. Ta proces, še posebno fiksacija, lahko spremeni antigenske lastnosti proteinov v tkivu. Koristno bi bilo primerjati uspeh imunolokalizacije na parafinskih rezinah s krio rezinami. Dobra stran parafinskih rezin je, da se morfolologija tkiva bolje ohrani. Pri krio rezinah je težava v tem, da se poruši struktura celic z velikimi vakuolami, značilnimi za rastlinske celice.

Za imunolokalizacijo je zelo pomembna izbira protitelesa. Monoklonska protitelesa so bolj specifična, vendar pa ker prepoznajo le en epitop, je njihova uporaba tvegana. Če se epitop v procesu priprave rezin spremeni, vezave protitelesa ne bo. Tudi signal je šibkejši kot pri poliklonskih protelesih, ker se vežejo le na eno mesto na proteinu. Poliklonska protitelesa spoznajo več epitopov na istem proteinu, zato se jih več veže na rezine in dobimo močnejši signal. Kljub temu pa vedno obstaja možnost, da bodo protitelesa navzkrižno reagirala z imunološko podobnim proteinom. Temu se deloma izognemo z afinitetnim očiščenjem seruma.

Sam proces smo izvedli s kompletom reagentov za imunolokalizacijo HistoGold (Zymed Laboratories), ki uporablja sekundarna protitelesa označena z delci koloidnega zlata, na katere se veže srebro in jih poveča. Barvanje lahko potem opazujemo v svetlem polju, preparati pa so trajni. Šibki člen v tem kompletu je raztopina srebra, s katero povečamo zlate delce. Ta raztopina tudi najhitreje izgubi uporabnost. Ker srebro rado spontano akumulira, je potrebno nadzorovati reakcijo in določiti optimalen čas razvijanja. Primer preparata s preveč ozadja je na sliki 17 ali 21. Protitelesa so večinoma dobro obstojna, moramo jih le primerno hraniti; ne smemo jih prevečkrat odmrzovati in spet zamrzovati (Harris in Oparka, 1994; Ausubel s sod., 1995).

Tudi za *in situ* hibridizacijo smo uporabili metodo, ki da trajne preparate. Za detekcijo hibridizirane RNA sonde smo uporabili sistem digoksinin (kot označevalna molekula), konjugat antidigoksininskih protiteles z alkalno fosfatazo in substrat NBT/BCIP, ki da netopen modro-vijoličen precipitat. Ta metoda sicer ni tako občutljiva kot radioaktivne metode, vendar pa je ločljivost zaradi visokega kontrasta barvanja boljša. Določimo lahko lokacijo mRNA v posameznih organelih, česar z radioaktivnimi metodami ne moremo (Marrison in Leech, 1994).

5.2 EKSPRESIJA PROTEINOV V ZRNU

Vzorec ekspresije proteinov SS1, SS2 in INCW2 na naših rezinah je v veliki meri pričakovan glede na objavljene podatke o prisotnosti in aktivnosti teh encimov. SS1 in SS2 se izražata v endospermu (slike 3, 4 in 9) in v alevronski plasti (sliki 4 in 8), v tkivu pedicela pa se izražata v abscizijski plasti in v območju žil (sliki 5 in 10). Barvanje za SS1 smo našli v endospermskih celicah okrog amiloplastov in po obodu celic (slika 6). Carlson in Chourey sta leta 1996 poročala o izolaciji dveh membransko vezanih oblik saharozne sintaze iz koruze. Signal za SS1 na obodu celic (slika 6) bi bil lahko posledica prisotnosti membransko vezane oblike saharozne sintaze. Signal za SS1 mRNA smo našli v endospermu v amiloplastih (slika 7b, levo zgoraj).

Chen in Chourey (1989) poročata o ekspresiji SS2 v bazalnih endospermskih prenosnih celicah (BEPC), vendar mi specifičnega barvanja teh celic nismo opazili (slika 10). Na sliki 8 lahko vidimo oster preskok v barvanju, ko celice alevronske plasti preidejo v BEPC.

INCW2 smo našli v BEPC (sliki 11 in 12), kot poroča Cheng s sod. (1996). Specifičen signal za INCW2 smo določili tudi v endospermu (sliki 13 in 14). S protitelesi proti INCW2 se je specifično obarvalo območje amiloplastov. Ker se invertaze pojavljajo v topni in na celično steno vezani obliki, je možno, da so uporabljena poliklonska protitelesa proti INCW2 navzkrižno reagirala s topno invertazo v citoplazmi.

