

Morfologiczne, cytologiczne i biochemiczne aspekty długotrwałego przechowywania nasion typu „orthodox”

Katarzyna Joanna Chwedorzewska, Jerzy Puchalski
Ogród Botaniczny Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej PAN
Prawdziwka 2, 02-973 Warszawa, Polska
e-mail: kchwedorzewska@go2.pl

Słowa kluczowe: biologia nasion, starzenie się nasion, przechowywanie nasion, bank nasion

Długość życia nasion

Określenie długości życia nasion ma ogromne praktyczne znaczenie. O potencjalnej długości życia niektórych nasion mogą świadczyć doświadczenia przeprowadzone na próbkach znalezionych w kamieniu węgielnym z 1832 roku. Po 125 latach jęczmień zachował 20% żywotności, a owies 10%, przy wilgotności odpowiednio 7,3% i 8,0% [4]. W przypadku roślin zbożowych najszybciej starzeją się ziarniaki żyta i pszenżyta, a najwolniej ziarniaki owsa i jęczmienia. Długość życia nasion w warunkach sztucznych jest inna niż w glebie. Szczególnie nasiona chwastów mogą przetrwać w glebie znacznie dłużej niż w warunkach sztucznych.

Czynniki wpływające na długość życia nasion

Nie jest jasne, które z czynników mają zasadniczy wpływ na długość życia nasion i jakie mechanizmy prowadzą do utraty żywotności. Wiadomo jedynie, że nasiona przechodzą szereg zmian określanych jako naturalne starzenie się, których efektem jest ich śmierć. Długość życia nasion jest wypadkową właściwości genetycznych i morfologicznych danego gatunku (czynniki wewnętrzne) i wpływu czynników środowiska (czynniki zewnętrzne).

Do czynników wewnętrznych zalicza się uwarunkowania genetyczne wpływające na budowę anatomiczną i skład chemiczny oraz strukturę wewnątrzkomórkową.

kową nasion. Czynniki zewnętrzne to cały kompleks warunków siedliskowych, takich jak: klimat, gleba, nawożenie, zabiegi uprawowe i warunki przechowywania. Nasiona tego samego gatunku przechowywane w identycznych warunkach, ale pochodzące z różnych siedlisk, mogą różnić się długowiecznością. Duże znaczenie ma kondycja nasion, a także czynniki oddziałujące na jakość przechowywanego materiału, takie jak uszkodzenia mechaniczne i zanieczyszczenia, czy drobnoustroje zasiedlające nasiona i stymulujące peroksydację tłuszczów nienasyconych i emisję lotnych substancji toksycznych.

Nasiona typu „orthodox”, zawierające małą ilość wody mogą być przechowywane w niskiej temperaturze bardzo długo. Kontrolowanie tych dwóch czynników wpływa istotnie na przedłużenie ich życia. Obniżając zawartość wody można w znaczący sposób przedłużyć żywotność nasion wielu gatunków. Istnieje jednak pewne minimum, poniżej którego nasiona zaczynają zamierać. Zawartość wody w nasionach w wielu przypadkach jest ściśle związana z zawartością i składem cukrów [9]. Wpływ na aktywność fizjologiczną przechowywanych nasion mają też warunki ich suszenia. Tlen zawarty w powietrzu jest kolejnym czynnikiem kształtującym długość życia nasion [45]. Tlen ma bardzo duży wpływ na przemiany biochemiczne, jakie zachodzą w nasionach w czasie przechowywania. Obniżenie zawartości tlenu i tym samym nagromadzenie się dwutlenku węgla, może wydłużać ich żywotność.

W bankach nasion wykonywane są indywidualne testy ustalające optymalne warunki przechowywania dla danego gatunku. Podejmowane są także próby stworzenia uniwersalnych modeli umożliwiające przewidywanie okresu zachowania żywotności nasion w różnych warunkach przechowywania [15]. Jednak można tylko przedłużyć życie nasion, nie można natomiast powstrzymać zmian genetycznych i utraty wigoru postępujących w czasie.

Zmiany związane ze starzeniem się nasion

Od dojrzałości woskowej przez cały okres przechowywania aż do kiełkowania w nasionach zachodzi kompleks niekorzystnych zmian określany jako starzenie się nasion. Wielu autorów badało to zjawisko posługując się materiałem poddanym sztuczemu starzeniu się, ponieważ uzyskiwanie materiału naturalnie starzonego jest zbyt długotrwałe. Dlatego też wiele prac opiera się na materiale, w którym ten proces przyspieszany był przez podwyższanie temperatury i wilgotności. Ganguli i Sen-Mandi [19] zwrócili uwagę, że w badaniach należy uwzględniać nie tylko, czy nasiona były poddane procesowi naturalnego, czy sztucznego starzenia się, ale i w jakich warunkach proces ten zachodził. Pomimo podobnych objawów (utrata żywotności) wywoływanych przez oba te procesy, zmiany w nasionach mogą mieć inny charakter. W czasie przyspieszonego starzenia się nasion np. zawartość aldehydu octowego jest znacznie niższa niż w przechowywanych przez dłuższy czas przy obniżonej wilgot-

ności i temperaturze, a o tym samym poziomie żywotności. Z drugiej strony podczas przyspieszonego starzenia się w nasionach spada znacznie poziom białek rozpuszczalnych w wodzie. Wykazano, że powolna utrata żywotności przez nasiona przechowywane przy niskiej wilgotności wiąże się z nieenzymatyczną denaturacją białek w reakcji głównie z aldehydem octowym i wytworzenie zasad Schiffa jako produktu pośredniego [16].

