

Metody oceny zmian genetycznych wywołanych starzeniem się nasion przechowywanych w bankach genów

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: starzenie się nasion, markery genetyczne, zachowanie plazmy zarodkowej

Wstęp

Długoterminowe przechowywanie nasion w warunkach banków genów indukuje proces naturalnego starzenia się. Jest on bardzo złożony i następuje na różnych poziomach organizacji komórkowej. Najbardziej ewidentne jego objawy ujawniają się w postaci anomalii w budowie morfologicznej, czy w postaci zmian ultrastruktury komórkowej. Objawy te są ściśle związane z zaburzeniami o podłożu biochemicznym takimi jak: degradacja lipidów, peroksydacja i tworzenie wolnych rodników, przemiany kwasów tłuszczowych, emisja lotnych substancji toksycznych czy przemiana biochemiczna dużych polimerów (białek, kwasów nukleinowych) i przemiana biochemiczna cukrów. Jeśli kumulacja zaburzeń biochemicznych nie doprowadzi do śmierci nasion to większość z nich usuwana jest podczas imbibicji i kiełkowania. Jednak zaburzenia biochemiczne w starzejących się nasionach mogą doprowadzić do znacznie poważniejszych zmian na poziomie genetycznym. Są one najgroźniejsze, ponieważ mogą utrwalać się i akumulować na przestrzeni pokoleń, zmieniając wyjściową strukturę genetyczną przechowywanych populacji.

Zmiany genetyczne związane ze starzeniem się nasion

Indukowane zmiany genetyczne

Proces starzenia się może powodować zmiany w strukturze DNA w postaci hydrolizy łańcucha, których ilość postępuje z wiekiem nasion. Często pękają zarówno pojedyncze, jak i podwójne nici jądrowego DNA [5]. Taka fragmentacja DNA prowadzi do aberracji chromosomowych, a indukowanie aberracji jest funkcją utraty żywotności, nie jest natomiast funkcją czasu przechowywania [36]. Częstość występowania aberracji chromosomowych jest ściśle związana z kompleksem warunków przechowywania (temperatura, wilgotność, a szczególnie obecność tlenu „aeracja,„) [11]. Za fragmentację DNA odpowiedzialny jest zwłaszcza rodnik hydroksylowy. Przyłącza on do zasad purynowych i pirymidynowych kwasów nukleinowych grupę hydroksylową do podwójnego wiązania odpowiedniego pierścienia. Również istotną rolę odgrywa produkt utleniania kwasów tłuszczowych – dwualdehyd malonowy reagujący z zasadami azotowymi kwasów nukleinowych. Fragmenty DNA mogą się łączyć z różnymi substancjami w trwałe kompleksy hamując proces replikacji i ekspresji informacji genetycznej [5]. Aberracje chromosomowe można obserwować dopiero podczas kiełkowania w mitotycznych jądrach komórek tkanek merystematycznych siewek wyhodowanych ze starzejących się nasion [27]. Należy zaznaczyć, że zmiany te spowodowane są uszkodzeniami chromonemy już w okresie poprzedzającym replikację. Procesy te nasilają się z czasem w tkankach powietrznie suchych i są prawdopodobnie spowodowane brakiem możliwości uruchomienia mechanizmu naprawczego [18]. Zmiany mutacyjne tego typu dotyczą nasion przechowywanych w stanie suchym, natomiast nie zaobserwowano występowania ich w nasionach w stanie pełnej imbibicji. Dzieje się to prawdopodobnie dlatego, że w tych ostatnich przez cały czas aktywny jest aparat naprawczy opierający się na działaniu specyficznych enzymów reperacyjnych: endonukleaz, polimeraz i ligaz, które zaczynają działać dopiero przy dostępie wody.

Mniejsze mutacje wywołane długotrwałym przechowywaniem nasion, jeśli nie są letalne, to manifestowane są dopiero w następnych pokoleniach, gdy zaistnieje możliwość segregacji genów [30], ponieważ często są one maskowane przez ich dominujące allele. Niektóre mutacje recesywnych genów mogą być letalne w przypadku komórek haploidalnych i powodować np. sterylność pyłku u dojrzałych roślin. Najlepiej widoczne są mutacje, których skutkiem fenotypowym jest zaburzona synteza chlorofilu [12]. Abdalla i Roberts [1] wykazali, że np. u grochu, fasoli i jęczmienia spadek żywotności do 50% powoduje indukcję mutacji chlorofilowych u około 1–1,4% roślin. Mniej ewidentnymi efektami mutacji są zmiany cech ilościowych powodujące np. obniżkę plonów i pogorszenie ich jakości, słabszą oporność na patogeny, czy spowolnienie wzrostu [2]. Nawet niewielki spadek żywotności może powodować znaczącą akumulację dziedzicznych mutacji, maskowanych w większości przez

