

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

RAZVOJ SJEMENE LUPINE  
SEED COAT DEVELOPMENT

SEMINARSKI RAD

Krešimir Šola

Preddiplomski studij biologije

Undergraduate Study in Biology

Mentor: doc.dr.sc. Dunja Lejnak-Levani

Zagreb, 2012.

# SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
2. Anatomija i razvoj sjemene lupine u vrste <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	2
3. Tijek razvoja sjemene lupine.....	4
3.1. Stadij 1 – razvoj od dvostani nog do globularnog embrija .....	5
3.2. Stadij 2 – razvoj globularnog i srcolikog embrija.....	8
3.3. Stadij 3 – stadij torpednog i ranog kotiledonarnog embrija .....	9
3.4. Stadij 4 – stadij zrelog kotiledonarnog embrija .....	12
3.5. Stadij 5 – zrela isušena sjemenka.....	13
4. Zaključak.....	14
5. Literatura .....	15
6. Sažetak.....	18
7. Summary.....	19

# 1. Uvod

Sjemenka u biljaka predstavlja zavšni stadij njihovog životnog ciklusa, a u isto vrijeme je potrebna za po etak novog. Sjemenka e nakon oplodnje nastati iz ženskog dijela biljke, gineceja, koji prolazi kroz drasti ne promjene koje se zasnivaju na diferencijaciji, dok rast i diobe odlaze u drugi plan.

Unutar sjemenke po inje razvoj nove biljke iz zigote, koji te e kroz nekoliko razli itih stadija embriogeneze. Kao i kod svih organizama, po etni razvojni stadiji su vrlo osjetljivi na promjene u okolišu, zbog ega uvijek postoje razli iti oblici zaštite embrija. U biljnom carstvu e zaštitu embriju pružiti sjemena lupina (testa), koja k tome osigurava uvjete za dormanciju sjemenke, ali i njezino rasprostranjivanje.

Sjemena lupina nastaje iz ovojnih listova sjemenog zametka, a uzevši to u obzir, ona e biti jedini dio sjemenke podrijetlom isklju ivo od mati ne biljke i ne sadži geneti ki materijal obaju roditelja. Sjemena lupina prilikom diferencijacije prolazi kroz drasti nije promjene od bilo kojeg drugog dijela sjemenke (Haughn i Chaudhury, 2005). Taj proces se istraživao i istražuje se pomo u raznih *null* mutanata<sup>1</sup> za pojedine gene bitne za pravilan razvoj sjemene lupine. Osim geneti kih istraživanja, razumijevanju razvoja sjemene lupine doprinjela su i brojna promatranja promjena sjemenki pomo u mikroskopa, ime se dobio izravan uvid u drasti nost promjena stanica integumenta.

Ve ina razvojnih procesa u biljaka istražuje se na vrsti *Arabidopsis thaliana*. Razvoj sjemene lupine tako er je najbolje prou en u sjemenke vrste *A. thaliana*, a takav obrazac razvoja odgovara ve ini vrsta u porodici *Brassicaceae* (Windsor i sur., 2000).

---

<sup>1</sup> Mutanti koji gube funkciju gena u kojem je mutacija

## 2. Anatomija i razvoj sjemene lupine u vrste *Arabidopsis thaliana*

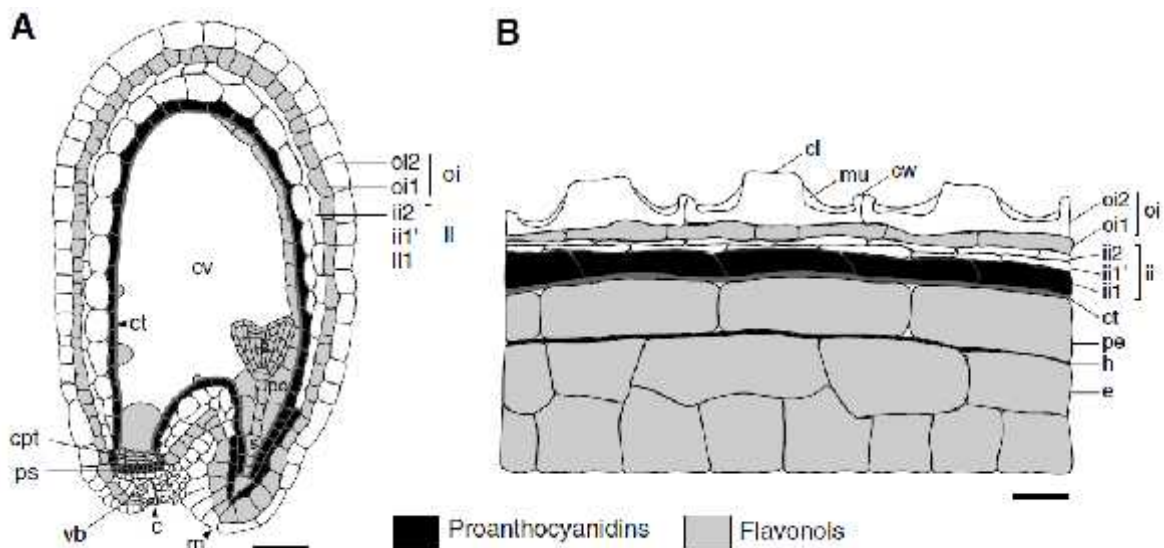
Sjemeni zametci kod roda *Arabidopsis* imaju dva ovojna lista – vanjski, koji je građen iz dva sloja stanica, i unutrašnji koji je građen iz tri sloja stanica. Oba ovojna lista su podrijetlom od L1 sloja apikalnog meristema, a nastaju prilikom rasta sjemenog zametka iz epidermalnog sloja (Schneitz i sur., 1995). Sjemeni zametak se razvija iz integumenata i halazalnih tkiva sjemenog zametka diferencijacijom, a okida razvoja je oplodnja. Halazalna tkiva su različite građe zbog toga što je ondje mjesto prihvaćanja funikulusa za sjemeni zametak, a time i mjesto na kojem dolaze do sjemenog zametka provodne žile (Debeaujon i sur., 2007).

Unutrašnji slojevi sjemene lupine razvijaju se iz unutrašnjeg ovojnog lista, a zajednički naziv im je endotelij. U početnim stadijima razvoja, stanice unutrašnjeg sloja endotelija (sl. 1., ii1) sintetiziraju proantocijanidine (PA), poznate pod imenom kondenzirani tanini (Debeaujon i sur., 2007). Ti bezbojni spojevi se nakupljaju u vakuolama stanica endotelija, a tijekom sazrijevanja sjemenke dolazi do njihove oksidacije, što sjemenkama daje smeću boju (Marles i sur., 2003). Stanice koje čine vanjska dva sloja endotelija tijekom razvoja sjemene lupine ostaju slabo diferencirane parenhimske stanice, koje se tijekom rasta sekundarnog endosperma pritišću i unište. Ta dva sloja su ujedno i prvi koji prolaze kroz programiranu staničnu smrt (PCD) (Haughn i Chaudhury, 2005).

