

# Razvoj sjemene lupine

---

Šola, Krešimir

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2012**

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:159353>

Rights / Prava: [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI 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 Leljak-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. Zaklju ak .....	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 rasprostranjanje.

Sjemena lupina nastaje iz ovojnih listova sjemenog zametka, a uvezši to u obzir, ona e biti jedini dio sjemenke podrijetlom isklju ivo od mati ne biljke i ne sadrži 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***

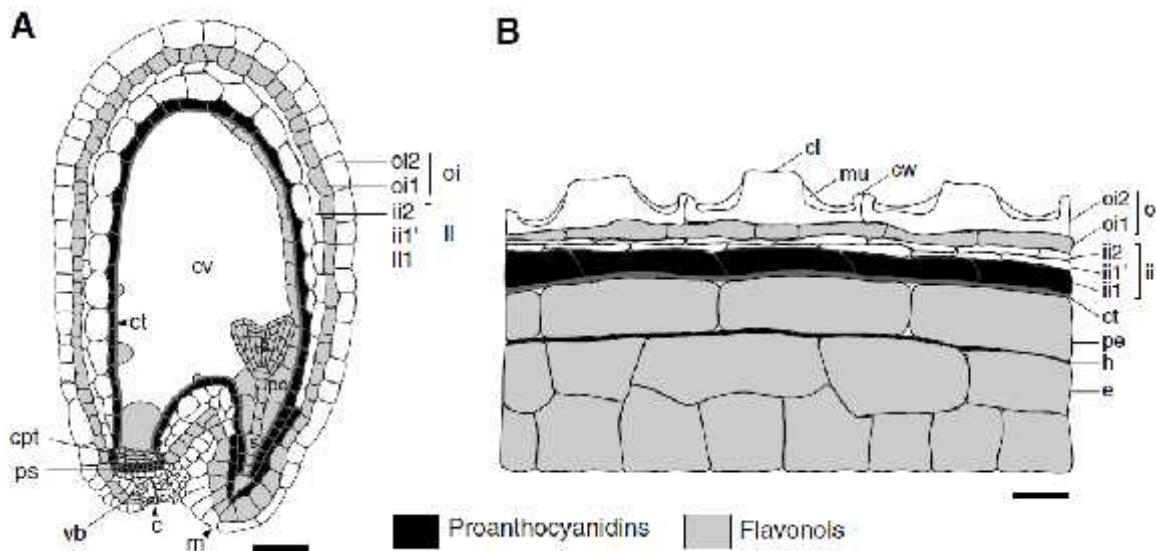
Sjemeni zametci kod roda *Arabidopsis* imaju dva ovojna lista – vanjski, koji je građen iz dva sloja stanica, i unutrašnji koji je građen iz tri sloja stanica. Oba ovojna lista su podrijetlom od L1 sloja apikalnog meristema, a nastaju prilikom rasta sjemenog zametka iz epidermalnog sloja (Schneitz i sur., 1995). Sjema lupina 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 prihvatanja funikulusa za sjemeni zametak, a time i mjesto na kojem dolaze sjemenog zametka provodne žile (Debeaujon i sur., 2007).

Unutrašnji slojevi sjemene lupine razvijaju se iz unutrašnjeg ovojnog lista, a zajedno s njim 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 smeđu 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 uništite. Ta dva sloja su ujedno i prvi koji prolaze kroz programiranu stanicu smrt (PCD) (Haughn i Chaudhury, 2005).

Vanjski slojevi sjemene lupine se razvijaju iz vanjskog ovojnog lista i zajedno s njim je epidermalni sloj. Taj sloj prolazi kroz drastične procese diferencijacije, koji uključuju izlučivanje mucilaga, sinteze sekundarnih staničnih stijenki i uništenje stanica unutrašnjeg sloja (sl. 1A i B; iii1). Mucilago su hidrofilni polisaharidi koji se iz stanica vanjskog epidermalnog sloja (sl. 1A i B; iii2) izlučuju između stanične membrane 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 klijanje, šiti sjemenku od toksičnih tvari iz okoliša (Haughn i Chaudhury, 2005). Golijev kompleks (GK), koji putem vezikula u apoplast izbacuje mucilago, se tijekom tog izlivaivanja prošititi itavim 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 usmjerjenog izlivaivanja 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. I A i B; oi1) je u kasnijim fazama razvoja sintetizirati sekundarnu stanicu na stijenku prema unutrašnjosti sjemenke (Debeaujon i sur., 2007), a osim toga u njima se odvija i sinteza flavonola koji su bezbojni do brijedozuti (Pourcel i sur., 2005).

