

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tanja TAJNIK

**RAZVOJ METODE ZA MERITEV VELIKOSTI GENOMA V
RASTLINSKEM MATERIALU, NABRANEM NA TERENU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tanja TAJNIK

**RAZVOJ METODE ZA MERITEV VELIKOSTI GENOMA V
RASTLINSKEM MATERIALU, NABRANEM NA TERENU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**DEVELOPMENT OF A METHOD FOR MEASUREMENT OF
GENOME SIZE IN PLANTS COLLECTED IN THE FIELD**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za botaniko, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Barbaro Vilhar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marjana Regvar, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Članica: doc. dr. Barbara Vilhar, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Članica: prof. dr. Marina Dermastia, Nacionalni inštitut za Biologijo in Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Datum zagovora: 12.10.2007

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tanja Tajnik

Ključna dokumentacijska informacija

- ŠD Dn
- DK 582:575.113(043.2)=163.6
- KG velikost genoma / slikovna citometrija / tanini / kakovost meritve / *Pisum sativum* / *Quercus robur*
- AV TAJNIK, Tanja
- SA VILHAR, Barbara (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2007
- IN RAZVOJ METODE ZA MERITEV VELIKOSTI GENOMA V RASTLINSKEM MATERIALU, NABRANEM NA TERENU
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 55 str., 6 tab., 17 sl., 2 pril., 26 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Preučevali smo vpliv taninov in temperature na kakovost meritve velikosti genoma s slikovno citometrijo, ki temelji na kvantitativnem barvanju DNA s Feuglenovo reakcijo. Želeli smo razjasniti, kakšne so možne motnje kakovosti meritve velikosti genoma, kadar ob povišani temperaturi na terenu fiksiramo rastlinske vrste, ki vsebujejo veliko taninov. Na preparatih korenin doba (*Quercus robur* L.), pripravljenih po standardnih postopkih in po fiksiranju v 4 % nevtralnem formaldehidu in v Farmerjevem fiksativu, je bila obarvanost DNA zelo šibka, zato velikosti genoma nismo mogli izmeriti. Možen vzrok za slabo obarvanost jedrne DNA je velika količina taninov v koreninah doba. Izmerili smo količino jedrne DNA v koreninah standardne vrste – graha (*Pisum sativum* L.), ki smo jih fiksirali skupaj s koreninami doba, ki vsebujejo veliko taninov. V nadaljevanju pa smo v fiksativ, v katerem smo fiksirali korenine graha, dodajali različne koncentracije tanina (taninske kisline). Za Farmerjev fiksativ smo preučili vpliv dveh temperatur fiksiranja (4 °C in 30 °C) in različnih koncentracij dodane taninske kisline na kakovost meritev. Na osnovi poskusov smo ugotovili, da je taninska kislina, ki smo jo dodajali v Farmerjev fiksativ, močno vplivala na kakovost meritve velikosti genoma. Znižala je intenziteto obarvanja DNA in s tem izmerjene vrednosti integrirane optične gostote. Pri fiksiranju v 4 % nevtralnem formaldehidu je bil vpliv taninov na kakovost meritve precej manjši kot pri Farmerjevem fiksativu. Pri fiksiranju v Farmerjevem fiksativu je bila kakovost meritve vzorcev brez taninov podobna pri temperaturi fiksiranja 4 °C in 30 °C. Pri vzorcih s tanini smo pri fiksiranju pri 30 °C opazili nekoliko večje zmanjšanje intenzitete obarvanosti jedrne DNA kot pri fiksiranju pri 4 °C. Naši rezultati so v skladu s prejšnjimi objavami o tem, da prisotnost taninov v tkivih lahko močno moti meritve velikosti genoma. Pri nekaterih vrstah oz. tkivih, ki vsebujejo zelo veliko taninov, so lahko meritve velikosti genoma s slikovno citometrijo celo nemogoče.

Key Words Documentation

- DN Dn
- DC 582:575.113(043.2)=163.6
- CX genome size / image cytometry / tannin / quality of measurement / *Pisum sativum* / *Quercus robur*
- AU TAJNIK, Tanja
- AA VILHAR, Barbara (mentor)
- PP SI-1000 Ljubljana
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2007
- TI DEVELOPMENT OF A METHOD FOR MEASUREMENT OF GENOME SIZE IN PLANTS COLLECTED IN THE FIELD
- DT Graduation thesis (Universtity studies)
- NO X, 55 p., 6 tab., 17 fig., 2 ann., 26 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB We investigated the influence of tannins and temperature on the quality of genome size measurement with image cytometry, which is based on quantitative staining of DNA with the Feulgen reaction. Our aim was to elucidate the possible interference of high temperature with DNA staining when species with high tannin content are fixed in the field. We prepared squash preparations of the root tip of English oak (*Quercus robur* L.) using standard procedures and two fixatives: the Farmer fixative and 4% neutral formaldehyde. Oak DNA was weakly stained, hence measurement of genome size was not possible, probably due to high amounts of tannins in the tissue. We fixed root tips of a standard species – pea (*Pisum sativum* L.) in both fixatives either without or with added tannins (tannic acid). For the Farmer fixative, we investigated the influence of different concentrations of tannic acid in the fixative and the temperature during fixation (4 °C in 30 °C) on the quality of genome size measurement. Our results show that tannic acid added to the Farmer fixative strongly interfered with genome size measurement. Namely, the samples with added tannic acid showed a marked reduction of the intensity of DNA staining. The interference of tannins with DNA staining was weaker when formaldehyde was used instead of the Farmer fixative. The quality of genome size measurement was similar in samples fixed in the Farmer fixative without added tannic acid at 4 °C and at 30 °C. When tannic acid was added to the fixative, the reduction of DNA staining intensity was more pronounced in samples fixed at 30 °C than in those fixed at 4 °C. Our results support previous observations that the presence of tannins interfere with genome size measurement. In species or tissues that contain high amounts of tannins, genome size measurement with image size cytometry may be impossible.

Kazalo vsebine

1	UVOD	1
2	PREGLED OBJAV	2
2.1	Rastlinski genom	2
2.2	Meritev velikosti rastlinskega genoma	3
2.2.1	Metode za meritev velikosti genoma	3
2.2.1.1	Kemijska ekstrakcija	3
2.2.1.2	Pretočna citometrija	3
2.2.1.3	Mikrodenzitometrija	3
2.2.1.3.1.	Fotometrična citometrija	4
2.2.1.3.2.	Slikovna citometrija	4
2.2.2	Standardne rastlinske vrste	6
2.2.3	Možni problemi pri meritvah velikosti genoma	6
2.3	Tanini	7
2.3.1	Lastnosti.....	7
2.3.2	Vrste taninov.....	7
2.3.2.1	Hidrolizirajoči tanini.....	7
2.3.2.2	Kondenzirani tanini.....	8
2.3.2.3	Biološki pomen taninov v rastlinah	9
2.3.2.4	Vsebnost taninov v rastlinah.....	9
2.4	Namen dela	10
3	MATERIALI IN METODE	12
3.1	Rastlinski material	12
3.2	Priprava korenin za fiksiranje.....	12
3.3	Fiksacija	13
3.3.1	Fiksiranje s Farmerjevim fiksativom	13
3.3.2	Fiksiranje s 4 % nevtralnimi formaldehidom	14
3.4	Barvanje po Feulgenu	15
3.4.1	Priprava Schiffovega reagenta	15
3.4.2	Priprava SO ₂ -vode	16
3.5	Izdelava mečkanih preparatov.....	16
3.6	Meritve preparatov oz. rastlinskega genoma s slikovno citometrijo.....	17
3.7	Dodajanje taninov v fiksativ	18
3.8	Dokazovanje taninov v tkivih.....	18
3.9	Statistična obdelava podatkov	19
4	REZULTATI	20
4.1	Meritev velikosti genoma pri dobi.....	20
4.2	Vpliv skupnega fiksiranja tkiv doba in graha na kakovost meritve genoma	21
4.3	Vpliv dodanih taninov na kakovost meritve velikosti genoma	24
4.4	Vpliv temperature fiksiranja na kakovost meritve velikosti genoma	29

5	RAZPRAVA IN SKLEPI	34
5.1	Razprava	34
5.1.1	Vpliv skupnega fiksiranja tkiv doba in graha na kakovost meritve velikosti genoma 34	
5.1.2	Vpliv vrste fiksativa in dodanih taninov na kakovost meritve velikosti genoma....	35
5.1.3	Vpliv temperature fiksiranja na kakovost meritve velikosti genoma	38
5.2	Sklepi.....	40
6	POVZETEK.....	41
7	SUMMARY.....	43
8	VIRI	45
9	ZAHVALA	48
10	PRILOGE.....	49
10.1	Priloga A	49
10.2	Priloga B.....	54

Kazalo tabel

Tabela 1. Kakovost meritve vrednosti 2C graha (<i>Pisum sativum</i>) pri skupnem fiksiranju korenin graha in doba (<i>Quercus robur</i>).....	22
Tabela 2. Kakovost meritve vrednosti 2C graha (<i>Pisum sativum</i>) pri dveh različnih fiksativih v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov..	25
Tabela 3. Prikaz statistično značilnih razlik med vzorci pri različnih koncentracijah dodane taninske kisline..	26
Tabela 4. Kakovost meritve vrednosti 2C graha (<i>Pisum sativum</i>) pri dveh temperaturah fiksiranja v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov pri prvi izvedbi poskusa....	30
Tabela 5. Prikaz statistično značilnih razlik med vzorci graha (<i>Pisum sativum</i>) pri različnih temperaturah fiksiranja in pri različnih koncentracijah taninske kisline.....	31
Tabela 6. Kakovost meritve vrednosti 2C graha (<i>Pisum sativum</i>) pri dveh temperaturah fiksiranja v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov pri izvedbi poskusa 2 in 3..	49

Kazalo slik

Slika 1. Primer frekvenčne porazdelitve integrirane optične gostote za jedra graha (<i>Pisum sativum</i>) iz koreninskega vršička.....	5
Slika 2. Strukturna formula galne kisline.....	8
Slika 3. Strukturna formula flavonola.....	8
Slika 4. <i>Quercus robur</i> – dob.....	12
Slika 5. Taninska kislina.....	18
Slika 6. Primer frekvenčne porazdelitve vrednosti IOG doba (<i>Quercus robur</i>) na mečkanih preparatih koreninskih vršičkov.....	20
Slika 7. Meritev vrednosti 2C graha (<i>Pisum sativum</i>) pri skupnem fiksiranju korenin graha in doba (<i>Quercus robur</i>).....	23
Slika 8. Vrednost 2C graha (<i>Pisum sativum</i>) pri dveh različnih fiksativih v odvisnosti od koncentracije dodane taninske kisline.....	27
Slika 9. Rztresenost vrednosti 2C graha (<i>Pisum sativum</i>) pri različnih koncentracijah dodane taninske kisline v dveh različnih fiksativih.....	28
Slika 10. Vrednost 2C graha (<i>Pisum sativum</i>) pri dveh različnih temperaturah fiksiranja v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov.....	32
Slika 11. Rztresenost vrednosti 2C graha (<i>Pisum sativum</i>) pri različnih koncentracijah dodane taninske kisline pri dveh različnih temperaturah fiksiranja pri prvi izvedbi poskusa.....	33
Slika 12. Meritev vrednosti 2C graha (<i>Pisum sativum</i>) pri dveh temperaturah fiksiranja v odvisnosti od koncentracije dodane taninske kisline v drugi izvedbi poskusa.....	50
Slika 13. Rztresenost vrednosti 2C graha (<i>Pisum sativum</i>) pri dveh temperaturah fiksiranja v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov v drugi izvedbi poskusa....	51
Slika 14. Meritev vrednosti 2C graha (<i>Pisum sativum</i>) pri dveh temperaturah fiksiranja v odvisnosti od koncentracije dodane taninske kisline v tretji izvedbi poskusa.....	52
Slika 15. Rztresenost vrednosti 2C graha (<i>Pisum sativum</i>) pri dveh temperaturah fiksiranja v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov v tretji izvedbi poskusa.....	53
Slika 16. Meritev povprečne vrednosti 2C graha (<i>Pisum sativum</i>) pri standardni temperaturi fiksacije 4 °C v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov v vseh treh izvedbah poskusa.....	54
Slika 17. Meritev povprečne vrednosti 2C graha (<i>Pisum sativum</i>) pri standardni temperaturi fiksacije 30 °C v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov v vseh treh izvedbah poskusa.....	55

Seznam prilog

Priloga A

Priloga B

Seznam okrajšav

DNA	deoksiribonukleinska kislina
IOG	integrirana optična gostota
EAA	Farmerjev fiksativ
F	4 % nevtralni formaldehid
KV	koeficient variacije
KV _v	koeficient variacije vrha
SN	standardna napaka
SD	standardna deviacija
ANOVA	enosmerna analiza variance
a.e.	arbitrarne enote
Ps	<i>Pisum sativum</i> , grah
Qr	<i>Quercus robur</i> , dob
Vrednost C	količina haploidnega genoma osebka
Vrednost 2C	količina haploidnega genoma osebka ob koncu mitoze v telofazi in v G1 fazi interfaze

1 UVOD

Velikost genoma, ki predstavlja količino jedrne DNA, je znana že za marsikatero rastlinsko vrsto. Količina jedrne DNA je bila leta 1998 znana za približno 16 % golosemenk (Bennett in sod. cit. po Murray, 1998) in 1 % kritosemenk (Bennett in sod., 2001). Leta 2001 so bili objavljeni podatki o količini jedrne DNA za 3864 rastlinskih vrst (Zonneveld in sod., 2005). Zadnja dopolnitev podatkov je bila leta 2004, in sicer so bili objavljeni podatki o količini jedrne DNA za skoraj 5000 rastlinskih vrst (Zonneveld in sod., 2005). Podatki o izmerjenih velikostih genoma so v podatkovni bazi, ki je pod okriljem Royal Botanical Gardens v Kewu, VB. Do leta 2008 bi naj bilo objavljenih podatkov o količini jedrne DNA za 2 % vseh odkritih kritosemenk (Bennett in Leitch, 2005). Podatkovna baza je mednarodni projekt, ki je internetno dostopen. Velikost genoma je znana predvsem pri kmetijsko pomembnih rastlinskih vrstah ter pri tistih vrstah, za katere smo lahko semena pridobili iz semenskih zbirk botaničnih vrtov (Bennett, 1998). Da bi dopolnili podatke o velikosti genoma pri prezrtih rastlinskih vrstah in družinah, bomo v prihodnosti morali material za meritve prinesiti s terena. Pri meritvah velikosti rastlinskega genoma pa obstaja veliko neraziskanih metodoloških problemov, ki lahko zelo vplivajo na samo kakovost meritev. Potrebno jih je raziskati in ugotoviti njihov vpliv na kakovost meritev.

Rastline lahko vsebujejo mnoge snovi, ki vplivajo na meritev velikosti jedrne DNA. Takšne snovi so pogosto sekundarni metaboliti, ki rastlinam služijo za obrambo. V diplomski nalogi smo se osredotočili na možen vpliv čreslovin oz. taninov na kakovost meritve velikosti genoma.

Simulirali smo predvsem razmere, ki jih lahko pričakujemo na terenu, kjer material pogosto fiksiramo in hranimo pri višjih temperaturah, kot so priporočene temperature za fiksiranje v laboratorijskih razmerah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Rastlinski genom

Zavedanje o pomembnosti rastlinskega sveta se v današnjem času močno povečuje. Rastline uporabljamo v prehrabene namene, s produkcijo kisika omogočajo življenje drugim aerobnim organizmom, izkorišča jih zdravstvena in farmacevtska industrija. Ogromno gospodarskih panog temelji prav na rastlinah. Uporabo rastlin bi lahko opisovali v nedogled, a nam še vedno manjka ogromno znanja o njihovi fiziologiji in morfologiji. Dandanes se zelo povečuje njihova raba, ki zahteva vedno več informacij o njihovih genih in genomu. S preučevanjem rastlinskega genoma ne odkrijemo samo zgradbe genoma. Izvemo tudi, kakšne karakteristike imajo geni in za kaj so odgovorni. Njihove lastnosti lahko s sodobno znanostjo prenesemo v vsakdanje življenje. Z razvojem biotehnologije oz. genskim inženiringom se vse to dandanes že dogaja.

Rastlinski genom je organiziran v kromosome. Podatki o številu rastlinskih kromosomov so velikokrat nezanesljivi, saj so pri mnogih vrstah izmerjeni pri enem samem osebku ali zelo majhni populaciji ali pa so kakšne rastlinske vrste taksonomsko napačno določene (Bennett, 1998). Podoben problem se pojavlja pri sami velikosti genoma. Raziskave velikosti rastlinskega genoma potekajo že od petdesetih let prejšnjega stoletja, pa še vedno poznamo vrednosti za približno 1 % odkritih rastlinskih vrst kritosemenk (Bennett in Leitch, 2005). Med temi vrednostmi je mnogo grobih približkov in nepreverjenih vrednosti.

Količino jedrne DNA lahko podajamo prek vrednosti C. Vrednost C je količina DNA v haploidnem genomu osebka. Pri diploidnih osebkih ob koncu mitoze v telofazi in v fazi G1 interfaze količina jedrne DNA ustreza vrednosti 2C. V fazi G2 interfaze in na začetku mitoze (profaza) pa količina DNA ustreza vrednosti 4C. V fazi S interfaze količina DNA ustreza vrednostim med 2C in 4C.

2.2 Meritev velikosti rastlinskega genoma

2.2.1 Metode za meritev velikosti genoma

Za meritve velikosti genoma lahko uporabljamo različne metode.

