

DONIESIENIE NAUKOWE

**Metoda oceny żywotności długookresowo przechowywanych nasion
na podstawie obecności i aktywności α -amylazy***Paweł Przybylski**Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych*

Postęp cywilizacji może wpłynąć na zubożenie puli genowej populacji drzew leśnych. Z tego względu Lasy Państwowe przechowują długoterminowo cenny materiał genetyczny, głównie w postaci nasion pozyskanych w miejscu urodzaju. Warunki przechowywania nasion to m.in. niska temperatura (w przypadku nasion orthodox do -30°C) i odpowiednio dostosowany do temperatury stopień wilgotności. Jednakże negatywne reakcje fizjologiczne zachodzące w nasieniu podczas sztucznie wywołanego spoczynku mogą spowodować zamarcie zdeponowanych nasion. Dlatego też stosuje się monitoring przechowywanego materiału siewnego. Praca prezentuje metody analizy biochemicznej, dzięki którym można przeprowadzić ocenę żywotności zdeponowanych nasion.

Rozwijający się przemysł oraz postęp cywilizacyjny spowodowały bezpośrednie zagrożenie środowiska naturalnego. Realne stało się niebezpieczeństwo spowodowane znacznymi emisjami gazów i pyłów zatruwających atmosferę oraz ścieków deponujących się w wodach gruntowych. Dostrzegalne stają się zmiany klimatu w skali globalnej, szczególnie w odniesieniu do efektu cieplarnianego i tzw. dziury ozonowej. Możliwe jest zatem wymarcie w niedalekiej przyszłości niektórych gatunków roślin i zwierząt lub też całych ich populacji egzystujących na danym terenie. Niebezpieczeństwo to szczególnie powinno zainteresować leśników, gdyż eliminacji mogą ulec podstawowe gatunki lasotwórcze naszego kraju. Dostrzegalne ocieplenie klimatu (Ericsson 1993), czy też zubożenie puli genowej, spowodowane wyparciem osobników niedostosowanych do wyższych dawek zanieczyszczeń przemysłowych, może stanowić w przyszłości zagrożenie dla ekosystemów leśnych Polski.

Leśnicy polscy, przewidując możliwość zaistnienia najczarniejszego scenariusza i pamiętając klęskę w Górach Izerskich, zde-

ponowali w Banku Genów nasiona najcenniejszych populacji krajowych drzew leśnych. Bank ten został założony w Kostrzycy w roku 1995 i jest obiektem będącym chlubą polskich leśników. Nasiona przechowuje się tu w specjalnie dostosowanych do tego typu chłodniach, umożliwiających zdeponowanie leśnego materiału rozmnożeniowego dla dalszych pokoleń.

Przechowywany w chłodniach materiał genetyczny musi jednak podlegać systematycznej kontroli. Wynika to z reakcji fizjologicznej zachodzącej w nasionach w przypadku długookresowego przechowywania, w czasie którego następuje uszkodzenie układu cytomembran, biosyntezy białka, aparatu genetycznego i jąder komórkowych (Janson i in. 1996). Zatem istnieje możliwość istotnego zubożenia genetycznego niektórych partii nasion, a wraz z tym utraty cennych genotypów. Naukowcy ochraniają więc zdeponowane zasoby genetyczne, opracowując metody ich przysposobienia do długookresowego przechowywania oraz określając żywotność materiału siewnego zarówno przed, jak i w trakcie zdeponowania.

W zakres oceny badanych nasion wchodzi cztery podstawowe charakterystyki: czystość plonu, masa 1000 nasion, żywotność nasion, liczba nasion zdolnych do kiełkowania (Załęski i in. 1998). Podstawową metodą określania żywotności nasion jest próba kiełkowania ich na bibule, na piasku lub w piasku. Natomiast dla drzew wymagających długiego przystosowania przed-siewnego barwienie tetrazoliną lub indygo-karminem pozwala na ocenę ich zdolności kiełkowania. Inną metodą stosowaną w przypadku zaistnienia potrzeby przyspieszonej oceny jest ustalenie jakości materiału siewnego poprzez prześwietlenie go miękkimi promieniami X – Roentgena (Załęski 1996), dzięki czemu można wykryć szczegóły wewnętrznej budowy, co pozwala na stwierdzenie ewentualnego niedorozwoju nasion spowodowanego deformacją zarodka lub też obecnością szkodliwych owadów.

