

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Adriana PODRŽAJ

**MIKROSKOPSKA ANALIZA ZGRADBE SEMENSKE  
OVOJNICE PRI BUČAH (*Cucurbita pepo L.*)**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Adriana PODRŽAJ

**MIKROSKOPSKA ANALIZA ZGRADBE SEMENSKE OVOJNICE  
PRI BUČAH (*Cucurbita pepo L.*)**

DIPLOMSKO DELO  
Visokošolski strokovni študij - 1. stopnja

**MYCROSCOPIC ANALYSIS OF *Cucurbita pepo L.* SEED COAT  
STRUCTURES**

B. SC. THESIS  
Professional Study Programmes

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega strokovnega študija Kmetijstvo – agronomija in hortikultura – 1. stopnja. Delo je bilo opravljeno na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Boruta Bohanca.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: izr. prof. dr. Marijana Jakše

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Borut Bohanec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Članica: doc. dr. Jana Murovec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Zlata Luthar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 26. september 2012

Diplomsko delo je rezultat lastnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega diplomskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Adriana Podržaj

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dv1  
DK UDK 635.62:581.48:57.086 (043.2)  
KG *Cucurbita pepo*/oljne buče/golo seme/tipi semen/semenska ovojnjica/debelina semenske ovojnice/zgradba semenske ovojnice/mikroskopske analize  
AV PODRŽAJ, Adriana  
SA BOHANEC, Borut (mentor), MUROVEC Jana (somentorica)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo  
LI 2012  
IN MIKROSKOPSKA ANALIZA ZGRADBE SEMENSKE OVOJNICE PRI BUČAH (*Cucurbita pepo* L.)  
TD Diplomsko delo (Visokošolski strokovni študij - 1. stopnja)  
OP VIII, 27 str., 3 pregl., 21 sl., 11 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V 19. stoletju so nekje na štajerskem odkrili mutiran tip semenske ovojnice buče *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* – štajerska golica. Mutacija je povzročila semena s tanko semensko ovojnico in s tem olajšala proizvodnjo bučnega olja. S tem se je povečalo tudi zanimanje za zgradbo semenske ovojnice. V preteklosti so bile že opravljene študije semenske ovojnice a le s svetlobnim mikroskopom. Namen diplomske naloge je bil bolj podrobno preučiti tipe semenske ovojnice in njihovo zgradbo z uporabo vrstičnega elektronskega mikroskopa. Izbranim semenom smo najprej izmerili debelino semenske ovojnice s pomočjo svetlobnega mikroskopa. Opisali smo njihovo zunanjost in jih glede značilnosti semenske ovojnice uvrstili v enajst razredov. Sledili so si od tistih z najdebelejšo semensko ovojnico do tistih z najtanjšo. S pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa smo si lahko tridimenzionalno ogledali semensko ovojnico in njene plasti. Raziskava je pokazala, da se zgradba semenske ovojnice razlikuje med semenami z debelo in tistimi z tanko semensko ovojnico. Razlike so vidne tudi pri semenski ovojnici suhih semen in svežih semen, na katerih smo predhodno opravili postopek liofilizacije.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dv1  
DC UDC 635.62:581.48:57.086 (043.2)  
CX *Cucurbita pepo*/oil pumpkins/naked seed/seed coat/structure/seed coat types/microscopy techniques/microscopic analysis  
AU PODRŽAJ Adriana  
AA BOHANEC Borut (supervisor), MUROVEC Jana (co-supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy  
PY 2012  
TY MYCROSCOPIC ANALYSIS OF OIL PUMPKINS (*Cucurbita pepo* L.) SEED COAT STRUCTURE  
DT B. Sc. Thesis (Professional Study Programmes)  
NO VIII, 27 p., 3 tab., 21 fig., 11 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB In the 19th century somewhere in Styria a mutated seed coat of pumpkin *Cucurbita pepo* L. – *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* was discovered. The mutation resulted in seeds with thin seed coat which facilitated the production of pumpkin seed oil. This has increased interest in the structure of seed coats. In the past, studies of seed coat have been conducted, but only with a light microscope. The purpose of this work was to collect and describe different types of pumpkin seed coats and to examine theirs structure using a scanning electron microscope. The thickness of different seed coat types was first measured by light microscopy. We described their appearance and classified them into eleven classes. Thicker seeds were followed by those with thinnest seed coat. With the help of scanning electron microscope we could see a three-dimensional structure of seed coats and their layers. Research has shown that we can distinguish between the structure of seeds with thick and thin seed coat. Differences are also reflected in the seed coat of dry seeds and fresh seeds, on which we had previously passed the lyophilization process.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 SISTEMATIKA IN RAZŠIRJENOST .....	2
2.2 SEME .....	2
2.3 SEMENSKA OVOJNICA .....	3
2.3.1 Epidermalna plast .....	4
2.3.2 Hipodermalna plast .....	5
2.3.3 Sklerenhimska plast .....	5
2.3.4 Aerenhimska plast .....	5
2.3.5 Klorenhimska plast .....	5
2.3.6 Epidermalna plast placente .....	5
2.4 TIPI SEMENSKIH OVOJNIC .....	6
2.5 GOLICA .....	6
2.6 VRSTIČNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP .....	7
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>8</b>
3.1 MERITVE DEBELINE SEMENSKE OVOVNICE .....	8
3.2 ŠKROBNI TEST .....	9
3.3 VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA .....	10
3.3.1 Priprava svežih semen z liofilizacijo .....	10
3.3.2 Priprava suhih semen .....	10
3.3.3 Pregled vzorcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom .....	10
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>11</b>
4.1 DEBELINA SEMENSKE OVOVNICE .....	11

4.2	ŠKROBNI TEST .....	13
4.3	TIPI SEMEN.....	14
4.3.1	Tip A .....	15
4.3.2	Tip B .....	16
4.3.3	Tip C .....	16
4.3.4	Tip D .....	17
4.3.5	Tip E .....	17
4.3.6	Tip F.....	17
4.3.7	Tip G .....	18
4.3.8	Tip H.....	18
4.3.9	Tip I.....	18
4.3.10	Tip J .....	19
4.3.11	Tip K .....	19
4.4	VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (VEM) .....	19
4.4.1	Primerjava suhih semen sort 'Noč čarovnic' in 'Slovenska golica' .....	19
4.4.2	Primerjava svežih semen sort 'Noč čarovnic' in 'Slovenska golica'.....	21
5	RAZPRAVA.....	23
6	SKLEPI .....	25
7	POVZETEK.....	26
8	VIRI .....	27
	ZAHVALA	

## KAZALO SLIK

Slika 1:	Razvijajoče se seme (Singh in Dathan, 1972) .....	3
Slika 2:	Pet plasti semenske ovojnice bučnega semena, modificirano po Harzu 1885 (Teppner, 2004).....	4
Slika 3:	Delovanje vrstičnega elektronskega mikroskopa (Lutar, 2009) .....	7
Slika 4:	Merjenje debeline semenske ovojnice na treh točkah enega mesta .....	9
Slika 5:	Povprečna debelina semenske ovojnice petih semen za 32 sort oz. akcесij buč.....	13
Slika 6:	Seme akcесije buče ob stiku z jod-jod kalijem .....	14
Slika 7:	Obarvana oljna zrna buče pod fluorescenčnim mikroskopom.....	14
Slika 8:	Tip semenske ovojnice A .....	16
Slika 9:	Tip semenske ovojnice B .....	16
Slika 10:	Tip semenske ovojnice C .....	16
Slika 11:	Tip semenske ovojnice D .....	17
Slika 12:	Tip semenske ovojnice E .....	17
Slika 13:	Semenska ovojica tipa F .....	17
Slika 14:	Semenska ovojica tipa G .....	18
Slika 15:	Semenska ovojica tipa H.....	18
Slika 16:	Semenska ovojica tipa I .....	18
Slika 17:	Semenska ovojica tipa J .....	19
Slika 18:	Semenska ovojica tipa K.....	19
Slika 19:	Semenska ovojica suhega semena sorte 'Noč čarovnic' pod vrstičnim elektronskim mikroskopom.....	20
Slika 20:	Prečni prerez skozi suho seme sorte 'Slovenska golica' pod vrstičnim elektronskim mikroskopom .....	21
Slika 21:	Sveža semenska ovojnica sort 'Noč čarovnic' (levo) in 'Slovenska golica' (desno) pod vrstičnim elektronskim mikroskopom .....	21

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Izbrane akcesije in država izvora.....	8
Preglednica 2: Povprečna debelina semenske ovojnici in standardni odkloni pri različnih sortah in akcijah buč.....	11
Preglednica 3: Akcesije buč in pripadajoči tip semena .....	15

## 1 UVOD

Navadna buča *Cucurbita pepo* L. je enoletnica in izvira iz Mehike in Severne Amerike (Murovec in sod., 2012). Je ena prvih udomačenih vrst. V preteklosti so jo gojili zlasti zaradi uporabe semen, mladih in zrelih plodov. K nam je prišla v 18. stoletju. Cenjena je bila predvsem v prehrani ljudi in živali (Kocjan Ačko, 1999).

