

AKADEMIA TECHNICZNO-ROLNICZA
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH
W BYDGOSZCZY

Rozprawy
nr 91

ELWIRA ŚLIWIŃSKA

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI JĄDROWEGO DNA
I BADANIE CYKLU KOMÓRKOWEGO
W LIŚCIACH I NASIONACH
BURAKA CUKROWEGO (*Beta vulgaris* L.)
ZA POMOCĄ CYTOMETRII PRZEPIYWOWEJ

76/577

Śliwińska, Elwira.
Oznaczanie zawartości jąder

1999.

BYDGOSZCZ - 1999



576/577

AKADEMIA TECHNICZNO-ROLNICZA
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH
W BYDGOSZCZY

Rozprawy
nr 91

ELWIRA ŚLIWIŃSKA

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI JĄDROWEGO DNA
I BADANIE CYKLU KOMÓRKOWEGO
W LIŚCIACH I NASIONACH
BURAKA CUKROWEGO (*Beta vulgaris* L.)
ZA POMOCĄ CYTOMETRII PRZEPIYWOWEJ

Biblioteka Główna ATR w Bydgoszczy



000000053159

BYDGOSZCZ - 1999

PRZEWODNICZĄCY KOMITETU REDAKCYJNEGO
prof. dr hab. Ojcumiła Stefaniak

OPINIODAWCY

prof. dr hab. Katarzyna Niemirowicz-Szczytt
dr Jaroslav Doležel

REDAKTOR NAUKOWY

prof. dr hab. Marek Jassem

OPRACOWANIE REDAKCYJNE I TECHNICZNE

mgr Elżbieta Rudzińska, Zbigniew Gackowski

Wydano za zgodą Rektora
Akademii Techniczno-Rolniczej
w Bydgoszczy



81685

ISSN 0209-0597

WYDAWNICTWA UCZELNIANE
AKADEMII TECHNICZNO-ROLNICZEJ W BYDGOSZCZY

Wyd. I. Nakład 150 egz. Ark. aut. 2,00. Ark. druk. 2,25. Papier druk. kl. III.

Oddano do druku i druk ukończono w styczniu 1999 r.

Uczelniany Zakład Małej Poligrafii ATR Bydgoszcz, ul. Ks. A. Kordeckiego 20

Zamówienie nr 1/99

99D 26/110

SPIS TREŚCI

Spis publikacji, na podstawie których powstała praca.....	4
1. Wstęp.....	6
2. Cel i zakres prowadzonych badań.....	8
3. Materiał i metody	10
3.1. Materiał	10
3.2. Cytometria przepływowa.....	10
3.3. Oznaczanie zawartości β -tubuliny.....	10
3.4. Oznaczanie zawartości podjednostki B globuliny 11 S	11
3.5. Laboratoryjna i polowa ocena kiełkowania nasion	11
4. Omówienie wyników	12
4.1. Analiza ploidalności w anizoploidalnych populacjach buraka	12
4.2. Cykl komórkowy w liściach buraków o różnym stopniu ploidalności	14
4.3. Oznaczanie ploidalności na podstawie analizy cytometrycznej różnych tkanek owocu buraka	17
4.4. Aktywność cyklu komórkowego w nasionach	17
4.4.1. Analiza cyklu komórkowego w czasie rozwoju nasion	17
4.4.2. Zmiany w udziale poszczególnych stadiów replikacji jądrowego DNA w kiełkujących nasionach	19
4.4.3. Związek między udziałem komórek w fazie G_2 a wigorem nasion	21
4.4.4. Wpływ terminu zbioru i przedsewnego traktowania nasion na cykl komórkowy.....	24
5. Podsumowanie.....	26
Literatura	29
Streszczenie	32
Summary.....	34