Zmiany morfologiczne

Jednym z najbardziej widocznych objawów procesu starzenia się jest utrata żywotności i wigoru. Utrata wigoru może być manifestowana nie tylko utratą zdolności do kiełkowania, ale i wydłużeniem samego kiełkowania w porównaniu z nasionami o wysokiej żywotności [11]. We wczesnym stadium procesu kiełkowania może dojść do opóźnienia wzrostu korzenia i pędu. Większość objawów procesu starzenia się ujawnia się dopiero podczas kiełkowania. Zwykle są to nekrozy w różnych tkankach zarodka, czy nienormalny przebieg samego kiełkowania. Mogą pojawiać się też anomalie w budowie morfologicznej siewek, takie jak brak korzeni, skręcanie liścieni i koleoptylu, wytwarzanie drobnych liści czy chlorozy. Prowadzą one często do zamierania siewek, deformacji organów, nienormalnego rozgałęziania się roślin, czy do wytwarzania zniekształconych liści. Zmiany te dziedziczą się rzadko i zwykle zanikają podczas ontogenezy lub w wyniku reprodukcji [14].

Zmiany na poziomie ultrastruktury komórek

W czasie starzenia się na poziomie ultrastruktury komórkowej pojawiają się różne anomalie. Widoczne są uszkodzenia błony komórkowej i membran organelli [27]. Uszkodzenia te wiążą się zwłaszcza z procesem utleniania kwasów tłuszczowych wchodzących w ich skład. Degradacja błony komórkowej jest jedną z głównych przyczyn procesu starzenia się nasion, powodując bezpośrednio wyciekanie różnych substancji niskocząsteczkowych z komórki, takich jak cukry rozpuszczalne w wodzie, elektrolity i inne związki nieorganiczne oraz organiczne, np. enzymy proteolityczne [39]. Wzrost przewodnictwa elektrycznego tych wycieków postępuje wraz z utratą żywotności i rozpoczyna się dopiero po uwodnieniu nasion. Uszkodzone błony powodują uwolnienie zawartości organelli do cytoplazmy, a potem do przestrzeni międzykomórkowej. Podczas pęcznienia starych nasion błona jądrowa może ulec deformacji i pojawiają się zaburzenia w podziałach komórkowych w postaci nienormalnego przebiegu procesu mitozy w tkankach merystematycznych. Większość komórek w jądrach, których mitoza przebiegła nieprawidłowo, nie dzieli się ponownie lub aberracje zanikają po kilku podziałach komórkowych [46]. W ciągu procesu starzenia się zmniejsza się ilość jąderek, aż do całkowitego ich zaniku [7]. W starych zarodkach obserwuje się nienormalną budowę mitochondriów i niską ich liczebność w stosunku do zarodków młodych. Niektóre są napęczniałe, a popękane lub rozerwane membrany

sprawiają wrażenie uszkodzeń mechanicznych. Grzebienie są zniekształcone, a matrix gęsta i ziarnista. Ważną właściwością starych nasion jest brak zdolności do zwiększania liczby mitochondriów w czasie kiełkowania [2]. Degradacja mitochondriów wiąże się z obniżeniem aktywności enzymów łańcucha oddechowego i upośledzeniem fosforylacji oksydacyjnej, a tym samym spadkiem syntezy ATP. Objawem tego są zaburzenia w transporcie elektronów oraz obniżona wartość stosunku fosforu do tlenu. Zmiany te prowadzą prawdopodobnie do ograniczenia lub zahamowania autonomicznej syntezy kwasów nukleinowych i białek, a w konsekwencji do zahamowania ontogenezy tych organelli. Zmniejszone pobieranie tlenu jest objawem dezorganizacji mitochondriów. Obniżenie natężenia oddychania może być spowodowane również częściową inaktywacją układów enzymatycznych cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego [34]. Szybciej ulegają destrukcji mitochondria i retikulum endoplazmatyczne, niż np. lizosomy, ze względu na większą zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach cytoplazmatycznych tych pierwszych, jednak dezorganizacja lizosomów może następować gwałtowniej, ponieważ mają one pojedynczą błonę cytoplazmatyczną [51]. W starzejących się nasionach widoczna jest znaczna utrata gęstości i powiększenie plastydów [46]. Destrukcji ulegają również rybosomy i zawarty w nich rRNA. Zawartość RNA jest identyczna w nasionach starych i świeżych, ale w tych pierwszych znacznie wzrasta jego fragmentacja i ilość nie funkcjonujących rybosomów [47]. W starych nasionach obniża się znacznie zawartość monosomów i polisomów, a niektóre stare tkanki zawierają tylko monosomy. W konsekwencji zmiany te powodują spadek biosyntezy białek [52]. Postępuje też dezorganizacja ciałek białkowych zawierających między innymi: białka zapasowe, RNA, czy enzymy hydrolityczne. Jak twierdzą Begnami i Cortelazzo [7], uszkodzenia ciałek białkowych są główną przyczyną utraty żywotności nasion, ponieważ do cytoplazmy uwalniane są enzymy proteolityczne [24]. Błona lizosomów może ulec uszkodzeniu, co prowadzi często do ich fuzji powodując tworzenie znacznie większych struktur [46]. Z postępującym procesem starzenia się maleje liczba diktiosomów, a nawet następuje ich całkowity zanik. Na skutek zaniku części cystern, tracą one swoją warstwową strukturę. Szczególnie membrany retikulum endoplazmatycznego są narażone na uszkodzenia spowodowane przemianami biochemicznymi kwasów tłuszczowych i białek wchodzących w ich skład. Uszkodzane są błony cytoplazmatyczne wakuoli. Na skutek zaburzenia ich selektywnej przepuszczalności może dojść do uwolnienia ich zawartości do cytoplazmy [51]. Zwiększa się ilość drobnych ziaren skrobiowych, nie zmienia się natomiast znacząco jej zawartość [7].