5.3 EKSPRESIJA PROTEINOV V KORENINI

Ekspresijo SS1 smo zasledili v obrobni celici koreninske čepice in v telesu 4 in 9 dni starih korenin (sliki 15 in 16). Kochova s sod. (1992) prav tako poroča o splošni razporeditvi signala za SS1 v glavnem delu korenine rastlin koruze. Specifično so se obarvale tudi celice osrednjega dela koreninske čepice. Podobno lokalizacijo SS1 v koreninski čepici sta opisala tudi Guerin in Carbonero (1997) v korenini ječmena. Postavila sta hipotezo o vključenosti SS1 v tvorbo statolitov, pomembnih za zaznavanje težnosti pri rastlinah. Pri obeh poskusih (Koch s sod., 1992; Guerin in Carbonero, 1997) so rastline gojili *in vitro*. V takih razmerah je količina polisaharidne sluzi manjša kot pri rastlinah gojenih v zemlji (v: Mauseth, 1988). V našem poskusu so se specifično dodatno obarvale tudi celice v obrobni, starejših delih koreninske čepice (sliki 15 in 16). Možno bi bilo, da je v tem primeru saharozna sintaza vključena tudi v zagotavljanje sladkornih monomerov za sintezo polisaharidov sluzi. Le-te naj bi bilo zaradi gojitvenih razmer v zemlji več.

Lokalizacija ekspresije INCW1 kaže podoben vzorec, posebno v 9 dni stari korenini (slika 18). Tudi invertaza cepi prihajajočo saharozo in bi bila prav tako lahko vključena v sintezo polisaharidov sluzi.

In situ hibridizacija za SS1 mRNA (slika 23) kaže ekspresijo v centralnem, prevodnem delu glavne in stranske korenine. Nolte in Kochova (1993) sta določila citoplazemsko saharozno sintazo v celicah spremljevalkah floema organov koruze, ki sprejemajo ali oddajajo saharozo. V našem primeru specifičnega barvanja floemskega tkiva nismo zasledili, pač pa je bil signal prisoten v osrednjem delu prevodnega cilindra in v celicah pericikla.

5.4 EKSPRESIJA PROTEINOV V POGANJKU

V 4 dni starih poganjkih je SS1 lokalizirana predvsem v pravih listih, ki so zviti znotraj koleoptile, pa tudi v predelu obeh žil v koleoptili (sliki 24 in 25). V 9 dni starih poganjkih pa je signal zelo šibek, nekaj barvanja vidimo le okoli žil v starejših listih (sliki 26 in 27). Možna razlaga tega dejstva je, da so pravi listi pri 4 dni starih poganjkih še heterotrofni, saj so v celoti znotraj koleoptile in saharozo porabljajo. 9 dni stare rastline pa že imajo 2 avtotrofna lista, tako da ni več potrebe za delovanje saharozne sintaze. V literaturi so za liste koruze do sedaj poročali le o splošni prisotnosti SS2 izocima (Nguyen-Quoc s sod., 1990), SS1 pa naj bi se inducirala v listih le ob stresu (Springer s sod., 1986)

Zanimiv je rezultat *in situ* hibridizacije za SS1 mRNA na sliki 29. Barva se samo prvi pravi list 9 dni starega poganjka. Morda je ravnina prereza v njegovi coni rasti (list raste v nožnici, bazalno).

Medtem ko z imunolokalizacijo za SS1 na 9 dni starih poganjkih ne dobimo skoraj nič signala, pa da imunolokalizacija za INCW1 močan signal v najmlajših listih, ki intenzivno rastejo. Ena od možnosti je, da se encima izmenjata v vlogi ponora tekom razvoja mladega lista, vendar pa je za kakršnekoli zaključke premalo podatkov.

6 POVZETEK

Prisotnost saharozne sintaze in invertaze celične stene, dveh izmed ključnih encimov sladkornega metabolizma pri rastlinah, smo določali na različnih in različno starih tkivih koruze (*Zea mays* L.).