2.2.1.1 Kemijska ekstrakcija

Določanje količine DNA po kemijski ekstrakciji je najstarejša metoda za meritve velikosti genoma. Ekstrahirano DNA razredčimo in njeno koncentracijo kolorimetrično določimo z uporabo difenilaminske reakcije, katere intenziteta je sorazmerna s koncentracijo deoksiriboze in s tem s koncentracijo DNA (Dolenc Koce, 2001).

2.2.1.2 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija temelji na analizi relativne intenzitete fluorescence jeder, pobarvanih s fluorokromi (Vilhar in sod., 2001). Suspenzija posameznih jeder v toku teče preko žarišča vzbujajoče svetlobe. Ob osvetlitvi jedra fluorokromi, vezani na DNA, sevajo svetlobo, ki jo zaznamo z optičnim detektorskim sistemom. Intenziteta sevane svetlobe je sorazmerna s količino DNA (Dolenc Koce, 2001).

2.2.1.3 Mikrodensitometrija

Mikrodensitometrija je najbolj razširjena metoda za merjenje količine DNA v jedrih, pobarvanih s Feulgenovo reakcijo (Vilhar in Dermastia, 2002, Dolenc Koce, 2001). Metoda temelji na meritvah intenzitete obarvanosti jeder oz. jedrne DNA.

Lambertov zakon opisuje odvisnost absorbirane svetlobe od obarvanosti vzorca, skozi katerega prehaja svetloba. Absorbanco (A) ali optično gostoto (OG) lahko merimo le posredno preko transmisije objekta. Transmisija (T) je količina svetlobe, ki jo prepušča osvetljeni predmet, in je določena z razmerjem med intenziteto presevne (I_p) in vpadne svetlobe (I_v). Optična gostota je logaritmsko povezana s transmisijo (Vilhar in Dermastia, 2002).

$$T = I_p / I_v$$

$$A = OG = \log (1/T)$$

Količino jedrne DNA denzitometrično ocenimo na osnovi absorbcije svetlobe v jedrih, ki smo jih predhodno obarvali s Feulgenovo reakcijo (Dolenc Koce, 2001 cit. po Feulgen in Rossenbeck, 1924). Količino DNA v posameznih točkah v jedru izrazimo kot optično gostoto, skupno količino jedrne DNA pa kot integrirano optično gostoto (IOG). Feulgenova reakcija je specifična za DNA, zato je IOG sorazmerna s količino jedrne DNA (Vilhar in sod., 2001 cit. po Feulgen in Rossenbeck, 1924).

2.2.1.3.1. Fotometrična citometrija

Fotokemična citometrija je postopek, s katerim merimo količino Feulgenovega barvila v objektu, ki ga opazujemo s svetlobnim mikroskopom z vgrajenim spektrofotometrom. Ta metoda se je uporabljala v preteklosti (Vilhar in sod., 2001, Dolenc Koce, 2001).

2.2.1.3.2. Slikovna citometrija

Slikovna citometrija je moderna izvedba mikrodensitometrije, kjer spektrofotometer nadomešča računalniški sistem za analizo slike, ki zajame izvorno mikroskopsko sliko preko digitalne ali video kamere (Vilhar in Dermastia, 2002). Za vsako točko v jedru (piksel) sistem izmeri sivo vrednost ter izračuna transmisijo in optično gostoto (Vilhar in Dermastia, 2002, Dolenc Koce, 2001).

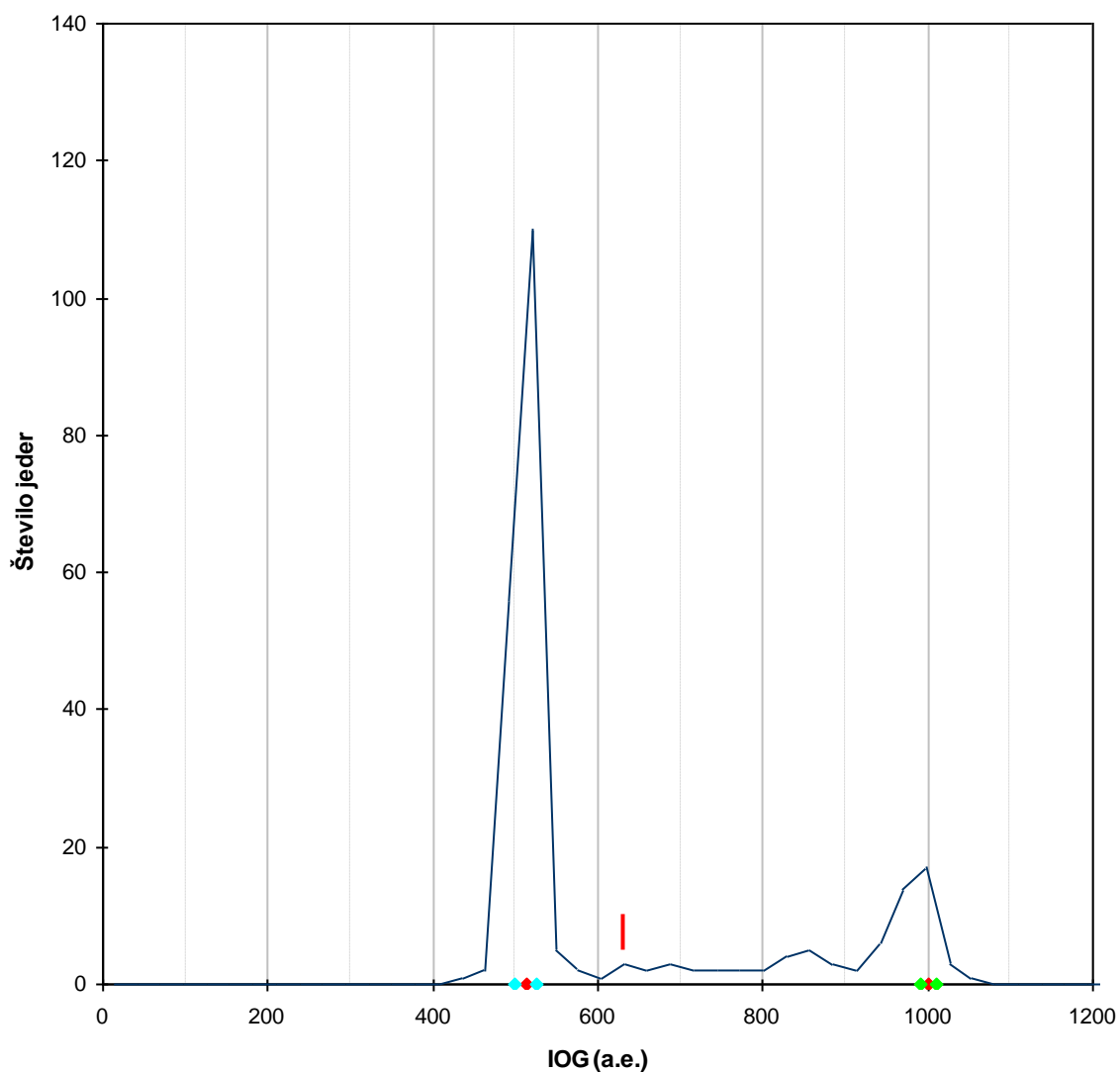
Rezultat meritev so frekvenčne porazdelitve IOG. To so grafični prikazi dveh vrhov. Prvi vrh predstavlja vrednost 2C, drugi pa 4C (slika 1).

Zaradi pomanjkanja botaničnih kriterijev kakovosti meritev se uporablja medicinske standarde (Vilhar in sod., 2001). Mednje sodita koeficient variacije vrha (širina vrha) in premik od idealnega razmerja med položajem vrhov 4C in 2C. Oba kriterija sta bila preizkušena pri rastlinskem materialu in sta se izkazala kot primerna (Vilhar in sod., 2001). Povprečni koeficient variacije vrha vrednosti 2C (KVv) naj bi bil pri kakovostnih in zanesljivih meritvah manjši od 6 % (Vilhar in sod., 2001 cit. po Böcking in sod., 1995). Premik 4C/2C pa naj ne bi odstopal od idealne vrednosti 2 za več kot 5 % (Vilhar in sod., 2001 cit. po Kindermann in Hilgers, 1994).

Povprečni koeficient variacije vrha se izračuna po formuli

$$KV_v = SD / X_p,$$

kjer je KV_v koeficient variacije vrha, SD standardna deviacija izmerjenih IOG znotraj vrha in X_p povprečna IOG vrha.



Slika 1. Primer frekvenčne porazdelitve integrirane optične gostote za jedra graha (*Pisum sativum*) iz koreninskega vršička.. Integrirana optična gostota (IOG) je prikazana v arbitrarnih enotah (a.e.). IOG je sorazmerna količini DNA.

2.2.2 Standardne rastlinske vrste

Standardne rastlinske vrste so vrste, ki jih uporabljamo pri meritvah genoma še neizmerjenih rastlinskih vrst. Preko njihove standardne vrednosti 2C lahko izrazimo vrednost 2C nove izmerjene rastlinske vrste. Standardne rastlinske vrste bi naj bile diploidne, s stabilno velikostjo genoma ter lahko dostopne iz večih virov (Bennett in sod., 2000). Tem kriterijem ustrezajo 3 rastlinske vrste. To so *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*, *Pisum sativum*. Obstaja pa še več rastlinskih vrst, ki so kandidatke za standardno rastlinsko vrsto. To so *Raphanus sativus*, *Lycopersicon esculentum*, *Vicia faba* (Bennett in sod., 2000). Grah (*Pisum sativum*) je rastlina, primerna za standardno rastlinsko vrsto. Je diploidna. Velikost njenega genoma je stabilna oz. nevariabilna z vrednostjo 2C 8,84 pg DNA (Greilhuber in Ebert, 1994).

2.2.3 Možni problemi pri meritvah velikosti genoma

Tanini sodijo med snovi, ki lahko vplivajo na kakovost meritve velikosti genoma (Greilhuber, 1987). Dele različnih rastlinskih vrst s tanini in brez njih so fiksirali v dveh različnih fiksativih. Uporabili so 4 % nevtraln formaldehid in metanol:ocetno kislino v razmerju 3:1 (MAA). Nato so fiksirano tkivo pobarvali s Schiffovim reagentom (barvanje po Feulgenu) in izmerili velikost integrirane optične gostote (IOG) oz. velikost rastlinskega genoma. Rezultati so pokazali, da je bila intenziteta obarvanja DNA oz. vrednost 2C ali velikost IOG rastlinskih vrst, ki ne vsebujejo taninov, enaka oz. primerljiva v obeh fiksativih. Rastlinske vrste, znane po vsebnosti taninov, pa so imele po fiksiranju s formaldehidom intenziteto obarvanja DNA višjo kot po fiksiranju v MAA. Po fiksiranju z MAA se tanini razpršijo iz vakuol in celic, kjer so skladiščeni. Okoliško tkivo je z njimi močno prepojeno (Greilhuber, 1987). Ti tanini reagirajo s citoplazmo in še posebej s kromatinom. Posledica je lahko zmanjšana intenziteta barvanja po Feulgenu v primeru fiksativa MAA (Greilhuber, 1987). Greilhuber tako opozarja, da je potrebno napake zaradi taninov predvideti vnaprej, če želimo uporabiti tehniko barvanja genoma po Feulgenu. Primernejši fiksativ za rastlinske vrste s tanini je formaldehid, ki omili vpliv taninov na kakovost meritve velikosti genoma.

2.3 Tanini

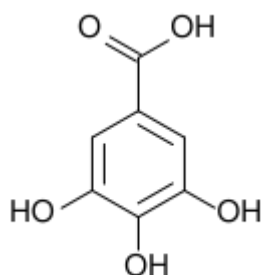
2.3.1 Lastnosti

Tanini so rastlinski polifenoli, ki vežejo in oborijo beljakovine. Sam izraz tanin izvira iz uporabe taninov pri strojenju živalskih kož (*tanning*-strojenje). Tanini so sestavljeni iz fenolnih enot. Gre torej za sestavljene polifenole, ki vsebujejo hidroksilno in druge kemijske skupine (tudi karboksilno; Taiz in Zeiger, 2002). Ker imajo veliko število hidroksilnih skupin, tvorijo različne vrste vezi z beljakovinami, aminokislinami, ogljikovimi hidrati, kovinskimi ioni, vitamini in drugimi makromolekulami (Makkar, 2003; Mole in Waterman, 1987). Molekulska masa taninov sega od 500 do 3000 Da (Bate-Smith in Swain, 1962). Tanine navadno razdelimo na hidrolizirajoče in kondenzirane (Hagerman in Butler, 1991).

2.3.2 Vrste taninov

2.3.2.1 Hidrolizirajoči tanini

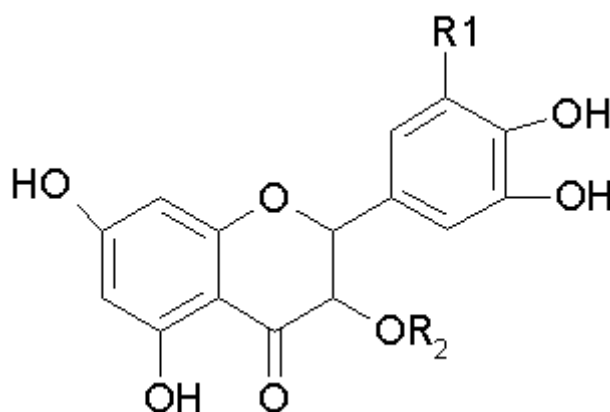
Središče hidrolizirajočih taninov je navadno D-glukoza. Hidroksilna skupina ogljikovega hidrata je delno ali popolnoma zaestrena s fenolno skupino, kot npr. galno kislino (galotanini; slika 2) oz. z heksahidroksidifensko kislino (elagitanini; Lowry in sod., 1996). Hidroliziramo jih lahko s šibkimi kislinami in bazami (Kumar, 1990). Predstavniki hidrolizirajočih taninov je taninska kislina, ki jo uvrščamo med galotanine in ki vsebuje na mol glukoze 8 do 19 molov galne kisline (Mangan, 1988). Hidrolizirajoči tanini se nahajajo v celičnih vakuolah, iz katerih se sprostijo ob poškodbi celic (Waghorn in McNabb, 2003). Najbolj pogoste drevesne vrste, iz katerih pridelujejo komercialne izvlečke hidrolizirajočih taninov, so hrast (*Quercus* sp.), kostanj (*Castanea* sp.), ruj (*Rhus* sp.), evkaliptus (*Eucalyptus* sp.) (Mangan, 1988). Hidrolizirajoči tanini so vodotopni (Khanbabaee in van Ree, 2001).



Slika 2. Strukturna formula galne kisline (vir: <http://en.wikipedia.org/wiki/Tannin>)

2.3.2.2 Kondenzirani tanini

Kondenzirani tanini so polimeri flavonolov (slika 3), ki ne vsebujejo sladkorja. So rjave do rdeče snovi, ki dajejo barvo kakavu, lesu itd. Ti tanini so najbolj razširjeni rastlinski tanini. Ker se pri segrevanju v prisotnosti kisline obarvajo in tvorijo antociane, jih imenujemo tudi proantociani (Taiz in Zeiger, 2002). Kondenzirani tanini se ne nahajajo v celičnih vakuolah, ampak v celičnih stenah, kjer se tudi sintetizirajo (Grundhofer, 2001). Velika večina teh taninov je topnih v vodi, njihova topnost pa se zmanjšuje z naraščanjem molekulske mase (Khanbabaee in van Ree, 2001).



Slika 3. Strukturna formula flavonola (vir: www2.arnes.si/~mborion4/fkg/slike/flavonol.gif)

2.3.2.3 Biološki pomen taninov v rastlinah

Vloga taninov v rastlinah je zelo raznovrstna. Ščitijo jih pred mnogimi rastlinojedimi organizmi, patogenimi mikroorganizmi in pred gnitjem. Tanini imajo trpek okus in so lahko toksični. V celicah se odlagajo v vakuole in celične stene (Taiz in Zeiger, 2002). Rastlinski deli, ki vsebujejo veliko taninov, so predvsem lubje, les, listi, korenine, plodovi, šiške (Taiz in Zeiger, 2002). V brstih se tanini nahajajo predvsem v zunanjih zaščitnih listih. V listih je običajno nahajališče taninov zgornja povrhnjica, vendar se pri zimzelenih rastlinah pogosto nahajajo po celotnem listnem tkivu. Ker so trpkega okusa, rastlino varujejo pred rastlinojedi, ki zaradi manjše užitnosti tkiva manj napadajo rastlino. V koreninah so tanini razporejeni predvsem v hipodermisu tik pod povrhnjico. Verjetno tako ustvarjajo kemično prepreko za prodor in naselitev rastlinskih patogenov. Seme običajno vsebuje tanine v zunanjih zaščitnih plasteh. Tanini sodelujejo pri vzdrževanju semenske dormance oz. pri mirovanju semena v pogojih, neugodnih za kalitev. Imajo pa tudi baktericidne učinke, ki varujejo pred bakterijskim napadom na seme. Tanine vsebuje tudi rastlinsko steblo oz. deblo. Pri drevesih so najpogosteje v sekundarnem floemu in ksilemu (Taiz in Zeiger, 2002).

2.3.2.4 Vsebnost taninov v rastlinah

Nekatere rastlinske vrste vsebujejo več taninov od drugih. Vsebujejo jih tako golosemenke kot kritosemenke. Med kritosemenkami pa se tanini bolj pogosto nahajajo v dvokaličnicah kot enokaličnicah (Zonneveld in sod., 2005).

Tanine pogosto vsebujejo tudi rastlinske vrste, ki jih ljudje in živali uporabljamo za prehrano. Te rastline so npr. proso (*Panicum miliaceum*), ogrščica (*Brassica napus*), ječmen (*Hordeum vulgare*) itd. Tanini so prisotni tudi v pivu, moštu in vinu, in sicer zaradi hmelja, jabolk in grozdja (Mueller-Harvey, 1999).