Starzenie się nasion prowadzi do zmian praktycznie wszystkich komponentów jądrowych i cytoplazmatycznych, a ich reperacja, ze względu na wysoki stopień odwodnienia, jest niemożliwa. W nasionach suchych z czasem zmiany na poziomie ultrastruktury ulegają akumulacji i mogą doprowadzić do śmierci komórek [51].

Zmiany biochemiczne

Utrata wigoru i żywotności przez starzejące się nasiona wywoływana jest trzema funkcjonalnie związanymi rodzajami zmian: utratą integralności membran komórkowych, akumulacją substancji toksycznych i denaturacją dużych cząsteczek, takich jak np. białka enzymatyczne czy kwasy nukleinowe. Niektóre badania wykazały również zmniejszający się poziom substancji zapasowych (skrobi i cukrów rozpuszczalnych) [38].

Degradacja lipidów. Zmiany zachodzące we frakcji tłuszczowej mają charakter hydrolityczny, lipolityczny i oksydacyjny. Proces degradacji lipidów może być katalizowany przez enzymy zawarte w nasionach lub pochodzące od mikroorganizmów je zasiedlających. Do enzymów najczęściej biorących udział w degradacji tłuszczów zalicza się lipazy i lipooksygenazy [30]. Lipazy katalizują hydrolizę trójglicerydów do glicerolu i kwasów tłuszczowych. Ich aktywność rośnie w miarę zmniejszania się zawartości wody w środowisku. Natomiast lipooksygenaza utlenia tlenem atmosferycznym wiązania cis-1,4-pentadienowe występujące w wielonienasyconych kwasach tłuszczowych oraz w innych estrach do hydronadtlenków, które zostają zdegradowane do ketonów, aldehydów i innych nisko molekularnych związków [22]. Działanie lipooksygenazy hamują przeciwutleniacze takie jak np. tokoferol, fenole, czy kwas askorbinowy. Proces utleniania kwasów tłuszczowych w nasionach znajdujących się w stanie imbibicji może być wywołany przez enzymy, natomiast w nasionach powietrznie suchych inicjowany bywa przez tlen z powietrza.

Peroksydacja i tworzenie wolnych rodników. W przechowywanych nasionach zachodzi proces jednostronnej dysymilacji polegającej na częściowym rozkładzie substancji organicznych. Dużą rolę w tym procesie odgrywiają reakcje oksydacji i peroksydacji. Wykazano, że nawet przy niskiej zawartości wody, wykluczającej oddychanie mitochondrialne, pobierany jest tlen [23]. Przy nieobecności katalizatorów tlen w stanie podstawowym jest mało aktywny. Natomiast jego aktywne biologicznie formy powstają na drodze utleniania i peroksydacji pod wpływem promieniowania jonizującego, temperatury, czynników ksenobiotycznych, metali, patogenów, czynników fotochemicznych i innych [32]. Podczas przechowywania w komórkach zwiększa się poziom tlenu aktywnego. Występuje on w formach bardzo reaktywnych i niestabilnych, takich jak anion ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, nadtlenuk wodorowy, czy tlen singletowy. Mechanizm ich powstawania i działania w obrębie komórek jest bardzo złożony. Wiele reakcji zaangażowanych w prawidłowy metabolizm komórkowy może prowadzić do ich powstawania, np. transport elektronów czy metabolizm lipidów. Indukują one reakcje łańcuchowe, które normalnie zachodzą bardzo wolno. Aktywne formy tlenu mogą uszkadzać strukturę wielu biopolimerów, najbardziej narażone na ich działanie są białka zawierające wiązania nienasycone i siarkę. Ponadto mogą one prowadzić do powstania i akumulacji biologicznie aktywnych, szkodliwych substancji, takich jak np. aldehydy, zasady Schiffa i wolne kwasy tłuszczowe. Wiele z tych produktów może łączyć się z białkami i DNA. Te wtórne

produkty reakcji mogą indukować zmiany o charakterze mutacyjnym w cząsteczkach kwasów nukleinowych [8].

Czynnikiem indukującym powstawanie wolnych rodników w tkankach wegetatywnych jest również światło. Natomiast nie jest jeszcze jasne, jaki wpływ ma ono na procesy oksydacyjne w nasionach. Wykazano, że podczas przyspieszonego starzenia się nasiona eksponowane na światło traciły szybciej żywotność niż w ciemności [33]. Związane to było z większą akumulacją organicznych wolnych rodników i peroksydacją lipidów w tych pierwszych.