SPIS PUBLIKACJI,
NA PODSTAWIE KTÓRYCH POWSTAŁA PRACA

- Śliwińska E., 1993. Cytometria przepływowa - nowa metoda analizy cyklu komórkowego i genomu roślin wyższych. *Hodowla Roślin i Nasiennictwo* 1: 10-15.
- Śliwińska E., Steen P., 1995. Flow cytometric estimation of ploidy in anisoploid sugar-beet populations. *J. Appl. Genet.* 36(2): 111-118.
- Śliwińska E., 1996. Flow cytometric analysis of the cell cycle of sugar-beet seed during germination. *Gen. Pol.* 37A: 254-257.
- Śliwińska E., Jansen R., 1997. Estimation of the share of components of different ploidy in anisoploid sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) populations by flow cytometry. *J. Appl. Genet.* 38(2): 151-160.
- Śliwińska E., 1997a. Analiza cyklu komórkowego buraków cukrowych o różnym stopniu ploidalności za pomocą cytometrii przepływowej. *Biul. IHAR* 202: 35-40.
- Śliwińska E., 1997b. Flow cytometric analysis of sugar-beet seeds different in vigour. W: *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*, Ellis R.H., Black M., Hong T.D. (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 577-584.
- Śliwińska E., 1998. Cell cycle activity during development of sugar-beet seed. W: *Plant Cytogenetics*, Małuszyńska J. (ed.). *Prace Naukowe Uniwersytetu Śląskiego* nr 1696: 51-59.
- Śliwińska E., Jing Hai-Chun, Job C., Job D., Bergervoet J.H.W., Bino R.J., Groot S.P.C., 1999. Effect of harvest time and soaking treatment on cell cycle activity in sugar-beet seeds. *Seed Science Research* 9 (w druku).

Wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie wyników wymienionych prac w niniejszej rozprawie habilitacyjnej.

Znaczną część wyników autorka prezentowała na konferencjach naukowych, krajowych i międzynarodowych, m.in.:

- Fifth International Workshop on Seeds, 11-15 września 1995, Reading, Wielka Brytania
- Workshop on Applied Seed Biology „Improving of Seed Quality”, 15-19 lipca 1996, Skierniewice, Polska
- The International Conference „Perspectives in Plant Genetics”, 16-17 września 1996, Warszawa-Ursynów, Polska
- Spring Symposium „Plant Cytogenetics”, 19-22 maja 1997, Cieszyn, Polska
- 61th Congress of International Institute for Beet Research on Set-Aside and Beet and Transgenic Beets, 11-12 lutego 1998, Bruksela, Belgia
- Seed Biology Symposium „Seed Development and Maturation”, 10-11 marca 1998, Helsingør, Dania

Badania prowadzono we współpracy z firmami hodowlano-nasiennymi: Kutnowską Hodowlą Buraka Cukrowego (Kutno, Polska), Instytutem Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (Bydgoszcz, Polska), Hodowlą Buraka Cukrowego (Kalisz, Polska), Danisco Seed (Holeby, Dania), KWS Kleinwanzlebener Saatzucht AG (Einbeck, Niemcy), Deleplanque et Cie (Manosque, Francja), Saatzuchtwirtschaft Strube GmbH & Co KG (Sollingen, Niemcy), a także z Katedrą Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin SGGW (Warszawa, Polska), Centre for Plant Breeding and Reproduction Research (Wageningen, Holandia) oraz Laboratoire Mixte CNRS/Rhône-Poulenc (Rhône-Poulenc, Francja).

1. WSTĘP

Odmiany buraka cukrowego uprawiane w Europie są heterozyjnymi mieszańcami, w większości triploidalnymi. Nasiona tych odmian produkowane są przez krzyżowanie męskosterylnych diploidalnych linii matecznych z tetraploidalnymi zapyłaczami. Ponieważ burak jest rośliną obcopolną, może zostać zapylony niepożądanym pyłkiem, co obniża wartość użytkową uzyskanych nasion. Jedną z przyczyn niejednorodności partii nasion heterozyjnych odmian pod względem poziomu ploidalności może być niepełna sterylność linii matecznych. Skutkiem tego część kwiatów zostaje zapylona własnym pyłkiem tych linii, zamiast pyłkiem zapyłacza, i w efekcie powstają nasiona diploidalne. Inne istotne zagrożenie dla upraw nasiennych buraka, które są usytuowane głównie na południu Europy, stanowi możliwość przekrzyżowania buraka uprawnego z diploidalnym, jednorocznym gatunkiem dzikim *Beta maritima*. Domieszka nasion takiego mieszańca w partiach handlowych powoduje wystąpienie uporczywych chwastów, zwanych burakochwastami. Nie można też wykluczyć innych źródeł zanieczyszczeń, np. domieszki nasion zapyłacza, na różnych etapach hodowli. Kontrola ploidalności jest zatem konieczna zarówno w trakcie procesu hodowlanego (testowanie linii rodzicielskich i próbnych mieszańców), jak i do potwierdzenia jednorodności partii nasion o przeznaczeniu handlowym.