geny dominujące. Mogą się one ujawnić dopiero w następnych pokoleniach i prowadzić do zmian w strukturze genetycznej całej przechowywanej populacji. Akumulacja niewielkich zmian genetycznych ma duże znaczenie, gdy nasiona przeznaczone są do reprodukcji lub hodowli, a w przypadku zachowania gatunków chronionych i zagrożonych materiał taki nie jest rekomendowany do reintrodukcji [41]. Jednak mutacje punktowe i aberracje chromosomowe nie mają tak istotnego wpływu na strukturę genetyczną populacji, co zjawisko selekcji naturalnej. Większość mutacji, jeśli nie jest letalna, to ulega eliminacji na drodze selekcji, poza tym nawet przy spadku żywotności do 50% są one względnie rzadkie (1–4%) [32]. Najistotniejszym dla banków genów efektem procesów starzenia się nasion są zmiany dotyczące struktury wewnętrznej całej populacji. Najważniejszą cechą populacji jest jej skład (ilość i frekwencja poszczególnych komponentów), będący przedmiotem zmian w czasie pobierania próby, przechowywania czy regeneracji.

Mechanizmy naprawcze

Jedną z podstawowych przyczyn starzenia się i zamierania nasion jest załamanie się większości mechanizmów naprawczych, szczególnie tych aktywnych w czasie wczesnego kiełkowania [23]. W nasionach w stanie suchym praktycznie zatrzymany jest metabolizm i może dojść do akumulacji zmian degradacyjnych, aż do całkowitej utraty żywotności, gdyż enzymy reperacyjne nie mogą funkcjonować przy niskiej zawartości wody w komórkach [35]. Natomiast w stanie uwodnionym zmiany te eliminowane są na bieżąco przez procesy reperacyjne [21]. Szczególnie w czasie kiełkowania następuje eliminacja lub znaczne ograniczenie uszkodzeń wywołanych starzeniem się [33]. Proces ten rozpoczyna się wcześnie wraz z rehydracją suchych nasion. Najpierw następuje odbudowanie membran, potem uszkodzone organelle zostają zastępowane nowymi, również enzymy są syntezowane *de novo*. Zmiany w genomie, takie jak aberracje chromosomowe, zanikają podczas podziałów komórkowych. Nawet poważne pęknięcia DNA ulegają ligacji [29]. Wszystkie te procesy zachodzą pod warunkiem, że degradacja nie posunęła się zbyt daleko. Na system reperacyjny składa się wiele labilnych białek, które również mogą ulec uszkodzeniom. Może to być bezpośrednią przyczyną utraty żywotności. Istnieje ponadto małe prawdopodobieństwo wznowienia syntezy enzymów tego układu [19].

U roślin istnieje kilka systemów reperacyjnych inicjowanych przez światło, jak i działających w ciemności, mogących zredukować lub całkowicie usunąć uszkodzenia materiału genetycznego. Istnieją trzy znane mechanizmy reperacyjne DNA: fotoaktywacja, reperacja przez wycinanie i reperacja postreplikacyjna [13].

Procesy naprawcze przeprowadzane są przez enzymy produkowane konstytutywnie w komórkach. Ich aktywność utrzymuje się zazwyczaj na określonym poziomie i mogą one naprawić określoną liczbę uszkodzeń powstałych między podziałami. Jeśli jednak dojdzie do sytuacji krytycznej, tj. powstanie duża ilość pęknięć i nastąpi frag-

mentacja DNA, to indukowany jest system „SOS”. Polega to na indukcji kilkunastu genów biorących udział w replikacji i reperacji DNA. Reakcja „SOS” zwiększa istotnie przeżywalność komórek w wyniku wzmożonej rekombinacji i wypełniania luk występujących w DNA. Proces ten powoduje istotny wzrost mutacji w wyniku losowego włączania zasad [20].

Nawet krótki okres uwodnienia poprzedzający przechowywanie może korzystnie wpłynąć na długość życia nasion. W celu redukcji skutków procesu starzenia się stosuje się tzw. „osmokondycjonowanie”. Istotą tego procesu jest pobudzenie nasion do rozpoczęcia przemian metabolicznych prowadzących do kiełkowania, przy jednoczesnym zahamowaniu wzrostu korzenia zarodkowego, przez zapewnienie restrykcyjnych warunków osmotycznych w czasie imbibicji [24]. Skuteczne jest również uwadnianie i odwadnianie nasion poprzedzające przechowywanie. Rao i in. [28] stosując tę metodę ograniczyli znacznie częstość występowania aberracji chromosomowych i anomalii w budowie morfologicznej siewek. Wiele uszkodzeń suchych nasion pojawia się też podczas gwałtownego pobierania wody w czasie kiełkowania [31].