Vanjski slojevi sjemene lupine se razvijaju iz vanjskog ovojnog lista i zajednički naziv im je epidermalni sloj. Taj sloj prolazi kroz drastične procese diferencijacije, koji uključuju izlučivanje mucilaga, sintezu sekundarnih staničnih stijenki i uništenje stanica unutrašnjeg sloja (sl. 1A i B; oi1). Mucilago su hidrofilni polisaharidi koji se iz stanica vanjskog epidermalnog sloja (sl. 1A i B; oi2) izlučuju iz međustaničnih membrana i primarne stanične stijenke (Windsor i sur., 2000). Prema sastavu, može biti pektinski, hemicelulozni ili celulozni. U slučaju sjemenke vrste *A. thaliana*, sastav mucilaga je pektinski, prvenstveno od ramnoze i galakturonske kiseline (Windsor i sur. 2000), dok su slabo zastupljeni celuloza i ksiloglukan (Haughn i Western, 2012). Tijekom sazrijevanja sjemenke mucilago se isušuje, a njegova uloga postaje jasna prilikom dodatka vode. Voda uzrokuje brzo izbacivanje mucilaga,

koji predstavlja želatinozni omota zrele sjemenke. Mucilago, osim što pruža vodom bogat okoliš koji potiče od klijanje, štiti sjemenku od toksinih tvari iz okoliša (Haughn i Chaudhury, 2005). Golgijev kompleks (GK), koji putem vezikula u apoplast izbacuje mucilago, se tijekom tog izlivanja proširuje u stanicama vanjskog epidermalnog sloja, a citoskelet ga organizira u formaciju nalik vulkanu. Mucilago se u apoplast oko tih stanica izliva u obliku prstena, koji nastaje zbog njegovog usmjerenog izlivanja oko „vulkana“ (Arsovski i sur., 2010). Zbog tog procesa, ali i stvaranja sekundarne stanične stijenke, stanice dobivaju karakterističan izgled koji se naziva kolumela (Windsor i sur., 2000). Subepidermalni sloj stanica (sl.1A i B; oi1) i u kasnijim fazama razvoja sintetiziraju sekundarnu staničnu stijenku prema unutrašnjosti sjemenke (Debeaujon i sur., 2007), a osim toga u njima se odvija i sinteza flavonola koji su bezbojni do blijedožuti (Pourcel i sur., 2005).

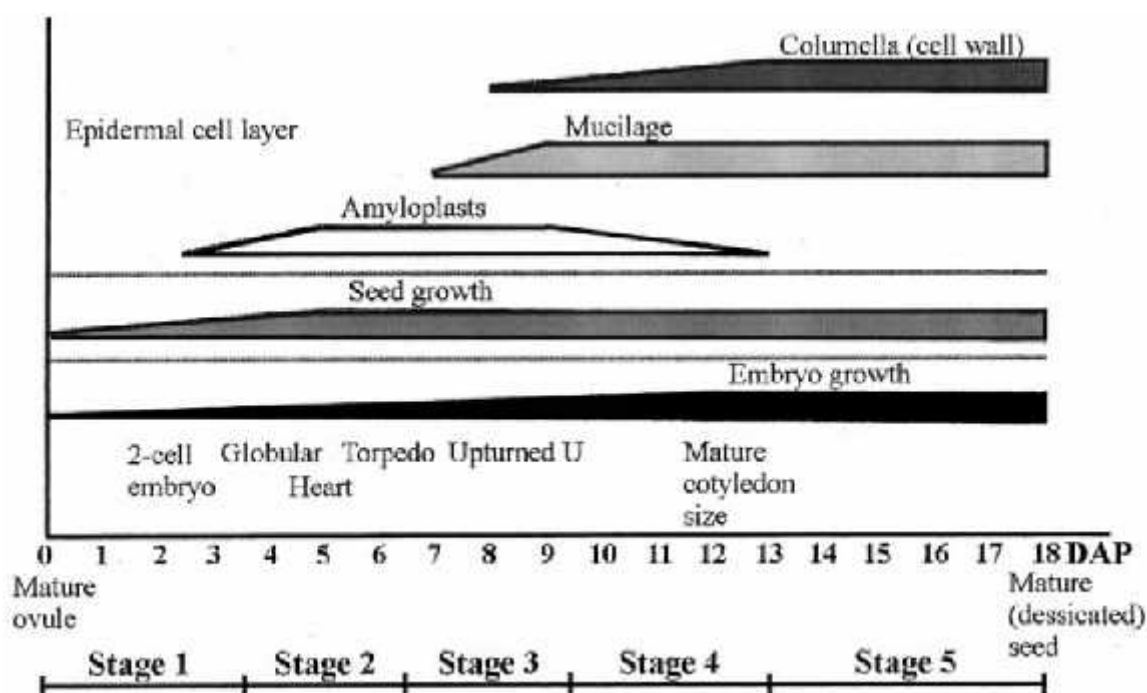
Svi navedeni procesi se odvijaju u svrhu zaštite embrija. Dva sloja debele sekundarne stanične stijenke sjemenci daju vrstu u, zaštitu i nepropusnost za vodu i kisik (Haughn i Chaudhury, 2005), što je bitno i za dormanciju sjemenke. Pretpostavlja se da PA, mucilago i sekundarna stanična stijenka zajednički omogućuju avajnu izmjenu plinova i tekućina između sjemenke i okoliša, što omogućuje dulji vijek trajanja sjemenke (Haughn i Chaudhury, 2005).



**Slika 1.** Prikaz strukture sjemenke lupine i mjesta sinteze pojedinih skupina spojeva u sjemenci vrste *A. thaliana*. (A) Anatomija sjemenke dok je embrio u srolikom stadiju. (B) Poprečni presjek kroz sjemenku zrele sjemenke. Kratice: c, halaza; cl, kolumela; cpt, nucel; ct, kutikula; cv, centralna vakuola; cw, stanična stijenka na stijenka; e, embrij; h, hijalini sloj; ii, unutrašnji integument; m, mikropila; mu, mucilago; oi, vanjski integument; pe, aleuronski sloj; ps, pigmentni sloj; s, suspenzor; vb, provodni snop. Preuzeto iz Debeaujon i sur., 2007.

### 3. Tijek razvoja sjemene lupine

Kao i u svakom drugom razvojnog procesu, tako i prilikom razvoja sjemene lupine, aktivnost gena u odre eno vrijeme na odre enom mjestu odre uje tijekom tog procesa. Tijekom razvoja sjemene lupine, bitnom se pokazala i interakcija između endosperma i integumenta, a kasnije endosperma i sjemene lupine (Haughn i Chaudhury, 2005). Budu i da je vremenski period od oplodnje u sjemenci najuo ljiviji na izgledu embrija, razvojni stadiji od ovojnih listova do zrele sjemene lupine se prikazuju paralelno sa stadijem u kojem je embrij. Razvojni procesi kojima nastaje zrela sjemena lupina su obi no podijeljeni u pet stadija (Western i sur, 2000; Windsor i sur., 2000), koji idu od samog rasta stanica, preko stvaranja amiloplasta, do izlu ivanja mucilaga i stvaranja sekundarne stijenke (sl. 2.).



**Slika 2.** Dijagram koji prikazuje me uovisnost razvoja sjemene lupine, razvoja embrija i rasta sjemenke u danima nakon oplodnje (DAP). Preuzeto iz Western i sur. 2000.