Stopień ploidalności roślin można określać stosując metody pośrednie, takie jak pomiar średnicy pyłku czy długości szparek, liczenie porusów w ziarnach pyłku lub chloroplastów w szparkach liści. Są to metody łatwe i szybkie, ale mało precyzyjne. Dokładne wyniki uzyskać można przez bezpośrednie oznaczenie liczby chromosomów lub zawartości DNA w jądrach komórkowych. Klasykzną metodą jest liczenie chromosomów w komórkach wierzchołków wzrostu za pomocą mikroskopu świetlnego. Jest to metoda czasochłonna, wymagająca obecności w próbce aktywnie dzielących się komórek. Metodą alternatywną, coraz częściej stosowaną w hodowli i nasiennictwie buraka cukrowego, jest cytometria przepływowa.

Cytometria przepływowa (ang. flow cytometry, FCM) jest szybką i precyzyjną metodą pomiaru zawartości jądrowego DNA w komórkach. Pierwotnie stosowana była w badaniach biomedycznych i w diagnostyce klinicznej, a od początku lat osiemdziesiątych wykorzystywana jest także w cytologii i cytogenetyce roślin (Muirhead i in. 1985, Brown i in. 1991, Doležel 1991, Śliwińska 1993). FCM opiera się na pomiarze intensywności fluorescencji wyizolowanych jąder komórkowych, umieszczonych w strumieniu cieczy. Fluorescencja jest emitowana dzięki uprzedniemu wybarwieniu jąder za pomocą barwników fluorochromowych, wiążących DNA. Stwierdzono liniową zależność między fluorescencją emitowaną przez jądra w trakcie pomiaru cytometrycznego a zawartością DNA w jądrze (Dean i in. 1982, Galbraith 1989). Pomiar fluorescencji

cji przez cytometr przepływowy odbywa się z szybkością 10^4 - 10^6 jąder na sekundę i można do niego wykorzystać praktycznie każdą tkankę roślinną.

Analiza cytometryczna, poza ustaleniem stopnia ploidalności badanej rośliny, pozwala na określenie udziału w danej tkance komórek, będących w różnych fazach cyklu komórkowego (Galbraith 1984). Cykl w dzielących się komórkach składa się z czterech faz: mitozy (M), po której następuje pierwsza przerwa (G_1 ; okres wzrostu komórki), syntezy DNA (S) oraz, poprzedzającego kolejny podział, drugiego okresu wzrostu komórki (G_2). Komórki nie uczestniczące aktywnie w podziałach komórkowych pozostają w fazie G_0 . Diploidalne komórki w fazie G_1/G_0 zawierają $2C$ jądrowego DNA (C oznacza zawartość DNA w haploidalnym genomie), w fazie G_2/M - $4C$, a w fazie S - ilość DNA pośrednią między $2C$ i $4C$ (Bewley i Black 1994, Ormerod 1994). Zmiany w proporcjach między liczbą komórek będących w fazie G_1 i tych w fazie G_2 mogą określać stan fizjologiczny badanych tkanek. Szczególne znaczenie ma to w odniesieniu do oceny stopnia dojrzałości i wczesnego kiełkowania nasion (Bino i in. 1995, 1996, Śliwińska 1996, 1998, Liu i in. 1997). Współczynnik G_2/G_1 może być także wskaźnikiem skuteczności przedsięwzięcia traktowania nasion (Bino i in. 1992, Lanteri i in. 1994).

2. CEL I ZAKRES PROWADZONYCH BADAŃ

Laboratoria firm hodowlano-nasiennych buraka z reguły są wyposażone w cytometr przepływowy, który zastąpił, stosowane niegdyś powszechnie, mikroskopy. Jego zastosowanie jest jednak, jak dotąd, ograniczone do analizy ploidalności pojedynczych roślin, z wykorzystaniem jako materiału do analizy najmłodszych liści 3-4-tygodniowych siewek. Proces hodowlany wymaga często sprawdzenia ploidalności setek roślin w krótkim czasie. Nasuwa się więc pytanie, czy można byłoby przyspieszyć oznaczenia przez analizę większej liczby roślin w jednej próbie, a jeśli tak, to ile roślin jednocześnie może być badanych, aby pomiar zachował swą precyzję.

W niniejszej pracy określano za pomocą cytometrii przepływowej procentowy udział komponentów 2x, 3x i 4x w anizoploidalnych populacjach buraka cukrowego, składających się z 10, 20 i 50 roślin (Śliwińska i Steen 1995, Śliwińska i Jansen 1997). Porównywano dokładność oznaczenia w populacjach o różnej liczebności, zwracając szczególną uwagę na niewielkie domieszki innej ploidalności, co najczęściej występuje w praktycznej hodowli. Określono optymalną liczebność roślin w próbie i sposób obliczania zawartości poszczególnych komponentów w populacji.