Zmiany selekcyjne

Do najważniejszych zmian w strukturze wewnętrznej populacji należy dryf genetyczny, czyli zmiany w populacji związane ze zbyt małą wielkością próby powodujące utratę zmienności na drodze przypadkowej selekcji oraz zespół zmian składający się na zjawisko szyftu genetycznego. Są to zmiany w populacji ujawniające się zmniejszeniem frekwencji pewnych genów prowadzące w efekcie do ich eliminacji lub jako wyraźna zmiana początkowej wzajemnej równowagi genów w populacji. Zjawisko szyftu genetycznego jest procesem złożonym i składają się na niego wszystkie wyżej opisane zmiany aparatu genetycznego, jak i zjawiska populacyjne: selekcja, a nawet dryf genetyczny. Długotrwałe przechowywanie może powodować utratę rzadkich genotypów i ograniczać pulę genetyczną populacji, bądź też w wyniku pojawienia się i akumulacji drobnych mutacji (nieletalnych) prowadzi do zwiększenia początkowej zmienności [41]. Zjawisko szyftu genetycznego ujawnia się zwykle w procesie regeneracji przechowywanych nasion. Jest wynikiem wpływu wielu zmiennych, niekorzystnych czynników. Podczas regeneracji mogą np. wystąpić różnice w dojrzałości osobników w zbieranej próbie i w produktywności poszczególnych genotypów. Dzieje się tak, dlatego, że nawet nasiona jednej odmiany mogą mieć różną żywotność w określonych warunkach. Podstawowe znaczenie mają czynniki zewnętrzne oddziałujące na materiał podczas regeneracji, takie jak choroby, zniszczenia powodowane przez zwierzęta, lub niesprzyjające warunki atmosferyczne, a w przypadku dużych kolekcji i skomplikowanego systemu regeneracji również błędy ludzkie [38]. Zmiany struktury populacji mogą mieć poważne konsekwencje i wpływ nawet na takie zjawiska jak interakcje ze środowiskiem [37].

Nawet w materiale nasiennym, który utracił żywotność, w niewielkim stopniu mogą zachodzić zmiany mutacyjne, które rozpoczynają segregacje w następnym pokoleniu i są kontynuowane w kolejnych. Może to prowadzić np. do sytuacji, w której w genetycznie „czystej linii” dochodzi do stopniowego nagromadzenia mutacji podczas cykli przechowywania i regeneracji. W literaturze nie ma jednoznacznych informacji, jaki wpływ na strukturę populacji ma niewielka, rzędu kilku procent utrata żywotności. Jest to jedno z bardziej istotnych zagadnień współczesnego przechowalnictwa, gdyż może powodować zachwianie wyjściowej struktury populacji i podważyć zasady, jakimi kierują się banki genów, tj. zachowania przechowywanego materiału w możliwie niezmienionej postaci. Z drugiej strony, opisywane zjawiska są bardzo trudne do analiz, szczególnie u gatunków charakteryzujących się dużą zmiennością genetyczną [40].

Przegląd metod wykorzystywanych do monitorowania zmian genetycznych związanych ze starzeniem się nasion

Markery morfologiczne

Początkowo do badań nad procesem starzenia się nasion wykorzystywano jako markery cechy morfologiczne i agronomiczne, zarówno jakościowe, jak i ilościowe. Nawet w przypadku odmian uprawnych (bardzo wyrównanych pod względem morfologicznym), obserwacja zmian w strukturze genetycznej populacji za pomocą tych cech była bardzo trudna. Obserwacje prowadzone przez Roosa i Rinckera [39] na populacjach o różnej żywotności nasion *Dactylis glomerata* po sztucznym starzeniu się nie wykazały wpływu tego procesu na badane cechy morfologiczne. Podejrzewali oni jednak, że u nasion poddanych sztuczemu starzeniu się nie objawiają się zmiany tych cech. W innych badaniach Wu i in. [50] analizowali różnice między regenerowanymi co 2–3 lata (5 regeneracji), 18-letnimi (nieregenerowane) i 11-letnimi (2 regeneracje) nasionami *Brassica napus* L. Badania te wykazały szereg różnic morfologicznych między poszczególnymi populacjami nasion spowodowanych procesem starzenia się i regeneracją. Markery tego typu w dużym stopniu narażone są na fluktuacje warunków środowiska, a brak oczekiwanych wyników w niektórych badaniach mógł być spowodowany brakiem lub zbyt subtelnym wpływem procesu starzenia się na dane cechy. Natomiast obserwowane różnice mogły świadczyć, zarówno o wpływie tego procesu na przechowywany materiał, jak i plastyczności fenotypowej badanych gatunków.

