

Starzenie się nasion i mechanizmy obronne przed stresem oksydacyjnym

Agnieszka Maria Karsznicka, Mieczysław Grzesik

*Pracownia Nasiennictwa Roślin Ozdobnych,
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach
ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice
e-mail: akarsz@insad.pl*

Słowa kluczowe: nasiona, starzenie się nasion, utleniacze, peroksydacja, mechanizmy obronne, antyutleniacze, kondycjonowanie

Wstęp

Starzenie się nasion, podobnie jak wszystkich organizmów żywych, jest procesem nieuchronnym. Proces starzenia się nasion objawia się zwykle zamieraniem poszczególnych tkanek oraz powstawaniem ośrodków nekrotycznych. Zmniejsza się wówczas dynamika, a następnie zdolność kiełkowania. Kiełki oraz siewki wyrosłe z nasion starych są często nienormalne, co jest wynikiem uszkodzeń jąder komórkowych oraz związanych z nimi aberracji chromosomowych. Następstwem tych nienormalności jest obniżenie plonu roślin i jego jakości. Natężenie zmian destrukcyjnych, powodujących starzenie nasion podczas ich przechowywania, uwarunkowane jest zarówno czynnikami zewnętrznymi – środowiskowymi, jak i wewnętrznymi – genetyczno-fizjologicznymi. W toku ewolucji rośliny wykształciły wiele mechanizmów zabezpieczających je przed przedwczesnym zestarzeniem się i śmiercią, szczególnie dotyczy to mechanizmów zapobiegających lub naprawiających uszkodzenia powstałe wskutek działania wolnych rodników. Niestety, częstokroć stanowią one niedostateczną ochronę, a efektywność ich maleje wraz ze starzeniem się nasion. Dlatego tak istotną sprawą jest możliwość aktywacji naturalnych mechanizmów obronnych i reperacyjnych poprzez aplikację antyutleniaczy nieenzymatycznych lub kondycjonowanie, zwiększając potencjalne możliwości obrony przed reakcjami wolnorodnikowymi lub ich skutkami i tym samym wigor nasion.

Czynniki genetyczno-fizjologiczne warunkujące starzenie się nasion

Właściwości genetyczne

Zasadniczy wpływ na żywotność nasion mają właściwości genetyczne. Nasiona różnych gatunków zachowują żywotność przez różny okres – od kilku dni (wierzby topole), do wielu tysięcy lat (łubin arktyczny – 11 tys. lat) [6]. Ta ogromna rozpiętość długości życia nasion uwarunkowana jest przede wszystkim właściwościami genetycznymi i będącą ich konsekwencją budową nasion. Ale i w obrębie gatunków stwierdzono różnice odmianowe podczas przechowywania nasion soi, fasoli, wyki, prosa, sorgo, pszenicy i koniczyny [34]. Na żywotność nasion może wpływać także stopień ploidalności. Stwierdzono, że wśród di-, tri- i tetraploidalnych nasion buraków odmiany anizoploidalnej najszybciej traciły żywotność nasiona tetraploidalne, a potem triploidalne [33]. Istnieje niewielki związek pomiędzy wysoką zawartością tłuszczu w nasionach różnych gatunków a ich względnie krótką żywotnością [34]. W badaniach nasion kukurydzy stwierdzono, że nasiona twarde i szkliste niektórych odmian pozostają żywotne dłużej niż odmian o wyższej zawartości skrobi oraz odmian słodkich. Z danych tych wynika, że istnieje możliwość poprawy żywotności drogą selekcji [34]. Zatem o „długowieczności” nasion decyduje w pierwszym rzędzie zakodowany genetycznie program starzenia się i śmierci.

Synteza lotnych związków toksycznych

Podczas przechowywania nasion, nawet w optymalnych warunkach, następuje synteza lotnych związków. Najbardziej rozpowszechnionymi substancjami lotnymi produkowanymi przez nasiona różnych gatunków są: aldehyd octowy, metanol, etanol i aceton. Najbardziej toksyczny spośród nich jest aldehyd octowy, gdyż przy stężeniu 1 mmol może spowodować całkowitą utratę żywotności nasion [54]. Wyższe homologii aldehydu octowego, np. butanol, pentanol, heksanol, ze względu na dłuższy łańcuch hydrofobowy mają utrudnioną penetrację w obrębie tkanek nasion, przez co stają się mniej toksyczne. Niemniej, wymienione aldehydy nagromadzają się w tracących wigor i żywotność nasionach oraz w ich otoczeniu nawet podczas przechowywania ich w optymalnych warunkach. Szczególnie procesy te mają miejsce podczas przechowywania nasion o niskiej wilgotności w warunkach hermetycznych, ze względu na brak możliwości wydostania się aldehydów na zewnątrz. Mechanizm toksycznego wpływu aldehydu octowego na nasiona polega na reagowaniu w sposób nieenzymatyczny z grupami aminowymi białek i DNA, podobnie jak w reakcjach Mailarda. Stwierdzono bowiem, że w nasionach wielu gatunków, przechowywanych przez długi okres w obniżonej temperaturze i wilgotności powietrza, nagromadzają się kompleksy aldehydu octowego z białkiem [54].

Reakcje Maillarda

Podczas przechowywania nasion, szczególnie w niekorzystnych warunkach, zachodzi szereg złożonych reakcji chemicznych, w których cukry proste reagują z aminokwasami, białkami lub kwasami nukleinowymi. Reakcje te zwane są ciemnieniem nieenzymatycznym, reakcjami melanoidynowymi lub też Maillarda. Na początku tej reakcji cukier redukujący (najczęściej glukoza) reaguje za pomocą swej grupy aldehydowej z wolną grupą aminową białka lub aminokwasów, tworząc glikozyloaminę. Prowadzi to do wytworzenia ciemnych produktów reakcji glikozylacji, będących zmodyfikowanymi białkami i kwasami nukleinowymi [52]. Nie ulega wątpliwości, że białka enzymatyczne i kwasy nukleinowe zmodyfikowane przez udział w reakcjach Maillarda nie wykazują swej normalnej aktywności biologicznej, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia wigoru i żywotności nasion.