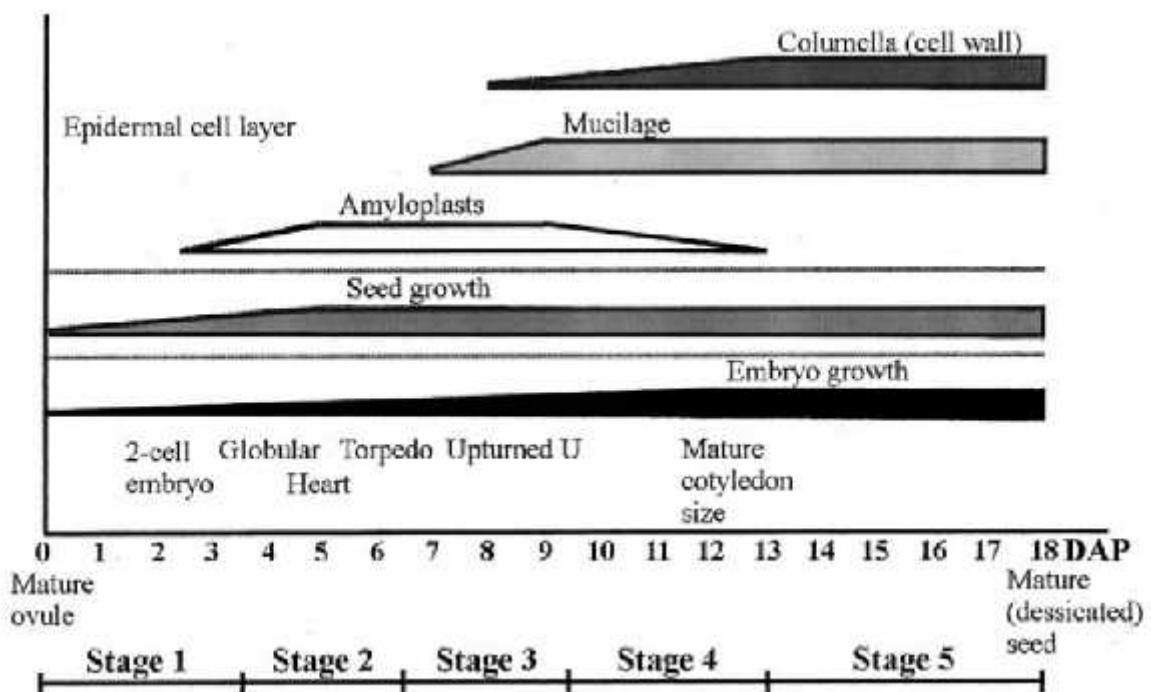
Svi navedeni procesi se odvijaju u svrhu zaštite embrija. Dva sloja debele sekundarne stanične stijenke sjemenci daju vrsto u, zaštitu i nepropusnost za vodu i kisik (Haughn i Chaudhury, 2005), što je bitno i za dormanciju sjemenke. Pretpostavlja se da PA, mucilago i sekundarna stanicna stijenka zajedno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



**Slika 1.** Prikaz strukture sjemene lupine i mesta sinteze pojedinih skupina spojeva u sjemenci vrste *A. thaliana*. (A) Anatomija sjemene dok je embryo u srodkom stadiju. (B) Poprečni presek kroz sjemenu lupinu zrele sjemenke. Kratice: c, halaza; cl, kolumela; cpt, nucel; ct, kutikula; cv, centralna vakuola; cw, stanična stijenka; e, embrij; h, hijalinski 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 razvojnom procesu, tako i prilikom razvoja sjemene lupine, aktivnost gena u odre eno vrijeme na odre enom mjestu odre uje tijek tog procesa. Tijekom razvoja sjemene lupine, bitnom se pokazala i interakcija izme u endosperma i integumenta, a kasnije endosperma i sjemene lupine (Haughn i Chaudhury, 2005). Budu i da je vremenski period od oplodnje u sjemenci najuo ljudi 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 obično podijeljeni u pet stadija (Western i sur, 2000; Windsor i sur., 2000), koji idu od samog rasta stanica, preko stvaranja amiloplasta, do izlučivanja mucilaga i stvaranja sekundarne stijenke (sl. 2.).