Markery białkowe

Dopiero rozwój biologii molekularnej pozwolił na ominięcie większości tych trudności dostarczając wielu użytecznych narzędzi, umożliwiając przejście z markerów morfologicznych na markery biochemiczne, a potem molekularne. Dobrym narzędziem okazały się białka zapasowe i enzymatyczne (izoenzymy). McDonald i Ka-

malay [16] analizowali wpływ regeneracji na strukturę populacji nasion fasoli używając białek zapasowych i cech morfologicznych, jednak w tym schemacie doświadczalnym nie wykryli oni istotnych różnic spowodowanych presją środowiska podczas regeneracji polowej, ani zbyt małą wielkością próby powodującą dryf genetyczny. Również Sergio i Spandnoletto Zeuli [42] obserwowali brak wpływu procesu starzenia się ziarniaków pszenicy na obraz elektroforetyczny białek zapasowych, jednak sugerowano, że wyróżnienie i zbadanie frekwencji poszczególnych biotypów w większej próbie mogłoby uwidocznić zmiany w strukturze populacji. Wykorzystując markery izoenzymatyczne (kwaśną fosfatazę) Rajagopal i Sen-Mandi [26] zaobserwowali znaczne różnice we wzorze prążków między zarodkami ryżu uzyskanymi z nasion młodych, nasion poddanych procesowi sztucznego i naturalnego starzenia się. Puchalski [25] wykorzystując izoenzymy, obserwował zmiany selekcyjne w dwóch enzymatycznych loci w przechowywanych populacjach w stosunku do materiału kontrolnego, zmiany te zachowywane były w pokoleniach potomnych pomimo przywrócenia wyjściowego poziomu żywotności. Maselli i in. [15] przy użyciu izoenzymów analizowali wpływ warunków przechowywania na zmienność genetyczną populacji. Ich doświadczenia dowiodły, że restrykcyjne warunki stosowane do przechowywania nasion przez długi czas (bardzo niska wilgotność i ujemna temperatura) dają znacznie lepsze wyniki niż warunki stosowane do przechowywania nasion przez czas krótszy przy wyższej wilgotności i dodatniej temperaturze około 5°C. Natomiast testy żywotności i wigoru nie wykazały istotnych różnic między nasionami z próby kontrolnej, a przechowywanymi w warunkach stosowanych przy długotrwałym magazynowaniu, natomiast wykazały istotne różnice między populacją przechowywaną w warunkach wykorzystywanych do krótkotrwałego przechowywania, a kontrolą. Szereg prac prowadzonych przez Stoyanową [44, 45] na ziarniakach pszenicy z wykorzystaniem białek zapasowych potwierdziły wystąpienie zmian w strukturze populacji typu szyftu genetycznego. Obserwowała ona głównie zmieniającą się przeżywalność różnych biotypów w badanych populacjach, spowodowaną sztucznym starzeniem się i późniejszą regeneracją. Udowodniła również, że skład poszczególnych biotypów w populacji jest zależny od stopnia utraty żywotności. Pozwoliło to na wyciągnięcie wniosków o wystąpieniu szyftu genetycznego w badanych próbach [47]. Ponadto Stoyanowa [46] znalazła dominującą mutację związaną z γ -gliadyną powstałą w roślinie wyhodowanej ze starych nasion, lecz nie mogła ona stwierdzić, czy była to zmiana spowodowana procesem starzenia się, czy tylko mutacją spontaniczną. Również dane uzyskane z populacji żyta wyprowadzonej z ziarniaków o różnej żywotności i po różnej liczbie cykli regeneracji [Niedzielski, praca nie publikowana] potwierdzają tendencje obserwowane przez Stoyanową [47] i Puchalskiego [25]. Obserwowali oni zmieniającą się frekwencję niektórych biotypów w badanych populacjach, co może sugerować wystąpienie selekcji wywołanej presją środowiska, zarówno podczas regeneracji, jak i przechowywania.