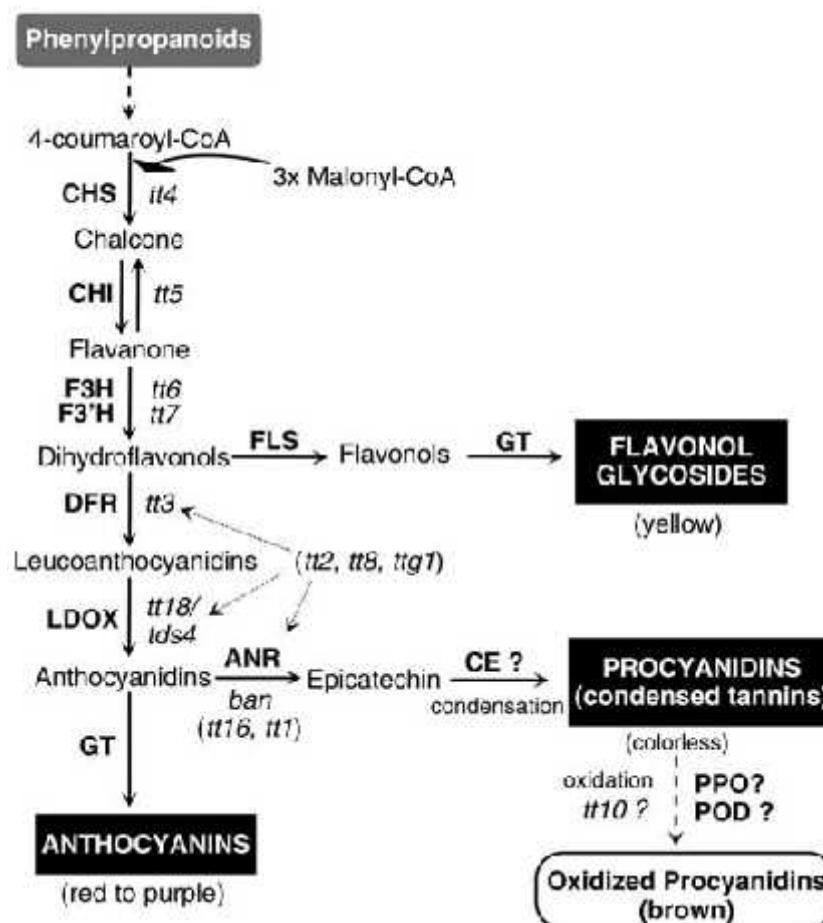
### 3.1. Stadij 1 – razvoj od dvostaničnog do globularnog embrija

Razvoj sjemene lupine započinje tek nakon što stanice integumenta nakon oplodnje dobiju signal. Budući da ovojni listovi nisu izravno uključeni u proces oplodnje, signal treba doći iz endosperma (Haughn i Chaudhury, 2005). Mutanti koji pokazuju slabiji rast sjemenki ukazuju na to da su u kontrolu veličine sjemenke uključeni geni *HAIKU1* (*IKU1*) i *HAIKU2* (*IKU2*) (Garcia i sur., 2003). Spomenuti mutanti imaju smanjen endosperm, oslabljenu proliferaciju stanica embrija, te smanjenu elongaciju stanica ovojnih listova. *IKU* geni na rast stanica najvjerojatnije djeluju neposredno, tako što omogućuju rast endosperma koji je tjerati stanice integumenta na rast (Garcia i sur., 2003). Pod kontrolom *IKU1* je, osim *IKU2* i *MINI3*, koji sudjeluje u istome putu (Wang i sur., 2010).

Važan proces ovog stadija je sinteza PA u stanicama endotelija. U taj proces su uključeni brojni geni, čiji mutanti daju bezbojne sjemenke, prema čemu su nazvani geni – *TRANSPARENT TESTA* (*TT*), *TRANSPARENT TESTA GLABRA* (*TTG*) i *BANYLUS* (*BAN*). Svi geni vezani uz razvoj endotelija su svrstani u dvije skupine (Haughn i Chaudhury, 2005). Prva skupina gena prepisuje proteine koji sudjeluju u biosintezi i kompartmentalizaciji flavonoida (*TT3*, *TT4*, *TT5*, *TT6*, *TT7*, *BAN*, *TT12*, *TT19*, *TDS4/TT18* i *AHA10*). Druga skupina prepisuje transkripcijske faktore (*TT1*, *TT2*, *TT8*, *TT16*, *TTG1* i *TTG2*). Geni koji su prvi u kontroli biosinteze PA su *TT1* i *TT16*. *TT1* kontrolira ekspresiju *TT4*, koji je bitan u prvom koraku biosinteze PA (sl. 3.), a pokazalo se da stupa u interakciju s transkripcijskim faktorom *TT2* (Appelhagen i sur., 2011). *TT16* je MADS transkripcijski faktor potreban za normalnu diferencijaciju i oblik stanica endotelija, a prisutan je cijelo vrijeme tijekom razvoja sjemene lupine (Nesi i sur., 2002). Sljedeći nivo u kontroli biosinteze PA su *TTG1*, *TT2* i *TT8*. Za razliku od *TTG1* i *TT2*, koji su aktivni do preslaska embrija u torpedo oblik (Nesi i sur., 2001), *TT8* je aktivan i u kasnim stadijima embrija (Baudry i sur., 2006). *TTG1*, *TT2* i *TT8* djeluju u stanicama endotelija kao transkripcijski kompleks, pod čijom su izravnom kontrolom *TTG2*, *TT3*, *TT18* i *BAN* (sl. 3.), geni biosintetskog puta PA, kao i *TT12*, koji je bitan u transportu PA (Johnson i sur., 2002, Baudry i sur., 2004, Nesi i sur., 2000, Nesi i sur., 2001). *TTG2*, za kojeg još nije poznato u kojem koraku regulira biosintezu PA, sudjeluje u kontroli jednog od gena čiji produkt ima ulogu u jednom od koraka biosinteze PA nakon leukoantocijanidina (Johnson i sur., 2002). Njegova aktivnost raste nakon oplodnje, a opada s

vakuolizacijom stanica endotelija (Johnson i sur., 2002). Otkriveno je da aktivnost *TTG2* ima utjecaj na elongaciju stanica u endoteliju, i to najvjerojatnije posredno, zbog nakupljanja određenih produkata tanina u stijenci koji smanjuju mogućnost elongacije (Garcia i sur., 2005).

Pokazalo se da *TT8* i *TT2* mogu samostalno djelovati na ekspresiju prethodno navedenih gena, ali u stanici stvaraju proteinske komplekse (Baudry i sur., 2004). Budući da se pokazalo da *TT2* i *TT8* mogu obavljati funkciju transkripcijskog kompleksa i bez *TTG1*, o kojem ovisi njihova aktivnost, najvjerojatnije je da su ekspresija *TT2* i *TT8* pod kontrolom *TTG1* (Baudry i sur., 2004). Ekspresija *TT2* je ograničena na stanice endotelija, dok to nije slučaj s *TT8* i *TTG1* (Nesi i sur., 2001). S obzirom da je ekspresija *TT2* ujedno i vremenski ograničena na period unutar kojeg se odvija biosinteza PA, *TT2* se može smatrati ključnim transkripcijskim faktorom u biosintezi PA.