Procesy utleniania

Najistotniejszą jednak przyczyną fizjologiczną starzenia się nasion są procesy oksydacyjne i peroksydacyjne przebiegające stale, nawet w warunkach małej zawartości wody w nasionach, gdy niemożliwe jest oddychanie mitochondrialne [49]. W ich wyniku powstają wolne rodniki, czyli atomy lub cząsteczki, mające jeden lub więcej niesparowanych elektronów. Są one zdolne do samodzielnego istnienia, ale charakteryzuje je na ogół wysoka reaktywność. Dążą do sparowania elektronów poprzez pozbycie się nadmiarowego elektronu lub przyłączenie elektronu od innej cząsteczki. Wówczas, zazwyczaj szybko, wchodzi w reakcje z wieloma różnymi cząsteczkami, zmieniając ich właściwości chemiczne i fizyczne [4]. Do ważniejszych reaktywnych biologicznie form tlenu występujących w komórkach nasion należą: anionorodnik ponadtlenkowy O_2^- , nadtlenek wodoru H_2O_2 , rodnik hydroksylowy (wodorotlenowy) $\cdot OH$ oraz dwuatomowa cząsteczka tlenu w stanie singletowym 1O_2 . Najwięcej wolnych rodników powstaje w obrębie mitochondriów, gdzie przebiegają procesy oddechowe, oraz w sąsiedztwie DNA. Dlatego struktury te najbardziej narażone są na ich działanie i jako pierwsze ulegają degradacji [15].

Najlepiej poznanym i udokumentowanym biologicznym łańcuchowym procesem wolnorodnikowym jest proces peroksydacji fosfolipidów błonnych, od którego rozpoczynają się najprawdopodobniej dalsze uszkodzenia oksydacyjne [53]. W skład fosfolipidów wchodzi reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które z łatwością ulegają utlenieniu do nadtlenków tych związków. Czynniki inicjującymi peroksydację lipidów mogą być: rodnik wodorotlenowy $\cdot OH$, rodniki organiczne (nadtlenkowy $LOO\cdot$, alkoksylowy $LO\cdot$, bądź alkilowy $L\cdot$), jak również ozon, tlenek i dwutlenek azotu, dwutlenek siarki [25]. Reakcja inicjacji przekształca cząsteczkę kwasu tłuszczowego w wolny rodnik alkilowy $L\cdot$, po czym następuje przegrupowanie wiązań podwójnych, w wyniku którego powstają wiązania sprzężone. Pojawienie się tych wiązań jest oznaką przebiegu peroksydacji i umożliwia śledzenie tego procesu [2].

W kolejnym etapie rodniki alkilowe $L\cdot$ reagują z tlenem, tworząc wolne rodniki nad-tlenkowe $LOO\cdot$, które z kolei zdolne są do odrywania atomów wodoru od kolejnych cząsteczek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych LH, prowadząc do powstania nad-tlenków kwasów tłuszczowych LOOH. Taki cykl reakcji może powtarzać się wielokrotnie. Ostatecznie dochodzi do reakcji pomiędzy wolnymi rodnikami z wytworzeniem produktu, niebędącego wolnym rodnikiem, a zmodyfikowaną formą kwasów tłuszczowych (np. dimery fosfolipidów, keto- lub hydroksykwasów tłuszczowe). Te związki, jako bardzo niestabilne, ulegają rozpadowi, tworząc kilku-, kilkunastowę-głowe fragmenty: aldehydy i hydroksyaldehydy. Najpopularniejszy i najczęściej identyfikowany jest dialdehyd malonowy MDA [2].

Wolne rodniki powstające podczas peroksydacji lipidów mogą reagować z białkami błon, tworząc wolne rodniki białek. Te natomiast mogą uczestniczyć w reakcjach z wolnymi rodnikami kwasów tłuszczowych, tworząc mieszane połączenia białkowo-lipidowe [4].

Negatywnych skutków peroksydacji lipidów błonnych jest bardzo wiele. Produkty peroksydacji modyfikują właściwości fizyczne błon komórkowych, zwiększając ich przepuszczalność dla jonów H^+ i innych substancji polarnych. Peroksydacja lipidów depolaryzuje błony. Powoduje również zahamowanie aktywności enzymów błonnych i białek transportujących. Ostatecznym wynikiem tych procesów jest utrata integralności błon wewnątrzkomórkowych i komórkowych [42]. Zarówno nad-tlenki kwasów tłuszczowych, jak i aldehydowe produkty peroksydacji są czynnikami rozprzegającymi fosforylację oksydacyjną w mitochondriach, czyli osłabiają zależność pomiędzy transportem elektronów przez łańcuch oddechowy a syntezą ATP w mitochondriach. Prawdopodobnie głównym mechanizmem takiego działania produktów peroksydacji lipidów jest niwelowanie przez nie różnicy stężeń protonów po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej, która powstaje wskutek aktywności łańcucha oddechowego i która napędza syntezę ATP. Zachodzi to prawdopodobnie w wyniku zwiększenia przez produkty peroksydacji lipidów przepuszczalności błony dla protonów [4].

Reaktywne formy tlenu mogą reagować z białkami, modyfikując reszty aminokwasowe oraz grupy prostetyczne białek złożonych i doprowadzając do agregacji lub fragmentacji cząsteczek białkowych [4]. Najczęściej mediatorem uszkodzenia białek jest rodnik wodorotlenowy $\cdot OH$, rzadziej anionrodnik ponadtlenkowy $O_2^{\cdot -}$ i nad-tlenek wodoru H_2O_2 (utlenianie grup tiolowych $-SH$). Zazwyczaj uszkodzenie oksydacyjne prowadzi do utraty aktywności biologicznej białka.