Markery oparte na polimorfizmie kwasów nukleinowych

Dynamiczny postęp w biologii molekularnej, a szczególnie odkrycie pod koniec lat osiemdziesiątych techniki opartej na łańcuchowej reakcji z polimerazą DNA (PCR – Polymerase Chain Reaction) [17], umożliwiło analizę zmian spowodowanych starzeniem się bezpośrednio na poziomie DNA. Na bazie reakcji PCR rozwinęło się wiele technik. Jednak nadal niezwykle rzadko są one stosowane w badaniach procesu starzenia się nasion. Wyniki badań Shatters i in. [43] z wykorzystaniem techniki RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA) [49], uzyskane w doświadczeniach z nasionami soi poddanymi sztucznemu starzeniu się, wykazały dwukierunkowy przebieg tego procesu. Autorzy stwierdzili zarówno powstawanie, jak i zanikanie pewnych markerów genetycznych, co wiązali z wpływem procesu sztucznego starzenia nasion. Jakkolwiek nie określono natury zmian w materiale genetycznym wywołanych starzeniem się, to sugerowano jedynie, że zmiany w profilach elektroforetycznych prawdopodobnie są związane z akumulacją uszkodzeń DNA w tzw. gorących miejscach („hot spot”) i mogą to być zarówno pęknięcia pojedynczej, jak i podwójnej nici DNA. Sugerowali również, że „gorące miejsca” nie są losowo rozmieszczone w genomie, a grupują się w pewnych regionach. Przypuszczenia te zdają się potwierdzać wcześniejsze badania Roberts i Osborne [34], które wykazały niższą gęstość DNA pochodzącego ze starych nasion w gradiencie sacharozy w porównaniu z próbą kontrolną. Autorzy wnioskowali, że spowodowane jest to hydrolizą wiązań N-glikozydowych, co w konsekwencji powoduje naruszenie integralności podwójnej helisy. Sugerowali oni również, że jest to prawdopodobna przyczyna pojawiania się aberracji chromosomowych. Ponieważ badane przez Shatters i in. [43] próby nasion nie były poddane regeneracji, należy się spodziewać, że procesy reperacyjne spowodowałyby znaczne obniżenie indukowanej zmienności. Podobne badania prowadzone przez Marcos-Filho i MacDonalda [14], z wykorzystaniem techniki RAPD do badań nasion soi przechowywanych w różnych warunkach i o różnej żywotności, nie stwierdziły przydatności tej techniki do monitorowania zmian spowodowanych długotrwałym przechowywaniem. Brak różnic między poszczególnymi populacjami mógł być spowodowany uśrednieniem prób lub specyfiką wybranych starterów do PCR. Również Cheng i in. [7] stosując technikę RAPD nie uzyskali wyników, które potwierdzałyby występowanie zmian na poziomie DNA wywołanych długotrwałym przechowywaniem nasion *Arachis hypogaea*. Autorzy brali do badań średnie próby z wielu roślin, co mogło być przyczyną niemożliwości wykrycia subtelnych zmian zachodzących w DNA u poszczególnych osobników. Nie wykryto również wpływu długotrwałego przechowywania na nasiona stosując inne techniki, takie jak izoenzymy i lub obserwacje cytologiczne. Jest prawdopodobne, że brak wykrywalnych różnic spowodowany był specyfiką obiektu, zbyt małą wielkością próby lub jej uśrednieniem. Bednarek i in. [3] obserwowali różnice w częstości markerów RAPD w badanych próbach żyta, pochodzących z ziarniaków o wysokiej i niskiej żywotności, mogące sugerować