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

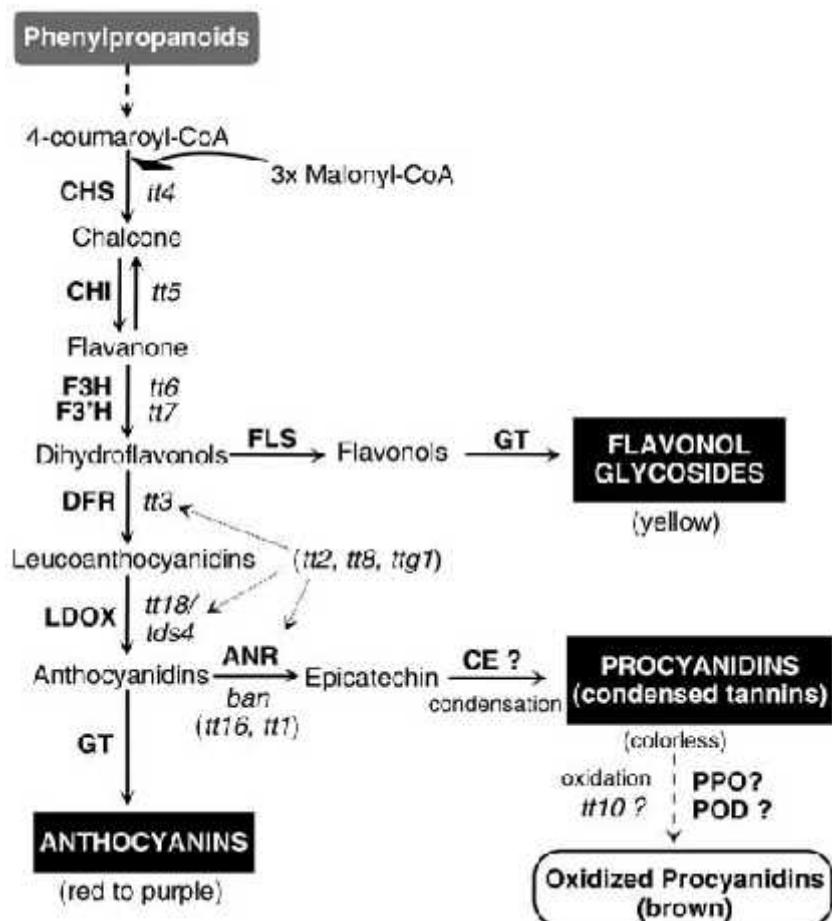
### **3.1. Stadij 1 – razvoj od dvostaničnog do globularnog embrija**

Razvoj sjemene lupine zapo inje tek nakon što stanice integumenta nakon oplodnje dobiju signal. Budu i da ovojni listovi nisu izravno uklju eni u proces oplodnje, signal treba do i iz endosperma (Haughn i Chaudhury, 2005). Mutanti koji pokazuju slabiji rast sjemenki ukazuju na to da su u kontrolu veli ine sjemenke uklju eni geni *HAIKU1* (*IKU1*) i *HAIKU2* (*IKU2*) (Garcia i sur., 2003). Spomenuti mutanti imaju smanjen endosperm, oslabljelu proliferaciju stanica embrija, te smanjenu elongaciju stanica ovojnih listova. *IKU* geni na rast stanica najvjerojatnije djeluju neposredno, tako što omogu uju rast endosperma koji e tjerati stanice integumenata 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 uklju eni brojni geni, iji mutanti daju bezbojne sjemenke, prema emu 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). Sljede i 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 ijom 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 iji 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 odre enih produkata tanina u stijenci koji smanjuju nlost elongacije (Garcia i sur., 2005).