Kwasy nukleinowe są związkami bardziej stabilnymi niż białka i lipidy, ale również mogą być uszkodzane przez rodnik wodorotlenowy $\cdot OH$ i tlen singletowy 1O_2 . Reakcje rodnika wodorotlenowego z kwasami nukleinowymi mogą prowadzić do uszkodzenia zasad nukleinowych, reszt cukrowych lub rozerwania wiązań fosfodiesterowych łączących nukleotydy, czyli powstawania pęknięć nici kwasów nukleinowych [4].

Tabela 1. Wykaz antyutleniaczy enzymatycznych funkcjonujących w żywych nasionach i spełniających funkcje zabezpieczające komórki przed stresem oksydacyjnym [15, 43, 44]

Antyutleniacze enzymatyczne	Lokalizacja	Działanie
Mn-SOD – dysmutaza ponadtlenkowa	mitochondria	eliminuje rodnik ponadtlenkowy $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
CAT – katalaza	peroksosomy	rozkłada nadtlenek wodoru $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
GSH-PO – peroksydaza glutationowa	mitochondria, cytoplazma	rozkłada nadtlenek wodoru i wolne rodniki organiczne $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$ $ROOH + 2GSH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$
GSH-S-T – transferaza glutationowa	błony plazmatyczne (mitochondria, reticulum endopl.)	redukuje nadtlenki lipidów I. $LOOH + GSH \rightarrow LO-SG + H_2O$ II. $LO-SG + GSH \rightarrow LOH + GSSG$
GSH-Pxs – peroksydaza glutationowa wodoronadtlenku fosfolipidu	błony plazmatyczne	redukuje nadtlenki fosfolipidów $PLOOH + 2GSH \rightarrow GSSG + PLOH + H_2O$
GR – reduktaza glutationowa	cytoplazma, struktury błoniaste	regeneruje glutation $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$
AP – peroksydaza askorbinianowa	cytoplazma, chloroplasty	usuwa nadtlenek wodoru powstający w chloroplastach $H_2O_2 + Asc \rightarrow D-Asc + 2H_2O$
AR – reduktaza dehydroaskorbinianowa	cytoplazma, chloroplasty	regeneruje askorbinian, utleniając glutation D-Asc + $+ 2GSH \rightarrow GSSG + Asc$

Tabela 2. Wykaz antyutleniaczy nieenzymatycznych mogących występować w nasionach i spełniających funkcje pomocnicze w dezaktywowaniu wolnych rodników [15, 39]

Antyutleniacze nieenzymatyczne	Lokalizacja	Działanie
Hydrofilowe		
Kwas askorbinowy – witamina C	cytoplazma, chloroplasty, wakuola, ściana komórkowa oraz śródowisko wodne wewnątrz organelli komórkowych	reaguje bezpośrednio lub przy udziale enzymów z szeregiem wolnych rodników, regeneruje antyoksydanty związane z membranami (np. tokoferole)
Glutation (GSH)		wspólnie z askorbinianem uczestniczy w usuwaniu nadtlenu wodoru, utrzymuje grupy tiolowe białek w stanie zredukowanym, co w wielu wypadkach jest niezbędne dla aktywności funkcjonalnej białek enzymatycznych
Flawonoidy		usuwiają rodniki hydroksylowe i nadtlenkowe oraz anionorodnik ponadtlenkowy
Kwasy fenolowe		nasilają dysmutację wolnych rodników do związków o znacznie mniejszej reaktywności lub same reagują z wolnymi rodnikami, chelatują metale prooksydacyjne, hamują lub wzmacniają działanie innych antyutleniaczy (enzymatycznych i nieenzymatycznych)
Kwas fitynowy		wiąże jony metali
Cysteina		redukuje wolne rodniki, utleniając się do cystyny
Hydrofobowe		
Karotenoidy – karoteny (prowit. A) likopen ksantofile	błony komórkowe	zapobiegają powstawaniu lub wygaszają tlen singletowy, pobierając energię wzbudzenia lub wchodząc z nim w reakcję; reagują z organicznymi wolnymi rodnikami, powstającymi w procesie peroksydacji lipidów, oraz z nadtlentkiem wodoru, zabezpieczając grupy tiolowe białek przed utlenieniem; redukują rodniki tiolowe (RS) i sulfonyle (RSO ₂)
α-tokoferol – witamina E		wiąże wtórne wolne rodniki organiczne, przerywa łańcuch reakcji wolnorodnikowych peroksydacji lipidów
Ubichinon – koenzym Q		chroni przed peroksydacją lipoproteiny o niskiej gęstości

Tabela 3. Wykaz systemów naprawczych funkcjonujących w żywych nasionach, które naprawiają lub usuwają uszkodzenia wywołane działaniem wolnych rodników [4, 7]

Systemy naprawcze	Lokalizacja	Działanie
Naprawa białek:		
proteinyazy, proteazy i peptydazy	cytoplazma, błony komórkowe	odcinają utlenione białka, a następnie rozkładają je na pojedyncze aminokwasy, które mogą ponownie zostać użyte do syntezy białek
Naprawa lipidów:		
fosfolipazy, acetylotransferazy, peroksydazy glutationowej i transferazy	wszystkie struktury błoniaste w komórce	wycinają utlenione fragmenty lipidów z błon, umożliwiając innym enzymom naprawę uszkodzonych segmentów; wymieniają kwasy tłuszczowe oddzielone od lipidów lub wspomagają naprawę utlenionych kwasów tłuszczowych bez konieczności wycinania dużych fragmentów błon
Naprawa DNA:		
egzo- i endo- nukleazy, glikozylazy i polimerazy, ligazy	mitochondria, jądro komórkowe	wycinają zniszczone przez wolne rodniki fragmenty DNA; wypełniają ubytki powstałe po działaniu egzo- i endonukleaz; łączą naprawiane fragmenty

Nadtlenki aminokwasów, białek, zasad kwasów nukleinowych i kwasów nukleinowych są stosunkowo nietrwałe w porównaniu z nadtlenkami kwasów tłuszczowych i dlatego peroksydacja lipidów jest procesem dużo lepiej poznany.