Količina taninov, vrsta le-teh in področje nahajanja v rastlinah se od vrste do vrste razlikujejo. Nekatere rastlinske vrste ne proizvajajo samo ene vrste taninov, ampak kar mešanico le-teh, kjer navadno ena vrsta tanina prevladuje (Mueller-Harvey, 1999).

Količina taninov v rastlinah pa ni enaka niti med različnimi osebki pri eni rastlinski vrsti. Različni osebki iste vrste se med seboj razlikujejo po količini taninov. Vsebnost taninov v

osebku je odvisna od zrelosti rastline, stresnih dejavnikov, abiotskih dejavnikov okolja (temperatura, količina padavin, vrsta tal, količine mineralov itd.; Mueller-Harvey, 1999). Tanini so nekakšen pokazatelj rastlinskega stresa. Rastline, ki rastejo v stresnem okolju, jih proizvedejo več od rastlin, ki rastejo v odsotnosti stresnih dejavnikov. Količina taninov je odvisna tudi od zrelosti rastline. Mlade rastline vsebujejo tako večjo količino taninov od starejših rastlin (Salminen in sod., 2004).

Rastline zmernega pasu običajno vsebujejo do 20 g taninov na kg suhe snovi z izjemo nekaterih stročnic, ki lahko vsebujejo do 50 g taninov na kg suhe snovi (Lowry in sod., 1996). Tropske rastline lahko vsebujejo še večje količine taninov, in sicer do 200 g taninov na kg suhe snovi (Lowry in sod., 1996). Skupno je lahko v rastlinah do 500 g fenolov na kg suhe snovi. Tanine so odkrili pri 80 % drevesnih vrst (Mueller-Harvey, 1999). Vsebnost taninov v dveh vrstah hrasta (*Quercus serrata* Thunb., *Quercus mongolica* Fisch. var. *Grosseserrata* Rehd. Et Wils.) se giblje od 7 % do 12 % suhe snovi (Shimada, 2001).

2.4 Namen dela

V diplomski nalogi smo ugotavljali vpliv taninov na kakovost meritve velikosti genoma. Na začetku smo želeli izmeriti velikost genoma rastlinske vrste z veliko vsebnostjo taninov. Izbrali smo si dob. Nato smo merili genom standardni rastlinski vrsti - grahu, ki smo jo fiksirali skupaj s rastlinsko vrsto, ki vsebuje veliko taninov. Ponovno smo izbrali dob, rastlinsko vrsto z veliko vsebnostjo taninov. Fiksirali smo v dveh fiksativih (Farmerjev fiksativ in formaldehid). Na osnovi prejšnjih objav smo pričakovali, da bo prisotnost taninov v fiksiranem tkivu zmanjšala kakovost meritve velikosti genoma.

V nadaljevanju pa smo standardni rastlinski vrsti, grahu, v Farmerjev fiksativ dodajali komercialno obliko tanina (taninsko kislino). Ugotavljali smo, kako in koliko tanini, prisotni v fiksativu, vplivajo na kakovost meritve velikosti rastlinskega genoma. Na osnovi prejšnjih objav smo pričakovali, da se pri večji koncentraciji dodanih taninov niža kakovost meritve velikosti genoma.

Vzporedno smo razvijali optimalno metodo za shranjevanje oz. fiksiranje rastlinskega materiala, nabranega na terenu. Preizkušali smo dva različna fiksativa, temperature

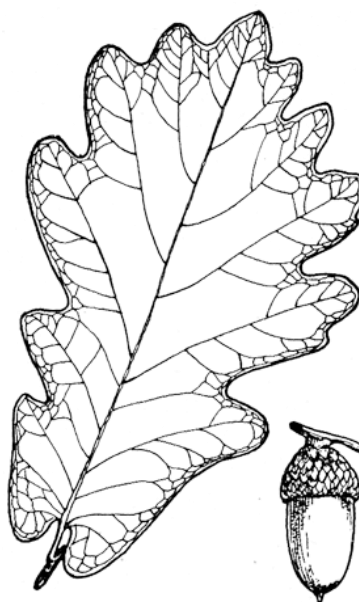
fiksiranja, koncentracije dodane taninske kisline itd. Ker se na terenu pogosto pojavljajo določene omejitve (visoka T, tip fiksativa, možnost shranjevanja rastlinskega materiala itd.), ki odstopajo od laboratorijskih oz. idealnih razmer dela, smo želeli ugotoviti, kako te spremembe vplivajo na kakovost meritve velikosti rastlinskega genoma.

3 MATERIALI IN METODE

Delo v laboratoriju je potekalo na Katedri za botaniko, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani v letu 2006 in 2007.

3.1 Rastlinski material

Za meritev velikosti genoma v rastlini, polni taninov, smo v Ljubljani in njeni okolici nabrali želod, plod vrste dob (*Quercus robur* L.; slika 4). Posadili smo ga v lončke s prstjo in gojili pri sobni temperaturi. Vzgojili smo 30 rastlin, s katerih smo v nadaljnjih poskusih odvezemali koreninske vršičke.



Slika 4. *Quercus robur* – dob (vir: trees.stanford.edu/ENCYC/QUERob.htm)

Kot standardno rastlinsko vrsto, ki ne vsebuje taninov, smo izbrali navadni grah *Pisum sativum* L. Za poskuse smo uporabili komercialno dostopna semena sorte Kleine Rheinlaerderin (oznaka: *Pisum sativum*, Kleine Rheinlaerderin, Partie Nr: 0-18/462, Fuelljahr: 2001).

3.2 Priprava korenin za fiksiranje

Koreninske vršičke doba smo odvezeli z rastlin, gojenih v lončkih. Odrezali smo približno 1 cm dolge koreninske vršičke ne preveč olesenelih, stranskih korenin in odrezane vršičke

sprali z vodo in prenesli v fiksativ. Rastline smo vrnili v zemljo in pri sobni temperaturi gojili naprej.

Semena graha smo najprej dobro sprali v vodi. Nato smo jih namakali 2 uri v vodovodni vodi, da smo povzročili imbibicijo oz. privzem vode, ki je začetek kaljenja semen. Semena smo nato prenesli v plastično posodo, kalilnik. Poskrbeli smo, da med njimi ni bilo prevelikega fizičnega stika, da so imela ves čas na razpolago vlažno okolje in kroženje zraka. Vsak dan smo po potrebi v kalilnik dodali vodovodno vodo. Koreninice so sprva nabrekli in po 24 urah so začele rasti. Vzklila je večina semen, in sicer je bila kaljivost graha približno 95 %. Po šestih dneh so zrasle 5 cm, mi pa smo potrebovali dolge približno 3-4 cm, za kar so potrebovale 4 dni. Odrezali smo približno 1 cm dolge vršičke glavne korenine in jih prenesli v fiksativ.

Število korenin, ki smo jih potrebovali, je bilo odvisno od posameznega poskusa, in se je navadno gibalo med 5-15 korenin. Ker pa je šlo za zelo krhko in mehko tkivo, ki se med nadaljnimi postopki rado poškoduje, smo navadno uporabili nekaj večje število korenin.

3.3 Fiksacija

Fiksacija je postopek, s katerim celice usmrtimo in pri tem ohranimo celične in tkivne strukture. Uporabljali smo dva fiksativa: Farmerjev fiksativ in 4 % nevtralni formaldehid (v nadaljevanju formaldehid). Enak postopek fiksiranja smo uporabili za korenine graha in doba.

3.3.1 Fiksiranje s Farmerjevim fiksativom

Fiksiranje po Farmerju uporabljamo za tkiva brez taninov. Farmerjev fiksativ je mešanica 3:1 (v/v) absolutni etanol : led očetna kislina pri 4 °C (Dolenc Koce, 2001 cit. po Jong, 1997). Namesto absolutnega etanola lahko uporabimo tudi absolutni metanol. Pomembno je, da pred uporabo pripravimo vedno svež fiksativ. V naših poskusih smo Farmerjev fiksativ pripravljali z absolutnim etanolom – EAA.

Vzorci smo v Farmerjevem fiksativu fiksirali 24 ur pri 4°C (v hladilniku). V majhne stekleničke smo dodali korenine in 8 mL fiksativa. Po 24 urah smo vzorce fiksiranega tkiva prenesli v 96 % etanol za dolgotrajnejše shranjevanje pri -20°C (v zamrzovalniku).

V enem izmed poskusov smo tkivo namesto pri priporočeni temperaturi 4 °C (Dolenc Koce, 2001 cit. po Jong, 1997) fiksirali s Farmerjevim fiksativom pri temperaturi 30 °C, ki je simulirala možne terenske razmere.

3.3.2 Fiksiranje s 4 % nevtralnimi formaldehidom

Fiksiranje s formaldehidom uporabljamo za tkiva s tanini. Ta fiksativ zadrži tanine predvsem na enem področju celice oz. poskrbi, da niso prisotni na celi celični površini (Greilhuber, 1987).

Postopek fikisiranja je opisala Dolenc Koce (2001). 4 % nevtralni formaldehid je pripravljen v Sørensenovem pufru (pH 6,8). Tako pripravljen fiksativ lahko dalj časa hranimo v hladilniku, če v njem ni precipitata. Vzorce smo fiksirali v tem fiksativu 90 minut pri sobni temperaturi. Za fiksiranje smo uporabili majhne stekleničke, v katere smo dodali korenine in fiksativ (8 mL). Nato smo jih sprali z destilirano vodo tako, da smo večkrat zamenjali manjše količine destilirane vode. Nadalje smo vzorce fiksirali v sveže pripravljenem Farmerjevem fiksativu (EAA) trikrat po 10 minut. V četrti mešanici Farmerjevega fiksativa smo vzorce shranili čez noč pri 4°C v hladilniku. Nato smo jih prenesli v 96 % etanol za dolgotrajnejše shranjevanje pri -20°C v zamrzovalniku.

Sørensenov pufer pripravimo tako, da v merilno bučo natehtamo 4,54 g KH_2PO_4 in 12,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Do 1000 mL dodamo destilirano vodo. Tako pripravljen pufer lahko hranimo v hladilniku več tednov (če v njem ni precipitata ali okužbe).

3.4 Barvanje po Feulgenu

Pred meritvami smo v fiksiranem rastlinskem tkivu kvantitativno obarvali DNA. Postopek smo priredili po Greilhuberju in Ebertovi (1994) na osnovi protokolov, objavljenih v Dolenc Koce (2001). Bistvo tega postopka je rožnato obarvanje DNA po vezavi Schiffovega reagenta na aldehydne skupine, ki nastanejo med delno hidrolizo DNA.

Korenine smo prenesli iz fiksativa v destilirano vodo. Najmanj 5 min smo jih spirali v destilirani vodi, da smo odstranili odvečen fiksativ. Nato smo jih prenesli v 5 M HCl in jih hidrolizirali pri 20°C. Trajanje hidrolize je bilo odvisno od tipa fiksativa. Korenine, fiksirane v Farmerjevem fiksativu, smo hidrolizirali 60 minut, korenine, fiksirane s 4 % formaldehidom, pa 80 minut.

Po hidrolizi smo korenine prenesli v ledeno mrzlo destilirano vodo za 5 minut, s čimer smo ustavili hidrolizo. Odstranili smo destilirano vodo in dodali Schiffov reagent za 120 minut pri 20°C. Po odstranitvi Schiffovega reagenta smo v stekleničke s koreninami dodali SO₂-vodo, da smo odstranili prebitek barvila. Korenine smo v SO₂-vodi spirali trikrat po 2 minuti, dvakrat po 10 minut in enkrat 20 minut. Zaradi toksičnosti SO₂-vode smo spiranje opravljali v digestoriju. SO₂-vodo smo pripravili svežo tik pred uporabo. Če smo jo nekaj dni hranili v hladilniku, smo vedno preverili, če še ima oster vonj. Nato smo odstranili vso SO₂-vodo in prenesli korenine v destilirano vodo do priprave mečkancev. Mečkane preparate smo izdelali takoj po končanem barvanju, torej isti dan.

Barvali smo v majhnih stekleničkah, kjer smo fiksiranim koreninam dolivali oz. odlivali različne raztopine, ki smo jih navedli v zgornjem postopku. Za vzdrževanje stalne temperature 20 °C smo stekleničke postavili v vodno kopel.

3.4.1 Priprava Schiffovega reagenta

- 4g pararosanilin klorida (Pararosaniline chloride, BDH, VB) raztopi v 800 mL vrele destilirane vode, premešaj in pusti ohladiti na 50°C.
- Raztopino vakuumsko prefiltriraj preko filtra iz steklenih vlaken (Microfibre filters, Whatman GF/C).

- Raztopini dodaj 120 mL 1 M HCl in 12g kalijevega metabisulfita $K_2S_2O_5$ (Fisons, VB).
- Raztopino pusti čez noč v temi na sobni temperaturi.
- Raztopini dodaj 2 do 4g aktivnega oglja za razbarvanje (decolourising charcoal, BDH, VB) in premešaj.
- Raztopino vakuumsko prefiltriraj preko filtra iz steklenih vlaken v suho steklenico (barvilo mora biti prozorno).
- Raztopino hrani v hladilniku pri 4 °C do 1 leto (v barvilu ne sme biti precipitata).

3.4.2 Priprava SO_2 -vode

- V 475 mL destilirane vode dodaj 25 mL 1 M HCl.
- Raztopini dodaj 2,5 g kalijevega metabisulfita $K_2S_2O_5$ (Fisons, VB).

3.5 Izdelava mečkanih preparatov

Postopek za pripravo mečkanih preparatov je opisala Dolenc Koce (2001). Mečkanci so preparati, ki jih pripravimo s pritiskom na rastlinsko tkivo, tako da dobimo eno plast celic.

Po barvanju in spiranju v SO_2 -vodi smo korenine prenesli v 45 % očetno kislino za 5 do 15 minut, da se je tkivo zmehčalo. Vsako objektno stekelce smo pred pripravo mečkanca očistili s kapljico 45 % očetne kisline in ga označili. Na očiščen objektnik smo položili obarvan vzorec – koreninico. Z britvico smo pod lupo odrezali koreninsko čepico, tako je za obdelavo ostal samo koreninski vršiček oz. s celičnimi delitvami bogat meristem. Z britvico, pinceto in preparirno iglo smo odrezali le manjši del tkiva in ga razrezali. Na tkivo smo položili krovno stekelce in nanj narahlo pritisnili s preparirno iglo. Na objektnik smo postavili filtrirni papir in s palcem navpično navzdol pritisnili na mesto s krovnikom, da smo dobili eno plast celic. Kakovost preparata smo preverili pod mikroskopom. Mečkance smo zamrznili na suhem ledu (CO_2 v trdnem stanju) in nato odstranili krovna stekelca. Preparate z mečkanci smo dehidrirali po 2 minuti v 96 % in v absolutnem etanolu. Dehidrirane preparate smo posušili na zraku (60 minut).

3.6 Meritve preparatov oz. rastlinskega genoma s slikovno citometrijo

Na pripravljenih preparatih smo merili količino jedrne DNA v meristemskih celicah koreninskega vršička. Za meritev količine jedrne DNA smo uporabili slikovno citometrijo.

Sistem za slikovno citometrijo je bil sestavljen iz svetlobnega mikroskopa (Axioskop MOT, Carl Zeiss, Jena, Nemčija), priključenega na osebni računalnik preko barvne CCD kamere (Sony DXC-950P). Gre za računalniški sistem, ki zajame sliko obarvanih jeter na mikroskopskem preparatu in jo nato analizira s pomočjo programske opreme za analizo slike. Uporabili smo programski paket KS 400 3.0 z ustreznimi makri. V svetlobno pot je bil vstavljen zeleni filter (540 nm). Za pripravo mikroskopa smo uporabili Köhlerjevo osvetlitev in povečavo objektiva 63x (Plan-Neofluar, Carl Zeiss, 63x/1,25 Oil).

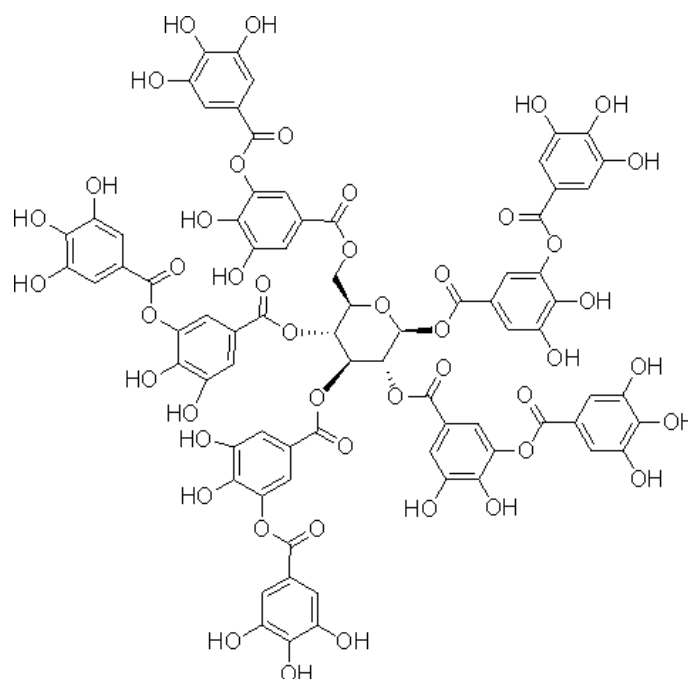
Pred začetkom meritve smo pustili CCD kamero in luč na mikroskopu prižgano 90 min, da se je merilni sistem ogrel in stabiliziral (Vilhar in Dermastia, 2002). Pred meritvijo smo s pomočjo različnih filtrov nevtralne optične gostote (ND 79, 70, 63, 50, 20, 5 %) izvedli optično kalibracijo oz. umerjanje (Vilhar in Dermastia, 2002).