Szczególnie reaktywny jest rodnik hydroksylowy. Reaguje on z większością związków organicznych, takich jak enzymy, kwasy nukleinowe i cukry. W kwasach nukleinowych następuje wtedy przyłączenie grupy hydroksylowej do podwójnego pierścienia zasad azotowych i powstania np. rodnika tyminowego, który ulegając dalszym reakcjom uszkadza cukier i powoduje rozcięcie cząsteczki kwasu. Skala procesu degradacji komórek zależy od równowagi pomiędzy nagromadzonymi wolnymi rodnikami i aktywnością enzymatycznych mechanizmów obronnych, takich jak np. dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza i katalaza [37]. Utracie żywotności towarzyszy spadek ich aktywności [50]. Enzymatyczne mechanizmy eliminują tylko mniej reaktywne formy tlenu. Oprócz enzymatycznych antyoksydantów podobne funkcje w komórce pełnią substancje nieenzymatyczne, takie jak: glutation, kwas askorbiny, flawonoidy czy tokoferole, mające duży potencjał redukcyjny. Mechanizm wchodzenia przeciwutleniaczy w reakcje łańcuchowe autooksydacji kwasów tłuszczowych może polegać np. na oddawaniu wodoru lub elektronu przez przeciwutleniacz oraz tworzeniu połączeń addycyjnych kwasu tłuszczowego z pierścieniem aromatycznym przeciwutleniacza. Niektóre przeciwutleniacze, np. α -tokoferol, stosowane podczas przechowywania, zwiększają wigor i żywotność hamując peroksydację [21]. Aktywność przeciwutleniającą zawdzięcza α -tokoferol możliwości oddawania wodoru i przechodzenia w formę chinonową. W starzejących się nasionach tempo reakcji spowodowanych działaniem wolnych rodników wzrasta lawinowo i działanie przeciwutleniaczy może tylko zredukować skutki tego procesu. Poza tym aktywność niektórych przeciwutleniaczy maleje, np. glutationu i dysmutazy ponadtlenkowej, wraz z utratą wigoru [43].

Przemiany kwasów tłuszczowych. W starzejących się komórkach gromadzą się wolne kwasy tłuszczowe i kwas fosforowy, spada poziom białek i rośnie zawartość wolnych aminokwasów. Szczególnie wrażliwe na działanie wolnych rodników są nienasycone kwasy tłuszczowe. Wraz ze wzrostem ilości wolnych kwasów tłuszczowych maleje w nasionach ilość lipidów ogółem, zwłaszcza obojętnych i polarnych [18]. Proces utleniania kwasów tłuszczowych ma charakter łańcuchowy. Obok kwasu tłuszczowego i tlenu, niezbędna do zapoczątkowania reakcji utleniania jest obecność rodnika lub czynnika mogącego utworzyć rodnik. Najbardziej aktywne czynniki przyspieszające utlenianie tłuszczów to: miedź, żelazo, kobalt, mangan i układ hemowy barwników (chlorofil, mioglobina, cytochromy i inne).

Najbardziej narażonymi na działanie wolnych rodników są chloroplasty, ponieważ produkują one przy udziale światła tlen cząsteczkowy w obecności niezwykle aktywnego chlorofilu. Ponadto złożony system błon tych organelli jest bogaty w lipidy, które są substratem reakcji inicjowanych przez wolne rodniki. Raz zapoczątkowana reakcja przez wytworzenie rodnika przebiega dalej samorzutnie. Produktem każdego etapu jest wodorotlenek i nowy rodnik. Zmniejszeniu się ilości lipidów na skutek utleniania, towarzyszy powstawanie m.in. aldehydów, w tym dwualdehydu malonowego, czy nadtlenków lipidów będących wolnymi rodnikami. Wiele z powstałych aldehydów ma aktywną grupę metylową, wrażliwą na dalsze utlenianie. Bardzo toksyczny jest dwualdehyd malonowy [5], który uszkadza zarówno białka, jak i kwasy nukleinowe. Tworzy się również wiele fosfolipidów o skróconych łańcuchach zawierających grupy: hydroksylową, karboksylową i aldehydową. Najszybciej degradacji ulegają apolarne trójglicerydy, polarne fosfolipidy [35] i glikolipidy, będące głównym składnikiem błon komórkowych. Wskutek utleniania reszt łańcuchów tłuszczowych zmienia się selektywna przepuszczalność membran komórkowych, co może naruszać integralność komórek.

Większość badań procesu utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych prowadzono na nasionach sztucznie starzonych. Występowała wówczas prosta zależność: zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych malała wraz z utratą żywotności. Proces ten mierzony był zawartością dwualdehydu malonowego. W przypadku nasion naturalnie starzejących się ta zależność jest niejednoznaczna, prawdopodobnie na skutek zachodzących procesów autooksydacji. Najważniejszą konsekwencją działania wolnych rodników jest uszkodzenie błon komórkowych przez utlenianie fosfolipidów i tworzenie wiązań między białkami (tzw. sieciowanie białek) [44].

Lotne substancje toksyczne. Zidentyfikowano 24 lotne substancje, w tym metanol, etanol, propylen, izopropanol, izobutanol, kwas octowy, octanu etylu, aldehyd octowy, aceton i inne wydzielane przez nasiona [54]. Jeśli są one przechowywane w hermetycznie zamkniętych pojemnikach dochodzi do akumulacji tych związków. Zjawisko to postępuje z czasem oraz ze wzrostem temperatury. Metabolity te są produkowane nawet w suchych nasionach przechowywanych w optymalnych warunkach [17]. Są to zwłaszcza wtórne produkty utleniania kwasów tłuszczowych.