Semena so velika od 8 do 26 mm, ploščata, ovalna, z bolj ali manj izraženim semenskim robom. So belkaste barve ali rahlo rumene (Teppner, 2004).

Pri bučah vrste *Cucurbita pepo* L. sestava semenske ovojnice močno variira. Buča ima večje število slojev semenske ovojnice, študije opisujejo pet plasti, od katerih so tri intenzivno lignificirane.

Normalno razvita semenska ovojnjica ima pet plasti. Prva je plast epidermalnih celic, sledi ji več plasti hipodermalnih celic. Naslednja je sklerenhimska plast, katero sestavlja največ dve plasti sklerenhimskih celic. Aerenhimska plast leži pod sklerenhimsko in je sestavljena iz ene do treh plasti celic, katere so velike in razvezjane, zato so lahko opazne. Pod aerenhimsko plastjo se nahaja klorenhimska, ki jo tvori več plasti celic. Ta daje semenom, katera nimajo razvitih vseh pet plasti, zeleno barvo.

Posebnega pomena je mutacija, ki je povzročila nastanek vrste *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca*. Danes je pretežno uporabljana kot vir za pridobivanje bučnega olja. Mutacija je nastala v naravi nekje na Štajerskem, zato je tudi danes pridelovanje buč brez čvrste semenske lupine prisotno predvsem na ozemlju območju Štajerske, v Podravju, Pomurju, sosednji Avstriji in delno na Madžarskem (Kocjan Ačko, 1999). Iz semen tako imenovanih golic je lažje iztisniti olje, saj je semenska ovojnjica tanjša. To je olajšalo in povečalo pridelavo olja. Olje, ki ga pridobimo iz golic je zelene barve in ga odlikuje tudi specifična sestava. Prvi pisani viri o pridobivanju semen za stiskanje olja so iz leta 1735 (Teppner, 2000).

### 1.1 NAMEN DELA

V diplomski nalogi sem se osredotočila na primerjavo semenskih ovojnici pri izbranih akcесijah buč, za katere je značilno, da imajo semensko ovojnicu delno ali v celoti reducirano. Analiza je vključevala tudi genotipe z normalno razvito semensko ovojnicijo, ki so služili za primerjavo. Namenski del je bil podrobna preučitev zgradbe semenske ovojnici pri izbranih akcесijah, saj je le ta pomemben element pri pridelavi oljnih buč.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 SISTEMATIKA IN RAZŠIRJENOST

Buče spadajo v družino Cucurbitaceae in obsega 5 kultiviranih in okoli 10 divjih vrst (Ivančič, 2002). V družini Cucurbitaceae so najpomembnejše in najbolj razširjene vrste navadna buča (*Cucurbita pepo* L.), orjaška ali velikanka (*Cucurbita maxima* Duch.) in muškatna ali dišeča buča (*Cucurbita moschata* Duch.) (Kocjan Ačko, 1999).

Domovina vrste *Cucurbita pepo* je Severna Amerika. Ameriški staroselci so poznali bučo v sedmem tisočletju pred našim štetjem. Iz Srednje Amerike so jo v 15. stoletju Španci prepeljali v Evropo. V 18. stoletju je postala buča vse pomembnejša za krmo domačih živali. Stiskanje olja iz semen se je razširilo šele na začetku 19. stoletja (Kocjan Ačko, 1999). Zaradi velike raznolikosti v rasti in plodovih, so poznane številne podvrste, sorte oz. kultivarji (Teppner, 2004).

Kocjan Ačko (1999) navaja, da v svetu poteka pridelava buč na približno 800.000 hektarjih njiv, največ v Evropi in Aziji z različnimi nameni uporabe plodov oziroma semen. Na avstrijskem Štajerskem pridelujejo buče na dobrih 11.000 ha. Buče so tam tretja najpomembnejša poljščina – za koruzo in žiti.

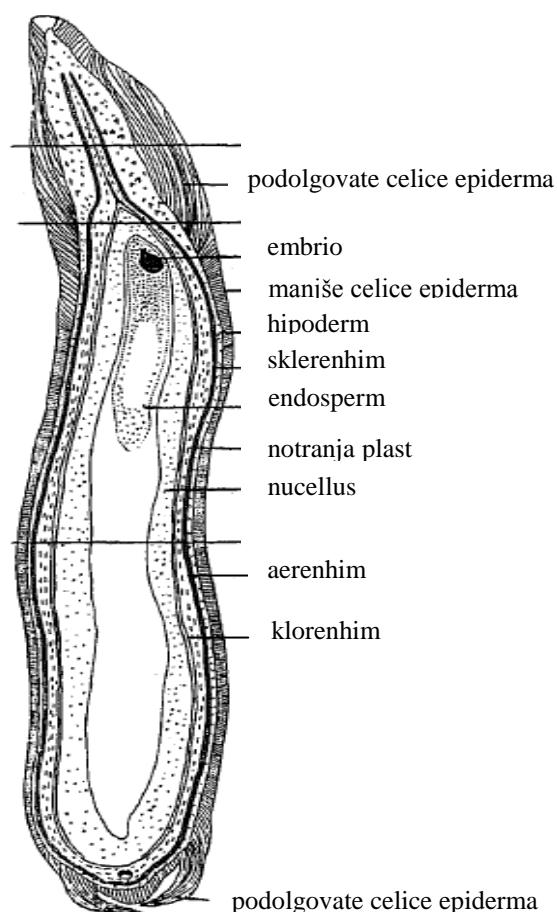
Kmetijski inštitut Slovenije poroča, da je v letu 2011 pridelava oljnih buč rahlo upadla. Potekala je na 5.718 hektarjih. Kljub temu je bil pridelek večji kot prejšnja leta in sicer 3.985 ton (Poročilo..., 2012).

### 2.2 SEME

Semena so od 8 do 26 mm dolga, ravna, ovalna, z bolj ali manj izrazitim izbočenim robom, večinoma belim ali rahlo obarvanim (Teppner, 2004).

Za setev bi bila najprimernejša semena, ki bi imela prečni prerez čim bolj podoben krogu. Na ta način bi semena golic pridobila na kompaktnosti in posledično bila manj lomljiva, saj je lomljivost semen pri golicah zelo velik problem. Na lomljivost semen ima velik vpliv tudi čvrstost semenske lupine. Semena s čvrsto semensko lupino so praviloma mnogo manj lomljiva (Ivančič, 2009, cit. po Štabuc, 2009).

Seme sestavlja semenska ovojnica, perisperm, ena ali dve plasti endosperma in embrio. Semenska ovojnica pa sestoji iz epiderma, hipoderma, sklerenhima, aerenhima in klorenhima (slika 1) (Singh in Dathan, 1972).



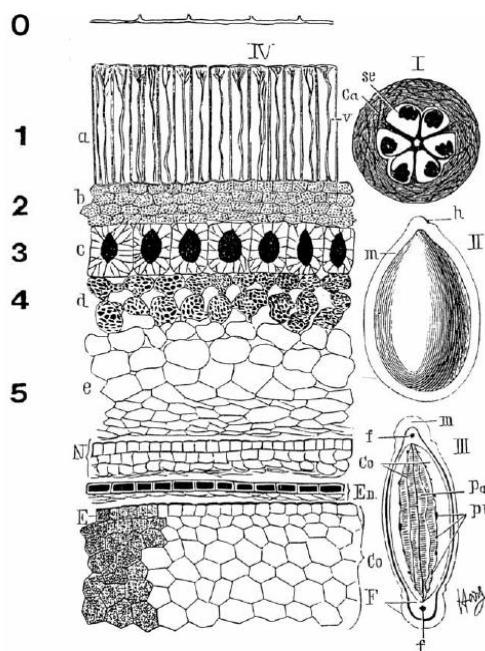
Slika 1: Razvijajoče se seme (Singh in Dathan, 1972)

### 2.3 SEMENSKA OVOJNICA

Semenska ovojnica predstavlja zaščitno plast bučnega semena (Teppner, 2004). Sestavljena je iz petih plasti. Razvije se iz zunanjega integumenta (Singh in Dathan, 1972). Iz nje se razvijejo tri plasti in del četrte, preostali deli so razvijejo iz notranjega integumenta (Teppner, 2004).

Zgradba semenske ovojnice obsega pet osnovnih plasti (slika 2) (Teppner, 2000):

0. Posušena epidermalna plast placente,
1. Epiderm,
2. Hipoderm (0 – 6 plasti celic),
3. Sklerenhim (1 – 2 plasti celic),
4. Aerenhim (1 – 3 plasti celic),
5. Klorenhim (8 – 12 plasti celic).