Intenziteto obarvanja DNA smo merili posredno prek IOG, ki je povezana s transmisijo. Kamera namreč intenziteto svetlobnega signala pretvori v sive vrednosti od 0 do 255, kjer predstavlja 0 črno barvo in 255 belo barvo. Sive vrednosti so sorazmerne transmisiji. Pri meritvi smo za ozadje uporabljali vrednost 220, da smo se izognili presvetljeni sliki. Sive slike smo zajemali preko zelenega kanala kamere in zajemalnika slike Matrox Meteor (velikost slike 760 x 560 pikslov oz. pik). Na osnovi sivih vrednosti na zajeti sliki je program za analizo slike izvedel segmentacijo slike in izračunal IOG za posamezno jedro. Pri meritvi nismo upoštevali jeter na robu slike.

Na vsakem preparatu smo izmerili 200 do 300 interfaznih, telofaznih in profaznih jeter. Rezultate meritve smo prikazali kot frekvenčno porazdelitev IOG (slika 1). To so grafični prikazi, iz katerih smo razbrali dva vrhova. Prvi vrh je predstavljal vrednost 2C, drugi pa 4C. Položaj vrhov, KVv in druge parametre vrhov smo izračunali s pomočjo makra v okolju MS Excel. IOG smo merili v arbitrarnih enotah.

3.7 Dodajanje taninov v fiksativ

Med samim poskusnih delom smo pri določenih poskusih v fiksativ ali vodo dodajali taninsko kislino (tannic acid, Chinese natural gall nuts (from grass) $C_{76}H_{52}O_{46}$, molekulska masa 1701,20, Sigma-Aldrich, Nemčija). Gre za taninsko kislino (slika 5), ki je bila v obliki prahu. Pripravljali smo raztopine z različno koncentracijo taninske kisline. Taninsko kislino smo razpatpljali v vodi, Farmerjevem fiksativu in 4 % nevtralnem formaldehidu. Pripravili smo 0 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,5 %, 1 % in 2 % raztopine.



Slika 5. Taninska kislina (vir: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIAL/T0200>)

3.8 Dokazovanje taninov v tkivih

Tanini se z železovimi solmi obarvajo črno (Greilhuber, 1987). Postopek je opisala Dolenc Koce (2001). Uporabili smo železov (III) klorid ($FeCl_3$), ki smo ga pripravili v 3 % koncentraciji v 1 N HCl. Koščke rastlinskega tkiva – korenin oz. prečne in vzdolžne prereze le-teh smo položili v raztopine $FeCl_3$. Raztopina se je ob prisotnosti taninov obarvala črno, kar smo preverili s svetlobnim mikroskopom.

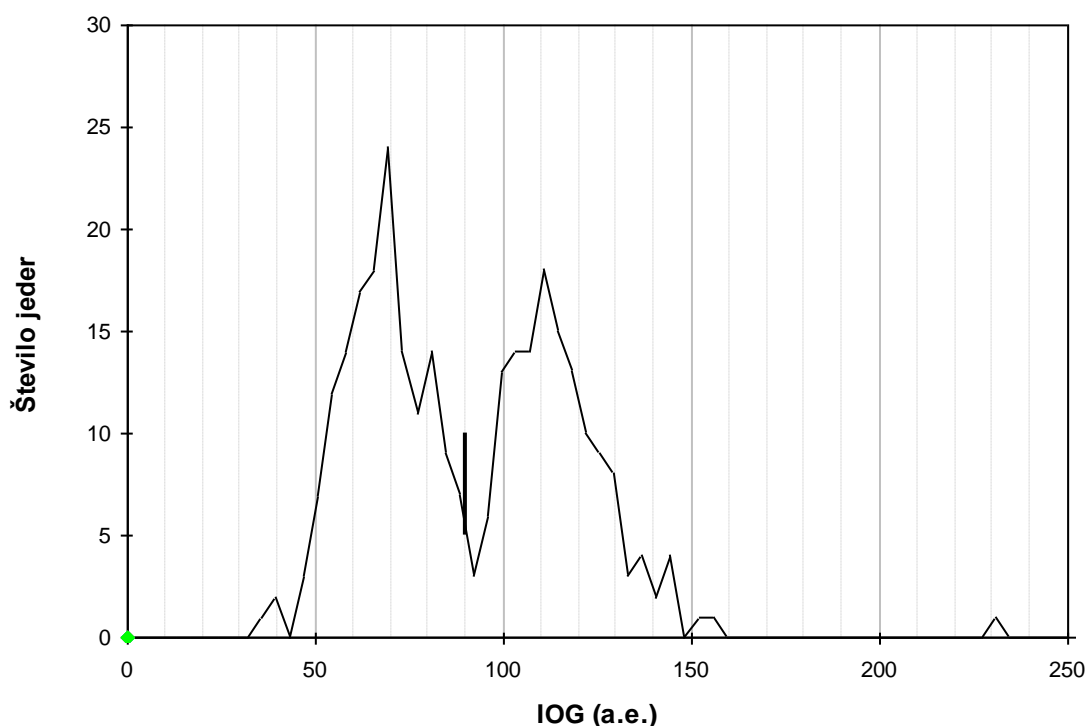
3.9 Statistična obdelava podatkov

Pri obdelavi podatkov smo uporabljali standardne statistične metode, ki so navedene na ustreznih mestih v poglavju Rezultati. Za statistično analizo smo uporabljali program GraphPad Prism 3.0.

4 REZULTATI

4.1 Meritev velikosti genoma pri dobu

Na osnovi barvanja z železovim kloridom in pregleda prečnih in vzdolžnih prereзов koreninskih vršičkov smo ugotovili, da tkivo vsebuje veliko taninov. Po barvanju s Feulgenovo reakcijo je bila jedrna DNA izjemno šibko obarvana tako pri fiksiranju v Farmerjevem fiksativu kot tudi v formaldehidu. Pri meritvi količine jedrne DNA je bila zaradi blede obarvanosti DNA detekcija in segmentacija jeder zelo težavna in pri mnogih jedrih celo nemogoča. Pri analizi izmerjenih IOG smo ugotovili, da so bili vrhovi bodisi izjemno široki ali pa jih ni bilo mogoče detektirati (slika 6). Kakovost barvanja jedrne DNA v koreninskih vršičkih doba je bila tako slaba, da meritev velikosti genoma doba nismo mogli izvesti.



Slika 6: Primer frekvenčne porazdelitve vrednosti IOG doba (*Quercus robur*) na mečkanih preparatih koreninskih vršičkov. Tkivo je fiksirano v formaldehidu. IOG je prikazana v arbitrarnih enotah.

4.2 Vpliv skupnega fiksiranja tkiv doba in graha na kakovost meritve genoma

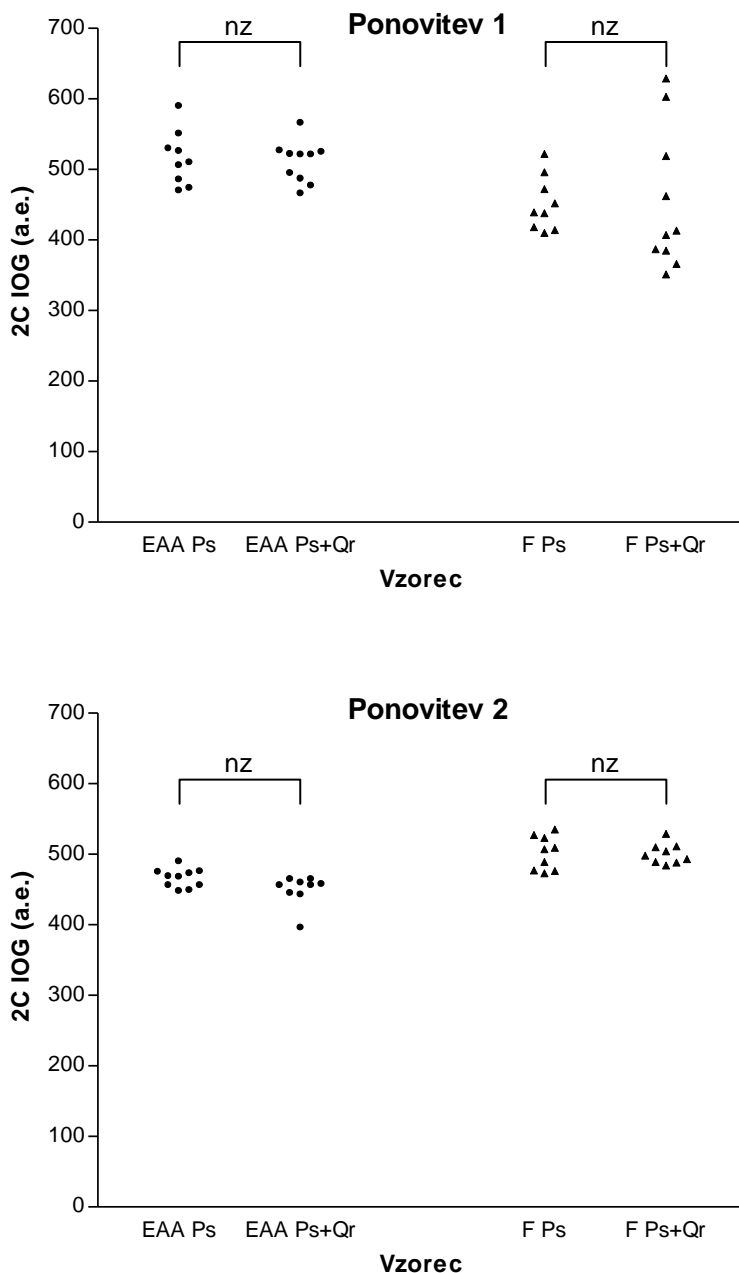
V predhodnih poskusih smo s pomočjo barvanja z železovim kloridom ugotovili, da korenine doba vsebujejo zelo veliko količino taninov.

Preučili smo, ali lahko tanini iz tkiv doba motijo barvanje DNA in kakovost meritve genoma pri grahu, ki smo ga uporabili kot standardno testno vrsto. Primerjali smo kakovost meritev velikosti genoma pri koreninah graha, ki smo jih fiksirali in barvali v samostojnih stekleničkah, s koreninami graha, ki smo jih fiksirali in barvali v stekleničkah skupaj s koreninami doba. Uporabili smo oba fiksativa. Poskus smo izvedli dvakrat.

Pri obeh fiksativih in pri obeh ponovitvah poskusa se povprečna vrednosti 2C graha, izmerjenih v vzorcih fiksiranih brez prisotnosti in v prisotnosti tkiva doba, niso statistično značilno razlikovala med seboj (tabela 1, slika 7; ANOVA, $p > 0,05$). Pri prvi ponovitvi poskusa smo v vzorcih, ki so bili fiksirani v formaldehidu v prisotnosti tkiva doba, opazili relativno veliko raztresenost izmerjenih vrednosti 2C ($KV = 22\%$). Pri vseh drugih vzorcih obeh ponovitev poskusa je bil koeficient variacije vrednosti 2C med 3 % in 8 %. Pri prvi ponovitvi poskusa je bil povprečni koeficient variacije vrha (KVv) v vzorcih z dobom večji od 6 % pri obeh fiksativih, pri prvi ponovitvi pa je bil KVv vedno nižji od 6 % (tabela 1). Pri tem $KVv < 6\%$ velja za kriterij kakovostne meritve (Vilhar in sod., 2001 cit. po Böcking in sod., 1995).

Tabela 1. Kakovost meritve vrednosti 2C graha (*Pisum sativum*) pri skupnem fiksiranju korenin graha in doba (*Quercus robur*). Prikazani so rezultati dveh ponovitev poskusa. Fiksativ: EAA – Farmerjev fiksativ, F – formaldehid. Fiksirano tkivo: Ps – v steklenički fiksirane samo korenine graha, Ps + Qr – v steklenički skupaj fiksirane korenine graha in doba. Prikazani so parametri meritev za grah: N – število merjenih preparatov, 2C - povprečna vrednost 2C s standardno napako (v arbitrarnih enotah), KV – koeficient variacije izmerjenih vrednosti 2C, KVv – povprečni koeficient variacije vrha 2C, premik 4C/2C – povprečno odstopanje razmerja med vrednostima 4C in 2C od idealnega razmerja 2.

Poskus	Fiksativ	Fiksirano tkivo	N	2C (a.e.)	KV (%)	KVv (%)	Premik 4C/2C (%)
Ponovitev 1	EAA	Ps	9	516 ± 13	7,5	4,4 ± 0,3	-12,8 ± 4,8
		Ps + Qr	10	511 ± 9	5,7	6,8 ± 2,4	-5,4 ± 1,5
	F	Ps	9	452 ± 13	8,5	5,8 ± 1,4	-7,1 ± 2,1
		Ps + Qr	10	453 ± 31	21,9	8,9 ± 2,5	-10,4 ± 5,3
Ponovitev 2	EAA	Ps	10	466 ± 4	2,9	2,2 ± 0,2	0,8 ± 0,6
		Ps + Qr	9	446 ± 7	4,8	2,2 ± 0,3	2,1 ± 1,0
	F	Ps	9	506 ± 8	4,7	3,4 ± 0,5	-3,5 ± 0,6
		Ps + Qr	9	500 ± 5	2,9	3,3 ± 0,3	-6,3 ± 2,1



Slika 7. Meritev vrednosti 2C graha (*Pisum sativum*) pri skupnem fiksiranju korenin graha in doba (*Quercus robur*). Prikazani so rezultati dveh ponovitev poskusa. Fiksativ: EAA – Farmerjev fiksativ, F – formaldehid. Fiksirano tkivo: Ps – v steklenički fiksirane samo korenine graha, Ps + Qr – v steklenički skupaj fiksirane korenine graha in doba. Vsaka točka prikazuje rezultat meritev na enem preparatu, pripravljenem iz enega koreninskega vršička. nz – statistično neznačilne razlike med povezanimi vzorci.

4.3 Vpliv dodanih taninov na kakovost meritve velikosti genoma

Najprej smo s pomočjo barvanja tkiva z železovim kloridom ugotavljali prodiranje dodanih taninov iz fiksativa ter iz vode v tkivo. V koreninah iz fiksativa brez dodanih taninov nismo opazili temnega obarvanja po barvanju z železovim kloridom. V koreninah, ki smo jih fiksirali v prisotnosti tanina, pa smo po 30 min na prečnih prerezi opazili, da so se korenine temno obarvale. Torej so tanini prešli iz fiksativa v korenine v Farmerjevem fiksativu, in sicer pri vseh koncentracijah dodanih taninov. Pri fiksaciji s formaldehidom pa prehoda taninov iz fiksativa v korenine graha ni bilo, opazili pa smo nastajanje oborine pri velikih koncentracijah taninske kisline (10 %). Opazili smo tudi prehod taninov iz vodne raztopine v korenine graha.

Pri nadaljnem delu smo koreninam graha pri fiksiranju v Farmerjevem fiksativu in formaldehidu dodajali različne koncentracije taninske kisline. Pri vzorcih, fiksiranih s Farmerjevim fiksativom, se je intenzivnost obarvanja DNA (IOG) zmanjševala z naraščajočo koncentracijo dodanih taninov (tabela 2, slika 8). Povprečna vrednost IOG v vzorcih brez taninov in v vzorcih z dodano 0,1 % taninsko kislino je bila statistično značilno različna od ostalih vzorcev (tistih z višjo koncentracijo dodanih taninov; tabela 3, slika 8; ANOVA, $p < 0,5$). Vrednost IOG v vzorcih brez tanina in z 0,1 % taninsko kislino ni bila statistično značilno različna. Po dodajanju 0,2 % ali več taninske kisline v Farmerjev fiksativ se je vrednost IOG zmanjšala na približno tretjino vrednosti kontrolnih vzorcev brez taninov.

Pri vzorcih, fiksiranih s formaldehidom, se vrednosti IOG kontrolnih vzorcev brez taninov in tistih vzorcev, ki smo jim dodali tanine, statistično značilno med seboj niso razlikovale (tabela 3, slika 8; ANOVA, $p > 0,05$). Pri vzorcih, fiksiranih s formaldehidom, se je povprečna IOG znižala za največ 13 % v primerjavi s kontrolnimi vzorci brez taninov.

Vrednosti vzorcev z enako dodano koncentracijo taninske kisline v različnih fiksativih so se med seboj statistično značilno razlikovale (ANOVA, $p < 0,5$), razen vzorci z dodano 0,1 % taninsko kislino. Kontrolni vzorci v različnih fiksativih se med seboj niso statistično značilno razlikovali (ANOVA, $p > 0,05$).

Pri vzorcih, fiksiranih v Farmerjevem fiksativu, je bil KV med 5 % in 14 %, razen pri vzorcih, ki smo jim dodali 0,2 % taninsko kislino, kjer je bila variabilnost meritev večja

(KV = 36 %). KV vzorcev, ki smo jih fiksirali s formaldehidom, pa je bil med 6 % in 29 %, pri čemer smo največjo raztresenost vrednosti IOG opazili pri srednje velikih koncentracijah dodanih taninov (tabela 2, slika 9).

Povprečni KVv so bili v večini primerov okoli priporočenih 6 % v vseh vzorcih v Farmerjevem fiksativu ter v formaldehidu brez taninov in z nizko koncentracijo dodane taninske kisline (do 0,2 %). V formaldehidu je bil pri višjih koncentracijah dodane taninske kisline KVv višji (9-19 %; tabela 2).