Utrudnieniem w cytometrycznym oznaczaniu składu populacji zawierającej rośliny o różnej ploidalności, których piki będące w różnych fazach cyklu komórkowego pokrywają się (np. diploidy i tetraploidy), jest to, że metoda ta nie pozwala na rozróżnienie komórek o niejednakowym stopniu ploidalności, ale o takiej samej zawartości DNA. Na przykład pik 4C może odpowiadać fazie G_2 dzielących się mitotycznie komórek diploidalnych, jak również fazie G_1 lub G_0 komórek tetraploidalnych. Wyodrębnienie komórek należących do rośliny o określonej ploidalności wymaga znajomości proporcji między komórkami w fazie G_1 i tymi w fazie G_2 w badanej tkance. Jednym z celów przeprowadzonych badań było porównanie cyklu komórkowego w młodych liściach linii i odmian buraka cukrowego o różnej ploidalności i próba zastosowania współczynnika G_2/G_1 do szacowania stosunków liczbowych pomiędzy komponentami o różnej ploidalności w anizoploidalnych populacjach (Śliwińska 1997a, Śliwińska i Steen 1995, Śliwińska i Jansen 1997).

Do cytometrii przepływowej można wykorzystywać wszystkie rodzaje tkanek roślinnych (Galbraith 1984). Najbardziej odpowiednie są tkanki młode, z dzielącymi się komórkami. Najczęściej stosowanym materiałem roślinnym są najmłodsze liście siewek. Jednakże, aby otrzymać z nasion buraka siewki we właściwym stadium, musi upłynąć co najmniej kilkanaście dni. Uniemożliwia to szybką ocenę ploidalności, co w określonych przypadkach może stanowić niedogodność dla hodowców i producentów nasion. W ramach prowadzonych badań podjęto zatem doświadczenia mające na celu sprawdzenie, czy możliwa jest analiza cytometryczna suchych nasion buraka i która część owocu (w przy-

padku tego gatunku stanowiącego nasienie w sensie użytkowania rolniczego) najlepiej nadaje się do takiej analizy (Śliwińska 1997b).

Ponieważ pomiar jądrowego DNA dostarcza informacji o cyklu komórkowym, może być on wykorzystywany nie tylko do oceny ploidalności. Przeprowadzono analizę cytometryczną nasion rozwijających się, dojrzałych i kiełkujących (Śliwińska 1996, 1997b, 1998a). Badania te miały na celu obserwacje zmian udziału poszczególnych stadiów podziałowych w komórkach zarodka buraka oraz stosunku liczby komórek zarodka do liczby komórek bielma od zapylenia do pełnej dojrzałości, a także w czasie pęcznienia nasion. Na podstawie otrzymanych histogramów określano stopień dojrzałości zarodka i próbowano powiązać udział komórek będących w fazie G_2 ze zdolnością nasienia do szybkiego skielkowania. Zbadano wpływ terminu zbioru na aktywność cyklu komórkowego w nasionach. Taka analiza może ułatwić producentom nasion wyznaczanie właściwego terminu zbioru (Śliwińska i in. 1999).

Opierając się na założeniu, że stosunek liczbowy komórek w fazie G_2 do komórek w fazie G_1 może odzwierciedlać stan fizjologiczny nasienia, badano partie nasion różniące się wigorem (Śliwińska 1997b). Celem było znalezienie współczynnika, który mógłby służyć do przewidywania wschodów polowych oraz do określania optymalnego przedsięwziętego traktowania nasion. Jak dotąd stosuje się w tym celu laboratoryjną ocenę wigoru i zdolności kiełkowania, której wyniki nie zawsze korelują dobrze z wynikami uzyskanymi w testach polowych. Przetestowano przydatność współczynnika G_2/G_1 jako wskaźnika wczesnego kiełkowania, uzupełniając analizę cytometryczną określeniem zawartości białka cytoszkieletowego β -tubuliny oraz podjednostki B białka zapasowego 11 S (Śliwińska i in. 1999).

Badano również wpływ kondycjonowania na aktywność cyklu komórkowego w suchych i kiełkujących nasionach. Określono wpływ tego zabiegu na gotowość zarodka do zainicjowania podziałów komórkowych, a tym samym na kiełkowanie (Śliwińska i in. 1999).