Reasumując, należy wysunąć twierdzenie, że reaktywne formy tlenu mogą uszkadzać wszystkie główne klasy składników komórek (związki niskocząsteczkowe, białka, lipidy i kwasy nukleinowe), powodując:

- utlenianie związków niskocząsteczkowych (glutation, askorbinian, nukleotydy nikotynamidoadeninowe);
- inaktywację enzymów;
- inaktywację białek transportowych;
- pęknięcia nici DNA, uszkodzenia zasad DNA, degradację rybozy;
- uszkodzenia chromosomów;
- peroksydację lipidów błon;
- inhibicję fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach;
- zaburzenia wewnątrzkomórkowej homeostazy Ca^{2+} ;
- zaburzenia struktury cytoszkieletu;
- zmiany morfologii komórek;
- powstawanie mutacji [4].

Wszystkie te zmiany prowadzą do zaburzeń fizjologii nasion, spadku wigoru, a następnie do zamierania zarodka i zaniku zdolności kiełkowania.

Naturalne mechanizmy obronne przed reakcjami wolnorodnikowymi

Destrukcyjny wpływ wolnych rodników i reaktywnych form tlenu jest ograniczany przez funkcjonowanie w żywych komórkach mechanizmów obronnych. W toku ewolucji rośliny przystosowały się do funkcjonowania w obecności reaktywnych form tlenu. Poziom ich w komórkach jest bowiem zdeterminowany pojemnością i aktywnością systemu antyoksydacyjnego [1, 12]. W roślinach istnieje kilka mechanizmów funkcjonowania systemu antyoksydacyjnego, zapobiegającego uszkodzeniom lub naprawiającego te, powstałe wskutek działania wolnych rodników. Ochronną rolę przed toksycznym i mutagennym działaniem aktywnych form tlenu pełnią **antyutleniacze enzymatyczne**, katalizujące reakcje rozkładu nadtlenu, **antyutleniacze nieenzymatyczne**, związki mające wysoki potencjał redukcyjny i łatwo reagujące z wolnymi rodnikami (z tego powodu zwane zmiataczami wolnych rodników), oraz **systemy naprawcze**, które degradują, naprawiają lub usuwają uszkodzenia wywołane działaniem wolnych rodników. Równowaga między wytwarzaniem a usuwaniem reaktywnych form tlenu jest zatem ściśle kontrolowana. Stan, w którym ta równowaga przesunięta jest w stronę wytwarzania reaktywnych form tlenu, określany jest mianem stresu oksydacyjnego [13]. Ważne jest, aby ochrona przed stresem oksydacyjnym była wystarczająca, a taką odporność na stres gwarantuje tylko zbilansowany poziom różnych antyutleniaczy, biorących udział w usuwaniu reaktywnych form tlenu.

Sposoby indukcji mechanizmów obronnych przed stresem oksydacyjnym

Aplikacja antyutleniaczy

Jedną z form zapobiegania reakcjom wolnorodnikowym w starzejących się nasionach może być aplikacja antyutleniaczy. Są to niskocząsteczkowe związki mające wysoki potencjał redukcyjny i łatwo reagujące z wolnymi rodnikami. Stosuje się zarówno antyutleniacze naturalnie występujące w komórkach roślinnych, jak i syntetyczne związki [3, 14]. Pierwsza grupa związków przedstawiona została w rozdziale omawiającym naturalne mechanizmy obronne przed reakcjami wolnorodnikowymi. Do drugiej grupy zaliczyć można m.in.: butylohydroksytoluen (BHT), butylohydroksyanisol (BHA), dihydroksyanisol (Tiron), dimetylu sulfotlenek (DMSO), kwas salicylohydroksamonowy (SHAM), czy gallusan propylu. Wszystkie te związki hamują utlenianie poprzez wchodzenie w reakcje z czynnikami utleniającymi (działanie prewencyjne) lub z produktami pośrednimi utleniania, jakimi są zwykle wolne rodniki (działanie interwencyjne), skierowując reakcje na tory terminacji, czyli przerywania łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych. Wyniki badań są jednak dość kontrowersyjne i niejednoznaczne, dlatego odczuwa się niedosyt związany z brakiem jed-

nogłośnej koncepcji na temat udziału antyutleniaczy w reakcjach z wolnymi rodnikami i ich wpływu na zdolność kiełkowania i wigor nasion. Przeciwno wyprowadzonej przez Harmana wolnorodnikowej teorii starzenia się [23, 24] oponowali Pristley i in. [35, 36], twierdząc, że poziom wolnych rodników oraz poziom antyoksydantów z grupy tokoferoli nie zmieniał się w starzejących się nasionach soi, niezależnie od sposobu starzenia. Zwiększająca się zaś ilość wolnych rodników w osiach zarodkowych soi, starzejących się w warunkach wysokiego uwodnienia, nie była wynikiem zwiększonej ich generacji, lecz uwalniania z pułapek istniejących w nasionach odwodnionych. Innego zdania jest Senaratna i in. [41], odnotowując spadek poziomu tokoferoli w nasionach soi podczas starzenia, co sugerowałoby ich udział i zużywanie w reakcjach z wolnymi rodnikami, powstającymi podczas starzenia się nasion. Górecki i Harman [14] próbowali natomiast dowieść na przykładzie nasion grochu, że w warunkach przeciwdziałających pojawianiu się wolnych rodników (zastosowanie kilku antyutleniaczy) nasiona dłużej zachowały wigor i żywotność. W innych badaniach niekorzystny wpływ wolnych rodników powstających w starzejących się płatkach irysa był skutecznie ograniczany poprzez moczenie ich w roztworach antyutleniaczy [3].