Povprečni premik razmerja med vrednostima 4C in 2C je bil večinoma okrog priporočene meje 5 % (Vilhar in sod., 2001 cit. po Böcking in sod., 1995). Pri obeh fiksativih je premik 4C/2C največji pri vzorcih, ki smo jim dodali najvišje koncentracije taninov (tabela 2).

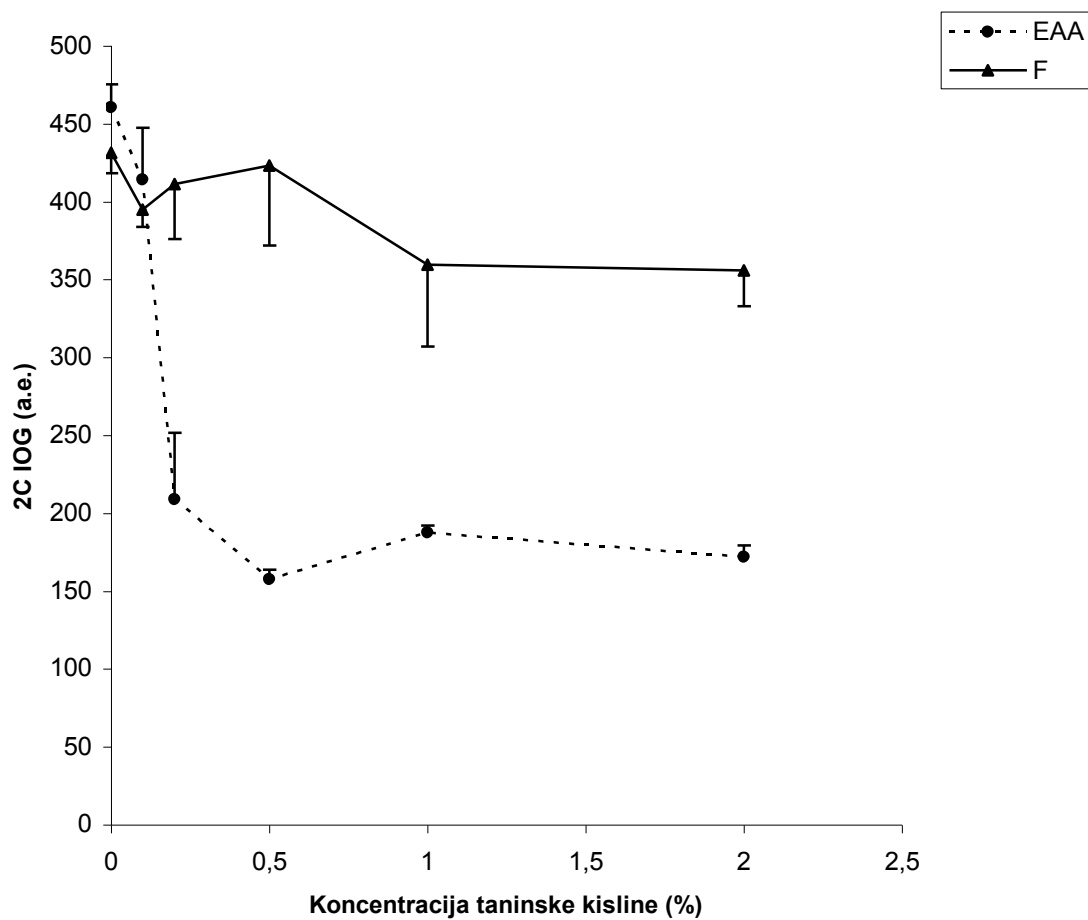
Tabela 2. Kakovost meritve vrednosti 2C graha (*Pisum sativum*) pri dveh različnih fiksativih v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov. Fiksativ: EAA – Farmerjev fiksativ, F – formaldehid. Prikazani so parametri meritev za grah: N – število merjenih preparatov, 2C - povprečna vrednost 2C s standardno napako (v arbitrarnih enotah), KV – koeficient variacije izmerjenih vrednosti 2C, KVv – povprečni koeficient variacije vrha 2C, premik 4C/2C – povprečno odstopanje razmerja med vrednostima 4C in 2C od idealnega razmerja 2.

Fiksativ	Konc. taninske kisline	N	2C (a.e.)	KV (%)	KVv (%)	Premik 4C/2C (%)
EAA	0%	5	461 ± 15	7,2	5,8 ± 0,4	-6,2 ± 0,6
	0,1%	3	414 ± 33	14	5,6 ± 0,8	-1,2 ± 2,1
	0,2%	3	209 ± 43	35,5	6,4 ± 1,7	4,8 ± 5,5
	0,5%	5	158 ± 6	9	6,6 ± 0,5	-5,6 ± 1,1
	1,0%	4	188 ± 5	4,9	7,9 ± 0,6	-6,7 ± 0,8
	2,0%	5	172 ± 8	9,8	5,2 ± 1,0	-7,8 ± 2,5
F	0%	5	431 ± 13	6,7	7,4 ± 2,2	-3,3 ± 1,9
	0,1%	4	395 ± 11	5,6	5,5 ± 1,1	-5,0 ± 1,6
	0,2%	5	411 ± 35	19,2	6,0 ± 0,7	-1,4 ± 4,6
	0,5%	4	423 ± 52	24,3	9,3 ± 1,6	0,5 ± 11,5
	1,0%	4	360 ± 53	29,2	15,3 ± 0,9	-16,6 ± 3,6
	2,0%	4	356 ± 23	13,1	19,4 ± 2,0	-19,7 ± 5,0

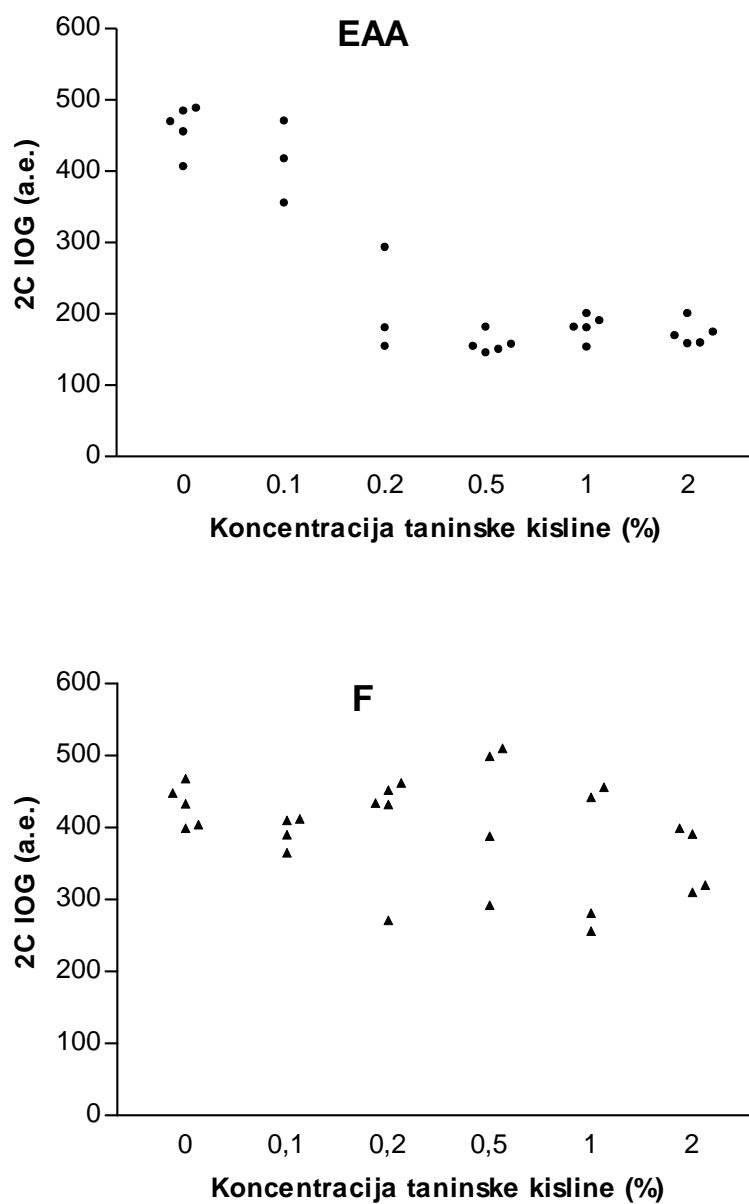
Tabela 3. Prikaz statistično značilnih razlik med vzorci pri različnih koncentracijah dodane taninske kisline. Fiksativ: EAA – Farmerjev fiksativ, F – formaldehid. ANOVA s Tukeyevim post-testom: nz - statistično neznačilna razlika ($p > 0,05$), * - statistično značilna razlika $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$.

		EAA				
		0	0,1%	0,2%	0,5%	1,0%
EAA	Konc. taninske kisline					
	0					
	0,1%	nz				
	0,2%	***	**			
	0,5%	***	***	nz		
	1,0%	***	***	nz	nz	
	2,0%	***	***	nz	nz	nz

		F				
		0	0,1%	0,2%	0,5%	1,0%
F	Konc. taninske kisline					
	0					
	0,1%	nz				
	0,2%	nz	nz			
	0,5%	nz	nz	nz		
	1,0%	nz	nz	nz	nz	
	2,0%	nz	nz	nz	nz	nz



Slika 8. Vrednost 2C graha (*Pisum sativum*) pri dveh različnih fiksativih v odvisnosti od koncentracije dodane taninske kisline. Prikazana je povprečna vrednost IOG in standardna napaka v arbitrarnih enotah (a.e.). Fiksativ: EAA – Farmerjev fiksativ, F – formaldehid. Za podatke glej tabelo 2. Statistična analiza je v tabeli 3.



Slika 9. Raztresenost vrednosti 2C graha (*Pisum sativum*) pri različnih koncentracijah dodane taninske kisline v dveh različnih fiksativih. Fiksativ: EAA – Farmerjev fiksativ, F – formaldehid. Vsaka točka prikazuje rezultat meritev na enem preparatu, pripravljenem iz enega koreninskega vršička.

4.4 Vpliv temperature fiksiranja na kakovost meritve velikosti genoma

Korenine graha smo fiksirali pri dveh različnih temperaturah: 4 °C in 30 °C. Čas fiksacije pri obeh temperaturah je bil 24 h. Za fiksiranje smo uporabili Farmerjev fiksativ. V fiksativ smo pred fiksiranjem korenin dodali različne koncentracije taninske kisline.

Vrednosti IOG kontrolnih vzorcev, fiksiranih pri različnih temperaturah, so bile podobne oz. niso bile statistično značilno različne (tabela 5; ANOVA, $p > 0,05$). Vrednosti IOG vzorcev, ki smo jih fiksirali pri 30 °C, pri vseh koncentracijah taninske kisline, so bile nekoliko nižje od vrednosti IOG vzorcev, ki smo jih fiksirali pri 4 °C (tabela 4, slika 10). Razlike med njimi niso bile statistično značilne, razen pri vzorcih z 0,1 % taninsko kislino (tabela 5; ANOVA, $p < 0,05$).

Vrednosti IOG vzorcev, ki smo jim dodali taninsko kislino, so bile nižje in statistično značilno različne od vrednosti IOG kontrolnih vzorcev brez dodane taninske kisline pri obeh temperaturah fiksiranja (tabela 5; ANOVA, $p < 0,05$). Nižale so se z naraščajočo koncentracijo dodane taninske kisline pri obeh temperaturah fiksiranja (tabela 4, slika 10).

KV so bili med 4 % in 26 % pri vzorcih, fiksiranih pri 4 °C. Najnižji KV je bil pri kontrolnih vzorcih brez taninov (KV = 4 %), pri vseh ostalih vzorcih pa je bil nad 13 %. Pri temperaturi fiksiranja 30 °C so bili KV med 2 % in 27 %. Pri kontrolnih vzorcih in vzorcih z 0,1 % taninske kisline je bil KV nizek, pri višjih koncentracijah pa nad 8 % (tabela 4, slika 11). Vrednosti 2C so bile najbolj raztresene pri vzorcih, ki smo jim dodali 0,2 % in 0,5 % taninsko kislino pri obeh temperaturah fiksiranja (slika 11).

KVv kot kriterij zanesljivosti meritve je bil v večini primerov okoli priporočenih 6 %. Pri obeh temperaturah fiksiranja je bil najvišji KVv pri vzorcih z 0,2 % taninsko kislino (nad 11 %).

Premik razmerja med vrednostima 4C in 2C večinoma ni odstopal od priporočenih 5 % odmika od idealnega razmerja 2 (tabela 4).

Poskus smo izvedli trikrat. Podobne rezultate smo dobili tudi pri drugi izvedbi poskusa (priloga A). Rezultati tretje izvedbe poskusa pa so od ostalih dveh odstopali (priloga A) Primerjava vseh izvedb je prikazana v prilogi B.

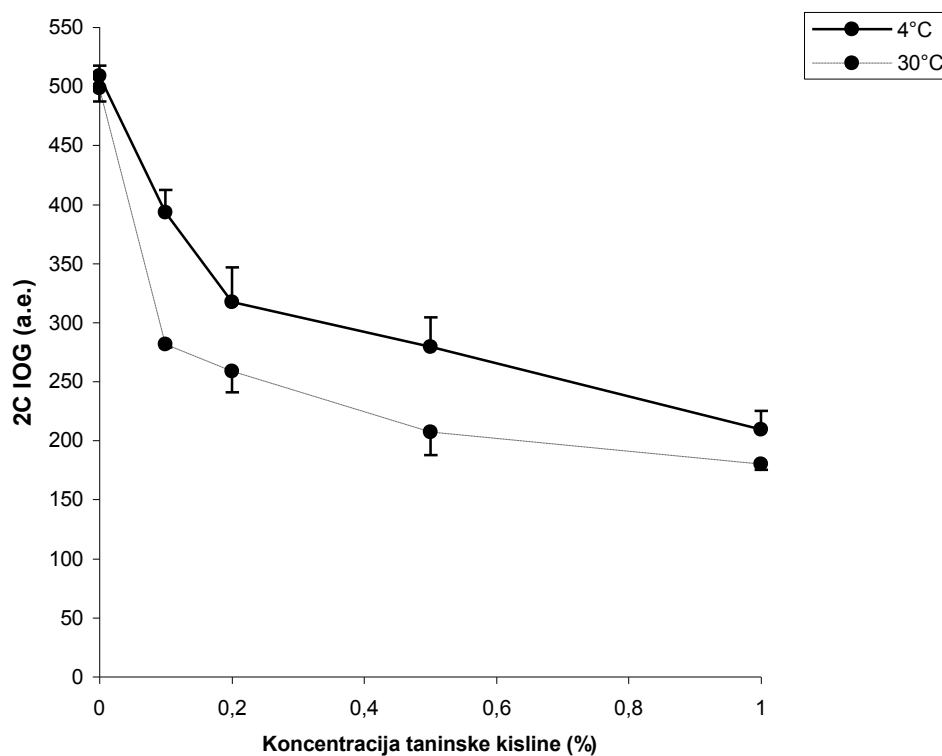
Tabela 4. Kakovost meritve vrednosti 2C graha (*Pisum sativum*) pri dveh temperaturah fiksiranja v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov pri prvi izvedbi poskusa. Tkivo je fiksirano v Farmarjevem fiksativu. Prikazani so parametri meritev za grah: T – temperatura fiksiranja, N – število merjenih preparatov, 2C - povprečna vrednost 2C s standardno napako (v arbitrarnih enotah), KV – koeficient variacije izmerjenih vrednosti 2C, KVv – povprečni koeficient variacije vrha 2C, premik 4C/2C – povprečno odstopanje razmerja med vrednostima 4C in 2C od idealnega razmerja 2.

Poskus	T	Konc. taninske kisline	N	2C (a.e.)	KV (%)	KVv (%)	Premik 4C/2C (%)
Izvedba 1	4 °C	0%	8	509 ± 9	4,8	3,7 ± 0,6	-2,2 ± 1,0
		0,1%	8	393 ± 19	13,7	10,3 ± 1,5	-5,1 ± 1,5
		0,2%	8	317 ± 29	26	11,9 ± 3,5	-6,6 ± 6,3
		0,5%	8	280 ± 25	25,3	6,8 ± 0,6	-4,4 ± 1,4
		1%	8	209 ± 16	21,3	7,3 ± 2,9	-1,4 ± 2,7
	30 °C	0%	8	499 ± 12	4,1	6,2 ± 1,2	-3,0 ± 0,5
		0,1%	8	282 ± 3	2,6	4,7 ± 0,7	-0,4 ± 1,1
		0,2%	8	259 ± 18	19,5	11,5 ± 3,2	-5,2 ± 1,9
		0,5%	8	207 ± 20	26,8	6,6 ± 0,8	-2,8 ± 2,1
		1%	8	180 ± 5	8,0	6,6 ± 1,3	-1,1 ± 1,4

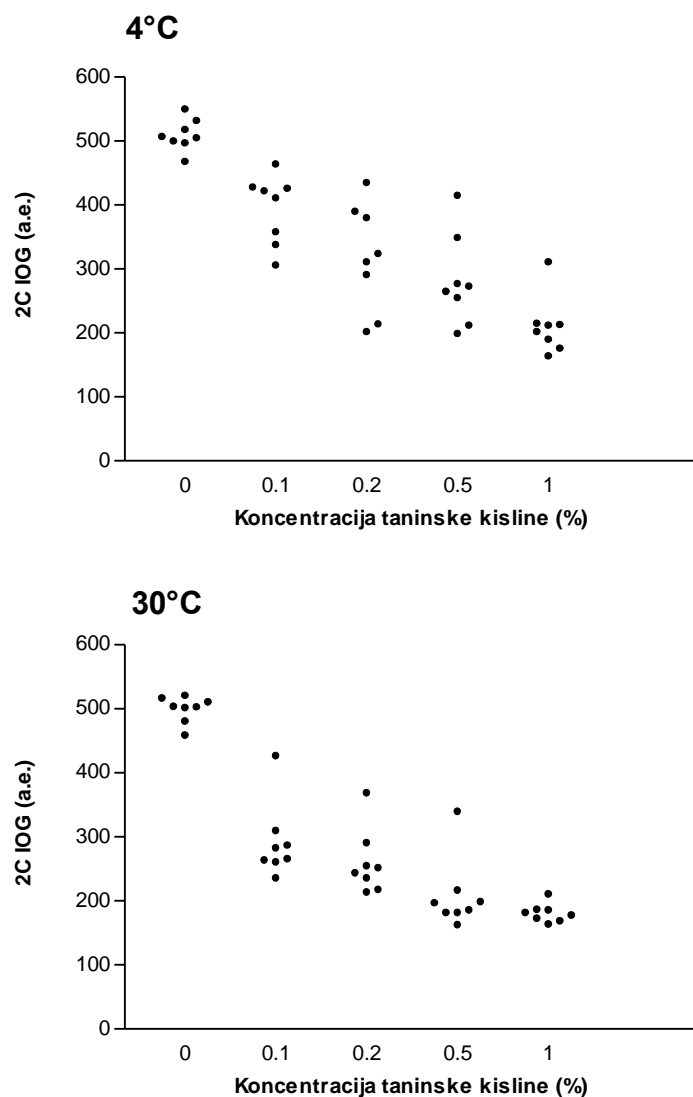
Tabela 5. Prikaz statistično značilnih razlik med vzorci graha (*Pisum sativum*) pri različnih temperaturah fiksiranja in pri različnih koncentracijah taninske kisline. Uporabljen je Farmerjev fiksativ. ANOVA s Tukeyevim post-testom: nz - statistično neznačilna razlika ($p > 0,05$), * - statistično značilna razlika $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$.