Slika 2: Pet plasti semenske ovojnice bučnega semena, modificirano po Harzu 1885 (Teppner, 2004)

Semenska lupina je lahko lignificirana, delno lignificirana ali povsem ne-lignificirana. Semena, ki imajo delno lignificirano semensko ovojnico, so sivo zelenasta, 'steklasto' siva, siva ali krem barve, odvisno od stopnje lignifikacije. Prve tri barve so posledica delne prosojnosti semenske ovojnice oz. loma svetlobnih žarkov, ki prehajajo skozi posušene plasti semenske ovojnice. Bolj ko je lignifikacija izrazita, bolj je seme sivo ali srebrnosivo. Pri semenski ovojnici krem barve, je stopnja prosojnosti že tako nizka, da svetlobni žarki ne prodrejo do klorenhimske plasti (Ivančič, 2009, cit. po Štabuc, 2009).

Semena z debelo semensko ovojnico imajo močno lignificirane tri plasti: hipoderm, sklerenhim in aerenhim. Semena so zato debela in težka, ter imajo bolj ali manj belkasto do svetlo rumeno semensko ovojnico (Teppner, 2000).

Glavna značilnost golic je temno zelena barva semen s tanko semensko ovojnico. Ta nastane, ker zunanje štiri plasti nimajo lignificirane celične stene, vendar ima peta plast, klorenhim, več celic kot nekatere sorte z debelo celično steno (Teppner, 2000).

### 2.3.1 Epidermalna plast

Epidermalno plast sestavlja podolgovate in majhne celice (slika 2) (Teppner, 2004). Podolgovate celice so zelo velike in obkrožajo semensko zasnovo. Velikost manjših epidermalnih celic se razlikuje glede na vrste buč. Imajo debelo celično steno in zadebelitve na radialnih stenah, ki nastanejo zaradi celuloze in se proti koncu celice

razvejijo (Singh in Dathan, 1972; Teppner, 2004). Epidermalne celice vsebujejo polno škrobnih zrn (Singh in Dathan, 1972).

### **2.3.2 Hipodermalna plast**

Število plasti celic v hipodermalni plasti se spreminja glede na vrste buč. Celice so zelo različnih oblik. Kjer so prostori veliki so tudi celice širše. Hipodermalna plast je najširša proti robovoma. Celice imajo zmerno debelo celično steno in so na nekaterih mestih zadebeljene s pasovi vlaken. Kjer je več medceličnega prostora so celice močno oddebeljene (Singh in Dathan, 1972). Vlakna tvorijo drobno mrežo. Celična stena je lignificirana (Teppner, 2004).

### **2.3.3 Sklerenhimska plast**

Je najbolj značilna plast v semenski ovojnici, ki daje semenski lupini trdnost. Vključuje sklereide, ki se razlikujejo po velikosti, obliki, razvejanju in usmeritvi. Najpogosteje so celice ozke, podolgovate in razvejane (Singh in Dathan, 1972). Pri robovih tvorijo dve ali več plasti celic, drugje pa eno plast celic (Murovec in sod., 2012).

### **2.3.4 Aerenhimska plast**

Aerenhimsko plast sestavljajo zvezdasto razporejene lignificirane celice z vidnim zračnim prostorom med celicami. V gojenih vrstah jo sestavlja več plasti velikih celic. Lignificirane celične stene vsebujejo mrežasto ali spiralno zavita vlakna (Singh in Dathan, 1972).

### **2.3.5 Klorenhimska plast**

Sestavljena je iz številnih plasti klorenhimskih celic s tanko celično steno. Je zelene barve zaradi protoklorofila (ta se od klorofila razlikuje po tem, da ima dva vodikova atoma manj, ki sta dodana s fotoreakcijo, kar pa je v notranjosti ploda nemogoče) (Singh in Dathan, 1972; Teppner, 2004).

### **2.3.6 Epidermalna plast placente**

Tekom razvoja semena placenta tesno obkroža seme. Zunanje stene celic epidermalne plasti placente se primejo zrelega semena in po sušenju tvorijo ohlapno, tanko, srebrno plast, katera se z drgnjenjem zlahka odstrani (Teppner, 2004).

## 2.4 TIPI SEMENSKIH OVOJNIC

Lastnosti plasti epiderma, hipoderma, sklerenhima, aerenhima, klorenhima in zunanji izgled semena, omogočajo identifikacijo in klasifikacijo semen raziskanih vrst (Singh in Dathan, 1972).

Teppner (2004), je semenske ovojnice zrelih semen razdelil v več skupin (slika 2). Številke od 0 do 5 pomenijo, katere plasti vsebuje določen tip semenske ovojnice, odebeljene številke pa označujejo sekundarno odebelitev določene plasti (z ligninom pri hipodermu, sklerenhimu in aerenhimu oz. s celulozo pri epidermu):

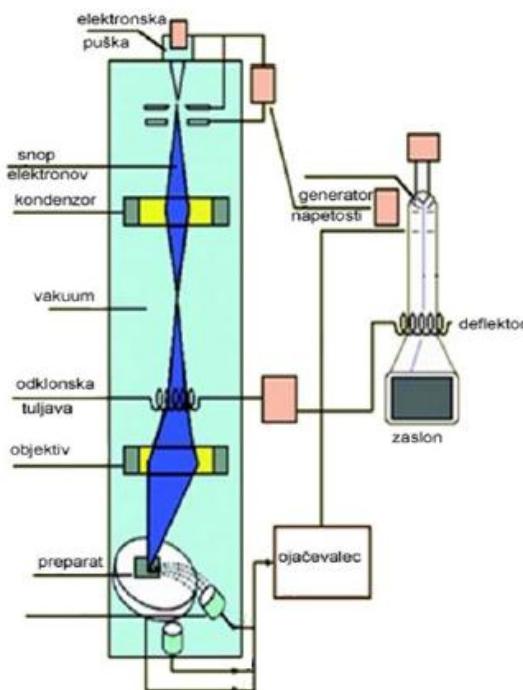
- 1.2.3.4.5.** debela semenska lupina (divje vrste in večina gojenih *C. pepo*),
- (0).**2.4.5.** s 'pol – debelo' semensko lupino (v F<sub>2</sub> generaciji po križanju genotipov z debelo in genotipov s tanko semensko ovojnico),
- (0).**3.5.** (ni imena) (variacija z epidermom, ki spominja na staro varieteto *oleifera*),
- (0).**4.5.** 'poltanka' semenska lupina (*C. pepo* subsp. *pepo* var. *georgica*),
- 1.4.5. tanka semenska ovojnica (*C. pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca*, var. *oleifera*, var. *flogra*).

## 2.5 GOLICA

Za območje severovzhodne Slovenije so zelo pomembne oljne buče – *C. pepo* L. subsp. *pepo* var. *styriaca* Grebenšč. (štajerska oljna buča). Sorte, ki se uvrščajo v to skupino se odlikujejo z veliko vsebnostjo in specifično sestavo olja ter golum semenom (semenska lupina ni lignificirana) (Ivančič, 2002). Danes so poznane številne sorte kot npr. 'Gleisdorfer Ölkürbis' (Satzucht Gleisdorf, Avstrija), 'Slovenska golica' (Semenarna Ljubljana, Slovenija) in 'Lady Godiva' (ZDA). Mutacija je nastala v 19. stoletju po naključju v naravi in je povzročila velike morfološke spremembe v zgradbi semena (Fruhwirth in Hermetter, 2007). Povzročila je temno zelena semena s tanko semensko ovojnico. Mutacija je pospešila proizvodnjo bučnega olja iz buč golic, saj ni bilo več potrebno lupljenje namočenih semen. Olje iztisnjeno iz vrst *Cucurbita* je ponavadi svetlejše zelene barve, olje iztisnjeno iz golic pa je temno zelene barve (Fruhwirth in Hermetter, 2007). V poznih fazah razvoja se pri golici plasti semenske ovojnice sesedejo. Plasti hipoderma in sklerenhima se popolnoma resorbirajo, epiderma ostane le tanka kompaktna plast. Tako imajo semena s tanko semensko ovojnico le tanke plasti epiderma, aerenhima in klorenhima (Teppner, 2000). Tanki semenski ovojnici brez zadebelitev in lignifikacije, prepušča zeleno barvo protoklorofila. Tako dobimo semena zelene barve (Teppner, 2004).

## 2.6 VRSTIČNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP

Vrstični elektronski mikroskop omogoča tridimenzionalno opazovanje površin preparatov in analizo struktur pri velikih povečavah. Z njim lahko opazujemo površine z elektronsko ločljivostjo v nanometerskem področju in v širokem razponu povečav, ki sega pri sodobnih komercialnih mikroskopih od 10 do 500 000 (Lutar, 2009).



Slika 3: Delovanje vrstičnega elektronskega mikroskopa (Lutar, 2009)

Vir valovanja pri elektronski mikroskopiji predstavljajo elektroni. Slednji imajo majhno maso, zato je njihova pot v zraku omejena. Posledično je potrebno v notranjosti elektronskega mikroskopa zagotavljati vakuum. Vir elektronov predstavlja elektronska puška, ki je nameščena v zgornjem delu mikroskopa (slika 3). Elektro-magnetne leče služijo temu, da v kondenzorju izsevane elektrone zberejo v ozek snop, ki ga nato deflektor v vrsticah vodi po površini preparata. Ob stiku snopa elektronov s površino preparata prihaja do vrste reakcij. Pride tudi do izbijanja sekundarnih elektronov iz površine preparata. Te zazna detektor. Ojačan signal sekundarnih elektronov nato potuje v katodno cev. Tam ga usklajen sistem skupaj z deflektorjem, vodi na površino ekrana. Sočasno s pomikanjem snopa elektronov po površini preparata nastaja slika na ekranu. Povečava mikroskopa izračunamo kot razmerje med površino ekrana in površino skeniranega preparata (Vrstični..., 2010).