wystąpienie zmian spowodowanych naturalnym starzeniem się w trakcie przechowywania. Również stwierdzili oni, że kilkakrotna regeneracja ziarniaków żyta o drastycznie obniżonej żywotności [5%] nie przywracała struktury genetycznej charakterystycznej dla próby kontrolnej, co mogło być związane z wpływem selekcji naturalnej zachodzącej w trakcie starzenia się. Natomiast bardzo skutecznym narzędziem do monitorowania zmian w strukturze populacji wywołanych długoterminowym przechowywaniem nasion okazała się technika AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms). Donini i in. [10] zastosowali ją do otrzymania odpowiedzi na pytanie czy wybrane odmiany pszenicy na przestrzeni 60 lat utraciły część zmienności genetycznej. Do doświadczeń wykorzystane zostały, oprócz techniki AFLP, takie markery, jak mikrosatelitarne (SSR), białka zapasowe i cechy morfologiczne. Autorzy nie stwierdzili trendu obniżania się zmienności genetycznej u obecnie uprawianych odmian na przestrzeni lat. Do doświadczeń wykorzystywali oni jednak próby średnie, co mogło w znacznym stopniu wpłynąć na uzyskane wyniki. Chebator i in. [6], wykorzystując markery mikrosatelitarne, obserwowali zmiany we frekwencji poszczególnych alleli u wybranych obiektów żyta przechowywanych w warunkach banku genów, będące konsekwencją kolejnych regeneracji. Również zaobserwowali oni, że redukcja wielkości przechowywanej próby może prowadzić do utraty niektórych alleli. Podobne wyniki uzyskali Börner i in. dla długoterminowo przechowywanych nasion pszenicy [4]. Technikę AFLP stosowano z dużym powodzeniem do badania wpływu procesu naturalnego starzenia się i regeneracji na przechowywane ziarniaki żyta [8]. Pomimo skuteczności i efektywności tej techniki otrzymane wyniki dały odpowiedź tylko na pytanie, czy proces starzenia się indukuje dziedziczne zmiany w strukturze przechowywanych populacji. Nie uzyskano natomiast odpowiedzi na pytanie, w jakich obszarach te zmiany się koncentrują. Pewne informacje uzyskano za pomocą PCR specyficznego – techniki analiz wykorzystującej długie startery komplementarne do fragmentów rejonów kodujących i niekodujących DNA [9]. Zaobserwowano zmiany dziedziczne w jednym z monitorowanych rejonów niekodujących, co może być przesłanką do twierdzenia, że to właśnie w tych obszarach genomu koncentruje się większość zmian dziedzicznych. Wyniki te dotyczyły tylko niewielkiej części genomu i należałoby zweryfikować tę hipotezę badając więcej fragmentów o znanych sekwencjach. Próba odpowiedzi na pytanie, które z rejonów genomu są bardziej wrażliwe na stresowe warunki, jakim jest długoterminowe przechowywanie nasion, została podjęta z zastosowaniem dwóch różnych systemów enzymów restrykcyjnych w technice AFLP: *EcoRI/MseI* i *PstI/MseI* (Chwedorzewska i in. dane niepublikowane). Wiele analiz mapujących dowiodło, że fragmenty generowane z wykorzystaniem systemu *EcoRI/MseI* nie są losowo ułożone na chromosomach, ale zazwyczaj występują w regionach nie transkrybowalnych, takich jak centromery czy telomery. Inaczej jest z systemem, *PstI/MseI*, gdzie fragmenty są zazwyczaj usytuowane w rejonach transkrypcyjnie aktywnych, bogatych w geny [48]. Wykorzystując oba te systemy enzymów restrykcyjnych w technice AFLP stwierdzono wpływ naturalnego starzenia

się na strukturę populacji, tylko w przypadku systemu *EcoRI/MseI*, co sugeruje, że zmiany wywołane starzeniem się dotyczą przede wszystkim rejonów niekodujących, gdzie rzadziej są eliminowane na drodze naturalnej selekcji, ponieważ nie mają znaczącego wpływu na funkcjonowanie organizmu (Chwedorzewska i in. dane niepublikowane). Potwierdza to również teorię Shatter i in. [43], że zmiany indukowane procesem starzenia się koncentrują się w określonych miejscach „hot spot”.

Podsumowanie

Większość prac nad wpływem starzenia się nasion na materiał genetyczny prowadzona była na próbach poddanych bezpośrednio procesowi starzenia się, a nie regenerowanych. Doświadczenia te dawały niepełny obraz tego procesu, ponieważ zmiany genetyczne należy rozpatrywać w kontekście dziedziczenia, a większość zmian w nasionach poddanych długotrwałemu przechowywaniu, nawet jeśli nie jest letalna, zanika podczas reprodukcji i nie jest przekazywana następnym pokoleniom. Istotną rolę odgrywają dopiero te zmiany, które utrwalane są i przekazywane następnym pokoleniom.

Postęp biologii molekularnej dostarcza coraz to doskonalszych narzędzi badawczych. Podstawowa trudność polega na odpowiednim ich zastosowaniu, dostosowanym do specyfiki analizowanego obiektu.

Literatura

- [1] Abdalla F.H., Roberts E.H. 1969. The effects of temperature, moisture on the genetic changes in seeds of barley, broad beans and peas during storage. *Ann. Bot.* 33: 153–167.
- [2] Abdalla F.H., Roberts E.H. 1969. The effects of seed storage conditions on the growth and yield of barley, broad beans, and peas. *Ann. Bot.* 33: 153–167.
- [3] Bednarek P.T., Chwedorzewska K., Puchalski J. 1998. Preliminary molecular studies on genetic changes in rye seeds due to long – term storage and regeneration. W: Challenges in Rye Germplasm Conservation. Red. T. Gass, W. Podyma, J. Puchalski, S.A. Eberhart, International Plant Genetic Resources Institute, Rome: 54–61.
- [4] Börner A., Chebotar S., Korzun V. 2000. Molecular characterization of the genetic integrity of wheat [*Triticum aestivum* L.] germplasm after long-term maintenance. *Theor. Appl. Genet.* 100: 494–497.
- [5] Cheah K.S.E., Osborne D.J. 1978. DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. *Nature* 272: 593–599.
- [6] Chebotar S., Roder M. S., Korzun V., Börner A. 2002. Genetic integrity of ex situ genebank collections. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7: 437–444.
- [7] Cheng H-Y, Zheng G-H, Jing X-M, Kuang T-Y, Tang P-S, Tao K-L, Zhou M-D, Duan N-X. 1997. Storage of peanut seeds with low moisture content for 11 years in ambient temperature. *Plant Genet. Res. Newsl.* 110: 35–40.