Odwrotnie, potraktowanie nasion substancjami generującymi wolne rodniki, jak np. paraquat [18] lub AAPH [45], powodowało obniżenie ich zdolności kiełkowania i przyspieszenie starzenia. To może przekonywać o znaczącej roli wolnych rodników w procesach starzenia. Niekorzystny wpływ tych substancji eliminowany był przez skutecznie funkcjonujący antyoksydacyjny i naprawczy system aktywowany poprzez matrykondycjonowanie nasion [18, 45].

Jednakże wciąż niewiele jest pozycji literatury dotyczących poprawy jakości nasion pod wpływem traktowania antyutleniaczami. Przyczyną tego jest być może wysoki koszt stosowania substancji chemicznych o właściwościach redukujących i spełniających funkcje antyutleniaczy w żywych komórkach lub też skierowanie uwagi w ostatnich latach na ekologiczny aspekt prowadzonych badań. W związku z tym poszukiwanie i stosowanie antyutleniaczy pochodzenia naturalnego wydaje się być perspektywicznym kierunkiem do prowadzenia badań nad wpływem antyutleniaczy na zdolność kiełkowania, wigor i możliwości przechowalnicze nasion, szczególnie gatunków roślin uprawianych w celach konsumpcyjnych.

Aktywacja enzymatycznych systemów antyoksydacyjnych i naprawczych

Całkowicie ekologicznymi i stosunkowo niedrogimi metodami, stosowanymi w celu indukcji mechanizmów obronnych i naprawczych, są metody kondycjonowania, bazujące na stosunkach wodnych nasion. Nasiona suche, mające wilgotność niższą od tzw. wilgotności kondycjonalnej, nie są w stanie regenerować uszkodzeń powstałych w wyniku procesów utlenienia [50]. Obserwowano natomiast regenerację uszkodzeń zestarzeniowych i funkcjonalnych w nasionach znajdujących się przez

wiele lat w glebie, w stanie napęczniałym, spoczynkowym, niekiełkującym [5]. Wynika z tego wniosek, że aparat naprawczy nasion musi mieć zapewnione odpowiednie warunki do podjęcia aktywności. Podobnie jest z aktywnością enzymatycznych systemów antyoksydacyjnych. W nasionach suchych aktywność enzymów jest minimalna [42]. Aby pobudzić enzymatyczne systemy antyoksydacyjne i naprawcze w komórkach, konieczne jest uwilgotnienie nasion, ale tylko do ściśle określonej granicy. Zabieg taki nazywany jest ogólnie kondycjonowaniem nasion. Przy optymalizacji warunków kondycjonowania niezbędna jest znajomość wpływu poszczególnych parametrów kondycjonowania (różnych dla nasion poszczególnych gatunków, odmian, a nawet partii), takich jak: wilgotność wyjściowa i szybkość wnikania wody do nasion, dawka wody i długość okresu kondycjonowania (inkubacji), temperatura kondycjonowania oraz dostępność tlenu podczas kondycjonowania (ze względu na aktywację procesów oddechowych). Dobrze wykonany zabieg kondycjonowania powoduje przyspieszenie i wyrównanie kiełkowania nasion i wschodów siewek, szczególnie w niekorzystnych warunkach środowiskowych [20], zwiększenie aktywności wielu enzymów, w tym o działaniu antyoksydacyjnym – katalazy, oksydazy ponadtlenkowej, reduktazy glutationowej [2, 26], poprawę integralności struktur komórkowych [2, 17], nierzadko wpływa również na spowolnienie procesów starzenia w przechowywanych po tym zabiegu nasionach [16, 29]. Dodatkowo kondycjonowanie może poprawić zdrowotność nasion wskutek wymywania szkodliwych patogenów z ich powierzchni i wnętrza [31]. Częstokroć jednak obserwowano, że wysoka wilgotność i dość wysoka temperatura podczas kondycjonowania nasion sprzyjają namnażaniu się grzybów i wzmożonej penetracji podczas imbibicji [21, 32, 48].

Techniki kondycjonowania podzielone zostały przez McDonalda [30] na cztery grupy, biorąc pod uwagę sposoby uwilgatniania nasion: hydrokondycjonowanie, osmokondycjonowanie, matrykondycjonowanie i podkiełkowywanie.

Hydrokondycjonowanie – metoda ta oparta jest na swobodnym wnikaniu wody do nasion, regulowanym jedynie jej dostępnością i siłą ssącą nasion. W zależności od tego, w jaki sposób nasiona kontaktują się z wodą, uszczegółowiono rodzaje hydrokondycjonowania.

Moczenie nasion polega na zanurzeniu i przetrzymywaniu ich w wodzie przez określony czas, w ściśle określonych warunkach (temperatura, napowietrzanie). Zabieg ten i natychmiastowy wysiew nasion powoduje częstokroć przyspieszenie kiełkowania i wschodów siewek [17, 20] oraz może zmniejszyć niekorzystny wpływ warunków środowiskowych na początkowy wzrost roślin. Jednakże kondycjonowanie tą metodą wymaga dużego doświadczenia, a niewłaściwe jego wykonanie może doprowadzić do zmniejszenia wartości siewnej nasion. Podczas moczenia suchych nasion woda wnika zbyt gwałtownie do tkanek i mamy do czynienia z tzw. zjawiskiem stresu wodnego, skutkiem którego mogą być fizyczne uszkodzenia struktur komórkowych [38]. Niedostateczna dostępność tlenu do zarodka, wywołana zalaniem nasion, również może negatywnie wpłynąć na ich kiełkowanie.