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

Doświadczenia prowadzono w latach 1992-1997.

Do badań użyto nasion diploidalnych i triploidalnych odmian oraz tetraploidalnych linii buraka cukrowego.

W celu uzyskania liści do cytometrii przepływowej nasiona wysiewano w szklarni i kiedy siewki były w stadium 3-4 liści, zbierano najmłodsze liście. Do analiz populacji z liści siewek wycinano dyski o średnicy 3 mm i mieszano je w odpowiednich proporcjach.

Do badania wykorzystano świeże nasiona zbierane w różnych etapach ich rozwoju z pól produkcyjnych w południowej Francji i w centralnej Polsce. Nasiona do późniejszych analiz suszono w temperaturze pokojowej do osiągnięcia około 12% wilgotności, wstępnie oczyszczano i kalibrowano. Część tak przygotowanych nasion poddano kondycjonowaniu: mocznono przez 3 godziny w wodzie i przez kolejne 3 godziny w 0,2% roztworze Funabenu T, a następnie suszono przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

3.2. Cytometria przepływowa

Próby przygotowywano zgodnie z zaleceniami Galbraitha i in. (1983), z niewielkimi modyfikacjami. W przypadku stosowania cytometru Partec CA II (Partec, Niemcy), wyposażonego w lampę rtęciową, materiał roślinny rozdrabniano na płytce Petriego za pomocą żyletki w obecności około 2 ml buforu lizującego, zawierającego barwnik fluorochromowy indolo-4',6-dwuamidyno-2-fenylidyny (DAPI). Następnie zawartość filtrowano przez filtr nylonowy i próbę analizowano za pomocą cytometru przepływowego (Śliwińska 1996, 1997a, 1997b, 1998a, Śliwińska i Steen 1995, Śliwińska i Jansen 1997). W przypadku stosowania cytometru Coulter Epics XL-MCL (Coulter Electronics, USA), wyposażonego w laser, bufor lizujący nie zawierał barwnika, a jodek propidyny (PI) dodawany był w ilości 20 μ l po przefiltrowaniu próby (Śliwińska i in. 1999). Dla każdej próby analizowano zawartość jądrowego DNA w 5 000 – 50 000 komórek, zależnie od rodzaju materiału roślinnego.

Otrzymane histogramy zostały poddane analizie statystycznej z zastosowaniem jednoczynnikowej analizy wariancji.

3.3. Oznaczanie zawartości β -tubuliny

Zawartość β -tubuliny określano w suchych i kielkujących nasionach zarówno surowych, jak i kondycjonowanych (Śliwińska i in. 1999). Dla każdej próby białko izolowano z 50 korzeni zarodkowych. Izolację białka, elektroforezę

i immunodetekcję zawartości białka przeprowadzono zgodnie z protokołem opracowanym przez de Castro i in. (1995, 1998).

3.4. Oznaczanie zawartości podjednostki B globuliny 11 S

Zawartość rozpuszczalnej podjednostki B globuliny 11 S oznaczano w suchych, surowych (nie kondycjonowanych) nasionach (Śliwińska i in. 1999). Do analizy zastosowano procedurę opisaną uprzednio przez Job i in. (1997). Jako kontroli użyto nasion surowych i traktowanych pochodzących z partii handlowej jednej z odmian firmy KWS Kleinwanzlebener Saatzucht AG (Einbeck, Niemcy).

3.5. Laboratoryjna i polowa ocena kiełkowania nasion

Laboratoryjną ocenę kiełkowania prowadzono zgodnie z zaleceniami ISTA (ISTA 1985), z niewielkimi modyfikacjami. Nasiona (3×100 z jednej próby) umieszczano w fałdowanej bibule o wilgotności względnej 65% (Jassem i in. 1993), w temperaturze 15°C i 20°C, w ciemności. Po 4 dniach określano liczbę kiełkujących nasion (energię kiełkowania), liczbę nasion z kiełkiem powyżej 5 mm długości w temperaturze 15°C oraz powyżej 15 mm w temperaturze 20°C (laboratoryjne wskaźniki wigoru; Sadowski 1991). Po 14 dniach określano liczbę kiełkujących nasion (zdolność kiełkowania) oraz liczbę nasion nie kiełkujących pełnych i pustych (Śliwińska 1997b, Śliwińska i in. 1999).