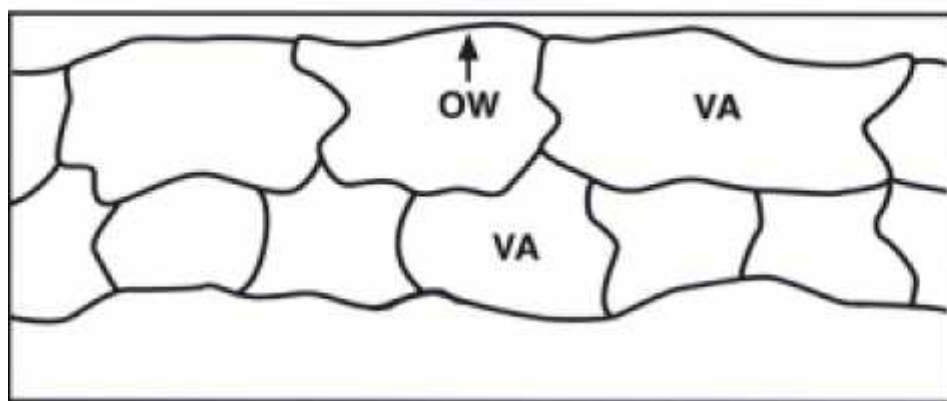


**Slika 3.** Prikaz biosintetskog puta proantocijanidina (PA), antocijanina i flavonola u *A. thaliana*. Uz pojedine enzime su navedeni i mutanti za njihove gene (*tt* i *ban*). Preuzeto iz Pourcel i sur., 2005.



Vanjska dva sloja unutrašnjeg ovojnog lista, u kojima se ne događa biosinteza kondenziranih tanina, prolaze kroz programiranu staničnu smrt još u ovoj, ranoj fazi razvoja. U tom procesu je ključan VPE (vacuolar processing enzyme), čija je aktivnost u stanicama ta dva sloja smanjuje i dolazi do pucanja vakuola, a vidljivo je i razlaganje jezgara (Nakaune i sur., 2005). U *VPE null*-mutantima ipak dolazi do pravilnog sazrijevanja, jer vanjski slojevi stanica unutrašnjeg integumenta prsnu pod mehaničkim pritiskom iz unutrašnjosti (Nakaune i sur., 2005).

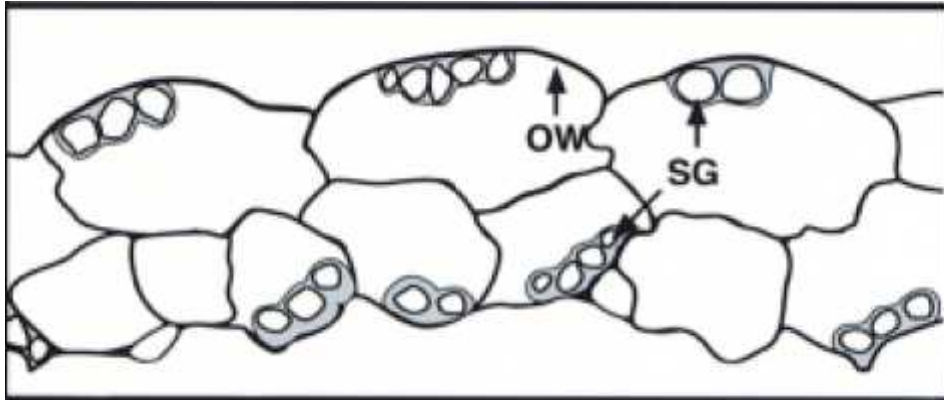
Epidermalni sloj sjemene lupine ne prolazi kroz značajne promjene kao što je to slučaj s endotelijem. Stanice su ispunjene velikim vakuolama i još se ne naziru promjene (sl. 4.) (Windsor i sur., 2000).



**Slika 4.** Shematski prikaz stanica epidermalnog sloja sjemene lupine u stadiju 1. S desne strane je prikaz stadija u kojem se nalazi embrij. OW, tanka vanjska stanična stijenka; VA, vakuola. Prilagođeno na temelju Windsor i sur., 2000.

## 3.2. Stadij 2 – razvoj globularnog i srcolikog embrija

U ovom stadiju se ne događaju velike promjene. Stanice unutrašnjeg ovojnog lista ne prolaze kroz promjene, dok se u stanicama vanjskog ovojnog lista formiraju amiloplasti (Windsor i sur., 2000). Škrobna zrnca se sintetiziraju u vanjskom epidermalnom sloju uz vanjsku staničnu membranu i stijenku, dok su u unutrašnjem sloju smještene uz unutrašnju stijenku (sl. 5.). Dolazi i do rearanžmana unutar stanice (Western i sur., 2001), što je bitno prilikom sinteze i izlučivanja mucilaga pomoću Golgijevog kompleksa (GK). Bitna stvar za razvoj sjemenne lupine je uspostava različitih puteva diferencijacije između dvaju epidermalnih slojeva (Windsor i sur., 2000). Gen za koji je poznato da je aktivan u ovom stadiju je *APETALA 2 (AP2)* (Western i sur., 2001). Nije poznato ostaje li *AP2* aktivan još od razvoja sjemenog zametka ili se nanovo aktivira u ovom stadiju. Sigurno je to da određuje slijed diferencijacije dvaju slojeva epidermalnog sloja tijekom stadija 3 (Western i sur., 2001).



**Slika 5.** Shematski prikaz stanica epidermalnog sloja sjemenne lupine u stadiju 2. S desne strane je prikaz stadija u kojem se nalazi embrij. OW, tanka vanjska stanična membrana i stijenka; SG, škrobna zrnca. Prilagođeno na temelju Windsor i sur., 2000.

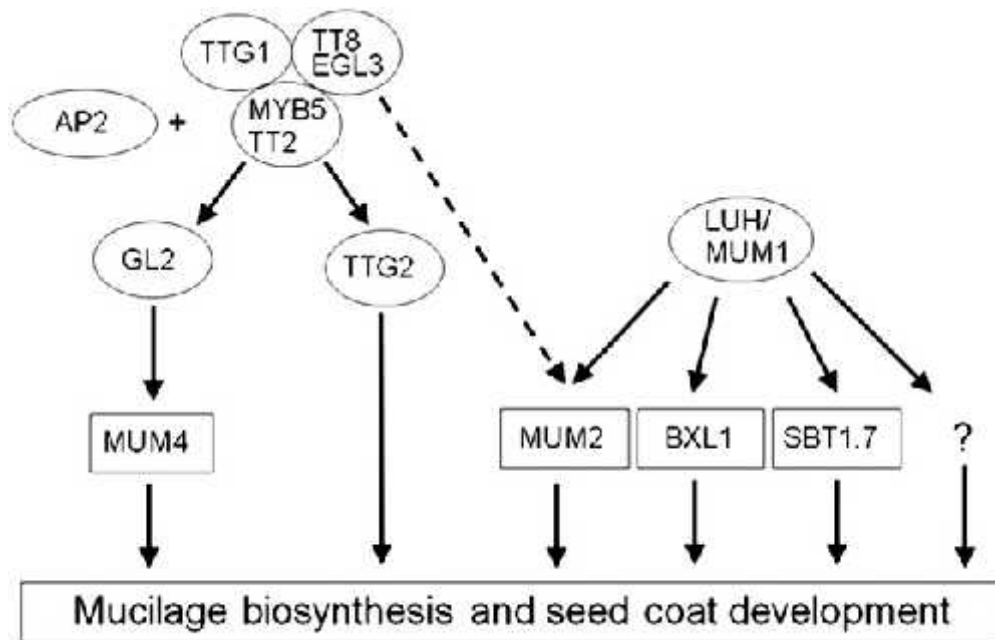
### 3.3. Stadij 3 – stadij torpednog i ranog kotiledonarnog embrija