Przemiany biochemiczne białek. W starzejących się nasionach, oprócz hydrolizy białek, obserwuje się ich denaturację i tak np. lotne aldehydy mogą modyfikować grupy aminowe białek [55]. Proces hydrolizy i denaturacji obejmuje zarówno białka enzymatyczne, strukturalne, zapasowe i histonowe. Podczas przechowywania nasion zmienia się nie tylko ogólna zawartość białek, ale i ich skład aminokwasowy, a na skutek denaturacji również ich organizacja przestrzenna [40]. Może to powodować zmiany aktywności katalitycznej enzymów. Uszkodzenie błon komórkowych spowodowane procesem degradacji fosfo- i glikolipidów i denaturacją białek, powoduje lawinowe reakcje łańcuchowe prowadzące nawet do śmierci komórek. W trakcie procesu starzenia się zmienia się aktywność enzymów proteolitycznych oraz endo- i egzono-

kleaz., aktywność endopeptydaz nie zależy od stopnia utraty żywotności, natomiast aktywność egzopeptydaz jest od niego zależna [24].

Utrata wigoru i żywotności wpływa zarówno na zarodek, jak i na otaczające go tkanki. Na przykład synteza i sekrecja α -amylazy w warstwie aleuronowej jest niezbędna do zainicjowania uruchomienia węglowodanowych rezerw z bielma ziarniaków. Postępujące uszkodzenia warstwy aleuronowej mogą powodować znaczne zmniejszenie syntezy α -amylazy i tym samym wpływać na opóźnienie procesu kiełkowania [12].

Przemiany biochemiczne cukrów. Cukry, szczególnie rozpuszczalne w wodzie pełnią funkcje ochronne w nasionach regulując zawartość wody. Odgrywają one również ważną rolę jako stabilizatory membran i białek. Zmniejszająca się zawartość skrobi i cukrów rozpuszczalnych nie wpływa na utratę żywotności nasion, podczas gdy reakcje redukcji cukrów odgrywają krytyczną rolę w procesie starzenia się [36]. Monosacharydy mogą przechodzić w produkty reakcji typu Amadori i Maillarda. Szczególnie glukoza jest reaktywna z racji posiadania łatwo utleniającej się grupy aldehydowej [28]. Ważny wpływ na proces starzenia się nasion mają reakcje Maillarda. Jest to szereg procesów, w których grupy karbonylowe aldehydów, ketonów, a głównie cukrów redukujących, reagują z grupami aminowymi, iminowymi i amidowymi aminokwasów, peptydów, białek i kwasów nukleinowych. Kondensacja cukrów z aminami prowadzi do powstania tzw. zasad Schiffa, następnie do utworzenia w reakcji Amadori połączeń N-glikozydowych z wytworzeniem formy 1-amino-1-dezoksy-2-ketozy, ulegających dalszym przemianom. Proces ten nasila się z czasem, powodując gromadzenie się produktów tych reakcji, co wywołuje zmiany w strukturze DNA i wpływa na aktywność enzymatyczną białek [6].

Zmiany na poziomie kwasów nukleinowych. Podczas kiełkowania następuje intensywne oddychanie, wytwarzanie ATP, synteza białek i wszystkich rodzajów RNA. W ciągu pierwszych godzin od jego rozpoczęcia zaczyna być syntetyzowany mRNA i rRNA. O ile synteza mRNA w tym czasie utrzymuje się na stałym poziomie, to synteza rRNA rośnie i osiąga maksimum w około 18 godzin od rozpoczęcia kiełkowania [49]. W pierwszym etapie kiełkowania biosynteza białek uruchamiana jest przez mRNA już obecny w komórkach przechowywanych nasion. Natomiast synteza nowego mRNA zachodzi wkrótce po rozpoczęciu procesu kiełkowania [13]. Nasiona stare kiełkują wolniej niż nasiona świeże i wykazują niższy poziom początkowej syntezy białek i nowo syntetyzowanego mRNA. Prawdopodobnie w starych nasionach znaczna część mRNA obecnego w komórkach przez okres przechowywania ulega degradacji. Zanim pojawi się nowy mRNA, obniża się tempo transkrypcji mRNA na białka, a tym samym spada wigor nasion [12]. Rozpoczęcie pierwszej replikacji DNA jest opóźnione [42]. Niektóre prace sugerują, że wigor nasion jest skorelowany z ilością i jakością, zarówno mRNA obecnego już w komórkach nasion przez cały okres przechowywania, jak i nowo syntetyzowanego mRNA obecnego w ostatniej fazie dojrzewania. Kieruje on syntezą białek podczas kiełkowania do chwili rozpoczęcia