Pokrywanie nasion, będących w rotacyjnym ruchu, rozpyloną wodą ma na celu zaabsorbowanie jej na powierzchni wszystkich nasion i następnie wniknięcie do wnętrza zarodka. Służy to spowolnieniu wnikania wody i równomiernemu oraz jednoczesnemu uwilgotnieniu wszystkich nasion. Metoda ta nazwana została „drum priming” i opisana przez Rowse [40]. Modyfikacją tej metody jest aplikowanie dawek wody w odstępach czasowych do nasion będących w ruchu [19, 51]. Kondycjonowane w ten sposób nasiona charakteryzowały się wyższą zdolnością i krótszym średnim czasem kiełkowania oraz wyższym wigorem, ocenianym prędkością utraty żywotności w teście przyspieszonego starzenia [19].

Osmokondycjonowanie jest powszechnie znanym zabiegiem stosowanym w celu przyspieszenia kiełkowania nasion. Polega ono na kontrolowanym uwilgotnianiu nasion w określonej temperaturze i czasie, w roztworach substancji osmotycznie czynnych, o niskim potencjale osmotycznym (KNO_3 , K_3PO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , NaCl , glicerol, mannitol, glikol polyetylenowy). Pobrana przez nasiona określona ilość wody umożliwia tzw. kiełkowanie *sensu stricte*, czyli przebieg procesów metabolicznych poprzedzających kiełkowanie właściwe, nie wystarcza natomiast do rozpoczęcia wzrostu zarodków i przebicia przez nie okrywy nasiennej. Większość nasion kondycjonuje się tą metodą w roztworach osmotycznie czynnych o potencjale od $-0,8$ do $-2,0$ MPa, w temperaturze $15-20^\circ\text{C}$, przez okres od kilku godzin do kilku dni [27]. Tak traktowane nasiona płuca się, suszy i przechowuje w stanie suchym przez określony czas. Wysiane do gruntu w dogodnym terminie nasiona natychmiast kiełkują, często w niekorzystnych warunkach środowiskowych [27]. Metoda osmokondycjonowania w roztworach osmotycznie czynnych, mimo opisanych zalet i opracowań w ponad 2000 publikacjach, nie znalazła szerokiego zastosowania w praktyce. Powodem tego są prawdopodobnie dość duże koszty stosowania, ograniczona dostępność tlenu do nasion oraz trudności z jednoczesnym kondycjonowaniem dużej ilości materiału siewnego.

Matrykondycjonowanie – to metoda uwilgotniania nasion, w której stosuje się nośnik wody, związek nieorganiczny (wermikulit, torf, Celite, Micro-Cel, Zonolite, Calflo), charakteryzujący się niskim potencjałem osmotycznym i dużą powierzchnią absorpcyjną (czyli możliwością utrzymywania dużej ilości wody), nietoksycznością w stosunku do nasion i przylepnością do ich powierzchni. Pierwsze próby stosowania tej metody opisali Kubik i in. [28] oraz Taylor i in. [46], a opatentowana została w 1990 roku [10]. Jest obecnie powszechnie uznaną metodą uszlachetniania nasion. Zabieg matrykondycjonowania polega na zmieszaniu nasion w odpowiednich proporcjach z wodą i substancją nośną oraz inkubowaniu ich w temperaturze korzystnej dla kiełkowania, zwykle $15-25^\circ\text{C}$, przez 1–14 dni, co jest uzależnione od gatunku [27]. Następnie substancja ta jest odsiewana lub wymywana, a nasiona odpowiednio suszone i przechowywane do czasu siewu. Przeprowadzone dotychczas badania wykazały, że matrykondycjonowanie nasion wielu gatunków przyspiesza i wyrównuje kiełkowanie, szczególnie w niskich temperaturach [20, 37, 47]. W poddanych temu

zabiegowi nasionach stwierdzono większą integralność membran cytoplazmatycznych [17, 47] oraz wyższy wigor. Wyrażone to zostało intensywnym wydzielaniem etylenu, wyższą aktywnością *in vivo* oksydazy ACC oraz dehydrogenaz [17, 22], korzystniejszymi wschodami siewek [20], jak również zaawansowaniem w degradacji materiałów zapasowych [8]. Kondycjonowane nasiona marchwi, bezpośrednio po uszlachetnieniu, zawierały wyższe ilości sacharozy niż nasiona kontrolne [11]. Badania cytologiczne za pomocą mikroskopu świetlnego i elektronowego wykazały znaczne przyspieszenie procesów metabolicznych w osiach zarodkowych matrykondycjonowanych nasion [17, 22]. Końcowym efektem tych procesów był szybszy wzrost i rozwój roślin w szklarni, po ich posadzeniu w polu oraz wyższy plon nasion [9]. Na podstawie uzyskanych wyników i obserwacji cytologicznych można przypuszczać, że matrykondycjonowanie powoduje uruchomienie procesów reperacyjnych, a następnie zapoczątkowuje procesy metaboliczne, które sprzyjają przyspieszeniu równomiernego kiełkowania nasion i wschodów siewek, szczególnie w warunkach stresowych. Badania wykazały, że matrykondycjonowane nasiona można przechowywać, najlepiej w niskiej temperaturze (3°C) i wilgotności względnej powietrza (RH; 40%), czyli w warunkach korzystnych dla przechowywania nasion typowych (ortodoksyjnych) [16].