Ovaj stadij se može smatrati ključnim u razvoju sjemene lupine. Nastupaju drastične promjene zbog diferencijacije epidermalnog sloja. Škrobne granule se još više povećavaju, vakuole unutrašnjeg epidermalnog sloja se podijele na više manjih, a stanice tog sloja se pritišću u uz vanjski epidermalni sloj (Windsor i sur., 2000). Stanice vanjskog epidermalnog sloja stvaraju i izlučuju mucilago, te poprimaju karakterističan oblik kolumele.

Pet strukturnih gena je uključeno u sintezu i izlučivanje mucilaga, a to su *MUCILAGE MODIFIED (MUM)* geni (Haughn i Chaudhury, 2005). Za *MUM1* se mislilo da je strukturni gen, ali se nedavno ustanovilo da je njegov produkt transkripcijski faktor pod njegovom je barem djelomičnom kontrolom ekspresija gena *MUM2* (Huang i sur., 2011). Mutanti *mum2* imaju nedostatak razgranatog ramnogalakturonana I, koji je glavni sastojak mucilaga (Dean i sur., 2007). Za *MUM2* je poznato da je  $\beta$ -galaktozidaza čija je aktivnost potrebna za izbacivanje mucilaga prilikom hidracije, ali nije poznato koji polisaharidi su njezini supstrati. *MUM3* i *MUM5* su još neistraženi geni, a jedino što se zna o njihovoj ulozi je da su bitni za biosintezu polisaharida uključenih u izgradnju mucilaga. Nije poznato jesu li strukturni geni i njihovi produkti izravno sudjeluju u biosintezi ili je riječ o transkripcijskim faktorima koji kontroliraju taj proces (Western i sur., 2001). *MUM4* kodira sintazu UDP-L-ramnoze (Western i sur., 2004, Arsovski i sur., 2009), te je na taj način izravno uključeno u proces biosinteze ramnogalakturonana I. Poznato je i nekoliko gena čije mutacije u dvostrukim mutantima s *mum4* daju pojačan fenotip. To su *MEN1*, *MEN2*, *MEN4*, *MEN5* i *MEN6*, čija uloga još uvijek nije razjašnjena. Poznato je da su *MEN1*, *MEN4* i *MEN5* uključeni u sintezu i/ili izlučivanje mucilaga, dok *MEN2* i *MEN6* imaju ulogu u otpuštanju mucilaga prilikom hidracije sjemenki (Arsovski i sur., 2009).

Kontrola strukturnih gena uključenih u sintezu, izlučivanje i otpuštanje mucilaga još uvijek nije do kraja razjašnjena. Sigurno je da su u to uključeni *AP2*, *TTG1*, *GL2*, *EGL3* i/ili *TT8*, *TTG2*, *MYB5* i/ili *TT2*, te prethodno spomenuti *MUM1*. *AP2* i *TTG1* kompleks (sl. 6.) zajednički djeluju u glavnom putu kontrole. *TTG1* proteinski kompleks i njegovi produkti gena *TTG1*, *EGL3* i *MYB5*. *EGL3* je djelomično podudaran *TT8* produktu, a *MYB5* *TT2* produktu,

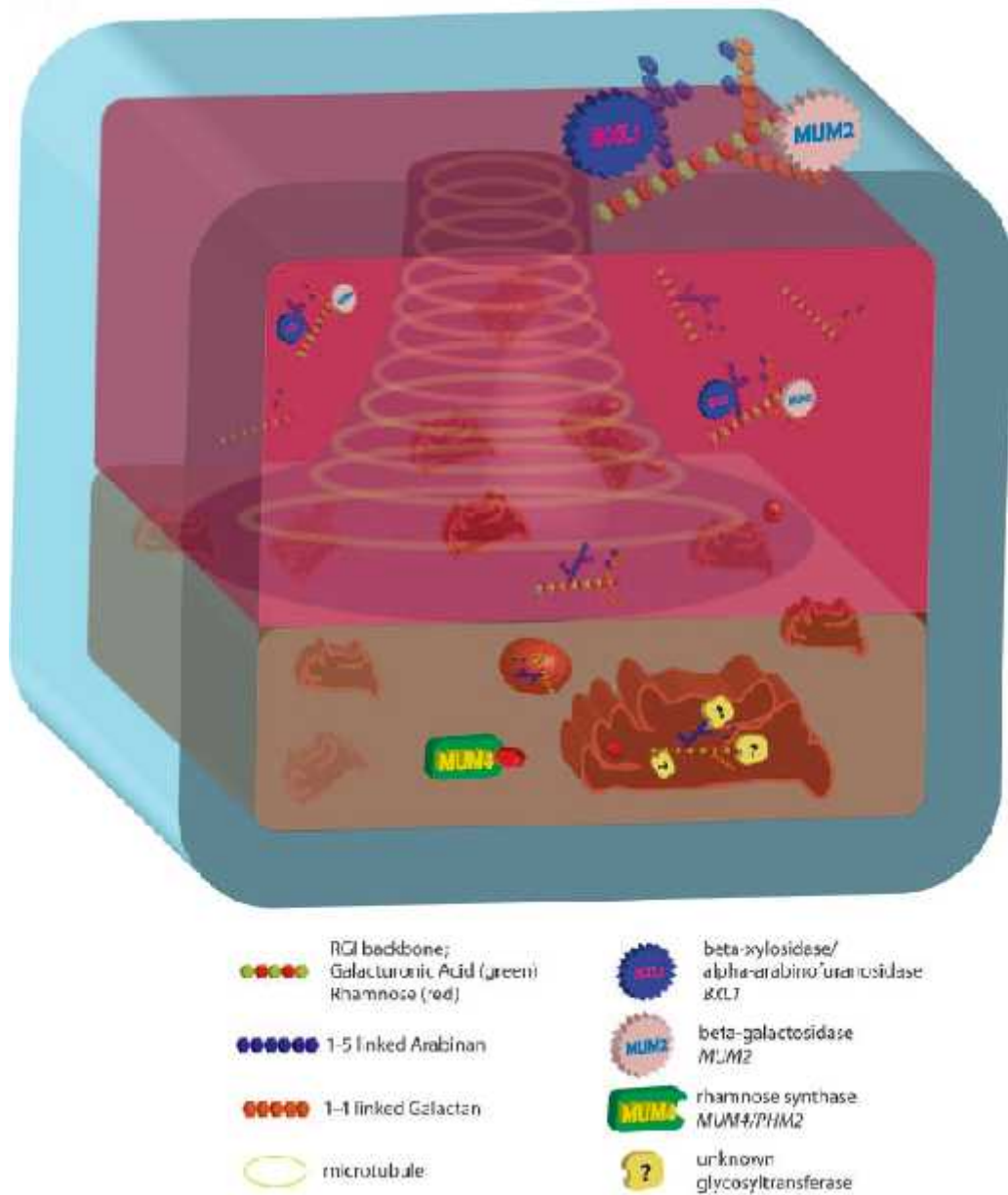
koji su prethodno spomenuti u kontroli biosinteze PA (Huang i sur., 2011, Haughn i Chaudhury, 2005). GL2 i TTG2 djeluju nizvodno od TTG1 kompleksa, pod njegovom kontrolom. Za GL2 je poznato da kontrolira ekspresiju *MUM4*, dok TTG2 djeluje na *MUM* gene na još nepoznat način. Alternativni put kontrole predstavlja MUM1, koji izravno djeluje na ekspresiju *MUM2* gena. Za TTG1 kompleks još uvijek nije ustanovljeno djeluje li izravno na ekspresiju *MUM2* ili ne (sl. 6., iscrtkana strjelica) (Huang i sur., 2011).