### 3 MATERIALI IN METODE

Raziskava je potekala na Biotehniški fakulteti v Ljubljani in sicer v laboratoriju Katedre za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo ter na Katedri za fiziologijo, antropologijo in etologijo Oddelka za biologijo.

#### 3.1 MERITVE DEBELINE SEMENSKE OVOJNICE

Za meritve smo izbrali semena buč, ki naj bi imela v celoti ali delno reducirano semensko ovojnico. Poleg tega smo v poskus vključili tudi genotipe z normalno razvito semensko ovojnico, ki so služili za primerjavo. Izbrali smo 32 sort oz. akcesij.

Preglednica 1: Izbrane akcesije in država izvora

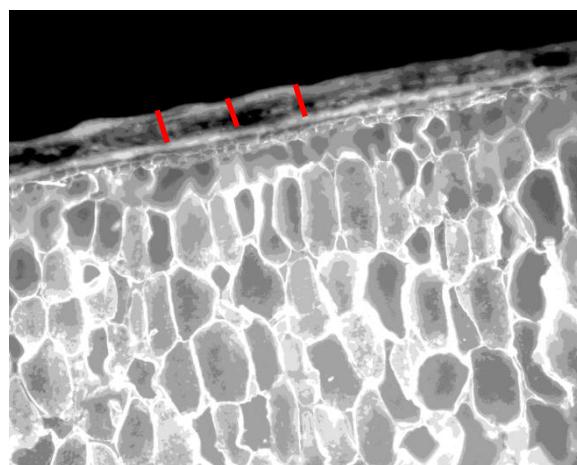
Št.	Ime sorte oz. akcesije	Država porekla
1	Gleisdorfer Ölkürbis, Saatzucht Gleisdorf	Avstrija
2	PI 267664	ZDA
3	PI 406678	Turčija
4	PI 267661	ZDA
5	PI 379320	Makedonija
6	PI 171628	Turčija
7	PI 379319	Makedonija
8	PI 169462	Turčija
9	PI 379310	Makedonija
10	Muškatna buča 'Kürbis Muscade de Provence' ( <i>Cucurbita moschata</i> L.), Semenarna Ljubljana	Slovenija
11	PI 379309	Makedonija
12	Buča 'Noč čarovnic' Sankt Martin F1 ( <i>Cucurbita maxima</i> L.), Semenarna Ljubljana	Slovenija
13	PI 379308	Makedonija
14	PI 364241	Madžarska
15	PI 357962	Makedonija
16	Bučke 'Elite F1' ( <i>Cucurbita pepo</i> L.), Semenarna Ljubljana	Slovenija
17	Slovenska golica, Semenarna Ljubljana	Slovenija
18	Rumena golica, Anton Ivančič, Maribor	Slovenija
19	'GI Opal' F1, Saatzucht Gleisdorf	Avstrija
20	PI 531323	Madžarska
21	PI 615111	ZDA
22	PI 615104	ZDA
23	PI 615102	ZDA
24	PI 506441	Moldavija
25	PI 490278	ZDA
26	PI 420331	Turčija

...se nadaljuje

...nadaljevanje preglednice 1. Izbrane akcesije in država izvora

Št.	Ime sorte oz. akcesije	Država porekla
27	PI 420330	Turčija
28	PI 420329	Turčija
29	PI 420328	Turčija
30	PI 406679	Turčija
31	PI 282487	ZDA
32	PI 285611	Poljska

Pri vsaki akcesiji smo izbrali pet semen. Vsako seme smo z rezilom prečno prerezali čez sredino tako, da smo dobili tanko rezino. Za vsako sorto (oz. akcesijo) smo pripravili pet vzorcev (rezin), iz vsakega semena po eno. Položili smo jih na objektno stekelce in jim pri 20-kratni povečavi pod svetlobnim mikroskopom izmerili debelino celične stene. Merili smo z računalniškim programom LUCIA Cytogenetics 2. Steno smo izmerili na štirih različnih mestih, po trikrat vsako mesto.



Slika 4: Merjenje debeline semenske ovojnice na treh točkah enega mesta

Iz rezultatov smo izračunali povprečje za posamezno seme in nato še za sorto. Izračunali smo tudi standardni odklon. Za računanje smo uporabili računalniški program Excel.

### 3.2 ŠKROBNI TEST

Seme smo testirali tudi na prisotnost škroba in oljnih zrn. Naključno izbrano seme posamezne sorte oz. akcesije smo za določanje škroba namočili v raztopino jod-jod kalija, za obarvanje oljnih zrn pa v dve različni barvili v različnih koncentracijah. Uporabili smo barvilo Brilliant Cresyl Blue ALD v koncentracijah: 100 mg/10 ml, 10 mg/10 ml in 1 mg/10 ml. Drugo barvilo je bilo Nile Blue A uporabljeno v istih koncentracijah kot barvilo navedeno zgoraj. Seme smo pustili namočeno nekaj minut. Nato smo pod mikroskopom

pogledali ali se je seme zaradi prisotnosti škroba obarvalo vijolično, oziroma pod fluorescenčnim mikroskopom ali se obarvajo oljna zrna oranžno.

### 3.3 VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

#### 3.3.1 Priprava svežih semen z liofilizacijo

Za liofilizacijo smo izbrali sveža semena dveh sort, ki sta se razlikovali po tipu semenske ovojnice. Sorta 'Slovenska golica' spada v skupino golic in ima stanjšano semensko ovojnicu, sorta 'Noč čarovnic' pa ima normalno razvito semensko ovojnicu (t.i. divji tip). Pri vsaki sorti smo izbrali nekaj celih semen, jih prečno prerezali z rezilom tako, da smo dobili tanko rezino.

V zaboju iz stiroporja smo postavili terilnice in nato čez polili tekoči dušik. S tem smo ohladili notranjost zaboja in terilnice. V ohlajene terilnice smo dali rezine semen. Ves čas smo polivali s tekočim dušikom, da smo ohranjali nizko temperaturo.

Zamrznjene vzorce smo nato vstavili v liofilizator. Semena so pod nizkim pritiskom ostala zamrznjena. Voda, ki je bila prisotna v semenih je počasi evaporirala iz trdnega v plinasto. Tako ni povzročala površinske napetosti in lomljena struktur.

Vzorce smo po dveh dneh vzeli iz liofilizatorja, jih nalepili na valjaste kovinske nosilce s srebrno koloidno pasto, naprašili s platino v napraševalcu Bal-Tec (Leica) SCD 050 ter pregledali z vrstičnim elektronskim mikroskopom JEOL JSM 7500F.

#### 3.3.2 Priprava suhih semen

Zgradbo semenske ovojnice sorte 'Noč čarovnic' s debelo semensko ovojnicu in sorte 'Slovenska golica' z reducirano semensko ovojnicu smo analizirali tudi pri suhih semenih. V ta namen smo izbrali zrela in posušena semena, jih prečno prerezali po sredini, rezine nalepili na valjaste kovinske nosilce s srebrno koloidno pasto, naprašili s platino v napraševalcu Bal-tec (Leica) SCD 050 ter pregledali z vrstičnim elektronskim mikroskopom JEOL JSM 7500F.

#### 3.3.3 Pregled vzorcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom

Vzorce svežih in suhih semen smo pregledali v vrstičnem elektronskem mikroskopu in s pomočjo dobljenih slik primerjali med seboj zgradbo semenske ovojnice, debelino in razporejenost plasti pri semenih z debelo (lignificirano) semensko ovojnicu in semenih z tanko (reducirano) semensko ovojnicu.

## 4 REZULTATI

### 4.1 DEBELINA SEMENSKE OVOJNICE

S pomočjo svetlobnega mikroskopa, računalniškega programa LUCIA Cytogenetics 2 in programa Excel, smo izračunali debeline semenskih ovojnic in njihove standardne odklone (preglednica 2).