Alternatywną metodą oceny jakości przechowywanego materiału siewnego jest test na wykrycie obecności w badanym materiale siewnym α -amylazy. Białko to jest enzymem hydrolitycznym pojawiającym się w nasionach w czasie kiełkowania, którego funkcją jest rozkład materiałów zapasowych (skrobi) na cukry proste. Jego synteza jest kontrolowana przez fitohormon giberelinę (Kopcewicz i in. 1998), wydzielany wyłącznie w nasionach, w których występuje prawidłowo rozwijający się zarodek. W przypadku jego braku lub uszkodzenia reakcja fizjologiczna nie zajdzie. Giberelina dyfunduje do komórek warstwy aleuronowej, gdzie rozpoczyna się synteza α -amylazy. Obecność enzymu świadczy o fizjologicznym rozpoczęciu procesu kiełkowania.

Przeprowadzenie dodatkowych oznaczeń ilościowych daje szansę stwierdzenia korelacji pomiędzy zawartością wykrytej amylazy a energią kiełkowania.

Jest kilka metod oceny obecności α -amylazy, w tej pracy omówiono najbardziej rozpowszechnione. Jedną z nich jest immunodetekcja, polegająca na reakcji serologicznej enzymatycznego białka. Zachodzi ona

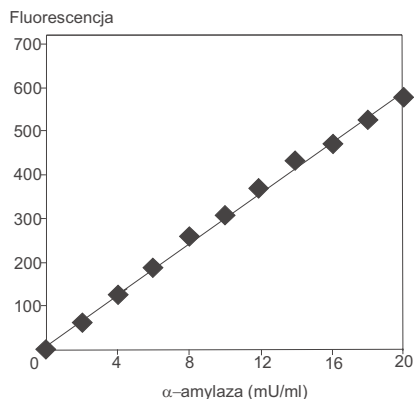
zgodnie z zasadą komplementarności antygen-przeciwciała. Na początku homogenizat z interesujących nas nasion poddajemy elektroforezie w warunkach nie denaturujących na żelu poliakrylamidowym. W tym etapie występują dwie fazy: 1) zagęszczanie białek obecnych w ekstrakcie, 2) właściwy rozdział na poszczególne frakcje. Rozdział odbywa się na zasadzie ukierunkowanej migracji białek w polu elektrycznym. Poliakrylamid tworzy specyficzną siatkę, przez jej pory białka migrują w tempie odpowiadającym ich wielkości i masie cząsteczkowej. Białka o dużej masie cząsteczkowej będą migrowały wolniej niż białka o mniejszej masie.

Identyfikacja białek rozdzielonych na żelach poliakrylamidowych jest znacznie utrudniona ze względu na małe pory żeli, w odniesieniu do dużych rozmiarów sond, np. przeciwciała (Dąbrowski 2005). Dla ułatwienia stosuje się transfer białek z żelu na porowatą membranę o zdolnościach adsorbcyjnych. Białka na membranach mogą reagować już z wieloma typami sond, w reakcjach serologicznych są to przeciwciała. Przyłączają się one do określonego białka, w wypadku nasion do α -amylazy. W dalszym etapie do przyłączonego przeciwciała, zwanego I-rzędowym, przyłączy się przeciwciało II-rzędowe. Tak połączony kompleks wybarwiany jest reakcją kolorymetryczną w celu uzyskania prążka świadczącego o obecności α -amylazy w analizowanym materiale. Jest to analiza wysoce precyzyjna, umożliwiająca wykrycie nawet poniżej 1 μ g białka w jednym gramie tkanki (Dąbrowski 2005).