		4 °C			
		0%	0,1%	0,2%	0,5%
4 °C	Konc. taninske kisline				
	0%				
	0,1%	***			
	0,2%	***	nz		
	0,5%	***	***	nz	
1,0%	***	***	**	nz	
		30 °C			
		0%	0,1%	0,2%	0,5%
30 °C	Konc. taninske kisline				
	0%				
	0,1%	***			
	0,2%	***	nz		
	0,5%	***	*	nz	
1,0%	***	***	nz	nz	

		30 °C				
		0%	0,1%	0,2%	0,5%	1,0%
4 °C	Konc. taninske kisline					
	0%	nz	***	***	***	***
	0,1%	**	**	***	***	***
	0,2%	***	nz	nz	***	***
	0,5%	***	nz	nz	nz	*
1,0%	***	*	nz	nz	nz	



Slika 10. Vrednost 2C graha (*Pisum sativum*) pri dveh različnih temperaturah fiksiranja v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov. Tkivo je bilo fiksirano v Farmerjevem fiksativu, ki smo mu dodali različne koncentracije taninske kisline. Prikazana je povprečna vrednost 2C s standardno napako (SN) v arbitrarnih enotah. Podatki so prikazani v tabeli 4. Statistična analiza je prikazana v tabeli 5.



Slika 11. Raztresenost vrednosti 2C graha (*Pisum sativum*) pri različnih koncentracijah dodane taninske kisline pri dveh različnih temperaturah fiksiranja pri prvi izvedbi poskusa. Tkivo je bilo fiksirano v Farmerjevem fiksativu, ki smo mu dodali različne koncentracije taninske kisline. Vsaka točka prikazuje rezultat meritev na enem preparatu, pripravljenem iz enega koreninskega vršička.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 Razprava

Podatke o velikosti jedrnega genoma v sodobnem času potrebujemo na mnogih področjih. Lahko jih uporabimo v celični in molekularni biologiji, fiziologiji, razvojni biologiji, ekologiji, fitogeografiji, taksonomiji in sistematiki, evoluciji in filogeniji genoma (Bennett in sod., 2000).

V naših raziskavah smo kot standardno rastlinsko vrsto uporabljali grah. Preko nje smo ocenjevali, ali prisotnost taninovin med fiksiranjem zmanjšuje intenziteto barvanja DNA ter s tem moti kakovost meritve velikosti genoma. Preučevali smo tudi razlike med dvema fiksativoma pri meritvi velikosti genoma in vpliv temperature fiksiranja na kakovost meritve velikosti genoma.

5.1.1 Vpliv skupnega fiksiranja tkiv doba in graha na kakovost meritve velikosti genoma

Zanimalo nas je, če lahko tanini iz ene rastlinske vrste preidejo v drugo in posledično motijo meritev velikosti genoma, če ti dve rastlinski vrsti fiksiramo v skupnih stekleničkah. Teh podatkov v literaturi nismo zasledili, zato smo preverili mobilnost taninovin med rastlinama. Za rastlinsko vrsto, bogato s tanini, smo uporabili dob. Standardna rastlinska vrsta pa je bila grah. Fiksiranje je potekalo v Farmerjevem fiksativu kot tudi v formaldehidu. Skupno fiksiranje graha in doba smo uporabili kot simulacijo terenskih razmer, kjer je priporočljivo, da standardno rastlinsko vrsto in rastlinsko vrsto, katere velikost genoma želimo izmeriti, fiksiramo skupaj. Skupno fiksiranje povzroči enak morebitni vpliv taninovin na obe rastlinski vrsti in s tem primerljivost rezultatov meritve velikosti genoma.

Vrednosti 2C vzorcev graha, ki smo jih fiksirali skupaj z dobom, so bile nekoliko manjše od vrednosti 2C vzorcev, ki smo jih fiksirali posamično v Farmerjevem fiksativu, vendar razlike niso bile statistično značilne. Pri vzorcih, fiksiranih s formaldehidom, te razlike ni bila (tabela 1).

Pri skupnem fiksiranju graha in doba ne moremo z gotovostjo trditi, da tanini iz ene rastlinske vrste (dob) preidejo v drugo (grah) in vplivajo na kvaliteto meritve velikosti

genoma le-te. Opazili smo, da so bile vrednosti 2C vzorcev graha, ki smo jim dodali dob v Farmerjevem fiksativu, nekoliko manjše od tistih vzorcev, ki smo jih fiksirali posamično v Farmerjevem fiksativu (tabela 1). To pomeni, da so tanini verjetno nekoliko vplivali na kakovost meritve velikosti genoma. V formaldehidu ni bilo razlike med tema skupinama vzorcev, kar ponovno dokazuje prednost tega fiksativa pred Farmerjevim fiksativom, kot smo zasledili že v literaturi (Greilhuber, 1987).

Izvedli smo dve ponovitvi poskusa. Parametri zanesljivosti in kakovosti meritev so bili v drugi ponovitvi poskusa bližje priporočenih vrednosti. Od priporočene vrednosti je odstopal premik 4C/2C pri vzorcih graha, fiksiranega samostojno v Farmerjevem fiksativu (premik 4C/2C = -12,8 %) pri prvi ponovitvi poskusa (tabela 1). Prav tako je odstopal premik 4C/2C od priporočene meje pri vzorcih graha, fiksiranega skupaj z dobom v formaldehidu (premik 4C/2C = -10,4 %; tabela 1) pri prvi ponovitvi poskusa. Zakaj sta ta premika večja od priporočenih vrednosti, ne moremo z gotovostjo trditi. Težko trdimo, da gre za vpliv taninov na kakovost meritve, saj pri prvem opisanem premiku 4C/2C ni bilo prisotnih taninov, pri drugem pa smo kot fiksativ uporabili formaldehid, ki naj bi v veliki meri preprečil vpliv taninov na kakovost meritve (Greilhuber, 1987). Možno je, da nismo izdelali dovolj kakovostnih preparatov ali da meritev ni bila izvedena dovolj kvalitetno, saj smo se s postopkom dela v tej fazi šele seznanjali.

Tudi raztresenost vrednosti 2C je bila manjša pri drugi ponovitvi poskusa (slika 7), na kar kaže KV.

5.1.2 Vpliv vrste fiksativa in dodanih taninov na kakovost meritve velikosti genoma

V različne koncentracije taninske kisline, raztopljene v vodi, smo za 24 h dodali korenine graha. Ugotovili smo, da so tanini iz vode prešli v korenine graha. Taninsko kislino smo dodajali tudi fiksativu med fiksiranjem korenin graha. Po 30 min fiksaciji s Farmerjevim fiksativom smo ugotovili, da je taninska kislina, ki smo jo dodajali fiksativu, prešla v tkivo korenin graha. To smo ugotovili pri vseh koncentracijah (med 0,5 % in 10 %) dodane taninske kisline v fiksativu. Prisotnost taninov smo dokazovali z železovim kloridom (Greilhuber, 1987).

Pri fiksaciji s formaldehidom pa taninska kislina iz fiksativa ni prešla v tkivo graha, saj se le-to po barvanju z železovim kloridom ni temno obarvalo. Ti rezultati so v skladu s prejšnjimi objavami (Greilhuber, 1987), ki za fiksiranje rastlin s tanini in neraziskanih rastlin priporočajo formaldehid. Formaldehid prepreči taninsko delovanje oz. interakcije taninov s kromatinom (Greilhuber, 1987).

Preizkušali smo tudi topnost taninske kisline v vodi in fiksativih. Ko smo pripravili različne koncentracije taninske kisline v vodni raztopini, smo v skladu s prejšnjimi objavami ugotovili, da so tanini vodotopni (Khanbabaee in van Ree, 2001), saj se je taninska kislina pri vseh koncentracijah popolnoma raztopila (med 0,5 % in 10 %). Oborina ni bila prisotna. Podatkov o topnosti taninov v Farmerjevem fiksativu in formaldehidu nismo zasledili. Na osnovi poskusov smo ugotovili, da se je taninska kislina tudi v Farmerjevem fiksativu raztopila pri vseh dodanih koncentracijah. Oborine nismo zasledili. Ko smo taninsko kislino raztapljali v formaldehidu, smo na začetku priprave višjih koncentracij (10 %) v fiksativu še opazili oborino, a smo jo s fizičnim mešanjem raztopine odstranili, kar pomeni, da se je taninska kislina tudi v formaldehidu raztopila.

Ker smo zasledili, da je formaldehid uspešnejši fiksativ pri delu s tanini (Greilhuber, 1987), smo to tudi preizkusili. Zopet smo fiksirali korenine graha v Farmerjevem fiksativu in formaldehidu ter fiksativoma dodajali različne koncentracije taninske kisline. Uporabili smo od 0,1 % do 2 % taninsko kislino. Vsebnost taninov v dveh vrstah hrasta (*Quercus serrata* Thunb., *Quercus mongolica* Fisch. var. *Grosseserrata* Rehd. Et Wils.) se giblje od 7 % do 12 % suhe snovi (Shimada, 2001). Koncentracije taninske kisline, ki smo jih v naših poskusih dodajali v fiksativ, pa so bile manjše (največ 2 %). Pri tem moramo upoštevati, da pri fiksiranju tkiv z visoko vsebnostjo taninov ti tanini lahko prodrejo iz taninskih celic v okolno tkivo in v fiksativ. Pri tem se nekoliko razredčijo, vendar lahko vseeno motijo kasnejše barvanje jedrne DNA.

Pri fiksiranju s formaldehidom, vrednosti 2C pri vzorcih, ki smo jim dodali taninsko kislino, niso odstopale od vrednosti 2C kontrolnih vzorcev brez taninske kisline (tabela 2, slika 8, slika 9). Znižale so se največ na 83 % kontrolne vrednosti. Pri vzorcih, fiksiranih v Farmerjevem fiksativu, pa smo opazili veliko razliko med vrednostmi 2C vzorcev brez taninske kisline in z njo. Vrednosti vzorcev s taninsko kislino so se znižale največ na 37 % kontrolne vrednosti pri najvišji dodani koncentraciji taninske kisline (2 %), medtem ko je pri najmanjši dodani koncentraciji taninske kisline (0,1 %) vrednost 2C bila še vedno 90 %

kontrolne vrednosti.. Ta rezultat govori o manj kakovostni meritvi velikosti genoma, kadar so v rastlinskem materialu prisotni tanini in za fiksiranje uporabljamo Farmerjev fiksativ. 0,1 % taninska kislina v Farmerjevem fiksativu še ni močno vplivala na intenziteto obarvanja DNA. Vrednosti 2C vzorcev z 0,1 % taninsko kislino so bile podobne z vrednostmi 2C kontrolnih vzorcev brez taninov (tabela 3). Višje koncentracije taninske kisline (0,2 %, 0,5 %, 1 %, 2 %) v Farmerjevem fiksativu pa so močno vplivale na intenziteto obarvanja DNA oz. na kakovost meritve genoma. Z večanjem dodane koncentracije taninov se je velikost vrednosti IOG nižala (tabela 2, slika 8).

V vseh poskusih, kjer smo grah fiksirali v Farmerjevem fiksativu in v fiksativ dodajali taninsko kislino, smo ugotovili, da je taninska kislina vplivala na kakovost meritve velikosti genoma (nižja intenziteta obarvanosti DNA; tabela 2, tabela 4, slika 8, slika 10).

V podobni raziskavi so preučevali razlike med formaldehidom in MAA (Farmerjev fiksativ; metanol:ocetna kislina). Jedra iz rastlin s tanini so se manj obarvala pri vzorcih, fiksiranih s MAA, medtem ko pri vzorcih, fiksiranih s 4 % formaldehidom tega pojava niso zasledili (Greilhuber, 1987). Ugotovili so, da je bila pri rastlinah brez taninov IOG oz. intenziteta obarvanja DNA primerljiva. Tako so sklepali, da je bilo moteno barvanje po Feulgeniu posledica celičnega vpliva taninov med fiksacijo (»self-tanning«) (Greilhuber, 1987). To smo potrdili tudi mi.

Kljub temu, da smo opazili vpliv taninske kisline na kakovost meritve velikosti genoma, nam vrednosti kriterijev za kakovost meritve tega niso pokazale, saj niso zelo odstopale od priporočenih vrednosti. KVv in premiki 4C/2C, so bili pri vzorcih fiksiranih v Farmerjevem fiksativu, tesno okoli priporočenih vrednosti pri vseh koncentracijah dodane taninske kisline. Izgleda, da so bile meritve opravljene zanesljivo, a smo pokazali, da so tanini močno vplivali na kakovost meritve. Pri vzorcih, fiksiranih v formaldehidu, so vrednosti parametrov odstopale od priporočenih vrednosti pri najvišjih dveh koncentracijah dodane taninske kisline (1 % in 2 %) (KVv > 15 % in premik 4C/2C > 16 %, tabela 2). Morda gre za vpliv taninov na kakovost meritve, a je zanimivo, da smo uporabili formaldehid, ki omili vpliv taninov na meritev velikosti genoma (Greilhuber, 1987). Verjetno so tanini pri dveh najvišjih koncentracijah vseeno v manjši meri vplivali na kakovost meritve.

Raztresenost vrednosti 2C kontrolnih vzorcev je bila majhna pri obeh fiksativih (slika 9).

5.1.3 Vpliv temperature fiksiranja na kakovost meritve velikosti genoma

Pri fiksiranju korenin graha smo si poleg priporočene temperature fiksiranja 4 °C (Dolenc Koce, 2001 cit. po Jong, 1997) izbrali temperaturo 30 °C, ki je predstavljala možno temperaturo v terenskih razmerah.

Vrednosti IOG vzorcev, ki smo jim dodali taninsko kislino, so bile nižje od vrednosti IOG kontrolnih vzorcev brez dodane taninske kisline pri obeh temperaturah fiksiranja (tabela 5; ANOVA, $p < 0,05$). Nižale so se z naraščajočo koncentracijo dodane taninske kisline pri obeh temperaturah fiksiranja (tabela 4, slika 10).

Vrednosti IOG vzorcev, ki smo jih fiksirali pri 30 °C, so bile pri vseh koncentracijah taninske kisline nekoliko nižje od vrednosti IOG vzorcev, ki smo jih fiksirali pri 4 °C (tabela 4, slika 10). Razlike niso bile statistično značilne, razen pri vzorcih z 0,1 % taninsko kislino (tabela 5; ANOVA, $p < 0,05$).

Ugotovili smo, da temperatura fiksacije ne vpliva bistveno na meritev velikosti genoma. Bolj je pomembna dodana taninska kislina oz. njena koncentracija. Verjetno bi temperatura fiksiranja, višja od 30 °C, bolj znižala vrednosti IOG oz. omogočila taninom večji vpliv na kakovost meritve velikosti genoma. Višjim temperaturam fiksacije (nad 30 °C) se na terenu navadno lahko izognemo.

Premiki 4C/2C so bili tesno okoli priporočenih vrednosti (tabela 4). Drugi parameter kriterijev zanesljivosti in kakovosti meritve velikosti genoma KVv je najbolj odstopal od priporočenih vrednosti pri vzorcih, ki smo jih dodali 0,2 % taninsko kislino pri obeh temperaturah fiksiranja in vzorcih z 0,1 % taninsko kislino pri temperaturi fiksiranja 4 °C (KVv > 10 %, tabela 4). Raztresenost vrednosti 2C je bila največja pri 0,2 % in 0,5 % dodane taninske kisline pri obeh temperaturah fiksiranja (KV > 20 %; tabela 4). Nižje koncentracije dodane taninske kisline (0,1 %, 0,2 %, 0,5 %) so bile pri uporabi Farmerjevega fiksativa najbolj problematične za samo meritev v vseh izvedenih poskusih (tabela 2, tabela 4). Taninska kislina pri teh koncentracijah verjetno ni vplivala na vse celice oz. ni v celoti prepojila tkiva, na kar kaže večja raztresenost vrednosti 2C (slika 9, slika 11), in manjši vpliv na intenziteto obarvanja (slika 8, slika 10).