nowej transkrypcji [53]. Metabolizm tego mRNA, jak i nowo syntetyzowanego, zmienia się wraz z utratą wigoru. Zostają wówczas zachwiane proporcje między nimi i następuje degradacja przenoszanej informacji. Nawet gdy stosunek obu mRNA jest identyczny w nasionach o różnym wigorze, to ilość ekstrahowanego poly-A⁺mRNA jest znacznie mniejsza w nasionach o niskiej żywotności [48]. Obniża się również biosynteza białek, co związane jest bezpośrednio ze spadkiem poziomu poly-A⁺mRNA. Wykazano również znaczny spadek całkowitego RNA, jak i poly-A⁺mRNA oraz poly-A⁻mRNA, w zarodkach nasion o niskiej żywotności [20]. Doświadczenia, dotyczące starzenia się ziarniaków pszenicy poddanych procesowi sztucznego starzenia się wykazały znaczne zahamowanie syntezy mRNA i białek [26], co mogło być spowodowane opóźnieniem akumulacji polipeptydów i specyficznego mRNA. Również obserwowano spadek syntezy białek i poly-(A)⁺RNA, co Grilli i in. wiąźali z obniżeniem aktywności poly(A) polimerazy w zarodkach izolowanych ze starych ziarniaków [25]. Krytycznym momentem w rozwoju zarodka jest rozpoczęcie replikacji pierwszego DNA. Wtedy ujawniają się wszystkie zmiany spowodowane starzeniem się akumulowane w trakcie okresu spoczynku. Wykazano, że nie wszystkie rodzaje RNA w procesie starzenia się ulegają uszkodzeniu i tak nie wykryto znaczących różnic w tRNA, ani upośledzenia produkcji aminoacylo-tRNA [47]. Wnioskowano, że w starzejących się nasionach nie zostaje zakłócona aktywność syntetaz aminoacylo-tRNA i nie jest to czynnik limitujący biosyntezę białek. Następuje natomiast spadek aktywności transferazy I, związanej z przyłączaniem aminoacylo-tRNA do rybosomu. Zmiany aktywności tego właśnie enzymu mogą być czynnikiem ograniczającym biosyntezę białek [41]. Spadek syntezy ATP i GTP w nasionach o niskim wigorze może limitować biosyntezę białek i kwasów nukleinowych oraz inne funkcje metaboliczne [10]. Spadek zawartości ATP jest skorelowany z utratą wigoru, wpływając na włączanie adenozyliny do RNA i ograniczając jego syntezę [3]. Również obserwuje się postępującą degradację wysokomolekularnego rRNA, zwłaszcza 18S i 25S [41]. Stopniowo z utratą żywotności frakcje 25S i 18S degradują odpowiednio do 23S i 13S. Podejrzewano, że degradacji ulega głównie 18S [20]. Nasilające się pęknięcia wiązań wodorowych w helikarnych rejonach RNA powodują, że głównie transkrybowany jest niskomolekularny RNA 4S do 5S [52]. Proces fragmentacji rybosomalnego RNA prawdopodobnie katalizowany jest przez rybonukleazy, wskazuje na to znaczna aktywność RNAz [47].

Nagromadzenie się wolnych rodników i innych toksycznych metabolitów powoduje denaturację białek histonowych i tym samym może upośledzać biosyntezę białek. Zmiany w prawidłowej syntezie białek prawdopodobnie objawiają się wzmożoną syntezą enzymów hydrolitycznych, co dodatkowo powoduje zachwianie stabilności systemu komórkowego. Ma to podłoże w zaburzeniach aparatu dekodowania informacji genetycznej. Zablockowanie transkrypcji DNA może być spowodowane represją genów przez białka histonowe lub kwaśne. Zaobserwowano, że stosunek białek histonowych do DNA rośnie wraz z wiekiem nasion [29]. Wzrasta również siła wiąza-

nia DNA z białkami histonowymi. Wyższy jest także stopień kondensacji chromatyny, a liczba nukleosomów przypadająca na jednostkę długości DNA zwiększa się. Wiąże się to np. ze zwiększeniem ilości mostków dwusiarczkowych między białkami niehistonowymi. Wykazano, że wraz ze spadkiem żywotności spada nieco poziom kwasów nukleinowych, a wzrasta aktywność RNazy i DNazy [31]. Inne prace [1] nie wykazały zmniejszania się poziomu całkowitego DNA w nasionach, a jedynie zmniejszenie ilości włączanego ^{32}P do DNA, tRNA i tylko w niewielkim stopniu do rRNA.

Podsumowanie

Zjawisko starzenia się nasion jest złożone i występuje na różnych poziomach organizacji komórkowej, a większość składających się na nie procesów, czy to cytologicznych, czy biochemicznych, może wpływać bezpośrednio lub pośrednio na ich materiał genetyczny. Zmiany na poziomie kwasów nukleinowych są ostatnim i zarazem najważniejszym ogniwem łańcucha przemian powodowanych procesem starzenia się, ponieważ mogą być dziedziczone w następnych pokoleniach i wpływać na strukturę wewnętrzną populacji potomnych.

Literatura

- [1] Abdul-Baki A.A., Chandara G.R. 1977. Effect of rapid ageing on nucleic acid and protein synthesis by soybean embryonic axes during germination. *Seed Sci. Technol.* 5: 689–698.
- [2] Abu-Shakra S.S., Ching T.M. 1967. Mitochondrial activity in germinating new and old soybean seeds. *Crop Sci.* 7: 115–118.
- [3] Anderson J.D. 1977. Adenylate metabolism of embryonic axes from deteriorated soybean seeds. *Plant Physiol.* 59: 610–614.
- [4] Aufhammer G., Simon U. 1957. Die Samen landwirtschaftlicher Kulturpflanzen im Grundstein des ehemaligen Nurnberger Stadttheaters und ihre Keimfahigkeit. *Zeitschrift fur Acker- und Pflanzenbau* 103: 454–472.
- [5] Bailly C., Benamar A., Corbineau F., Come D. 1996. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated ageing. *Physiol. Plantarum* 97: 104–110.
- [6] Baker E.H., Bradford K.J. 1991. The fluorescence assay for Millard product accumulation does not correlate with seed viability. *Seed Sci. Res.* 1994; 4: 103–106.
- [7] Begnami C.N., Cortelazzo A.L. 1996. Cellular alterations during accelerated aging of French bean seeds. *Seed Sci. Technol.* 24: 295–303.
- [8] Benson E.E. 1990. Free radical damage in stored plant germplasm. IBPGR, Rome.