- [8] Chwedorzewska K.J., Bednarek P.T., Puchalski J., Krajewski P. 2002. AFLP profiling of long-term stored and regenerated rye genebank samples. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7a: 457–463.
- [9] Chwedorzewska K.J., Bednarek P.T., Puchalski J. 2002. Studies on specific rye genome regions due to seed ageing and regeneration. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7a: 569–576.
- [10] Donini P., Law J.R., Koebner R.M.D., Reeves J.C., Cooker R.J. 2000. Temporal trends in the diversity of UK wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100: 912–917.
- [11] Dourado A.M., Roberts E.H. 1984. Chromosome aberrations induced during storage in barley and pea seeds. *Ann. Bot.* 54: 767–779.
- [12] Dourado A.M., Roberts E.H. 1984. Phenotypic mutations induced during storage in barley and pea seeds. *Ann. Bot.* 54: 781–790.
- [13] Hidema J., Kumagai T., Sutherland J.C., Sutherland B.M. 1997. Ultraviolet B-sensitive rice cultivar deficient in cyclobutyl pyrimidine dimer repair. *Plant Physiol.* 113: 39–44.
- [14] Marcos-Filho J., McDonald, M.B. 1998. Sensitivity of RAPD analysis, germination and vigour tests to detect the intensity of deterioration of naturally and artificially aged soybean seeds. *Seed Sci. Technol.* 26: 141–157.
- [15] Maselli S., Perez-Garcia F., Aguinagalde I. 1999. Evaluation of seed storage conditions and genetic diversity of four crucifers endemic to Spain. *Ann. Bot.* 84: 207–212.
- [16] McDonald B. Jr., Kamalay J.C. 1990. Determination of protein composition following snap bean seed regeneration. *Seed Sci. Technol.* 18: 755–763.
- [17] Mullis K.B., Faloona F., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase – catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335–350.
- [18] Murata M., Tsuchiya T., Roos E.E. 1984. Chromosome damage induced by artificial seed aging in barley. *Theor. Appl. Genet.* 67: 161–170.
- [19] Osborne D.J. 1980. Senescence in seed. W: Senescence in Plant. Red. K.V. Thimann. CRC Press, Boca Raton, FL, 13–37.
- [20] 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.
- [21] Osborne D.J., Bouriak I. I. 1997. DNA status, replication and repair in desiccation tolerance and germination. W: R.H. Ellis, M. Black, A.J. Murdoch, T.D. Hong [red.] Basic and Applied Aspects of Seed Biology. Kluwer Academic Publ. Dordrecht, 23–32.
- [22] Osborne D.J., Dell'Aquila A., Elder R.H. 1984. DNA repair in plant cells. An essential event of early embryo germination in seeds. *Folia Biologica* [Praha], special publication, 155–169.
- [23] Osborne D.J., Sharon R., Ben-Ishai R. 1980/81. Studies on DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye [*Secale cereale*]. *Israel J. Bot.* 29: 259–272.
- [24] Pijlen van J.G., Kraak H.L. Bino, de Vos C.H.R. 1995. Effects of ageing and osmopriming on germination characteristics and chromosome aberrations of tomato [*Lycopersicon esculentum* L.] seeds. *Seed Sci. Technol.* 23: 823–830.
- [25] Puchalski J. 1993. Izoenzymy jako markery zmian genetycznych w siewkach żyta wywołanych przechowywaniem i regeneracją. Prace Ogrodu Botanicznego PAN. Seria: monografie i rozprawy, 4: 86 ss.