Adapted from Western et al.(2004), Gonzalez et al.(2009) and Li et al.(2009)

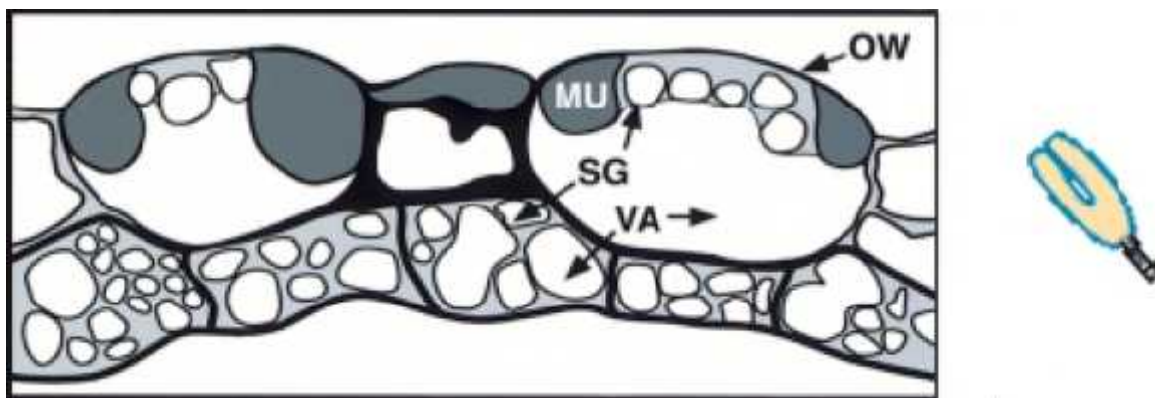
**Slika 6.** Regulatorni put biosinteze mucilaga i razvoja sjemene lupine. Kontrola biosinteze i izluka ivanjanja kontrolirana je TTG1 kompleksom transkripcijskih faktora u kombinaciji s AP2, te MUM1 transkripcijskim faktorom. Pretpostavljeni put regulacije prikazan je iscrtkanom strjelicom. Preuzeto iz Huang i sur., 2011.

Na sl. 7. vidljiv je utjecaj sinteze i izluka ivanjanja mucilaga na izgled stanice. Dramatične promjene kreću se još u stadiju 2 s razmještanjem GK, te njegovim promjenama. Cisterne GK se skraćuju i povećavaju promjer, što je posljedica pojačane produkcije mucilaga (Arsovski i sur., 2010). Zbog usmjerenog izluka ivanjanja mucilaga u apoplast, citoskeletni elementi organiziraju GK i vezikule u formaciju nalik vulkanu (sl. 7.) zbog čega se mucilago u apoplast izluka uje u prstenasti džep koji okružuje „vulkan“.



**Slika 7.** Prikaz stanice koja izlučuje mucilago. Ispod sheme stanice je legenda s enzimima i polisaharidima koji su prikazani. GK poslagani u obliku vulkana, a vakuola u stanici više nema. Unutar GK sintetiziraju i doručuju se polisaharidi, koji se potom sekretornim vezikulima usmjereno izlučuju u apoplast. Prilagođeno na temelju Arsovski i sur., 2010.

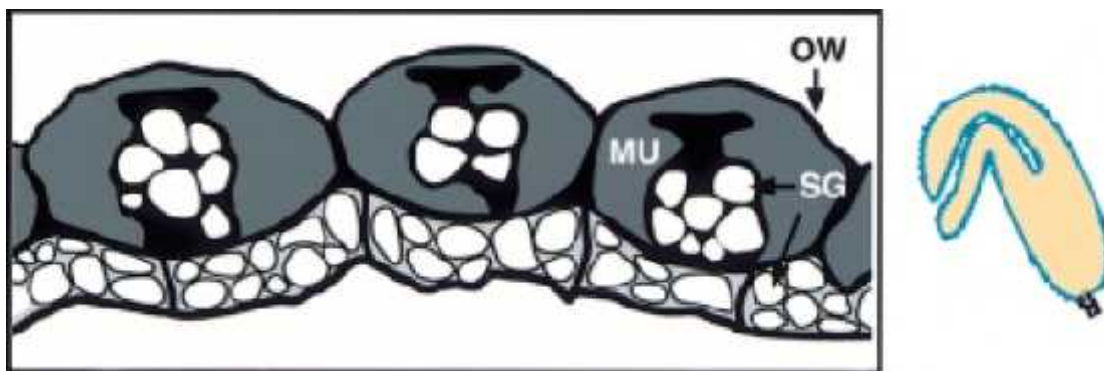
Ovaj ključni stadij razvoja sjemene lupine evidentan je i u unutrašnjem epidermalnom sloju. Ondje se nastavlja sinteza škroba i njegovo pohranjivanje u obliku škrobnih zrnaca, a osim toga u stanicama se vakuole razbijaju na veći broj manjih vakuola (sl. 8.) (Windsor i sur., 2000).



**Slika 8.** Shematski prikaz stanica epidermalnog sloja sjemene lupine u stadiju 3. S desne strane je prikaz stadija u kojem se nalazi embrij. OW, tanka vanjska stani na stijenka; SG, škrobna zrnca; VA, vakuola. Prilago eno na temelju Windsor i sur., 2000.