- [9] Bernal-Lugo I., Leopold A.C. 1995. Seed stability during storage: Raffinose content and seed glassy state. *Seed Sci. Res.* 5: 75–80.
- [10] Bewley J.D., Black M. 1985. Seeds: physiology of development and germination. Plenum Press, New York: 104–107.
- [11] Bingham I.J., Harris A., MacDonald L. 1994. A comparative study of radicle and coleoptile extension in maize seedlings from aged and unaged seed. *Seed Sci. Technol.* 22: 127–139.
- [12] Bray C.M. 1997. Stress, protein biosynthesis and loss of vigour and viability in cereal seed. W: R.H. Ellis, M. Black, A. J. Murdoch, T. D. Hong, Basic and Applied Aspects of Seed Biology. Kluwer Academic Publ. Dordrecht: 437–449.
- [13] Brooker J.D., Tomaszewski M., Marcus A. 1978. Performed messenger RNAs and early wheat embryo germination. *Plant Physiol.* 61: 145–149.
- [14] Dourado A.M., Roberts E.H. 1984. The nature of the virido-albina/striata mutant induced during storage in the barley seeds. *Ann. Bot.* 54: 791–798.
- [15] Ellis R.H., Roberts E.H. 1981. The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Sci. Technol.* 9: 373–409.
- [16] Esashi Y., Kamataki A., Zhang M. 1997. The molecular mechanism of seed deterioration in relation to the accumulation of protein-acetaldehyde adducts. W: R.H. Ellis, M. Black, A.J. Murdoch, T.D. Hong; Basic and Applied Aspects of Seed Biology. Kluwer Academic Publ. Dordrecht: 489–498.
- [17] Fielding J.L., Goldsworthy A. 1982. The evolution of volatiles in relation to ageing in dry wheat seed. *Seed Sci. Technol.* 10: 277–282.
- [18] Francis A., Coolbear P. 1988. Changes in the fatty acid content of the polar lipid fraction of tomato seeds induced by ageing and/or subsequent low temperature pre-sowing treatment. *Seed Sci. Technol.* 16: 87–95.
- [19] Ganguli S., Sen-Mandi S. 1990. Some physiological differences between naturally and artificially aged wheat seeds. *Seed Sci. Technol.* 18: 507–514.
- [20] Ghosh B., Chaudhuri M.M. 1984. Ribonucleic acid breakdown and loss of protein synthetic capacity with loss of viability of rice embryos (*Oryza sativa*). *Seed Sci. Technol.* 12: 669–677.
- [21] Górecki R.J., Harman G.F. 1987. Effects of antioxidants on viability and vigour of ageing pea seeds. *Seed Sci. Technol.* 15: 109–117.
- [22] Górecki R.J., Kulka K., Puchalski J. 1998. Biochemical aspects of seed deterioration during storage. Challenges in rye germplasm conservation, W: Gass T., Podyma W., Puchalski J., Eberhart S.A.: 37–44.
- [23] Górecki R.J., Kulka K., Puchalski J. 1998. Mechanizmy starzenia się nasion w aspekcie ich długotrwałego przechowywania. *Zeszyty Problem. Post. Nauk Roln.* 463: 191–209.
- [24] Górecki R.J., Kulka K., Sobierajski B. 1987. Enzymy proteolityczne i aktywność antytrypsynowa białek w starzejącym się sztucznie ziarnie żyta ozimego. *Zeszyty Problem. Post. Nauk Roln.* 240: 129–139.
- [25] Grilli I., Bacci E., Lombardi T., Spano C., Floris C. 1995. Natural ageing: poly [A]polymerase in germinating embryos of *Triticum durum* wheat. *Ann. Bot.* 76: 15–21.
- [26] Guy P.A., Black M. 1998. Germination-related proteins in wheat revealed by differences in seed vigour. *Seed Sci. Res.* 8: 99–111.