Uporabili smo dve metodi za lokalizacijo genske ekspresije na celični ravni, imunolokalizacijo proteinov in hibridizacijo mRNA *in situ*. Za imunolokalizacijo smo uporabili primarna protitelesa proti dvema izocimoma saharozne sintaze, SS1 in SS2, ter proti dvema izocimoma invertaze iz celične stene, INCW1 in INCW2. Na primarna protitelesa smo vezali sekundarna protitelesa označena z delci koloidnega zlata. Signal smo ojačali z reakcijo, v kateri se na delce zlata naloži srebro in jih s tem poveča. Za *in situ* hibridizacijo smo uporabili z digoksinom označene sonde RNA, ki so se vezale z mRNA v tkivu. Lokacijo vezave smo določili s protitelesi proti digoksinu, konjugiranimi z alkalno fosfatazo. Kot substrat za alkalno fosfatazo smo dodali NBT/BCIP, ki da modro-vijoličen netopen precipitat.

Potrdili smo prisotnost obeh encimov v celicah, ki sestavljajo tkiva, iz katerih sta bila encima že predhodna izolirana, ali je bila v njih določena encimska aktivnost. Kot splošen encim smo saharozno sintazo zasledili v manjših količinah v vseh proučevanih tkivih, specifično pa se pojavlja v določenih območjih razvijajočega se zrna. Izocima SS1 in SS2 smo zaznali v endospermu, alevronski plasti in v tkivu pedicela. Izocim invertaze iz celične stene, INCW2, se specifično izraža v bazalnih prenosnih celicah endosperma.

V nadaljevanju smo zasledili še prisotnost izocima saharozne sintaze SS1 v celicah koreninske čepice, kjer naj bi imela domnevno vlogo pri zagotavljanju sladkornih monomerov za sintezo sluzi. Signal imunolokalizacije za SS1 na prečnem prerezu korenine kaže splošno porazdelitev encima. Signal za SS1 mRNA pa je bolj specifičen, mRNA smo našli predvsem v celicah osrednjega dela prevodnega cilindra in celicah pericikla.

Opazili smo tudi prostorsko ločeno ekspresijo saharozne sintaze in invertaze v razvijajočih se listih.

7 ZAHVALA

Najprej bi se rad zahvalil svoji mentorici, prof. dr. Marini Dermastia, za obilo še kako potrebne vzpodbude in veliko pomoč pri izdelavi te diplomske naloge.

Zahvaljujem se kolegom iz laboratorija dr. Prema Choureya, dr. Susan J. Carlson, Waynu Juricku, dr. Earlu W. Taliercio in dr. Premu Choureyu za veliko pomoč pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge.

Zahvaljujem se doc. dr. Barbari Vilhar za konstruktivne napotke.

Zahvaljujem se podjetju IMOS investicijske gradnje d.d. za sponzoriranje letalske karte.

Zahvaljujem se moji družini in prijateljem, da so me zelo pogrešali med nastajanjem pričujočega dela.

8 LITERATURA

- Amor, Y., Haigler, C. H., Johnson, S., Wainscott, M., Delmer, D. P. (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
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1995). *Current protocols in molecular biology*, chapter 14: In situ hybridization and immunohistochemistry (John Wiley & Sons, Inc.)
- Carlson, S. J., Chourey, P. S. (1996). Evidence for plasma membrane-associated forms of sucrose synthase in maize. *Molecular and General Genetics* 252: 303-310
- Chen, Y.-C., Chourey, P. S. (1989). Spatial and temporal expression of the two sucrose synthase genes in maize: immunohistological evidence. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 553-559
- Cheng, W.-H., Taliercio, E. W., Chourey, P. S. (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
- Delmer, D. P., Amor, Y. (1995). Cellulose biosynthesis. *The Plant Cell* 7, 987-1000
- Eschrich, W. (1980). Free space invertase: its possible role in phloem unloading. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 93: 363-378
- Fu, H., Park, W. D. (1995). Sink and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. *Plant Cell* 7: 1369-1385
- Guerin, J., Carbonero, P. (1997). The spatial distribution of sucrose synthase isozymes in barley. *Plant Physiology* 114: 55-62
- Harris, N., Oparka, K. J. (1994). *Plant cell biology, a practical approach* (Oxford University Press)
- Heiser, C. B. Jr. (1990). *Seed to civilization, the story of food* (Harvard University Press)
- Heldt, H.-W. (1997). *Plant biochemistry & molecular biology* (Oxford University Press)
- Ho, L. C. (1988). Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 355-378
- Huang, X. F., Nguyen-Quoc, B., Chourey, P. S., Yelle, S. (1994). Complete nucleotide sequence of the maize (*Zea mays* L.) sucrose synthase 2 cDNA. *Plant Physiology* 104: 293-294