Preglednica 2: Povprečna debelina semenske ovojnice in standardni odkloni pri različnih sortah in akcесijah buč

Št.	Ime sorte oz. akcесije	Pov.debelina stene (µm)	St.odklon (µm)
1	Gleisdorfer Olkürbis, Saatzucht Gleisdorf	22,60	6,04
2	PI 267664	31,65	6,41
3	PI 406678	360,27	51,62
4	PI 267661	48,82	25,62
5	PI 379320	395,03	42,14
6	PI 171628	222,05	17,40
7	PI 379319	92,30	14,34
8	PI 169462	244,84	17,47
9	PI 379310	311,81	30,65
10	Muškatna buča 'Kürbis Muscade de Provence' ( <i>Cucurbita moschata</i> L.), Semenarna Ljubljana	340,11	60,47
11	PI 379309	276,78	27,94
12	Buča 'Noč čarovnic' Sankt Martin F1 ( <i>Cucurbita maxima</i> L.), Semenarna Ljubljana	264,47	21,27
13	PI 379308	304,74	37,46
14	PI 364241	30,79	5,78
15	PI 357962	217,41	19,90
16	Bučke 'Elite F1' ( <i>Cucurbita pepo</i> L.), Semenarna Ljubljana	295,66	47,79
17	Slovenska golica, Semenarna Ljubljana	23,84	3,77
18	Rumena golica, Anton Ivančič, Maribor	36,23	7,43
19	'Gl opal' F1, Saatzucht Gleisdorf	27,72	3,04
20	PI 531323	36,37	8,64
21	PI 615111	205,90	54,20
22	PI 615104	38,39	6,07
23	PI 615102	114,94	4,00
24	PI 506441	64,70	9,64
25	PI 490278	32,27	7,45
26	PI 420331	119,23	61,52
27	PI 420330	232,99	45,90
28	PI 420329	143,57	19,68

...se nadaljuje

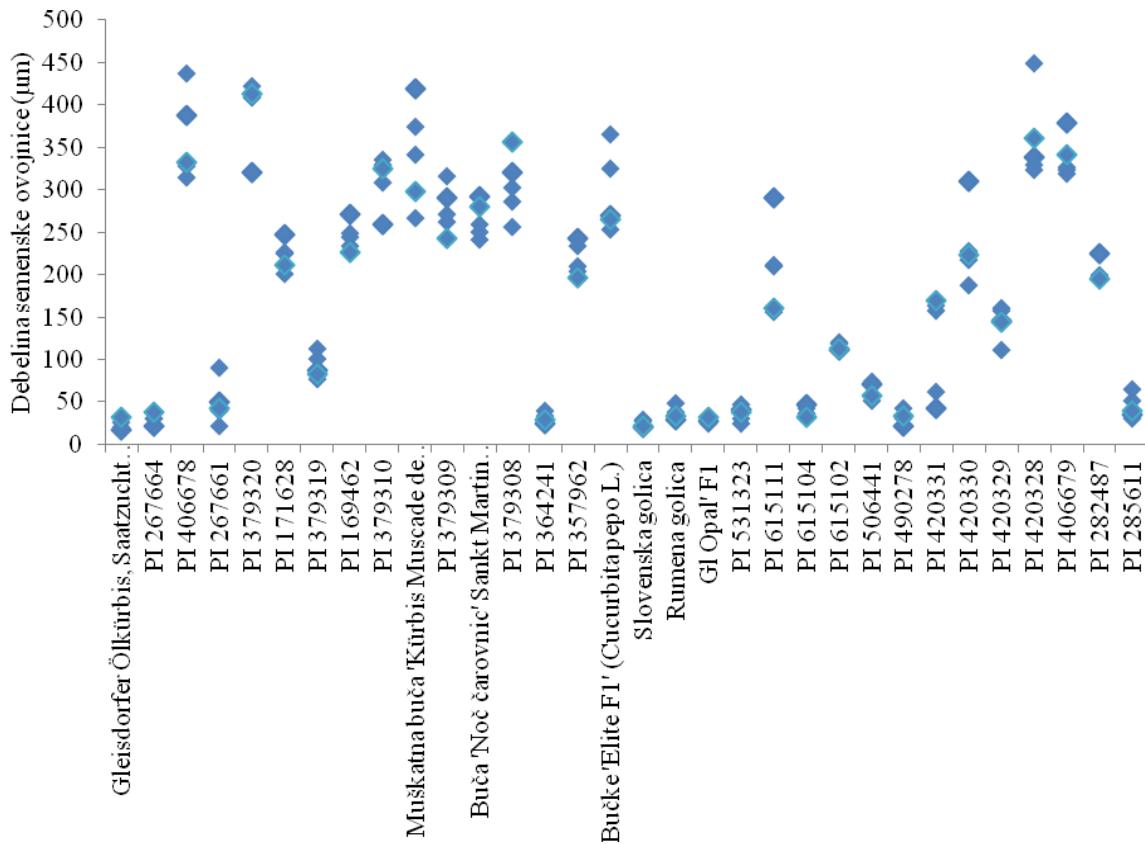
...nadaljevanje preglednice 2. Povprečna debelina semenske ovojnice in standardni odklon pri različnih sortah in akcesijah buč

Št.	Ime sorte oz. akcesije	Pov. debelina stene (µm)	St. odklon (µm)
29	PI 420328	360,18	51,43
30	PI 406679	337,72	24,91
31	PI 282487	201,98	12,86
32	PI 285611	43,90	13,72

Iz preglednice 2 je razvidno, da se izbrane akcesije zelo razlikujejo glede na debelino semenske ovojnice.

Najtanjšo semensko ovojnico so imela semena sort 'Gleisdorfer Olkürbis' (22,60 µm), 'Slovenska golica' (23,84 µm) in žlahtniteljska linija 'Rumena golica' (36,23 µm). Vse tri sorte spadajo v skupino golic in se pridelujejo za proizvodnjo bučnega olja. Naše meritve so potrdile, da imajo oljne sorte zelo stanjšano (reducirano) semensko ovojnico kot posledico mutacije gena (genov) odgovornih za sekundarno debelitev (lignifikacijo) celic semenske ovojnice.

Najdebelejšo semensko ovojnico je imela akcesija PI 379320 (395,03 µm), za katero lahko sklepamo, da ima izoblikovanih vseh pet plasti, katere navajajo predhodne študije.



Slika 5: Povprečna debelina semenske ovojnice petih semen za 32 sort oz. akcесij buč

Na grafikonu (slika 4) so prikazane debeline semenskih ovojnici petih semen posameznih sort oz. akcесij. Opazimo lahko odstopanja nekaterih semen od povprečne debeline. Razlog za odstopanja je lahko merjenje semen na različnih mestih, saj ni bilo možno določiti istega mesta merjenja pri vseh petih semenih. Poleg tega so različne debeline semenskih ovojnici opažene pri nekaterih sortah oz. akcесijah lahko tudi posledica različnih tipov semenske ovojnice znotraj posamezne sorte oz. akcесije (preglednica 3).

Tako kot v preglednici 2 je tudi iz slike 5 razvidno, da imajo akcесije golic 'Gleisdorfer Olkürbis', 'Rumena golica' in 'Slovenska golica', najtanjšo semensko ovojnico, akcесija PI379320 pa najdebelejšo.

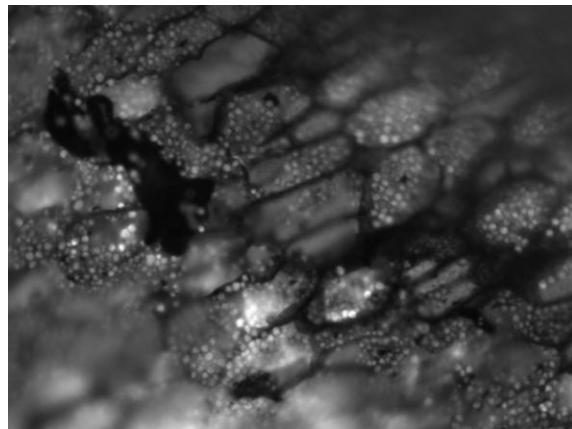
#### 4.2 ŠKROBNI TEST

Škrobni test je bil izveden na nekaj naključno izbranih akcесijah. Po nekaj minutah v raztopini jod-jod kalija, so vsa semena kazala negativen rezultat. Ob stiku jod-jod kalija se škrob ni obarval vijolično, zato ugotavljamo, da v semenih izbranih akcесij škrob ni bil prisoten.



Slika 6: Seme akcесије буče об стiku z jod-jod kalijem

Škrob v kotiledonih ni bil navzoč, opaziti pa je bilo mnogo oljnih zrn. Slednja smo, obarvana z barviloma Brilliant Cresyl Blue ALD in Nile Blue A, opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom. Opazili smo veliko oljnih struktur, ki so bila obarvana oranžno.



Slika 7: Obarvana oljna zrna buče pod fluorescenčnim mikroskopom

#### 4.3 TIPI SEMEN

Semena, katerim smo merili debelino semenske ovojnice, smo razdelili glede na zunanji izgled semenske ovojnice v 11 razredov od A do K. Razdelil smo jih glede na barvo semenske ovojnice, stopnjo in način razporeditve lignifikacije skladno z Murovec in sod. (2012), ter debelino semenskega roba. Prvi razred je vseboval močno lignificirana semena z debelim semenskim robom, zadnji razred pa so bila popolnoma gola semena brez vseh petih plasti semenske ovojnice (preglednica 3).