Podkiełkowanie – metoda ta polega, odmiennie niż w prezentowanych powyżej trzech technikach kondycjonowania, na doprowadzeniu metabolizmu nasion do punktu, w którym następuje przebicie okrywy nasiennej przez korzeń zarodkowy [30]. Metoda ta zatem służy nie tyle pobudzeniu enzymatycznych systemów, co maksymalnemu zaawansowaniu procesów metabolicznych składających się na kiełkowanie nasion.

Badanie fizycznych i chemicznych czynników oraz procesów metabolicznych, zachodzących w nasionach podczas ich kondycjonowania metodami opartymi wyłącznie na stosunkach wodnych, rzuca nowe światło na te zagadnienia. Dotychczas zabiegi takie stosowane były dość powszechnie na nasionach „świeżych”, niezestarałych, celem przyspieszenia ich kiełkowania i wschodów siewek w polu. Ostatnio optymalizuje się metody kondycjonowania do celów poprawy wigoru nasion częściowo zestarzałych i podejmowane są próby przedłużania żywotności nasion.

Literatura

- [1] Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85: 235–241.
- [2] Bailly C., Benamar A., Corbineau F., Come D. 1997. Changes in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds during accelerated ageing and subsequent priming. W: Ellis R.H., Black M., Murdoch A.J., Hong T.D. *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. ISBN 0-7923-4363-8: 665–672.

- [3] Bailly C., Corbineau F., van Doorn W.G. 2001. Free radical scavenging and senescence in Iris petals. *Plant Physiol. Bioch.* 39: 649–656.
- [4] Bartosz G. 2003. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. PWN, Warszawa: 447 ss.
- [5] Bochenek A. 1998. Ekofizjologiczne uwarunkowania dynamiki glebowego banku nasion chwastów. *Post. Nauk Rol.* 6: 83–100.
- [6] Bochenek A., Górecki R.J., Grzesiuk S. 2000. Ogólne właściwości biologiczne nasion. W: Duczmal K.W., Tucholska H. Nasiennictwo. PWRiL, Poznań: 116–170.
- [7] Davies K.J.A. 2000. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. *IUBMB Life* 50(4/5): 279–289.
- [8] Dawidowicz-Grzegorzewska A. 1997. Ultrastructure of carrot seeds during matriconditioning with Micro-Cel E. *Ann. Bot.* 79: 535–545.
- [9] Dąbrowska B., Suchorska K. 1999. Wpływ matrykondycjonowania nasion papryki (*Cap-sicum annuum* L.) ostrej na wigor nasion, siewek, plonowanie i jakość surowca. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 466: 135–145.
- [10] Eastin J.A. 1990. Solid matrix priming of seeds. U.S. Patent 4912874.
- [11] Fauquet C. 2002. Recherche de marqueurs physiologiques et biochimiques de la pregermination des semences de carotte (*Daucus carota* L.). Memoire de Maîtrise, Université Pierre et Marie Curie: 49 ss.
- [12] Foyer C.H., Descourvieres P., Kunert K.J. 1994. Protection against oxygen radicals: An important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17: 507–523.
- [13] Foyer C.H., Lopez-Delgado H., Dat J.F., Scott I.M. 1997. Hydrogen peroxide – and glutathione – associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100: 241–254.
- [14] Górecki R.J., Harman G.E. 1987. Effects of antioxidants on viability and vigour of ageing seeds. *Seed Sci. Technol.* 15: 109–117.
- [15] Górecki R.J., Kulka K., Puchalski J. 1998. Mechanizm starzenia się nasion w aspekcie ich długiego przechowywania. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 463: 191–209.
- [16] Grzesik M. 1999. Germination and stress tolerance of *Callistephus chinensis* L. seeds following matriconditioning and storage. Hodowla Roślin Ogrodniczych u Progu XXI wieku. Akademia Rolnicza, Lublin: 369–372
- [17] Grzesik M., Dawidowicz-Grzegorzewska A., Górnik K. 2000. Effects of matriconditioning with Micro-Cel E on *Callistephus chinensis* L. seeds germination, seedling emergence, stress tolerance and some catabolic events. *Acta Hort.* 517: 121–129.
- [18] Grzesik M., Górnik K., Karsznicka A. 2001. Improving storability of *Callistephus chinensis* seeds by matriconditioning in the presence of chemicals. 1st International Congress on: Genetic, Molecular and Physiological Mechanisms, organised by: Wageningen Seed Centre and EU COST Action 828. Abstracts: 34.
- [19] Grzesik M., Lea Tea, Bedrosian A., Paschal T. 2001. Germination and ageing of the hydroprimed seeds of China aster (*Callistephus chinensis* Ness). *Folia Hort. Ann* 13/1A: 569–573.
- [20] Grzesik M., Nowak J. 1998. Effect of matriconditioning and hydropriming on *Helichrysum bracteatum* L. seed germination, seedling emergence and stress tolerance. *Seed Sci. Technol.* 26: 363–376.