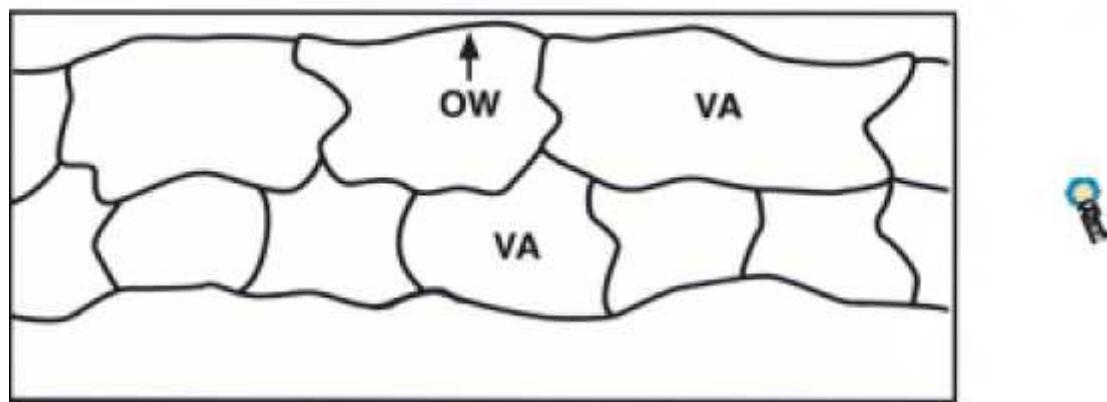
Pokazalo se da TT8 i TT2 mogu samostalno djelovati na ekspresiju prethodno navedenih gena, ali u stanici stvaraju proteinske komplekse (Baudry i sur., 2004). Budu i da se pokazalo da TT2 i TT8 mogu obavljati funkciju transkripcijskog kompleksa i bez *TTG1*, o kojem ovisi njihova aktivnost, najvjerojatnije je da su ekspresija *TT2* i *TT8* pod kontrolom *TTG1* (Baudry i sur., 2004). Ekspresija *TT2* je ograni ena na stanice endotelija, dok to nije slu aj s *TT8* i *TTG1* (Nesi i sur., 2001). S obzirom da je ekspresija *TT2* ujedno i vremenski ograni ena na period unutar kojeg se odvija biosinteza PA, TT2 se može smatrati klju nim 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 stanicu smrt još u ovoj, ranoj fazi razvoja. U tom procesu je ključan VPE (vacuolar processing enzyme), ijom se aktivnošć u stanice tih dva sloja smanjuju 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 prsnog pod mehaničkim pritiskom iz unutrašnjosti (Nakaune i sur., 2005).

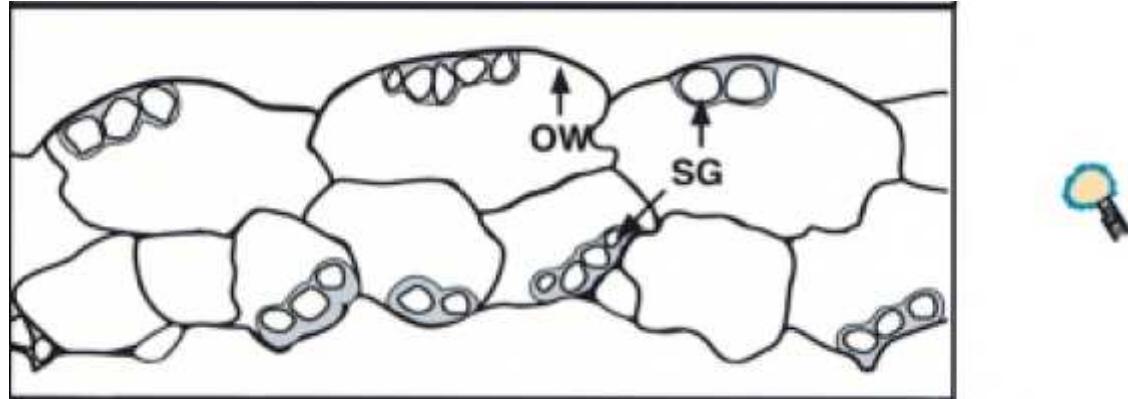
Epidermalni sloj sjemene lupine ne prolazi kroz znatne promjene kao što je toj slučaj s endotelijem. Stanice su ispunjene velikim vakuolama i još se ne naziru promjene (sl. 4.) (Windsor i sur., 2000).



**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 stana na 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 će biti bitno prilikom sinteze i izlivanja mucilaga pomoću Golgijevog kompleksa (GK). Bitna stvar za razvoj sjemene lupine je uspostava različitih puteva diferencijacije između dvaju epidermalnih slojeva (Windsor i sur., 2000). Gen za koji je poznato da je aktiviran u ovom stadiju je *APETALA 2* (*AP2*) (Western i sur., 2001). Nije poznato ostaje li *AP2* aktiviran još od razvoja sjemenog zametka ili se nanovo aktivira u ovome stadiju. Sigurno je to da on određuje slijed diferencijacije dvaju slojeva epidermalnog sloja tijekom stadija 3 (Western i sur., 2001).