### 3.4. Stadij 4 – stadij zrelog kotiledonarnog embrija

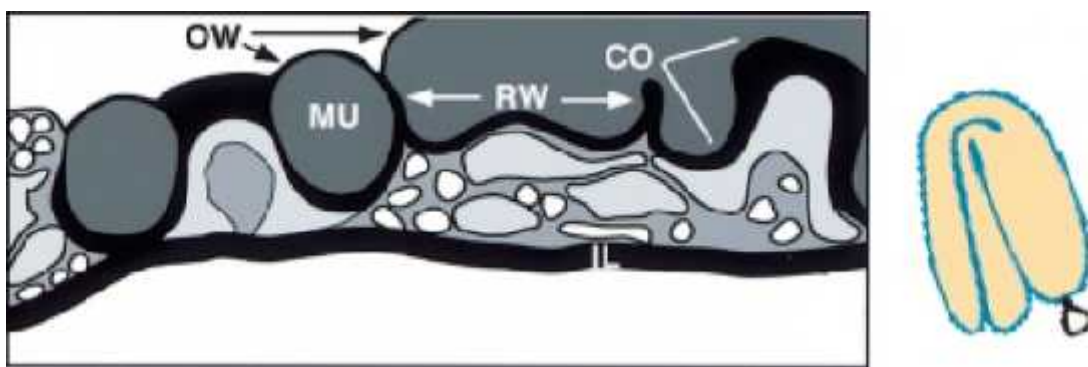
Produkcija i izlu ivanje mucilaga do ovog stadija su završeni i potrebne su još samo manje dorade diferencijacijskog procesa. Vakuola u stanicama vanjskog epidermalnog sloja više nema, jer je prilikom sinteze i izlu ivanja mucilaga bio potreban prostor za slaganje GK u „vulkan“. Taj proces je formirao karakteristi ne stanice, na kojima se još samo treba stvoriti sekundarna stani na stijenka. Zbog toga što kontakt izme u stani ne membrane i primarne stani ne stijenke postoji samo u središtu vanjske stijenke, stanice vanjskog epidermalnog sloja zadržavaju izgled koji su poprimile izlu ivanje mucilaga (Windsor i sur., 2000). Takav izgled naziva se kolumela (sl 9.). Škrobna zrnca se razgra uju u oba sloja, ime se osloba aju gra evne jedinice za polisaharide sekundarnih stijenki. Unutrašnji epidermalni sloj se zbog rasta endosperma i embrija pritiš e, kao i dva vanjska sloja endotelija koja su prošla kroz programiranu stani nu smrt u stadiju 1.



**Slika 9.** Shematski prikaz stanica epidermalnog sloja sjemenke lupine u stadiju 4. S desne strane je prikaz stadija u kojem se nalazi embrij. MU, mucilago; OW, tanka vanjska stani na stijenka; SG, škrobna zrnca. Prilago eno na temelju Windsor i sur., 2000.

### 3.5. Stadij 5 – zrela isušena sjemenka

U posljednjem stadiju razvoja, sekundarna stani na stijenka završava svoju sintezu, te je sada obložila epidermalni sloj s vanjske i unutrašnje strane (sl. 10.). Škrobnih zrnaca u stanicama više nema, a endotelij i unutrašnji epidermalni sloj su potpuno potisnuti i uništeni rastom embrija (Windsor i sur., 2000). Sjemenka lupina je u potpunosti diferencirana i svedena na jedan, vanjski epidermalni sloj. U unutrašnjosti zbog pucanja stanica endotelija prilikom kompresije dolazi do otpuštanja i oksidacije PA, zbog ega zrela sjemenka poprima sme u boju. Mucilago koji je izlu en izme u primarne stani ne stijenke i stani ne membrane sada se isušuje. Prilikom dodatka vode dolazi do imbibicije, te se mucilago otpušta i okruži sjemenku (sl. 10., desni dio).



**Slika 10.** Shematski prikaz stanica epidermalnog sloja sjemenke lupine u stadiju 5. S desne strane je prikaz stadija u kojem se nalazi embrij. CO, kolumela; IL, unutrašnji epidermalni sloj; MU, mucilago; OW, tanka vanjska stani na stijenka;. Prilago eno na temelju Windsor i sur., 2000.

## 4. Zaključak

Razvoj sjemene lupine je vrlo dinamičan proces, koji uključuje procese diferencijacije pri kojima gotovo svaki sloj integumenata ima vlastitu sudbinu. Na primjeru uro njaka vidljivo je da pojedini geni koji su aktivni u više različitih biljnih tkiva, u određenim uvjetima i kombinacijama s ekspresijom drugih gena uključeni u kontrolu razvoja, daju sasvim drugačije rezultate. Primjer toga je *GL2* (*GLABRA 2*), koji sudjeluje u razvoju trihoma, korjenovih dlačica, te regulaciji sadržaja ulja u sjemenkama. *TTG1*, *TTG2*, *TT8* i *TT2* su spomenuti tijekom diferencijacije endotelija i epidermalnog sloja, jer mogu sudjelovati u kontroli diferencijacije oba sloja.

Tijekom razvoja sjemene lupine, od pet slojeva koji okružuju ovojne listove ostaje samo jedan, okružen sekundarnim staničnim stijenkama koje jako dobro štite embrij i endosperm. Zbog nepropusnosti sekundarnih staničnih stijenki, ali i drastičnih promjena u jedinom preostalom sloju stanica prilikom sinteze i izlučivanja mucilaga, te stanice umiru. PA iz endotelija, kao i flavonoidi iz unutrašnjeg epidermalnog sloja, pružaju dodatnu zaštitu, pojačavaju nepropusnost sjemene lupine, a mogu i spriječiti daljnji rast stanica. Mucilago je također jedan oblik zaštite sjemenke, a poznato je i da se, ukoliko nastanu sušni uvjeti, on ponovno vraća u isušeno stanje i tvori tanki sloj na površini kolumele.

U razvoju sjemene lupine još uvijek postoje nerazjašnjene funkcije gena. Negdje su to transkripcijski faktori, čije se mete djelovanja još uvijek traže, a negdje strukturni geni koji sudjeluju izravno u procesima biosinteze. Još je uvijek nepoznat točan način i komunikacije između endosperma i ovojnih listova nakon oplodnje i kakva je priroda signala za poticanje diferencijacije. Osim toga, neistražen je ostao i način odlaganja PA u vakuole stanica endotelija.

Sustav razvoja sjemene lupine može poslužiti kao dobar modelni sustav za istraživanje programirane stanične smrti, kroz koju prolaze stanice vanjskih slojeva unutrašnjeg integumenta. Izlučivanje mucilaga na specifičan način tako je dobar model za proučavanje, ali u ovom slučaju usmjerene sekrecije tvari iz biljnih stanica. Ovaj sustav, stoga, ima dobru perspektivu u biljnoj razvojnoj biologiji, kao i u staničnoj biologiji.