Preglednica 3: Akcesije buč in pripadajoči tip semena

Št.	Ime sorte oz. akcesije	Tip semena
1	Gleisdorfer Ölkürbis, Saatzucht Gleisdorf	I
2	PI 267664	K, G, J
3	PI 406678	A, E
4	PI 267661	K, H, J
5	PI 379320	A, K
6	PI 171628	A
7	PI 379319	A, K
8	PI 169462	A
9	PI 379310	A
10	Muškatna buča 'Kürbis Muscade de Provence' ( <i>Cucurbita moschata</i> L.), Semenarna Ljubljana	A
11	PI 379309	A, E
12	Buča 'Noč čarovnic' Sankt Martin F1 ( <i>Cucurbita maxima</i> L.), Semenarna Ljubljana	A
13	PI 379308	A
14	PI 364241	K, I
15	PI 357962	A
16	Bučke 'Elite F1' ( <i>Cucurbita pepo</i> L.), Semenarna Ljubljana	A
17	Slovenska golica, Semenarna Ljubljana	I
18	Rumena golica, Anton Ivančič, Maribor	C, I
19	Gl Opal' F1, Saatzucht Gleisdorf	I
20	PI 531323	K, I, J
21	PI 615111	A
22	PI 615104	I
23	PI 615102	D
24	PI 506441	K, E
25	PI 490278	A, L, H
26	PI 420331	A, E
27	PI 420330	A, E
28	PI 420329	K, E
29	PI 420328	A, E
30	PI 406679	A, E
31	PI 282487	A, G
32	PI 285611	H, B

#### 4.3.1 Tip A

Semena tipa A so velika, bela in imajo debelo semensko ovojnico. Bela barva semen nakazuje na visoko stopnjo lignifikacije, saj klorenhim ni viden. Semenska ovojnica vsebuje pet, zgoraj opisanih plasti (epiderm, hipoderm, sklerenhim, aerenhim,

klorenhim) (slika 2). Izrazit je tudi semenski rob, ki je prav tako lignificiran (preglednica 3, slika 8).



Slika 8: Tip semenske ovojnice A

#### 4.3.2 Tip B

Velika semena s posušeno epidermalno plastjo placente, ki je lahko odstranjiva. Seme je zelenkaste barve. Plast sklerenhima je prisotna samo po sredini semena, ob robu te plasti ni (preglednica 3, slika 9).



Slika 9: Tip semenske ovojnice B

#### 4.3.3 Tip C

Velika semena zelene barve z izrazitim robom. Plast sklerenhima je prisotna samo ob robu, v sredini semena pa ne. Lignifikacija je prisotna na robu, proti sredini pa jo je vedno manj. Na nekaterih semenih je prisotna tudi posušena epidermalna plast placente (preglednica 3, slika 10).



Slika 10: Tip semenske ovojnice C

#### 4.3.4 Tip D

Manjša semena sivo zelene barve. Semenski rob je rahlo izbočen. Plast sklerenhima je pomečkana (preglednica 3, slika 11).



Slika 11: Tip semenske ovojnice D

#### 4.3.5 Tip E

Svetlo zelena semena z neizrazitim robom. V semenski ovojnici je prisotna samo plast aerenhima (preglednica 3, slika 12).



Slika 12: Tip semenske ovojnice E

#### 4.3.6 Tip F

Sivo zelena semena z izraženim semenskim robom. Plast sklerenhima se pojavi ob robu semena. V sredini je seme valovito (preglednica 3, slika 13).



Slika 13: Semenska ovojica tipa F

#### 4.3.7 Tip G

Semena so sivo zelene barve. So velika, podolgovata z izraženim in lignificiranim robom (preglednica 3, slika 14).



Slika 14: Semenska ovojnica tipa G

#### 4.3.8 Tip H

Ovalna semena zelenkaste barve. Izražen imajo lignificiran semenski rob. Pisotna je tudi posušena epidermalna plast placente (preglednica 3, slika 15).



Slika 15: Semenska ovojica tipa H

#### 4.3.9 Tip I

Seme tipične golice, temno zelene barve brez lignificiranega roba semena (preglednica 3, slika 16).



Slika 16: Semenska ovojnica tipa I

#### 4.3.10 Tip J

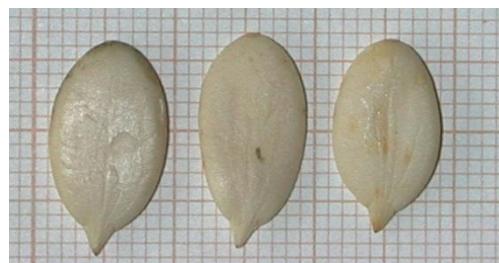
Semena ovalne oblike. Večji del semena prekriva zelena barva, ki jo povzroči klorenhim. Na semenski ovojnici se pojavljajo tudi beli madeži, ki pa so posledica odsotnosti klorenhimske plasti (preglednica 3, slika 17).



Slika 17: Semenska ovojnica tipa J

#### 4.3.11 Tip K

Manjša semena bele do rahlo rumenkaste barve. Rob semena ni izražen. Semenska ovojnica je popolnoma odsotna. Ni prisotne nobene od petih plasti, manjka tudi klorenhimska plast (preglednica 3, slika 18).



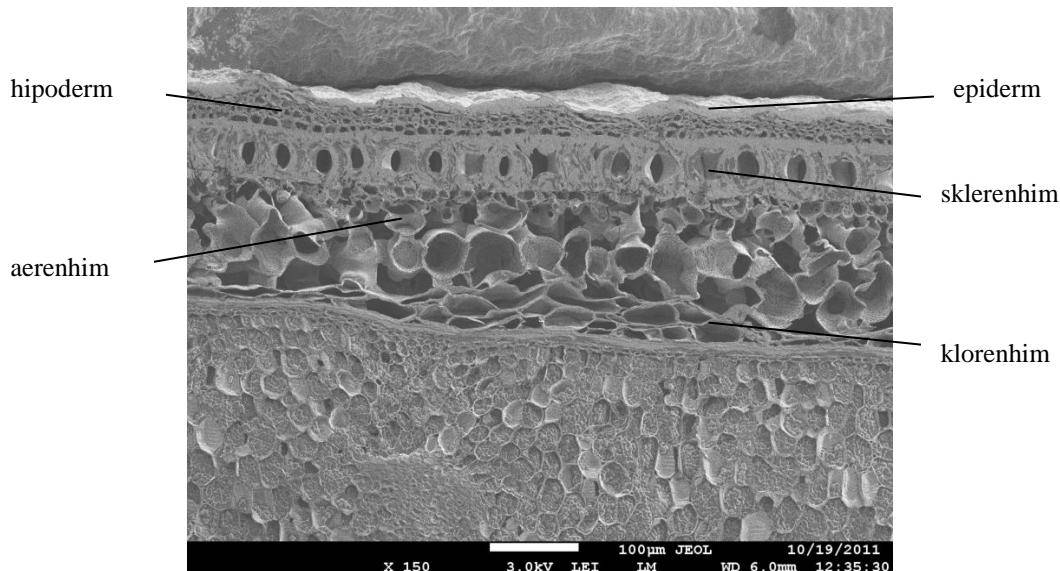
Slika 18: Semenska ovojnica tipa K

### 4.4 VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (VEM)

#### 4.4.1 Primerjava suhih semen sort 'Noč čarovnic' in 'Slovenska golica'

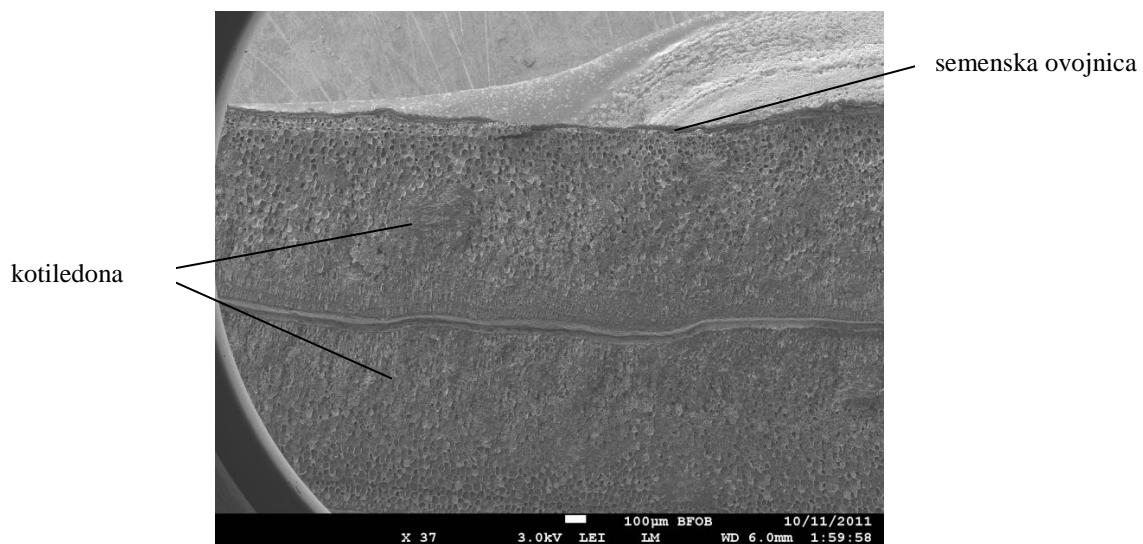
Suha semena sorte 'Noč čarovnic' so imela razvitih vseh pet plasti, katere naj bi bile prisotne v debelih semenskih ovojnicah (preglednica 3).