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

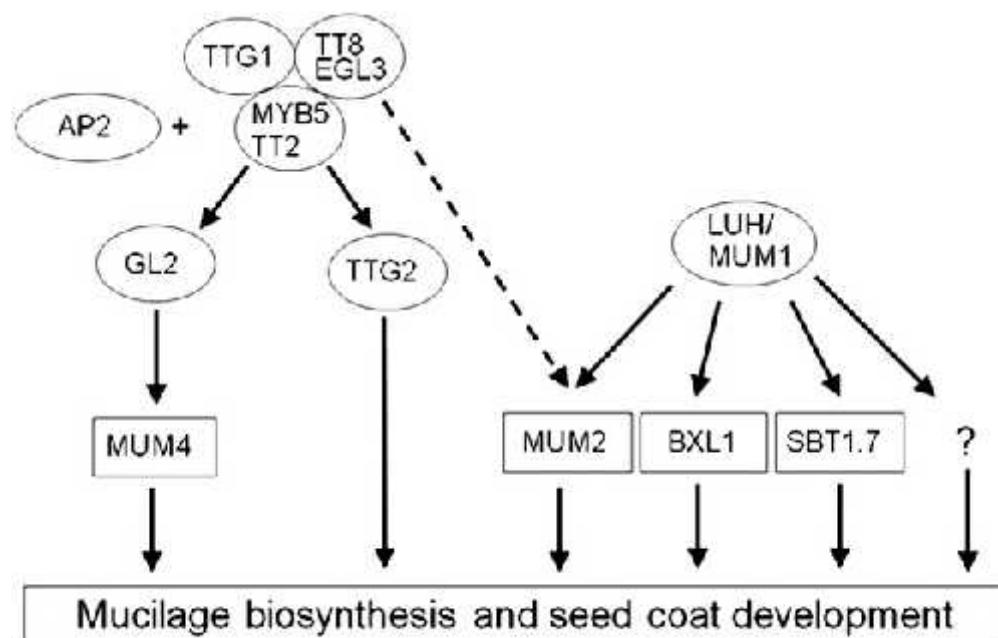
### **3.3. Stadij 3 – stadij torpednog i ranog kotiledonarnog embrija**

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 same stanice tog sloja se pritišu uz vanjski epidermalni sloj (Windsor i sur., 2000). Stanice vanjskog epidermalnog sloja stvaraju i izlučuju mucilagu, te poprimaju karakterističan oblik kolumele.

Pet strukturnih gena je uključeno u sintezu i izlučivanju mucilage, 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 kontrolom ekspresije gena *MUM2* (Huang i sur., 2011). Mutanti *mum2* imaju nedostatak razgranatog ravnogalakturonana I, koji je glavni sastojak mucilaga (Dean i sur., 2007). Za *MUM2* je poznato da je -galaktozidaza koja 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 iji proizvodi 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 uključen u proces biosinteze ravnogalakturonana I. Poznato je i nekoliko gena koji imaju mutacije u dvostrukim mutantima s *mum4* dajući pojavu fenotipa. To su *MEN1*, *MEN2*, *MEN4*, *MEN5* i *MEN6*, a njihova uloga još uvijek nije razjašnjena. Poznato je da su *MEN1*, *MEN4* i *MEN5* uključeni u sintezu i/ili izlučivanju 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.) zajedno djeluju u glavnom putu kontrole. *TTG1* proteinski kompleks ima proizvode gena *TTG1*, *EGL3* i *MYB5*. *EGL3* je djelomično podudaran *TT8* produktu, a *MYB5* *TT2* produktu,