Ta poskus smo izvedli trikrat. Rezultati druge izvedbe poskusa so podobni kot pri prvi izvedbi poskusa (priloga A). Tretja izvedba poskusa pa od prvih dveh odstopa iz neznanih vzrokov (nekvalitetno barvanje, seznanjanje z metodo; priloga A).

Rezultati naše raziskave so v skladu s prejšnjimi objavami o tem, da lahko prisotnost taninov močno moti kakovost meritve velikosti genoma (Greilhuber, 1987). Tako lahko podpremo prejšnja priporočila, da pri fiksiranju materiala na terenu uporabimo formaldehid (Greilhuber, 1987). Priporočljivo je tudi skupno fiksiranje standardne in merjene vrste (v skupnih stekleničkah). S tem dosežemo enak možen vpliv taninov na kakovost meritve velikosti genoma in s tem primerljivost rezultatov velikosti genoma obeh rastlin. Na osnovi naših rezultatov pri fiksiranju priporočamo temperaturo 4 °C oz. ne zelo povišano temperaturo.

5.2 Sklepi

Na preparatih korenin doba, pripravljenih po standardnih postopkih in po fiksiranju v 4 % nevtralnem formaldehidu in v Farmerjevem fiksativu, je bila obarvanost DNA zelo šibka. Zato na teh preparatih nismo mogli izmeriti količine jedrne DNA. Možen vzrok za slabo obarvanost jedrne DNA je velika količina taninov v koreninah doba. Slikovna citometrija tako ni najbolj primerna metoda za meritev velikosti genoma pri rastlinskih vrstah oz. tkivih z zelo velikimi vsebnostmi taninov.

Taninska kislina, ki smo jo dodajali v Farmerjev fiksativ, je močno vplivala na kakovost meritve velikosti genoma. Znižala je intenziteto obarvanja DNA in s tem izmerjene vrednosti IOG. Pri fiksiranju v 4 % nevtralnem formaldehidu je bil vpliv taninov na kakovost meritve precej manjši kot pri Farmerjevem fiksativu.

Pri fiksiranju v Farmerjevem fiksativu je bila kakovost meritve vzorcev brez taninov podobna pri temperaturi fiksiranja 4 °C in 30 °C. Pri vzorcih s tanini smo pri fiksiranju pri 30 °C opazili nekoliko večje zmanjšanje intenzitete obarvanosti jedrne DNA kot pri fiksiranju pri 4 °C.

Podpremo lahko prejšnja priporočila, da pri fiksiranju materiala na terenu uporabimo formaldehid. Priporočljivo je tudi skupno fiksiranje standardne in merjene vrste (v skupnih stekleničkah). S tem zagotovimo podoben morebitni vpliv taninov pri merjenju velikosti genoma pri obeh vrstah in s tem zaneslivejšo meritev.

Na osnovi naših rezultatov pri fiksiranju priporočamo temperaturo 4 °C oz. ne zelo povišano temperaturo.

6 POVZETEK

Velikost genoma, ki predstavlja količino jedrne DNA osebka ali vrste, poznamo že za marsikatero rastlinsko vrsto. Danes so objavljeni podatki o količini jedrne DNA za približno 5000 rastlinskih vrst (Zonneveld in sod., 2005). Podatki o izmerjenih velikostih genoma se nahajajo v internetni podatkovni bazi, ki je mednarodni projekt.

Rastline pogosto vsebujejo snovi, ki lahko vplivajo na kakovost meritev količine jedrne DNA s slikovno citometrijo. Ta metoda temelji na barvanju DNA po Feulgenju. Moteče snovi so pogosto sekundarni metaboliti, ki rastlinam služijo za obrambo. Med drugim tudi tanini lahko vplivajo na intenzivnost barvanja DNA v rastlinskih tkivih (Greilhuber, 1987).

Količina taninov, kemijska sestava le-teh in mesto nahajanja v rastlinah se od vrste do vrste razlikujejo. Nekatere rastlinske vrste ne proizvajajo samo ene vrste taninov, ampak mešanico le-teh, kjer navadno prevladuje ena vrsta tanina (Mueller-Harvey, 1999). Količina taninov ni enaka niti pri različnih osebkih iste rastlinske vrste, spreminja pa se lahko tudi med ontogenetskim razvojem osebka. Odvisna je od zrelosti rastline, stresnih dejavnikov, podnebja, abiotskih in biotskih dejavnikov okolja (Mueller-Harvey, 1999). Tanini so torej nekakšen pokazatelj rastlinskega stresa.

V diplomski nalogi smo ugotavljali vpliv taninov na kakovost meritve količine DNA. Najprej smo merili količino jedrne DNA v koreninah standardne vrste – graha (*Pisum sativum* L.), ki smo jih fiksirali skupaj s koreninami doba (*Quercus robur* L.), ki vsebujejo veliko taninov. V nadaljevanju pa smo v fiksativ, v katerem smo fiksirali korenine graha, dodajali različne koncentracije tanina - taninske kisline. Naš namen je bil ugotoviti, kako tanini vplivajo na kakovost meritve velikosti rastlinskega genoma. Tkiva smo fiksirali v dveh različnih fiksativih: v Farmerjevem fiksativu in v 4 % nevtralnem formaldehidu. Za Farmerjev fiksativ smo preučili vpliv dveh temperatur fiksiranja (4 °C in 30 °C) in različnih koncentracij dodane taninske kisline na kakovost meritev. Želeli smo namreč razjasniti, kakšne so možne motnje kakovosti meritve velikosti genoma, kadar ob povišani temperaturi na terenu fiksiramo rastlinske vrste, ki vsebujejo veliko taninov.

Na preparatih korenin doba, pripravljenih po standardnih postopkih in po fiksiranju v 4 % nevtralnem formaldehidu in v Farmerjevem fiksativu, je bila obarvanost DNA zelo šibka.

Zato na teh preparatih nismo mogli izmeriti količine jedrne DNA. Možen vzrok za slabo obarvanost jedrne DNA je velika količina taninov v koreninah doba.

Na osnovi poskusov smo ugotovili, da je taninska kislina, ki smo jo dodajali v Farmerjev fiksativ, močno vplivala na kakovost meritve velikosti genoma. Znižala je intenziteto obarvanja DNA in s tem izmerjene vrednosti integrirane optične gostote (IOG). Pri fiksiranju v 4 % nevtralnem formaldehidu je bil vpliv taninov na kakovost meritve precej manjši kot pri Farmerjevem fiksativu.

Pri fiksiranju v Farmerjevem fiksativu je bila kakovost meritve vzorcev brez taninov podobna pri temperaturi fiksiranja 4 °C in 30 °C. Pri vzorcih s tanini smo pri fiksiranju pri 30 °C opazili nekoliko večje zmanjšanje intenzitete obarvanosti jedrne DNA kot pri fiksiranju pri 4 °C.

Rezultati naše raziskave so v skladu s prejšnjimi objavami o tem, da lahko prisotnost taninov močno moti kakovost meritve velikosti genoma (Greilhuber, 1987). Tako lahko podpremo prejšnja priporočila, da pri fiksiranju materiala na terenu uporabimo formaldehid (Greilhuber, 1987). Priporočljivo je tudi skupno fiksiranje standardne in merjene vrste (v skupnih stekleničkah). S tem dosežemo enak možen vpliv taninov na kakovost meritve velikosti genoma in s tem primerljivost rezultatov velikosti genoma obeh rastlin.

Na osnovi naših rezultatov pri fiksiranju priporočamo temperaturo 4 °C oz. ne zelo povišano temperaturo.

7 SUMMARY

Genome size is the amount of nuclear DNA of an individual or a species. Presently, genome size is known for almost 5000 plant species (Zonneveld *et al.*, 2005). Genome size data are collected in an international database, which is accessible via the internet.

Plants may contain many substances that influence the quality of genome size measurement with image cytometry. This method is based on quantitative staining of DNA with the Feulgen reaction. Such interfering substances are mostly secondary metabolites, which have a role in plant defense. Tannins may interfere with the staining intensity of the nuclear DNA (Greilhuber, 1987).

The amount of tannins, their chemical composition and their distribution in tissue varies among plant species. Some plant species produce more than one type of tannins, sometimes a mixture of tannins, where usually one type is dominant (Mueller-Harvey, 1999). The amount of tannins is not equal in different individuals of the same plant species. It depends on the age of the plant, stress factors, climate, abiotic and biotic factors (Mueller-Harvey, 1999). Tannins may thus be indicators of stress.

In the study we investigated the influence of tannins and the temperature of fixation on the quality of plant genome size measurement. We first measured genome size in a standard plant species – pea (*Pisum sativum*), which was fixed in the fixative together with a species containing large amounts of tannins - English oak (*Quercus robur*). We added different concentrations of tannic acid to the fixative of the standard species, and measured the genome size. Our aim was to determine whether the added tannins interfere with genome size measurement. We used two fixatives: the Farmer fixative and 4% neutral formaldehyde. For the Farmer fixative, we investigated the influence of different concentrations of tannic acid in the fixative and the temperature during fixation (4 °C in 30 °C) on the quality of genome size measurement. Our aim was to elucidate the possible interference of high temperature with DNA staining when species with high tannin content are fixed in the field.

We prepared squash preparations of the root tip of English oak using standard procedures. Oak DNA was weakly stained, hence measurement of genome size was not possible, probably due to high amounts of tannins in the tissue. Our results show that tannic acid

added to the Farmer fixative strongly interfered with genome size measurement. Namely, the samples with added tannic acid showed a marked reduction of the intensity of DNA staining. The interference of tannins with DNA staining was weaker when formaldehyde was used instead of the Farmer fixative. The quality of genome size measurement was similar in samples fixed in the Farmer fixative without added tannic acid at 4 °C and at 30 °C. When tannic acid was added to the fixative, the reduction of DNA staining intensity was more pronounced in samples fixed at 30 °C than in those fixed at 4 °C.

Our results support previous observations that the presence of tannins may interfere with the quality of genome size measurement (Greilhuber, 1987). Therefore, to mitigate the possible effects of tannins, we support previous recommendations that formaldehyde should be used for fixation of plant material in the field (Greilhuber, 1987). In addition, the standard and the measured species should be fixed together in the same vials. This procedure allows for a similar effect of tannins and hence comparable genome size measurement in both species. Our results show that the plant material should be fixed at 4 °C or at least at not very high temperatures.

8 VIRI

- Bate-Smith, Swain. 1962. Flavonoid compounds. *Comparative biochemistry*, 3: 75-809
- Bennett M.D. 1998. Plant genome values: How much do we know? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 2011-2016
- Bennett M.D., Leitch I.J. 2000. Plant DNA C-values database:
<http://www.kew.org/cval/database1.html> (12.avg.2007)
- Bennett M.D., Leitch I.J. 2005. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms: Progress, Problems and Prospects. *Annals of Botany*, 95: 45-90
- Bennett M.D., Parmjit Bhandol, Ilija J. Leitch. 2000. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms and their Modern Uses – 807 New Estimates. *Annals of Botany*, 86: 859-909
- Dolenc Koce J. 2001. Ugotavljanje variabilnosti količine jedrne DNA pri standardnih rastlinskih vrstah in morskih kritosemenkah s slikovno citometrijo. Doktorska disertacija.
- Greilhuber J. 1987. »Self-tanning« - a new important source of stoichiometric error in cytophotometric determination of nuclear DNA content in plants. *Plant Systematics and Evolution*, 158: 87-96
- Greilhuber J. 1998. Intraspecific Variation in Genome Size: A Critical Reassessment. *Annals of Botany*, 82: 27-35
- Greilhuber J., Ebert I., 1994. Genome size variation in *Pisum sativum*. *Genome*, 37: 646-655.
- Grundhöfer P., Niemetz R., Schilling G., Gross G.G. 2001. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. *Phytochemistry*, 57 (6): 915-27
- Hagerman A.E., Butler L.G. 1991. Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites. *G.A.*, 1: 355-388
- Khanbabaee K., van Ree T. 2001. Tannins: Classification and Definition. *Natural Products Reports*, 18: 641-649

- Kumar R., Vaithyanathan S. 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 30: 21-38
- Lowry J.B., McSweeney C.S., Palmer B. 1996. Changing perceptions of the effect of plant phenolics on nutrient supply in the ruminant. *Australian Journal of Agricultural Research*, 47: 829-842.
- Makkar H.P. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49: 241-256.
- Mangan J.L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition Research reviews*, 1: 209-231
- Mole S., Waterman P.G. 1987. Tannic acid and proteolytic enzymes: enzyme inhibition or substrate deprivation?. *Phytochemistry*, 26: 99-102
- Mueller-Harvey I. 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 3-20
- Salminen J.P., Roslin T., Karonen M., Sinkkonen J., Pihlaja K., Pulkkinen P. 2004. Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides, and proanthocyanidins in oak leaves. *Journal of Chemical Ecology*, 30 (9): 1693-1711
- Shimada T. 2001. Nutrient compositions of acorns and horse chestnuts in relation to seed-hoarding. *Ecological Research*, 16 (4): 803-808
- Sigma-Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIAL/T0200>
(5.sep.2007)
- Taiz L., Zeiger E., 2002. *Plant physiology*. Sinauer Associates Inc.
- Vilhar B., Dermastia M. 2002. Standardisation of instrumentation in plant DNA image cytometry. *Acta Bot. Croat.*, 61: 11-26
- Vilhar B., Dermastia M., Dolenc Koce J., Greilhuber J., Tensch E.M. 2001. Plant Genome Size Measurement with DNA Image Cytometry. *Annals of Botany*, 87: 719-728

Waghorn G.C., McNabb W.C. 2003. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of The Nutrition Society*, 62 (2): 383-392

Zonneveld B.J.M., Leitch I.J., Bennett M.D. 2005. First Nuclear DNA Amounts in more than 300 Angiosperms. *Annals of Botany*, 96: 229-244

9 ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Barbari Vilhar za pomoč na vseh področjih izdelave diplomske naloge. Zahvaljujem se ji tudi za vse znanje, ki mi ga je posredovala.

Celotni Katedri za botaniko se zahvaljujem za vso pomoč, ki sem jo mnogokrat potrebovala.

Ogromna zahvala gre staršem za vso podporo pri študiju in ostalih stvareh. Zahvaljujem se tudi Mojci in Nataši za to, da mi stojita ob strani. Hvala tudi Tiborju.

Posebna zahvala pa gre Matevžu, ker me prenaša in podpira moje ideje.

Na koncu se zahvaljujem vsem prijateljem in tistim, ki ste mi pomagali pri nastanku te naloge.