- [21] Habdas H., Grzesik M., Szafirowska A., Sokołowska A. 2000. Cytological and physiological effects of matriconditioning on cucumber seeds germination. *Acta Hort.* 517: 113–120.
- [22] Habdas H., Janas R., Szafirowska A., Staniaszek M. 1999. Zmiany cytologiczne wywołane przez grzyby w matrykondycjonowanych nasionach roślin ogrodniczych. *Handbook of Horticultural Science in the XXI Century*. Akademia Rolnicza, Lublin: 239–243.
- [23] Harman D. 1978. Free radical theory of aging: nutritional implications. *Age* 1: 145–152.
- [24] Harman G.E., Mattick L.R. 1976. Association of lipid oxidation with seed ageing and death. *Nature* 260: 323–324.
- [25] Hippeli S., Elstner E.F. 1996. Mechanisms of oxygen activation during plant stress: biochemical effects of air pollutants. *J. Plant Physiol.* 148: 249–257.
- [26] Jeng T.L., Sung J.M. 1994. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzyme activity of artificially-aged peanut seed. *Seed Sci. Technol.* 22: 531–539.
- [27] Khan A.A. 1992. Preplant Physiological Seed Conditioning. *Hort. Rev.* 13: 131–181.
- [28] Kubik K.K., Eastin J.A., Eastin J.D., Eskridge K.M. 1988. Solid matrix priming of tomato and pepper. *Proceedings of the International Conference on Stand Establishment of Horticulture Crops*. Lancaster, PA: 86–96.
- [29] Mandal A.K., De B.K., Saha R., Basu R.N. 2000. Seed invigoration treatments for improved storability, field emergence and productivity of Soybean (*Glycine max* [L.] MERRILL). *Seed Sci. Technol.* 28: 349–355.
- [30] McDonald M.B. 2000. Seed priming. W: Black M., Bewley J.D. *Seed Technology and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press, England; CRC Press, USA and Canada: 287–325.
- [31] Osburn R.M., Schroth M.N. 1988. Effect of osmopriming sugar beet seed on exudation and subsequent damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathol.* 78: 1246–1250.
- [32] Petch G.M. 1989. The implications of microfloral changes resulting from seed priming and film-coating during the process engineering of vegetable seeds. *School of Chemical Engineering, University of Birmingham, England*: 178 ss.
- [33] Podlaski S. 2000. Przechowywanie nasion. W: Duczmal K.W., Tucholska H. *Nasiennictwo*. PWRiL, Poznań: 276–278.
- [34] Priestley D.A. 1986. Seed ageing: Implications for Seed Storage and Persistence in the Soil. *Cornell University Press, Ithaca, NY*: 304 ss.
- [35] Priestley D.A., Leopold A.C. 1979. Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. *Plant Physiol.* 63: 726–729.
- [36] Priestley D.A., Werner B.G., Leopold A.C., McBride M.B. 1985. Organic free radical levels in soybean seeds and pollen: the effects of hydration and aging. *Physiol. Plant.* 64: 88–94.
- [37] Prusiński J. 1991. Kiełkowanie i wschody roślin strączkowych w warunkach chłodnej i wilgotnej gleby. *Post. Nauk Rol.* 3/4/5: 3–18.
- [38] Prusiński J. 1998. Kondycjonowanie nasion roślin strączkowych – teoria i praktyka. *Post. Nauk Rol.* 6: 3–101–114.
- [39] Rice-Evans C., Miller N.J., Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *The Trends in Plant Science* 2: 152–159.
- [40] Rowse H.R. 1996. Drum-priming: a non-osmotic method of priming seeds. *Seed Sci. Technol.* 24: 281–294.

- [41] Senaratna T., Gusse J.F., McKersie B.D. 1988. Age-induced changes in cellular membranes of imbibed soybean seed axes. *Physiol. Plant.* 73: 85–91.
- [42] Stewart R.R.C., Bewley J.D. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated ageing of soybean axes. *Plant Physiol.* 65: 245–248.
- [43] Sung J.M. 1996. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during ageing. *Physiol. Plant.* 97: 85–89.
- [44] Sung J.M., Chiu C.C. 1995. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. *Plant Sci.* 110: 45–52.
- [45] Sung J.M., Chiu K.Y. 2001. Solid matrix priming can partially reverse the deterioration of sweet corn seeds induced by 2,2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride generated free radicals. *Seed Sci. Technol.* 29: 287–298.
- [46] Taylor A.A., Klein D.E., Whitlow T.H. 1988. SMP: solid matrix priming of seeds. *Scientia Hort.* 37: 1–11.
- [47] Taylor A.A., Prusiński J., Hill H.J., Dickson M.D. 1992. Influence of seed hydration on seedling performance. *HortScience* 27: 336–344.
- [48] Tylkowska K., van den Bulk R.W. 2001. Effects of osmo- and hydropriming on fungal infestation levels and germination of carrot (*Daucus carota* L.) seeds contaminated with *Alternaria* spp. *Seed Sci. Technol.* 29: 365–375.
- [49] Vertucci Ch.W., Leopold A.C. 1987. Oxidative Processes in Soybean and Pea Seeds. Effect of light, temperature and water content. *Plant Physiol.* 84: 1038–1043.
- [50] Villiers T.A. 1973. Ageing and the longevity of seeds in field conditions. W: Heydecker W. Seed ecology. Pennsylvania State University Press: 265–288.
- [51] Warren J.E., Bennett M.A. 1997. Seed hydration using the drum priming system. *HortScience* 32: 1220–1221.
- [52] Wettlaufer S.H., Leopold A.C. 1991. Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. *Plant Physiol.* 97: 165–169.
- [53] Wilson D.O., McDonald M.B. 1986. The lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Sci. Technol.* 14: 269–300.
- [54] Zhang M., Maeda Y., Furihata Y., Nakamaru Y., Esashi Y. 1994. A mechanism of seeds deterioration in relation to the volatile compounds evolved by dry seeds themselves. *Seed Sci. Res.* 4: 49–56.

Seeds ageing and protective mechanisms counteracting oxidation stress

Key words: seeds, seeds ageing, oxidants, peroxidation, defence mechanisms, antioxidants, conditioning

Summary

Ageing of all organisms is a genetically coded inevitable consequence of life processes, which are modified by external factors. Peroxidation processes, synthesis of toxic compounds and Maillard reaction, are the most important processes in seeds,

affecting ageing rate. A counter balance for them is provided by natural defence mechanisms including anti-oxidation processes and repair systems. Stimulation of natural defence mechanisms and application of antioxidants may be the methods counteracting negative reactions and decreasing ageing of seeds. The more efficient the anti-oxidation system, the higher seed vigour. High quality of seeds thanks to selection, optimal storage conditions and conditioning can significantly increase the longevity of seeds.