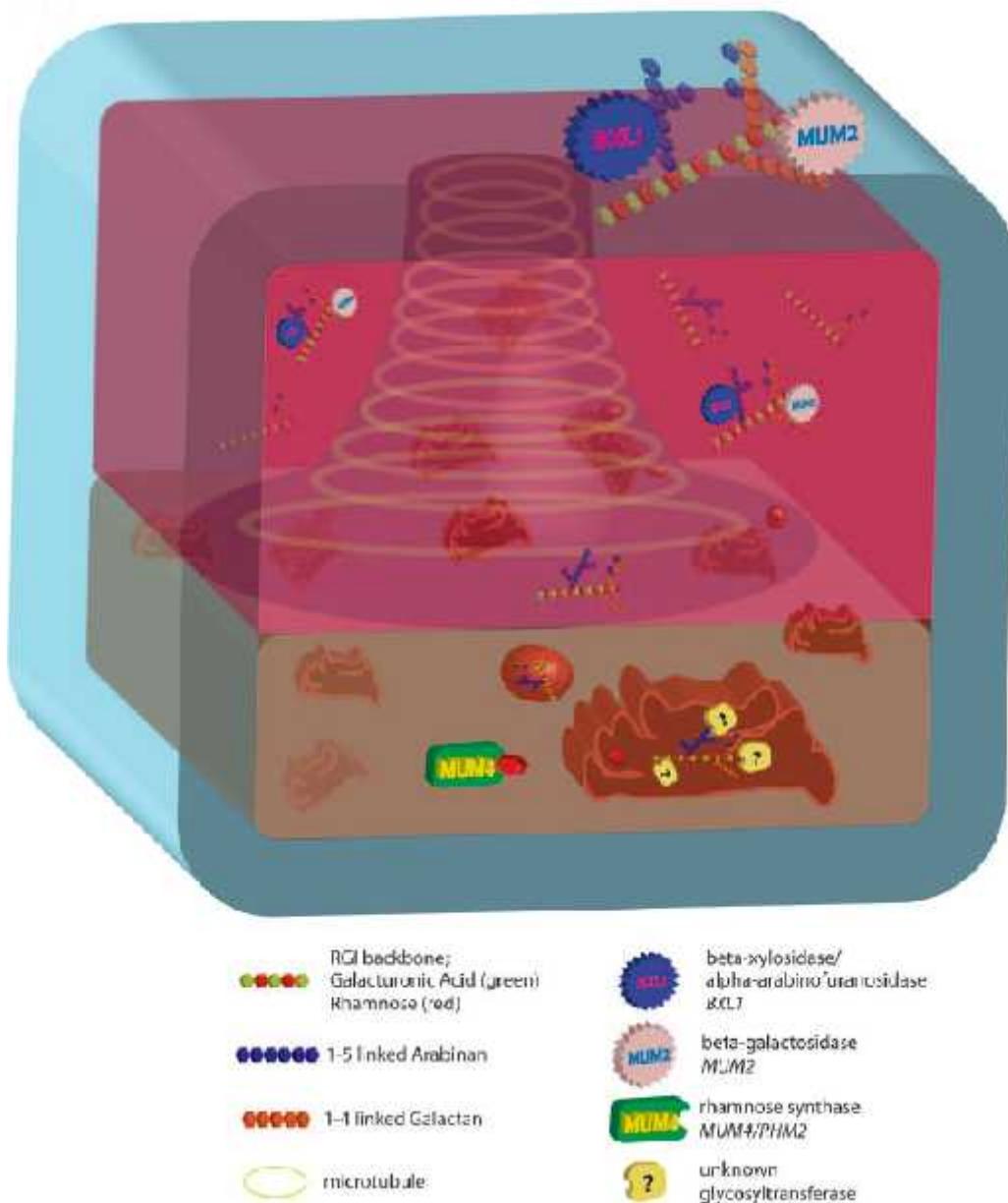
koji su prethodno spomenuti u kontroli biosinteze PA (Huang i sur., 2011, Haughn i Chaudhury, 2005). GL2 i TTG2 djeluju nizvodno od TTG1 kompleksa, pod njom su kontrolom. Za GL2 je poznato da kontrolira ekspresiju *MUM4*, dok TTG2 djeluje na *MUM* gene na još nepoznat način. Alternativni put kontrole 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)