- [27] Hallam N.D. 1973. Fine structure of viable and non-viable rye and other embryos. W: Seed Ecology. Red. W. Heydecker. Butterworths, London: 115–144.
- [28] Horbowicz M. 1997. Changes of carbohydrate contents during natural and accelerated ageing of some vegetable seeds. W: R.H. Ellis, M. Black, A.J. Murdoch, T.D. Hong. Basic and Applied Aspects of Seed Biology. Kluwer Academic Publ., Dordrecht: 803–808.
- [29] Innocenti A.M., Bitonti M.B. 1979. Histones/DNA ratio in young and old root meristems of *Triticum durum* caryopses. *Caryologia* 32: 441–448.
- [30] Kalpana R., Madhava Roa K.V. 1993. Lower lipoxigenase activity in seeds of pigeonpea cultivars during accelerated ageing. *Seed Sci. Technol.* 21: 269–272.
- [31] Kalpana R., Madhava Roa K.V. 1997. Nucleic acid metabolism of seeds of pigeonpea cultivars during accelerated ageing. *Seed Sci. Technol.* 25: 293–301.
- [32] Khan M.M., Hendry G.A.F., Atherton N.M., Vertucci-Walters C.H.W. 1996. Free radicals accumulation and lipid peroxidation in testas of rapidly aged soybean seeds: a light-promoted process. *Seed Sci. Res.* 6: 101–107.
- [33] Khan M.M., Hendry G.A.F., Atherton N.M., Vertucci-Walters C.H.W. 1997. Light promotes free radical accumulation in ageing soybean seeds. W: R.H. Ellis, M. Black, A.J. Murdoch, T.D. Hong; Basic and Applied Aspects of Seed Biology. Kluwer Academic Publ., Dordrecht: 809–815.
- [34] Kulka K. 1971. Oddychanie i sucha masa kielkującego ziarna owsa i jęczmienia o różnym wieku. *Zeszyty Problem. Post. Nauk Roln.* 113: 133–140.
- [35] Lin S.S., Pearce P. 1990. Changes in lipids of bean seeds (*Phaseolus vulgaris*) and corn caryopses (*Zea mays*) aged in contrasting environments. *Ann. Bot.* 65: 451–456.
- [36] Madhava Roa K.V., Kalpana R. 1994. Carbohydrates and the ageing process in seeds of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) MILLSP.) cultivars. *Seed Sci. Technol.* 22: 495–501.
- [37] Nandi S., Sen-Mandi S., Sinha T.P. 1997. Active oxygen and their scavengers in rice seed (*Oryza sativa*) aged under tropical environmental conditions. *Seed Sci. Res.* 7: 253–259.
- [38] Nautiyal A.R., Purohit A.N. 1985a. Seed viability in Sal II. Physiological and biochemical aspects of ageing of *Shorea robusta*. *Seed Sci. Technol.* 13: 69–79.
- [39] Nautiyal A.R., Purohit A.N. 1985b. Seed viability in Sal III. Membrane disruption in ageing seeds of *Shorea robusta*. *Seed Sci. Technol.* 13: 77–82.
- [40] Nautiyal A.R., Thapliyal A.P., Purohit A.N. 1985. Seed viability in Sal IV. Protein changes accompanying loss of viability in *Shorea robusta*. *Seed Sci. Technol.* 13: 83–86.
- [41] Osborne D.J. 1980. Senescence in seed. W: Senescence in Plant. Red. K.V. Thimann. CRC Press, Boca Raton, FL: 13–37.
- [42] Osborne D.J. 1982. Deoxyribonucleic acid integrity and repair in seed germination: the importance in viability and survival. W: The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination. Red. A.A. Khan. Elsevier Biomed. Press, Amsterdam: 435–463.
- [43] Pauls K.P., Thompson J.E. 1984. Evidence for accumulation of peroxidized lipids in membranes of senescing cotyledons. *Plant Physiol.* 75: 1152–1157.
- [44] Pearce R.S., Abdel Samad I.M. 1980. Changes in fatty acid content of polar lipids during ageing of seeds of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *J. Exp. Bot.* 31: 1283–1290.
- [45] Rao N.K., Roberts E.H. 1990. The effect of oxygen on seed survival and accumulation of chromosome damage in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Seed Sci. Technol.* 18: 229–238.

- [46] Roberts E.H. 1973. Loss of seed viability. Ultrastructural and physiological aspects. *Seed Sci. Technol.* 1: 529–545.
- [47] Roberts B.E., Osborne D.J. 1973. Protein synthesis and viability in rye grains. W: *Seed Ecology*. Red. W. Heydecker. Butterworths, London: 99–114.
- [48] Smith C.A.D., Bray C.M. 1984. Polyadenylated RNA levels and macromolecular synthesis during loss of seed vigour. *Plant Sci. Let.* 34: 335–343.
- [49] Spiegel S., Obendorf R.L., Marcus A. 1975. Transcription of ribosomal and messenger RNAs in early wheat embryo germination. *Plant Physiol.* 56: 502–507.
- [50] Sung J.M. 1996. Lipid peroxidation and peroxide – scavenging in soybean seeds during aging. *Physiol. Plantarum* 97: 85–89.
- [51] Villiers T.A. 1973. Ageing and the longevity of seeds in field conditions. W: *Seed Ecology*. Red. W. Heydecker. Butterworths, London: 265–288.
- [52] Weidner S., Zalewski K. 1982. Ribonucleic acids and ribosomal proteins synthesis during germination of unripe and aged wheat caryopses. *Acta Soc. Bot. Polon.* 51: 291–300.
- [53] Whitmore F.W. 1991. Stored messenger RNA and stratification in eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Seed Sci. Technol.* 19: 341–346.
- [54] Zhang M., Liu Y., Totii I., Sasaki H., Esashi Y. 1993. Evolution of volatile compounds by seeds during storage periodic. *Seed Sci. Technol.* 21: 359–373.
- [55] Zhang M., Maeda Y., Furihata Y., Nakamaru Y., Esashi Y. 1994. A mechanism of seed deterioration in relation to the volatile compounds evolved by dry seeds themselves. *Seed Sci. Res.* 4: 49–56.

Morphological, cytological and biochemical aspects of long-term storage of orthodox seed

Key words: seed biology, seed ageing, seed storage, seed bank

Summary

Rapid extinction of many native plants or erosion of species genetic variability were the main prerequisites for organization of biological diversity conservation.

Long-term seed storage is used as a basic method to genetic diversity conservation of cultivated plants as well as wild native species. So called „orthodox” seeds could be dried and stored at low temperatures to prolong their life span. However, due to natural ageing process, the severe deterioration may occur in seed. Some morphological, cytological and metabolic changes were very often observed in aged seeds. The effects of deterioration on molecular level are most important, as they lead to the erosion of primary genetic structure of preserved populations. The nature of all changes mentioned above and their influence on seed biology were discussed.