## 5. Literatura

- Appelhagen I., Lu G., Hup G., Schmelzer E., Weisshaar B., Sagasser M., 2011. TRANSPARENT TESTA1 interacts with R2R3-MYB factors and affects early and late steps of flavonoid biosynthesis in the endothelium of *Arabidopsis thaliana* seed. *The Plant Journal* **67**, 406–419.
- Arsovski A.A., Haughn G.W., Western T.L., 2010. Seed coat mucilage cells of *Arabidopsis thaliana* as a model for plant cell wall research. *Plant Signaling & Behavior* **5:7**, 796–801.
- Arsovski A.A., Villota M.M., Rowland O., Subramaniam R., Western T.L., 2009. MUM ENHANCERS are important for seed coat mucilage production and mucilage secretory cell differentiation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2601–2612.
- Baudry A., Caboche M., Lepiniec L., 2006. TT8 controls its own expression in a feedback regulation involving TTG1 and homologous MYB and bHLH factors, allowing a strong and cell-specific accumulation of flavonoids in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **46**, 768–779.
- Baudry A., Heim M.A., Dubreucq B., Caboche M., Weisshaar B., Lepiniec L., 2004. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **39**, 366–380.
- Dean G.H., Zheng H., Tewari J., Huang J., Young D.S., Hwang Y.T., Western T.L., Carpita N.C., McCann M.C., Mansfield S.D., Haughn G.W., 2007. The *Arabidopsis* MUM2 gene encodes a  $\beta$ -galactosidase required for the production of seed coat mucilage with correct hydration properties. *The Plant Cell* **19**, 4007–4021.
- Debeaujon I., Lepiniec L., Pourcel L., Routaboul J., 2007. Seed coat development and dormancy. U: Seed Development, Dormancy and Germination, Annual Plant Reviews, Volume 27. Ed. K. Bradford, H. Nonogaki, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 25–49.
- Garcia D., Fitz Gerald J.N., Berger F., 2005. Maternal control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to determine seed size in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**, 52–60.
- Garcia D., Saingery V., Chambrier P., Mayer U., Jurgens G., Berger F., 2003. *Arabidopsis haiku* mutants reveal new controls of seed size by endosperm. *Plant Physiology* **131**, 1661–1670.
- Haughn G.W., Western T.L., 2012. *Arabidopsis* seed coat mucilage is a specialized cell wall that can be used as a model for genetic analysis of plant cell wall structure and function. *Frontiers in Plant Science* **3**, 64.

- Haughn G.W., Chaudhury A., 2005. Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. *TRENDS in Plant Science* **10**, 10.
- Huang J., DeBowles D., Esfandiari E., Dean G., Carpita N.C., Haughn G.W., 2011. The *Arabidopsis* transcription factor LUH/MUM1 is required for extrusion of seed coat mucilage. *Plant Physiology* **156**, 491–502.
- Johnson C.S., Kolevski B., Smyth D.R., 2002. *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *The Plant Cell* **14**, 1359–1375.
- Marles M.A.S., Ray H., Gruber M.Y., 2003. New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry* **64**, 367–383.
- Nakaune S., Yamada K., Kondo M., Kato T., Tabata S., Nishimura M., Hara-Nishimura I., 2005. A Vacuolar Processing Enzyme, VPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *The Plant Cell* **17**, 876–887.
- Nesi N., Debeaujon I., Jond C., Stewart A.J., Jenkins G.I., Caboche M., Lepiniec L., 2002. The *TRANSPARENT TESTA16* locus encodes the ARABIDOPSIS BSISTER MADS domain protein and is required for proper development and pigmentation of the seed coat. *The Plant Cell* **14**, 2463–2479.
- Nesi N., Jond C., Debeaujon I., Caboche M., Lepiniec L., 2001. The *Arabidopsis* *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *The Plant Cell* **13**, 2099–2114.
- Nesi N., Debeaujon I., Jond C., Pelletier G., Caboche M., Lepiniec L., 2000. The *TT8* gene encodes a basic Helix-Loop-Helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis* siliques. *The Plant Cell* **12**, 1863–1878.
- Pourcel L., Routaboul J., Kerhoas L., Caboche M., Lepiniec L., Debeaujon I., 2005. *TRANSPARENT TESTA10* encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *The Plant Cell* **17**, 2966–2980.
- Schneitz K., Hülkamp M., Pruitt R.E., 1995. Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *The Plant Journal* **7** (5), 731–749.
- Wang A., Garcia D., Zhang H., Feng K., Chaudhury A., Berger F., Peacock W.J., Dennis E.S., Luo M., 2010. The VQ motif protein IKU1 regulates endosperm growth and seed size in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **63**, 670–679.
- Western T.L., Young D.S., Dean G.H., Tan W.L., Samuels A.L., Haughn G.W., 2004. *MUCILAGE-MODIFIED4* encodes a putative pectin biosynthetic enzyme developmentally regulated by *APETALA2*, *TRANSPARENT TESTA GLABRA1*, and *GLABRA2* in the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiology* **134**, 296–306.
- Western T.L., Burn J., Tan W.L., Skinner D.J., Martin-McCaffrey L., Moffatt B.A., Haughn G.W., 2001. Isolation and characterization of mutants defective in seed coat mucilage secretory cell development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**, 998–1011.
- Western T.L., Skinner D.J., Haughn G.W., 2000. Differentiation of mucilage secretory cells of the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiology* **122**, 345–355.

Windsor B.J. Symonds V.V., Mendenhall J., Lloyd A.M., 2000. *Arabidopsis* seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *The Plant Journal* **22**(6), 483-493.

## 6. Sažetak

Razvoj sjemene lupine najbolje je istražen u vrste *A. thaliana*. Razvoj sjemene lupine iz vanjskih i unutarnjih ovojnih listova sjemenog zametka po inje nakon oplodnje, a signal za po etak dolazi iz endosperma. Proces se temelji na diferencijaciji, te u maloj mjeri na rastu stanica. Vanjski ovojni list se diferencira u epidermalni sloj, dok od unutrašnjeg nastaje endotelij. Stanice epidermalnog sloja sintetiziraju i izluuju mucilago, a u kasnijim stadijima razvoja stvaraju sekundarne stanice stijenke. Mucilago prekriva površinu zrele sjemenke, a u doticaju s vodom dolazi do imbibicije i mucilago se otpušta, te okruži sjemenku. Tijekom sinteze i izluivanja mucilaga unutrašnjost vanjskog epidermalnog sloja poprima oblik vulkana, što se odražava i u vanjskom izgledu stanica. U stanicama unutrašnjeg sloja endotelija se sintetiziraju proantocijanidini (PA), koji nakon oksidacije u zreloj sjemenci poprimaju smeću boju. Vanjska dva sloja unutrašnjeg ovojnog lista u ranijim stadijima razvoja prolaze kroz programiranu smrt stanica. Zbog rasta embrija i endosperma u unutrašnjosti sjemenke, svi slojevi osim vanjskog epidermalnog se potisnu i unište.

Razvoj sjemene lupine predstavlja dobar model za proučavanje programirane stanice smrti, te usmjerenog izluivanja tvari iz biljnih stanica. Ovo područje razvojne biologije biljaka stavlja znanstvenike pred brojne izazove, od određivanja puteva kontrole diferencijacijskih procesa, do otkrivanja funkcija strukturnih gena.

## 7. Summary

Seed coat development is best described for *Arabidopsis thaliana*. Development of a seed coat from two ovule integuments starts right after fertilization. Signal for this process comes from an endosperm. Changes occurring during seed coat development are based on differentiation and, to a small degree, on cell elongation. Outer integument differentiates into epidermal layer, while the inner becomes endothelium. Cells of the epidermal layer synthesize and secrete mucilage and, at late stages, secondary cell walls. Mucilage covers the surface of a mature seed, thus in contact with water it can imbibe and be released. During mucilage synthesis and secretion the cell interior is volcano-shaped, which is evident on the outside. Cells of the innermost endothelium layer synthesize proanthocyanidins (PA), which oxidize at late stages of development and turn from colourless into brown. Two outer layers of the inner integument go through programmed cell death (PCD) in early stages. Growth of embryo and endosperm causes all layers except the outermost to compress and break.

Seed coat development can serve as an excellent model for PCD research, as well as for targeted secretion. This area of plant developmental biology is still challenging, since differentiation control pathways and some structural gene functions still have to be elucidated.