Drugą metodą oznaczenia aktywności enzymu jest metoda Bernfelda z 1955 r. (Kłyszajko-Stefanowicz 2003). Polega ona na utlenieniu kwasem 3,5-dinitrosalicylowym grup redukujących, uwolnionych podczas hydrolizy skrobi przez amylazy. Powstałe barwne połączenia grup aldehydowych z odczynnikami określa się kolorymetrycznie w spektrofotometrze przy długości fali 530 nm. Jest to metoda prosta w wykonaniu

i stosunkowo niedroga, wymaga jednak znacznej ilości czasu. Stosowana jest także metoda Hainkela (Kłyszajko-Stefanowicz 2003) wykorzystująca hydrolytyczne właściwości α -amylazy. Enzym ten rozkładając substrat (skrobię) na cukry proste powoduje zmniejszenie intensywności zabarwienia skrobi przez jod. Wyniki podaje się w jednostkach Wohlgemutha, oznaczając taką aktywność amylazy w 1 ml roztworu, która rozkłada 1 mg skrobi do produktów nie dających zabarwienia w reakcji z jodem. Metoda ta jest znacznie szybsza od poprzedniej, zachowując poprawność uzyskanych wyników.

Na rynku dostępne są komercyjne urządzenia automatyzujące znacząco cały cykl analiz detekcji obecności i aktywności enzymów hydrolytycznych w przechowywanych nasionach. Dzięki ich pomocy można otrzymać dziesiątki wyników w ciągu jednego dnia, przy zachowaniu wysokiej precyzji i dokładności. Zasada ich działania opiera się również na trawieniu skrobi przez α -amylazy. W tym przypadku do produktów trawienia dodawany jest specyficzny znacznik fluorescencyjny, który po połączeniu z monosacharydami emituje wiązkę światła wizualizowaną spektrofotometrycznie.



Krzywa wzorcowa ilości α -amylazy w 1 ml roztworu, na podstawie fluorescencji [dane: Invitrogen detection technologies: EnzChek Ultra Amylase Assay Kit (E33651)].

Na podstawie uzyskanych wyników odpowiedni program komputerowy, wykorzystując krzywą wzorcową, określi ilościowo występowanie α -amylazy w badanej próbce.

Biochemiczne metody oceny aktywności fizjologicznej nasion mogą dostarczyć znacznej liczby informacji w krótkim czasie. Są one także doskonałym uzupełnieniem stosowanych dotychczas metod oceny.

Literatura

- Dąbrowski S. 2005: Immunodetekcja białek. Materiały do kursu „DNA-Gdańsk II”.
- Erikson G., Namkoong G., Roberts J. H. 1993: Dynamic gene conservation for unceration futures. *For. Ecol. Manag.*, 62: 15-37.
- Janson L., Załęski A., Gorączko P., Gozdalik M., Sułkowska M., Gumnicka O., Tomaszewski M. 1996: Fizjologiczne i biochemiczne aspekty długoterminowego przechowywania generatywnych i wegetatywnych organów i tkanek drzew leśnych. *Inst. Bad. Leś.*, 24-88.
- Kłyszajko-Stefanowicz L. 2003: Ćwiczenia z biochemii. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- Kopcewicz J., Lewak S. 1998: Podstawy fizjologii roślin. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1998.
- Suszka B., Muller C., Bonnet-Masimbert M. 1994: Nasiona leśnych drzew liściastych. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa-Poznań.
- Załęski A., Aniśko E., Kantorowicz W. 1998: Zasady oceny nasion w Lasach Państwowych. Stud. Podyplom. Gen. i Sel. Drzew Leś. Materiał. Wykład., Cz.1: 248-251.
- Załęski A. 1998: Zastosowanie rentgenowskich metod oceny w leśnictwie. Stud. Podyplom. Gen. i Sel. Drzew Leś. Materiał. Wykład., Cz. 1: 260-264.