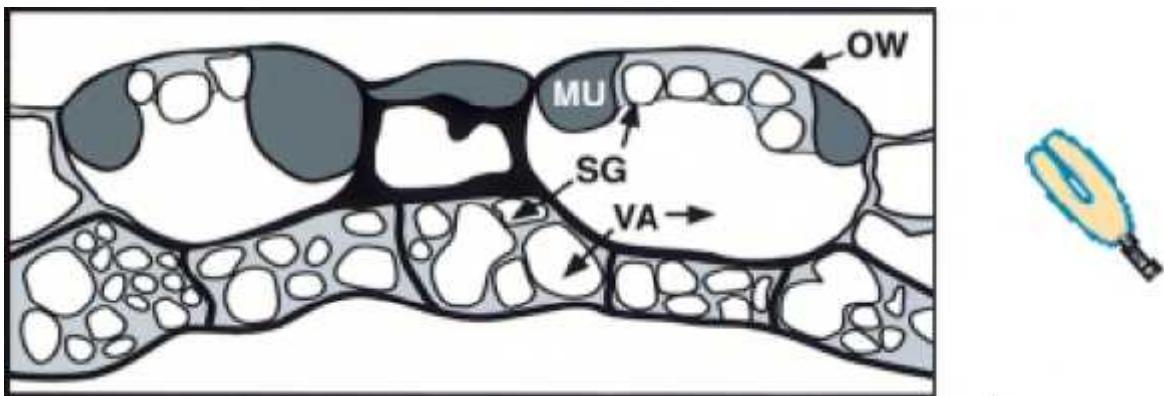
**Slika 6.** Regulatorni put biosinteze mucilaga i razvoja sjemene lupine. Kontrola biosinteze i izliva ivanja kontrolirana je TTG1 kompleksom transkripcijskih faktora u kombinaciji s AP2, te MUM1 transkripcijskim faktorom. Prepostavljeni put regulacije prikazan je iscrtkanom strjelicom. Preuzeto iz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

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



**Slika 7.** Prikaz stanice koja izlu uje mucilago. Ispod sheme stanice je legenda s enzimima i polisaharidima koji su prikazani. GK poslagani u obliku vulkana, a vakuola u stanicici više nema. Unutar GK sintetiziraju i dora uju se polisaharidi, koji se potom sekretornim vezikulima usmjereni izlu uju u apoplast. Prilago eno na temelju Arsovski i sur., 2010.

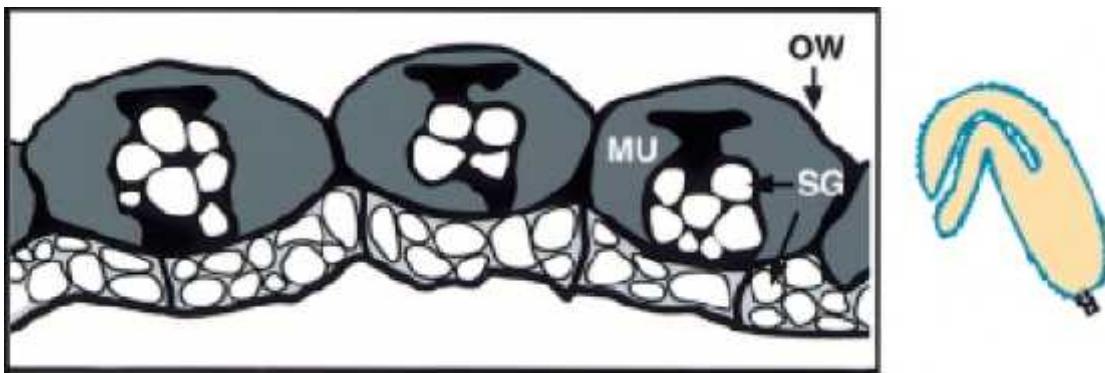
Ovaj ključni stadij razvoja sjemene lopine evidentan je i u unutrašnjem epidermalnom sloju. Ondje se nastavlja sinteza škroba i njegovo pohranjivanje u obliku škrobnih zrnaca, a osim toga u stanicama se vakuole razbijaju na veći broj manjih vakuola (sl. 8.) (Windsor i sur., 2000).