Zgornjo plast semenske ovojnice je sestavljal epiderm. Sestavljen je iz ene plasti celic brez vidnega celičnega lumna. Sledila mu je plast hipoderma, ki je vsebovala več plasti celic. Slednje so imele debelo celično steno, ter so bile gosto nanizane, zato med njimi skorajda ni bilo medceličnega prostora. Plast hipoderma je bila ob robu semena širša in bolj razvezjana. Tudi celice so bile proti robu bolj podolgovate in so vsebovale več medceličnega prostora. Zunanost celične stene je bila gladka, medtem, ko je bila notranjost zadebeljena z vlknastimi tvorbami. Sklerenhimska plast je bila zgrajena le iz ene plasti celic, le proti robu sta bili prisotni dve plasti. Sklerenhim je bil lepo viden, saj je bila notranjost celice velika in lepo vidna. Celice so obdajajale debele celične stene, ki se vsebovale več slojev. Sklerenhimskim celicam so sledile aerenhimske. Te so bile velike z velikim medceličnim zračnim prostorom. Aerenhimska plast ni vsebovala več plasti celic, temveč je bila zgrajena iz celic, ki so bile zelo razvezjane in medsebojno povezane. Med plastjo aerenhima in kotiledoni se je nahajala plast klorenhima. Sestavljena je bila iz več plasti celic, ki so bile majhne in so imele tanko celično steno.



Slika 19: Semenska ovojnica suhega semena sorte 'Noč čarownic' pod vrstičnim elektronskim mikroskopom

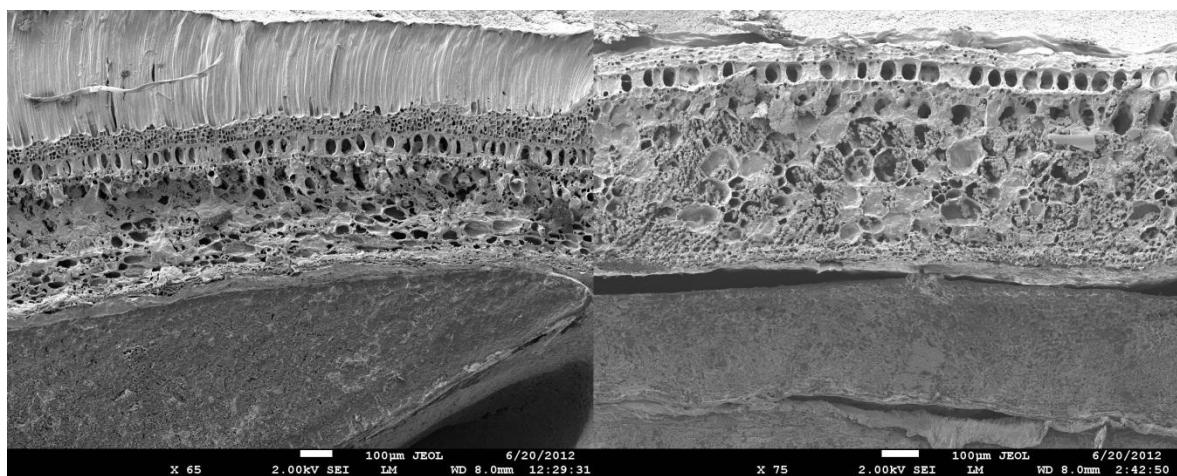
Semenska ovojnica suhih semen sorte 'Slovenska golica' je posledica mutacije. Povzročila je, da je semenska ovojnica tanjša s sesedenimi plasti, zaradi česar je vidna zelena barva klorenhimske plasti, ki je pri teh semenih edina dobro razvita. V naši raziskavi smo ugotovili, da semensko ovojnicu suhega semena predstavlja samo ena zbita plast klorenhimskih celic brez izrazitih struktur (slika 20).



Slika 20: Prečni prerez skozi suho seme sorte 'Slovenska golica' pod vrstičnim elektronskim mikroskopom

#### 4.4.2 Primerjava svežih semen sort 'Noč čarovnic' in 'Slovenska golica'

Pregled svežih semen je pokazal, da so pri semenih sorte 'Noč čarovnic' na površini semenske ovojnice še prisotne dolge podolgovate epidermalne celice (slika 21 levo) medtem, ko jih v suhem semenu ni več (slika 19). Plasti hipoderma, sklerenhima in aerenhima pa so bile v svežih semenih slabše vidne (slika 21 levo) v primerjavi s suhim semenom (slika 19).



Slika 21: Sveža semenska ovojnica sorte 'Noč čarovnic' (levo) in 'Slovenska golica' (desno) pod vrstičnim elektronskim mikroskopom

Pri svežih semenih sorte 'Slovenska golica' s stanjšano semensko ovojnico pa epidermalne plasti v ovojnici ni bilo, hipodermalna plast pa je bila sestavljena le iz nekaj plasti celic.

Sklerenhimska plast je bila sestavljena iz ene plasti celic, vendar je bila na nekaterih mestih prekinjena. Celična stena sklerenhimov je bila pri semenih 'Slovenske golice' tanjša kot pri semenih sorte Noč čarovnic z debelo semensko ovojnico. Aerenhimska plast je bila v tej faziji še močno razvita. Sestavljaljo jo je več plasti celic. Pod njo je ležala debela plast klorenhima (slika 21 desno).

## 5 RAZPRAVA

Pridelava oljnih buč je zelo razširjena. Pomemben element pri pridelavi predstavlja tudi zgradba semenske ovojnice. Cilj diplomske naloge je bila natančna analiza semenske ovojnice izbranih sort oz. akcesij.

V poskus smo vključili sorte z debelo semensko ovojnicico in sorte s tanko semensko ovojnicico. Nato smo primerjali razlike v zunanjem izgledu semena, debelino semenske ovojnice in sestavo plasti v semenski ovojnici.

Debelino semenske ovojnice smo merili na petih semenih, zato je pri merjenju prišlo tudi do odstopanj, saj ni bilo možno izmeriti debeline na istih mestih pri vseh petih semenih. Kljub temu smo z merjenjem debeline semenske ovojnice ugotovili, da imajo najtanjšo semensko ovojnico buče golice. Debelejšo semensko ovojnico pa imajo sorte oz. akcesije, katere imajo semensko ovojnico normalno razvito. To, da smo izmerili najtanjšo semensko ovojnico pri bučah golicah, potrdi dejstvo, da je v semenski ovojnici buč golic prišlo do mutacije in s tem do sprememb v plasteh semenske ovojnice, kar navajata tudi Fruhwirth in Hermetter (2007).

Izvedli smo tudi škrobn test, da smo preverili vsebnost škroba v kotiledonih. Ugotovili smo, da izbrane akcesije ne vsebujejo škroba. Opazili pa smo veliko oljnih zrn, kar potrjuje, da so izbrane sorte oz. akcesije primerne za pridelavo oljnih buč, saj vsebujejo veliko olja.

Glede na zunanji izgled smo proučevana semena razdelili v 11 skupin od A do K. Sledila so si najprej tista z debelo semensko ovojnico in nato semena s tako semensko ovojnico. Semena uvrščena v razred A so imela belo semensko ovojnico in močno izražen semenski rob. Te lastnosti lahko pripisemo močni lignifikaciji in prisotnosti vseh plasti v semenski ovojnici. Pri naslednjih razredih je bila vedno bolj navzoča zelena barva semena in tanka semenska ovojnica, ki je nastala zaradi mutacije. Zaradi odsotnosti nekaterih plasti v semenski ovojnici, je spodnja plast klorenhima dajala semenu zeleno barvo. Buče golice imajo zeleno seme, zaradi odsotnosti nekaterih plasti v semenski ovojnici.

Z uporabo vrstične elektronske mikroskopije smo primerjali suha semena sort 'Noč čarovnic' in 'Slovenska golica'. Pri primerjavi smo ugotovili, da obstajajo velike razlike v sestavi semenske ovojnice. Pri sorti 'Noč čarovnic' so bile plasti lepo vidne. Ugotovili smo, da semensko ovojnico sorte 'Noč čarovnic' sestavljajo plasti, katere navaja v literaturi tudi Teppner (2004). Opaziti je bilo mogoče eno plast podolgovatih epidermalnih celic, sledilo ji je več plasti hipodermalnih celic. Čeprav Teppner (2000) v literaturi navajaja 2 plasti sklerenhimskih celic, smo v vseh primerih opazili le eno plast. Plast aerenhima je bila lepo vidna, saj so jo sestavljalne velike, povezane, razvezjane celice z medceličnim prostorom. Klorenhimatska plast je bila sestavljena iz več plasti, vendar so bile le te stisnjene med ostale plasti semenske ovojnice in embriom. S pomočjo tridimenzionalnega pogleda

vrstičnega elektronskega mikroskopa, smo ugotovili, da imajo celice hipoderma in aerenhima zunanjost celice gladko, medtem, ko je notranjost slojevita. Sklepamo lahko, da ima sorta 'Noč čarovnic' debelo semensko ovojnico in belo barvo semena, zaradi razvitih plasti v semenski ovojnici. Tako skozi semensko ovojnico ni možno videti spodnje plasti klorenhima, kateri daje golicam zeleno barvo. Pri opazovanju semenske ovojnice sorte 'Slovenska golica' smo ugotovili, da je semenska ovojnica tanka in nima izraženih plasti. Plasti v semenski ovojnici so bile sesedene in jih ni bilo moč razlikovati. Seme je imelo zaradi reducirane semenske ovojnice zeleno barvo, katera je nastala zaradi spodnje plasti klorenhima.