- Jaynes, T. A., Nelson, O. E. (1971). Invertase activity in normal and mutant maize endosperms during development. *Plant Physiology* 47: 623-628
- Kiesselbach, T. A. (1949). The structure and reproduction of corn. Research Bulletin 161, Agricultural Experimental Station (University of Nebraska Press)
- Koch, K. E., Nolte, K. D., Duke, E. R., McCarthy, D. R., Avigne, W. T. (1992). Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *The Plant Cell* 4: 59-69
- Lowe, J., Nelson, O. E. (1946). Miniature seed – a study in the development of a defective caryopsis in maize. *Genetics* 31: 525-533
- Maas, C., Schaal, S., Werr, W. (1990) A feedback control element near the transcription start site of the maize *shrunk* gene determines promoter activity. *EMBO J.* 9: 3447-3452
- Martinčič, A., Wraber, T., Jogan, N., Ravnik, V., Podobnik, A., Turk, B., Vreš, B. (1999). Mala Flora Slovenije (Tehniška založba Slovenije)
- Marrison, J. L., Leech, R. M. (1994). The subcellular and intra-organelle recognition of nuclear and chloroplast transcripts in developing leaf cells. *The Plant Journal* 6(4): 605-614
- Mauseth, J. D. (1988). *Plant anatomy* (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.)
- Nguyen-Quoc, B., Krivitzky, M., Huber, S. C., Lechamy, A. (1990). Sucrose synthase in developing maize leaves. *Plant Physiology* 94: 516-523
- Nolte, K. D., Koch, K. E. (1993). Companion-cell specific localization of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading. *Plant Physiology* 101: 899-905
- Springer B., Werr, W., Starlinger, P., Bennet, D. C., Zokolica, M., Freeling, M. (1986). The *Shrunk* gene on chromosome 9 of *Zea mays* L. is expressed in various plant tissues and encodes an anaerobic protein. *Molecular and General Genetics* 205: 461-468
- Sturm, A., Chrispeels, M. J., (1990). cDNA cloning of carrot extracellular β -fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell* 2: 1107-1119
- Sturm, A., Tang, G.-Q. (1999). The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science (reviews)* 4(10): 401-407
- Sturm, A. *et al.* (1999). Tissue-specific expression of two genes for sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Molecular Biology* 39: 349-360
- Taliercio, E. W., Shanker, S., Choi, J.-H., Chorey, P. S. (1995). Molecular aspects of cell wall invertase in developing kernels of maize. *Plant Physiology* 108 (suppl.): 182 (abstr.).

- Unger, C., Hardegger, M., Lienhard, S., Sturm, A. (1994). cDNA cloning of carrot (*Daucus carota*) soluble acid β -fructofuranosidases and comparison with the cell wall isoenzyme. *Plant Physiology* 104: 1351-1357
- von Schaewen, A., Stitt, M., Schmidt, R., Sonnewald, U., Willmitzer, L. (1990). Expression of yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *EMBO J.* 9: 3033-3044
- Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Buchner, P., Wobus, U. (1995). Seed coat-associated invertases of fava bean control both unloading and storage functions: Cloning of cDNAs and cell type-specific expression. *Plant Cell* 7: 1835-1846
- Weil, M., Krausgrill, S., Schuster, A., Rausch, T. (1994). A 17 kDa *Nicotiana tabacum* cell-wall peptide acts as an in-vitro inhibitor of the cell-wall isoform of acid invertase. *Planta* 193: 438-445
- Wittich, P. E., Vreugdenhil, D. (1998) Localization of sucrose synthase activity in developing maize kernels by *in situ* enzyme histochemistry. *Journal of Experimental Botany* 49(324): 1163-1171
- Xu, D.-P., Sung, S.-J. S., Loboda, T., Kormanik, P. P., Black, C. C. (1989). Characterization of sucrolysis via the uridine diphosphate and pyrophosphate-dependent sucrose synthase pathway. *Plant Physiology* 90, 635-642