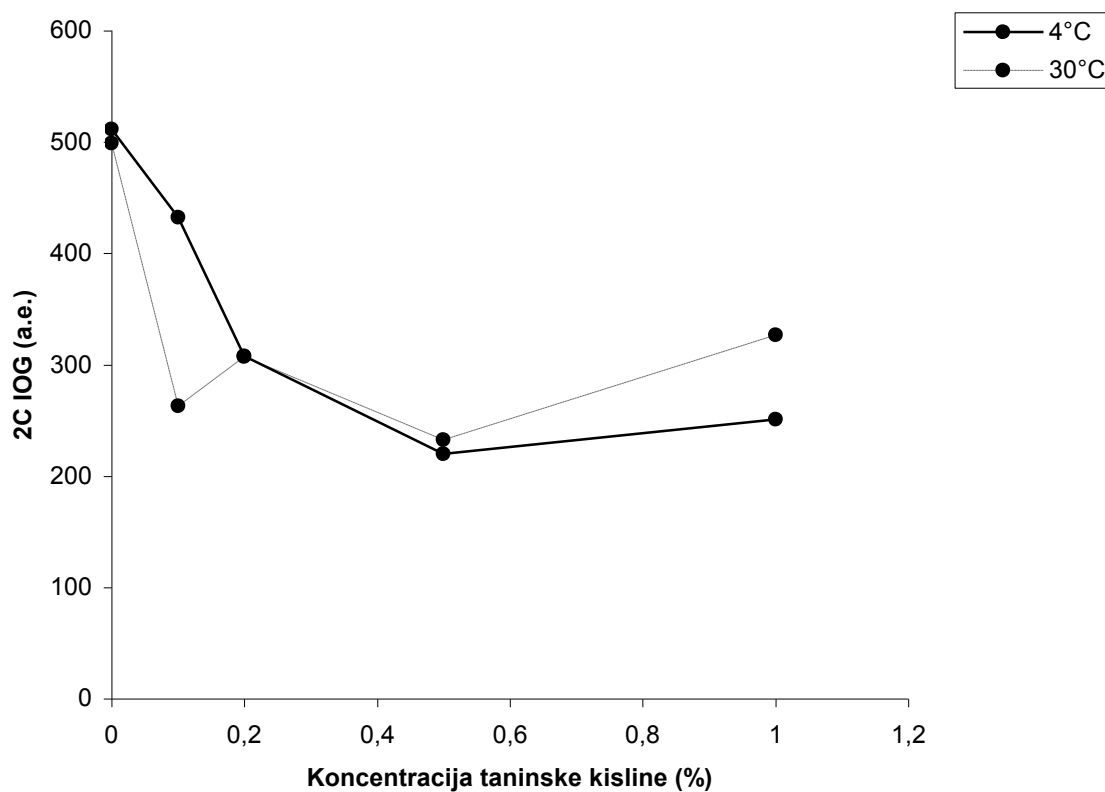
10 PRILOGE

10.1 Priloga A

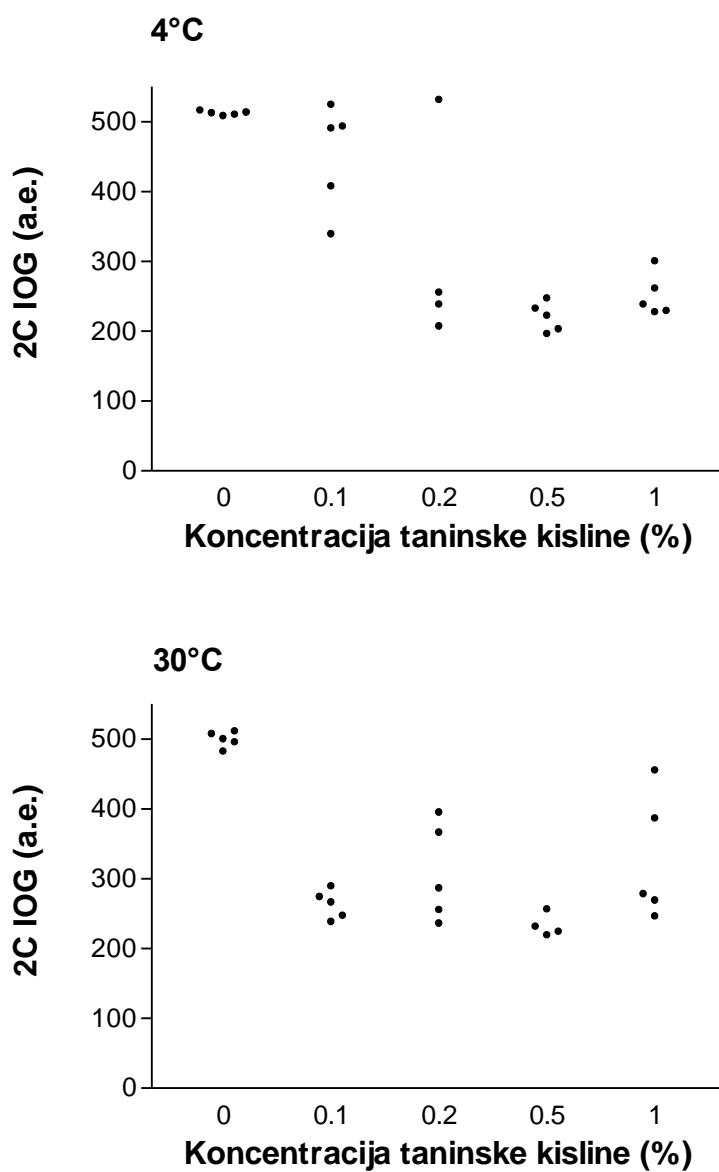
Prikazana je druga izvedba poskusa vpliva dveh različnih temperatur fiksiranja na intenziteto obarvanja DNA oz. na vrednost 2C v odvisnosti od dodane koncentracije taninov.

Tabela 6. Kakovost meritve vrednosti 2C graha (*Pisum sativum*) pri dveh temperaturah fiksiranja v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov pri izvedbi poskusa 2 in 3. Tkivo je fiksirano v Farmerjevem fiksativu. Prikazani so parametri meritev za grah: T – temperatura fiksiranja, N – število merjenih preparatov, 2C - povprečna vrednost 2C s standardno napako (v arbitrarnih enotah), KV – koeficient variacije izmerjenih vrednosti 2C, KVv – povprečni koeficient variacije vrha 2C, premik 4C/2C – povprečno odstopanje razmerja med vrednostima 4C in 2C od idealnega razmerja 2.

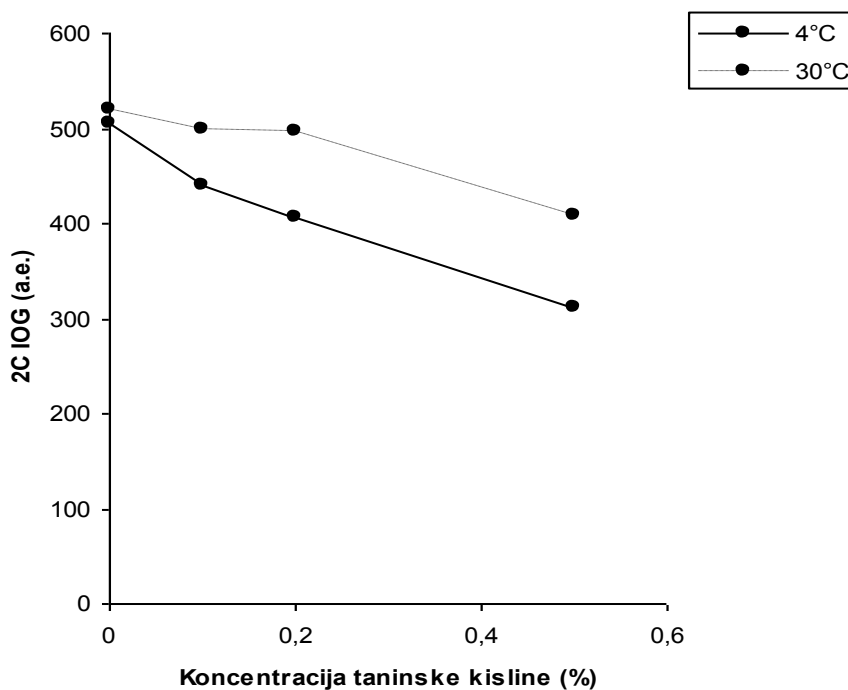
Poskus	T	Konc. taninske kisline	N	2C (a.e.)	KV (%)	KVv (%)	Premik 4C/2C (%)
Izvedba 2	4 °C	0%	5	512 ± 1	0,6	3,3 ± 0,9	-2,0 ± 0,5
		0,1%	5	432 ± 33	17,1	8,9 ± 1,9	-4,2 ± 2,0
		0,2%	4	308 ± 75	48,8	9,2 ± 0,8	-17,6 ± 6,9
		0,5%	5	220 ± 9	9,6	4,1 ± 0,6	-4,5 ± 0,8
		1,0%	5	251 ± 14	12,2	5,7 ± 1,0	-5,8 ± 0,5
	30 °C	0%	5	499 ± 5	2,2	3,8 ± 0,6	-2,9 ± 1,0
		0,1%	5	263 ± 9	7,8	6,8 ± 1,5	-6,4 ± 1,6
		0,2%	5	307 ± 31	22,6	8,4 ± 1,6	-6,5 ± 2,0
		0,5%	4	233 ± 8	7,1	5,2 ± 1,5	-4,2 ± 2,1
		1,0%	5	327 ± 5	2,2	6,3 ± 0,8	-4,9 ± 1,6
Izvedba 3	4 °C	0%	5	520 ± 6	2,4	3,0 ± 0,3	-2,5 ± 0,3
		0,1%	4	499 ± 12	4,6	7,5 ± 1,2	-3,9 ± 1,5
		0,2%	5	498 ± 11	4,9	5,8 ± 1,2	-3,2 ± 0,9
		0,5%	5	408 ± 68	37,3	5,8 ± 1,0	-2,9 ± 0,7
	30 °C	0%	5	505 ± 3	1,5	3,7 ± 0,9	-4,0 ± 0,9
		0,1%	5	439 ± 51	26,0	6,1 ± 1,5	-4,0 ± 0,9
		0,2%	5	406 ± 52	28,7	5,7 ± 1,0	-4,2 ± 1,3
		0,5%	5	313 ± 55	34,9	5,4 ± 1,0	-7,4 ± 1,3



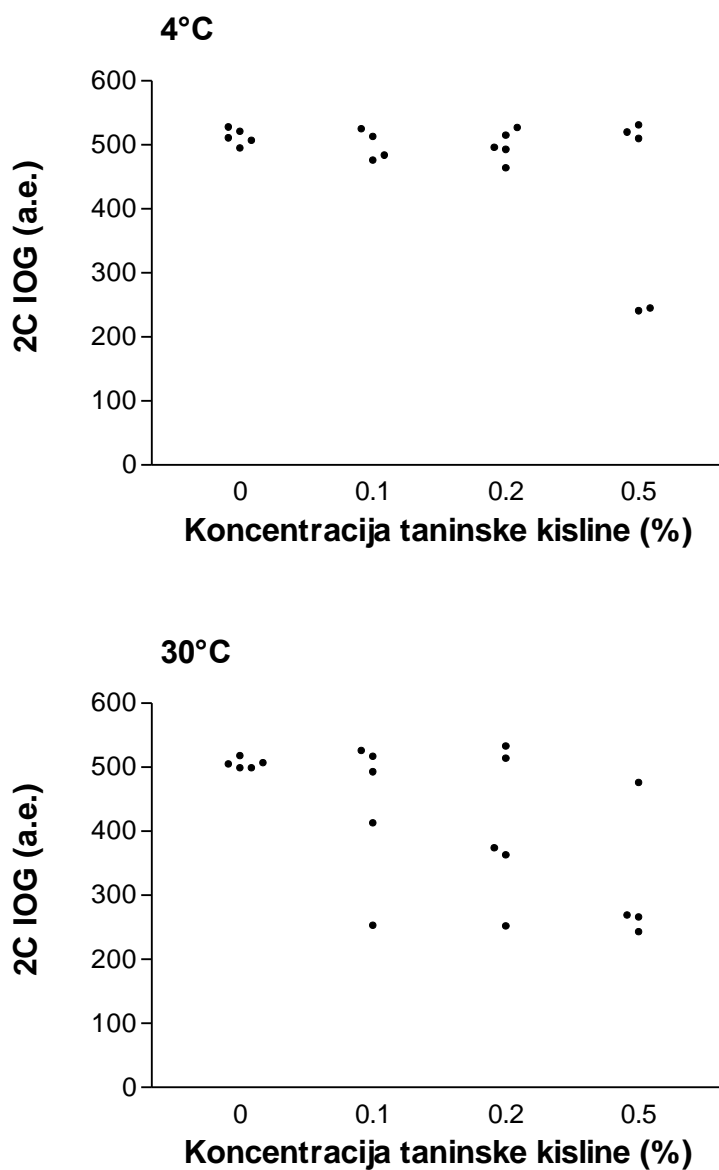
Slika 12. Meritev vrednosti 2C graha (*Pisum sativum*) pri dveh temperaturah fiksiranja v odvisnosti od koncentracije dodane taninske kisline v drugi izvedbi poskusa. Tkivo je fiksirano s Farmerjevim fiksativom, kamor smo dodajali taninsko kislino.. Zaradi večje preglednosti niso prikazane standardne napake (SN). Podatki so v tabeli 6.



Slika 13. Raztresenost vrednosti 2C graha (*Pisum sativum*) pri dveh temperaturah fiksiranja v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov v drugi izvedbi poskusa. Fiksirali smo s Farmerjevim fiksativom..



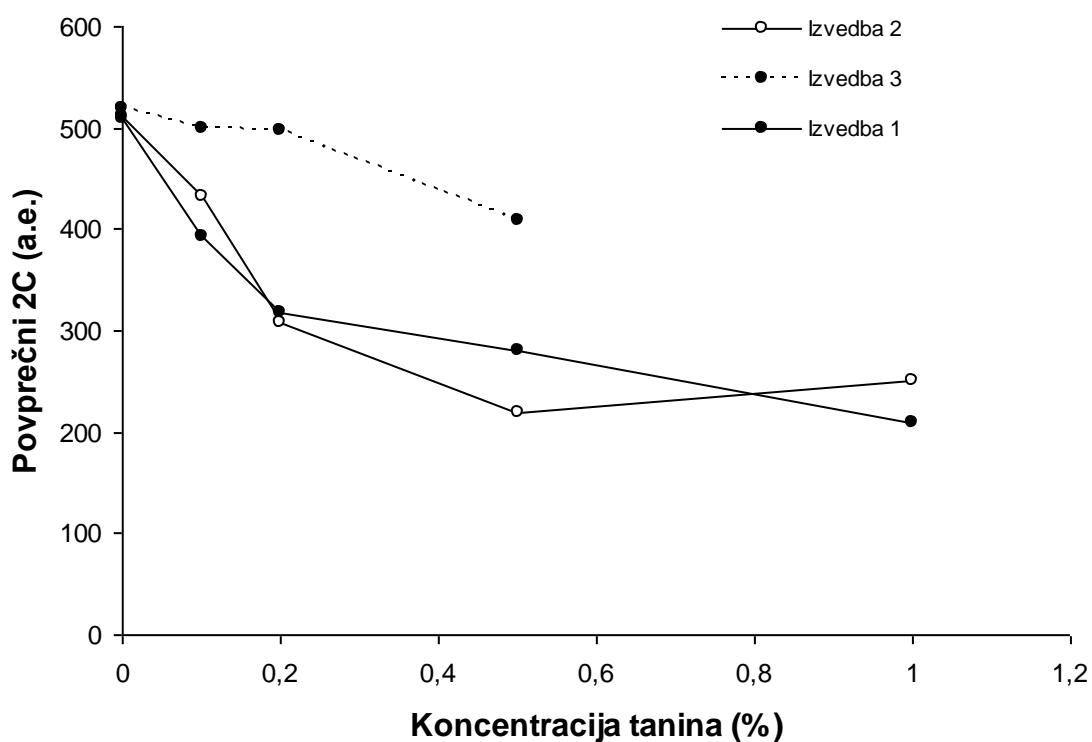
Slika 14. Meritev vrednosti 2C graha (*Pisum sativum*) pri dveh temperaturah fiksiranja v odvisnosti od koncentracije dodane taninske kisline v tretji izvedbi poskusa. Tkivo je fiksirano s Farmerjevim fiksativom, kamor smo dodajali različne koncentracije taninske kisline. Zaradi večje preglednosti niso prikazane standardne napake (SN). Podatki so prikazani v tabeli 6.



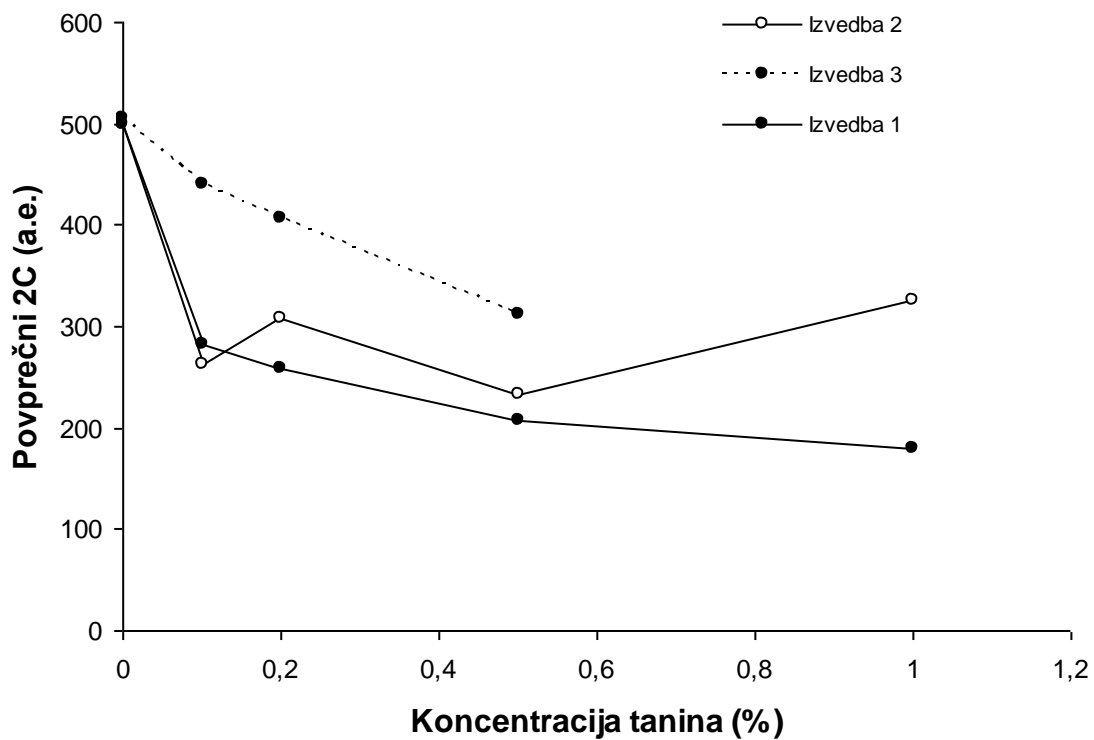
Slika 15. Raztresenost vrednosti 2C graha (*Pisum sativum*) pri dveh temperaturah fiksiranja v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov v tretji izvedbi poskusa. Tkivo smo fiksirali s Farmerjevim fiksativom, kamor smo dodajali taninsko kislino. Zaradi večje preglednosti niso prikazane standardne napake (SN).

10.2 Priloga B

Prikazana sta grafa s skupnimi podatki vseh treh izvedb poskusa, kjer smo ugotavljali vpliv temperature fiksacije na intenziteto obarvanja DNA oz. na rezultat meritve velikosti genoma v odvisnosti od različnih koncentracij dodane taninske kisline. Vidimo, da sta izvedbi 1 in 2 med seboj primerljivi, izvedba 3 pa odstopa od ostalih dveh izvedb.



Slika 16. Meritev povprečne vrednosti 2C graha (*Pisum sativum*) pri standardni temperaturi fiksacije 4 °C v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov v vseh treh izvedbah poskusa. Fiksirali smo s Farmerjevim fiksativom.. Zaradi večje preglednosti niso prikazane standardne napake (SN).



Slika 17. Meritev povprečne vrednosti 2C graha (*Pisum sativum*) pri standardni temperaturi fiksacije 30 °C v odvisnosti od koncentracije dodanih taninov v vseh treh izvedbah poskusa. Fiksirali smo s Farmerjevim fiksativom.. Zaradi večje preglednosti niso prikazane standardne napake (SN).