- [26] Rajagopal [DASS] A.S.M., Sen-Mandi S. 1992. Studies on acid and alkaline phosphatases in aged rice embryos. *Seed Sci. Technol.* 20: 215–222.
- [27] Rao N.K., Roberts B.E., Ellis R.H. 1987. Loss of viability in lettuce seeds and accumulation of chromosome damage under different storage condition. *Ann. Bot.* 60: 85–96.
- [28] Rao N.K., Roberts B.E., Ellis R.H. 1987. The influence of pre- and post-storage hydration treatments on chromosomal aberrations, seedling abnormalities, and viability of lettuce seeds. *Ann. Bot.* 60: 97–108.
- [29] Redfearn M., Clarke N.A., Osborne D.J., Halmer P., Thomas T.H. 1997. DNA integrity and synthesis in relation to seed vigour in sugar beet. W: R.H. Ellis, M. Black, A.J. Murdoch, T.D. Hong [red.]. *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*. Kluwer Academic Publ., Dordrecht 23–32.
- [30] Roberts E.H. 1981. Physiology of ageing and its application to drying and storage. *Seed Sci. Technol.* 9: 359–372.
- [31] Roberts E.H. 1983. Loss of seed viability during storage. *Advances in Research and Technology of Seeds [Wageningen] Part 8*: 9–34.
- [32] Roberts E.H. 1988. Seed aging: The genome and its expression. W: *Senescence and Aging in Plants*. Red. L.D. Noode'n i A.C. Leopold. Academic Press, San Diego, CA: 465–498.
- [33] Roberts E.H., Ellis R.H. 1982. Physiological, ultrastructural and metabolic aspects of seed viability. W: *The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination*. Red. A. A. Khan. Elsevier Biomed. Press, Amsterdam: 465–485.
- [34] Roberts B.E., Osborne D.J. 1973. Protein synthesis and viability in rye grains. W: *Seed Ecology*. Red. W. Heydecker. Butterworths, London: 99–114.
- [35] Roos E.E. 1980. Physiological, biochemical, and genetical changes in seed quality during storage. *HortSci.* 15: 781–784.
- [36] Roos E.E. 1984. Genetic shifts in mixed bean populations. I. Storage effects. *Crop Sci.* 24: 240–244.
- [37] Roos E.E. 1984. Genetic shifts in mixed bean populations. II. Effects of regeneration. *Crop Sci.* 24: 711–715.
- [38] Roos E.E. 1988. Genetic changes in a collection over time. *HortSci.* 23: 86–90.
- [39] Roos E.E., Rincker C.M. 1988. Genetic stability in 'Pennlate' orchardgrass seed following artificial aging. *Crop Sci.* 22: 611–613.
- [40] Roos E.E., Sowa S., Burton G.W. 1978. Accelerated aging studies of normal and segregating chlorophyll deficient isolines of pearl millet. *Crop Sci.* 18: 231–233.
- [41] Schoen D.J., Jacques L.D., Bataillon T. M. 1998. Deleterious mutation accumulation and the regeneration of genetic resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 394–399.
- [42] Sergio L., Spanoletti Zeuli P.L. 1992. Study of the genetic structure of wheat germplasm entries by means of storage protein electrophoresis. *FAO/IBPGR Plant Genet. Res. Newsl.* 90: 1–5.
- [43] Shatters R.G.Jr., Schweder M.E., West S.H., Abdelghany A., Smith R.L. 1995. Environmentally induced polymorphisms detected by RAPD analysis of soybean seed DNA. *Seed Sci. Res.* 5: 106–116.
- [44] Stoyanova S.D. 1991. Genetic shift and variations of gliadins induced by seed ageing. *Seed Sci. Technol.* 19: 363–371.

- [45] Stoyanova S.D. 1992. Effects of seed ageing and regeneration on the genetic composition of wheat. *Seed Sci. Technol.* 20: 489–496.
- [46] Stoyanova S.D. 1994. Expression of gliadin in dominant mutation of wheat seeds. *Seed Sci. Technol.* 22: 477–484.
- [47] Stoyanova S.D. 1996. Variation of gliadins in wheat cultivars associated with seed survival and multiplication. *Seed Sci. Technol.* 24: 115–126.
- [48] Vuylsteke M., Mank R., Antonise R., Bastiaans R., Senior M.L., Stuber C.W., Melchinger A.E., Lubberstedt T., Xia X.C., Stam P., Zabeau M., Kuiper M. 1999. Two high-density AFLP linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 99: 921–935.
- [49] Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalsky J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531–6536.
- [50] Wu X.M., Wu N.F., Qian X.Z., Li R.G., Huang R.G., Zhu L. 1998. Phenotypic and genotypic changes in rapeseed after 18 years of storage and regeneration. *Seed Sci. Res.* 8: 55–64.

Methods evaluating genetic changes induced by ageing of seeds stored in gene banks

Key words: seed ageing, genetic markers, germplasm conservation

Summary

Conservation of plant germplasm is still realized mainly through long – term storage of seeds under controlled moisture and temperature in seed banks. To maintain high level of seed viability, consecutive regenerations under field conditions are needed. Both these steps are crucial for proper preservation of existing genetic diversity. Long-term storage may lead to appearance of DNA changes that are usually eliminated during germination and growth. On the other hand, long – term storage and regeneration may lead to genetic shift or drift, when some rare genotypes are eliminated or others ones favoured due to selection processes. A few studies were carried out to address the problem of effect of long-term germplasm storage under gene bank conditions on genetic structure of the population. Mainly the methods based on phenotypic observations were used to investigate such events. Only a couple of studies were focused directly on genomic diversity by undertaking protein markers, RAPD, specific PCR, AFLP and microsatellite.