**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

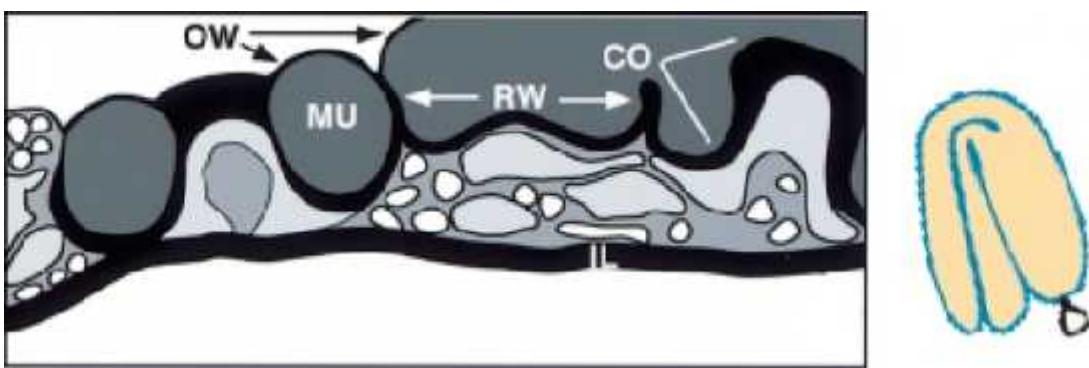
Producija i izluivanje mucilaga do ovog stadija su završeni i potrebne su još samo manje dorade diferencijacijskog procesa. Vakuola u stanicama vanjskog epidermalnog sloja više nema, jer je prilikom sinteze i izluivanja mucilaga bio potreban prostor za slaganje GK u „vulkan“. Taj proces je formirao karakteristične stanice, na kojima se još samo treba stvoriti sekundarna stani na stijenka. Zbog toga što kontakt između stanića ne membrane i primarne stanićne stijenke postoji samo u središtu vanjske stijenke, stanice vanjskog epidermalnog sloja zadržavaju izgled koji su poprimile izluivanje mucilaga (Windsor i sur., 2000). Takav izgled naziva se kolumela (sl. 9.). Škrobna zrnca se razgrađuju u oba sloja,ime se oslobođaju građevne jedinice za polisaharide sekundarnih stijenki. Unutrašnji epidermalni sloj se zbog rasta endosperma i embrija pritiže, kao i dva vanjska sloja endotelija koja su prošla kroz programiranu staničnu smrt u stadiju 1.



**Slika 9.** Shematski prikaz stanica epidermalnog sloja sjemene lupine u stadiju 4. S desne strane je prikaz stadija u kojem se nalazi embrij. MU, mucilago; OW, tanka vanjska stani na stijenka; SG, škrobnja zrnca. Prilagođeno 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). Sjema lupina je u potpunosti diferencirana i svedena na jedan, vanjski epidermalni sloj. U unutrašnjosti zbog pucanja stanicu endotelija prilikom kompresije dolazi do otpuštanja i oksidacije PA, zbog čega zrela sjemenka poprima smeđu boju. Mucilago koji je izlazi između primarne stani na stijenke i stani na 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 sjemene lupine u stadiju 5. S desne strane je prikaz stadija u kojem se nalazi embrij. CO, kolumna; IL, unutrašnji epidermalni sloj; MU, mucilago; OW, tanka vanjska stani na stijenka; Prilagođeno 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 urovnjaka vidljivo je da pojedini geni koji su aktivni u više različitim biljnim tkiva, u određenim uvjetima i kombinacijama s ekspresijom drugih gena uključeni u kontrolu razvoja, daju sasvim drugačija 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 čine ovojne listove ostaje samo jedan, okružen sekundarnim stanicama stijenkama koje jako dobro štite embrij i endosperm. Zbog nepropusnosti sekundarnih stanicnih 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, pojava atične nepropusnosti sjemene lupine, a moguće i sprječiti daljni 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, a ne mete djelovanja još uvijek traže, a negdje strukturni geni koji sudjeluju izravno u procesima biosinteze. Još je uvijek nepoznat točan način komunikacije između endosperma i ovojnih listova nakon oplođenja i kakva je priroda signala za početak 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 također 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., Huep 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 -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. In: *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., Hülskamp 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 izlu uju mucilago, a u kasnijim stadijima razvoja stvaraju sekundarne stani ne stijenke. Mucilago prekriva površinu zrele sjemenke, a u doticaju s vodom dolazi do imbibicije i mucilago se otpušta, te okruži sjemenku. Tijekom sinteze i izlu ivanja 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 sme u 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 stani ne smrti, te usmjerenog izlu ivanja tvari iz biljnih stanica. Ovo područje razvojne biologije biljaka stavlja znanstvenike pred brojne izazove, od određivanja puteva kontrole diferencijacijskih procesa, do otkrivanja funkcija strukturalnih 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.