Pri opazovanih vzorcih svežih semen sort 'Noč čarovnic' in 'Slovenska golica', smo ugotovili, da so plasti pri sorti 'Slovenska golica' lepše vidne kot pri suhih vzorcih. Epidermalne plasti v semenski ovojnici sorte 'Slovenska golica' ni bilo. Hipodermalna plast je bila sestavljena le iz nekaj plasti celic. V sklerenhimski plast je bilo moč opaziti le eno plast celic. Celična stena sklerenhimov je bila pri semenih 'Slovenske golice' tanjša kot pri semenih sorte 'Noč čarovnic' z debelo semensko ovojnico. Aerenhimska plast je bila lepo vidna. Sestavljaljo jo je več plasti celic. Pod njo je ležala debela plast klorenhima. Ponovno lahko sklepamo, da so semena golic zelene barve zaradi tanjše semenske ovojnice in debele plasti klorenhima. Pri sorti 'Noč čarovnic' je bila epidermalna plast lepo vidna. Sestavlja je jo velike podolgovate celice. Prisotne so bile tudi plasti hipoderma, sklerenhima, aerenhima in klorenhima, vendar niso bile tako dobro vidne kot pri suhih vzorcih. Razlog za slabše vidne plasti je lahko, da jih nismo dobili v fiziološki zrelosti ali pa je prišlo med pripravljanjem semena za opazovanje do porušenja struktur zaradi izsušitve.

Pri semenih s tanko semensko ovojnico, ki naj bi sodeč po prejšnjih študijah (Singh in Dathan, 1972) vsebovala več plasti klorenhima, smo opazili, da se število plasti ne povečuje, temveč je podobno kot v semenih z normalno razvitimi semenskimi ovojnicami.

## 6 SKLEPI

Pri merjenju debeline semenske ovojnice smo ugotovili velike razlike med normalno razvito semensko ovojnico in ovojnico buč golic. Golice imajo tanjšo ovojnico kot ostale preučevane akcesije. Sklepamo lahko, da je za to odgovorna mutacija, katera je povzročila, da je prišlo do spremembe v plasteh semenske ovojnice.

V vseh preučevanih sortah oz. akcesijah se nahaja veliko oljnih zrn, saj smo njihovo prisotnost potrdili s testom.

Tudi na zunanji izgled semena vpliva sestava semenske ovojnice. Semena z normalno razvito semensko ovojnico so bele barve, saj imajo razvite vse plasti v semenski ovojnici, ki so močno lignificirane. Semena buč golic pa so zelene barve, saj je zaradi tanke semenske ovojnice in odsotnosti plasti v semenski ovojnici vidna spodnja plast klorenhima, ki je odgovorna za zeleno barvo.

Tako pri suhih kot pri svežih vzorcih sorte 'Noč čarovnic' so plasti v semenski ovojnici lepo vidne pod vrstičnim elektronskim mikroskopom. Pri svežih vzorcih je bolj izrazita epidermalna plast, ostale plasti pa so malce slabše razvite kot pri suhih vzorcih. Pri svežem vzorcu imajo celice hipoderma in aerenhima zunanjost celice gladko, medtem, ko je notranjost slojevita.

Pri suhih semenih sorte 'Slovenska golica' je pod vrstičnim elektronskim mikroskopom moč opaziti zelo reducirano semensko ovojnico. Plasti v njej so sesedene in jih ni mogoče razlikovati. Pri svežih semenih iste sorte, pa so plasti lepo vidne. Odsotna je le plast epiderma. Plasti so tanjše kot pri normalno sorti 'Noč čarovnic', vendar se jih da razlikovati.

## 7 POVZETEK

Navadna buča *Cucurbita pepo* L. je ena izmed najbolj razširjenih buč. Z mutacijo v naravi nekje na Štajerskem je nastala buča golica *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca*. Razvoj golice je pospešil in povečal pridelavo bučnega olja, saj je bilo pridobivanje slednjega lažje zaradi odsotnosti plasti v semenski ovojnici. Teppner (2004) navaja, da naj bi bilo v semenski ovojnici prisotnih pet plasti in sicer: epidermalna, hipodermalna, sklerenhimска, aerenhimska in klorenhimska plast.

S poskusom smo preverjali debelino semenske ovojnice izbranih sort oz. akcесij. Meritve smo opravili pod svetlobnim mikroskopom. Vključili smo sorte oz. akcесije z debelo semensko ovojnico in golice. Na podlagi izmerjene debeline semenske ovojnice smo nato izbrali semena z najdebelejšo in najtanjo semensko ovojnico. Slednjim smo nato opazovali sestavo semenske ovojnice pod vrstičnim elektronskim mikroskopom. Zgradbo semenske ovojnice smo spremļjali tako pri suhih kot pri svežih semenih. Semena, ki so bila vključena v poskus, smo glede na zunanji izgled razvrstili v enajst skupin od A do K in jih opisali.

Pri suhih semenih z debelo semensko ovojnico smo opazili vseh pet razvitih plasti. Epidermalno plast je sestavlja ena plast epidermalnih celic, hipodermalno pa je sestavljal več plasti manjših celic. Sledila je sklerenhimatska plast z plastjo velikih celic. Aerenhimatsko plast so sestavlja razvezjane celice z veliko medceličnega prostora, pod njem pa je ležala plast klorenhima. Pri suhih semenih s tanko semensko ovojnico plasti niso bile vidne. Plasti v semenski ovojnici so bile sesedene in jih ni bilo možno ločiti.

Pri svežih semenih smo pri vzorcih s tanko in debelo semensko ovojnico, lahko ločevali posamezne plasti v semenski ovojnici. Pri semenih z debelo semensko ovojnico je bila prisotna tudi epidermalna plast, katera pri suhih vzorcih semen ni bila vidna. Ostale plasti so bile prisotne, vendar so bile slabše vidne kot pri suhih vzorcih. Pri svežih semenih s tanko semensko ovojnico epidermalna plast ni bila razvita. Vidne pa so bile plasti hipoderma in sklerenhima. V sklerenhimski plasti so bile celice manjše kot pri semenih z debelo semensko ovojnico. Aerenhimatska plast je bila že razvita in lepo vidna. Pod njo je ležala klorenhimska plast, katera je povzročila, da je seme s tanko semensko ovojnico zelene barve.

## 8 VIRI

- Fruhwirth G., Hermetter A. 2007. Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities. European Journal of Lipid Science and Technology, 109: 1128-1140
- Ivančič A. 2002. Hibridizacija pomembnejših rastlinskih vrst. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo: 776 str.
- Kocjan Ačko D. 1999. Pozabljene poljščine. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 187 str.
- Lutar M. 2009. Priprava vzorcev halofilnih nitastih gliv za vrstično elektronsko mikroskopijo. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 51 str.
- Murovec J., Drašlar K., Bohanec B. 2012. Detailed analysis of *Cucurbita pepo* L. seed coat types and structures with scanning electron microscopy. Botany, (v tisku)
- Poročilo o stanju kmetijstva, živilstva, gozdarstva in ribištva v letu 2011. 2012. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo gozdarstvo in prehrano RS: 82 str.
- Singh D., Dathan A. S. R. 1972. Structure and development of seed coat in Cucurbitaceae. VI. Seeds of *Cucurbita*. Phytomorphology, 22: 29-45
- Štabuc M. 2009. Variabilnost debeline semenske lupine pri navadni buči. Diplomsko delo. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede: 35 str.
- Teppner H. 2000. *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) – History, Seed Coat Types, Thin Coated Seeds and their Genetics. Phyton-Annales rei Botanicae, 40: 1–42
- Teppner H. 2004. Notes on *Lagenaria* and *Cucurbita* (Cucurbitaceae) – Review and New Contributions. Phyton- Annales rei Botanicae, 44: 245-308
- Vrstični elektronski mikroskop. 2010. Oddelek za biologijo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta.  
<http://web.bf.uni-lj.si/bi/mikroskopija/mikroskop-sem.php#more> (20. avg. 2012)

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Borutu Bohancu in somentorici dr. Jani Murovec za njuno vodstvo, strokovno pomoč ter nasvete.

Zahvaljujem se tudi doc. dr. Kazimirju Drašlarju za pomoč pri vrstični elektronski mikroskopiji. Zahvala gre tudi vsem sodelavcem katedre, ki so mi pomagali pri delu.

Posebna zahvala gre tudi moji družini ter partnerju za pomoč in podporo skozi celoten študij.