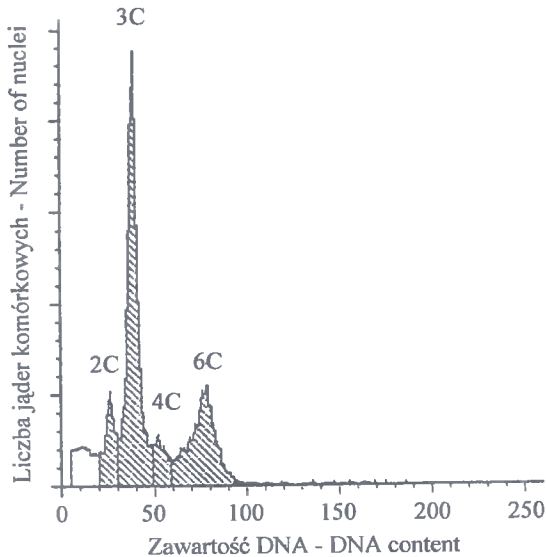
Testy polowe zostały przeprowadzone w Stacji Hodowli Roślin Polanowice k. Kruszwicy. Nasiona wysiewano w 4 powtórzeniach po 100 i określano wschody polowe przez liczenie roślin, które wzeszły po 3 dniach (pierwsze liczenie) i po 21 dniach (ostatnie liczenie) od ukazania się pierwszych siewek. Kiedy siewki były w stadium 2-4 liści, zbierano je, oczyszczano i określano świeżą masę 100 siewek (Śliwińska i in. 1999).

Wyniki przeanalizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji po transformacji na stopnie Bliss'a. Obliczono korelacje pomiędzy wynikami uzyskanymi z analiz cytometrycznych, laboratoryjnych testów kiełkowania i ocen polowych.

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW

4.1. Analiza anizoploidalnych populacji buraka

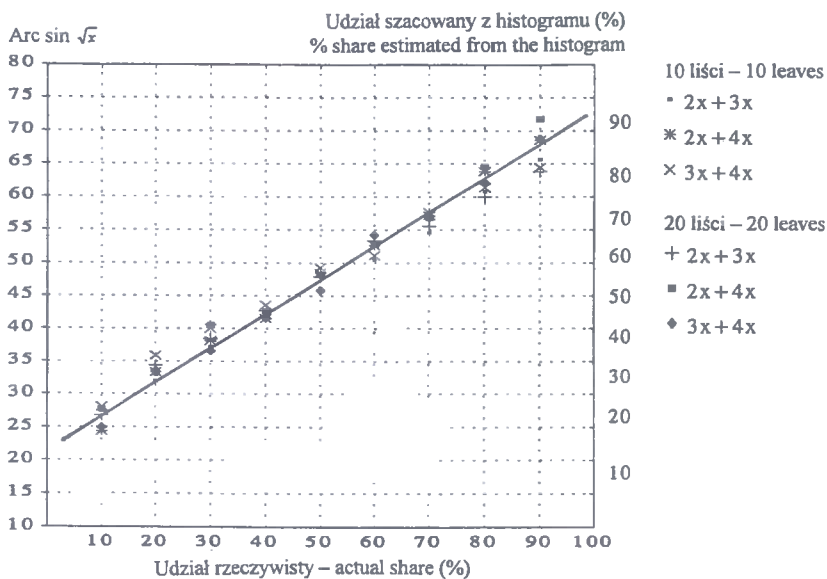
Wyniki uzyskane po zmieszaniu dysków liściowych tej samej wielkości z 10, 20 i 50 roślin wykazały, że niezależnie od liczby liści, użytych do przygotowania jednej próby, otrzymuje się porównywalne histogramy dla tych samych proporcji komponentów o różnej ploidalności (Śliwińska i Steen 1995, Śliwińska i Jansen 1997). Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez Akinerdema (1991), który jednakże badał tylko populacje uzyskane ze zmieszania liści roślin diploidalnych, triploidalnych i tetraploidalnych w równych proporcjach. Znacznie trudniej zinterpretować wyniki, jeśli domieszka obcej ploidalności jest niewielka. Jakkolwiek cytometria przepływowa pozwala na wykrycie tak niewielkiego zanieczyszczenia jak jedna roślina diploidalna w populacji 50 roślin odmiany triploidalnej buraka (rys. 1), to jednak dokładne określenie proporcji poszczególnych komponentów w populacji anizoploidalnej jest tym trudniejsze, im więcej roślin stanowi jedną próbę. Jak wykazały przeprowadzone doświadczenia, liczbowy udział komponentu stanowiącego mniej niż 50%, oszacowany na podstawie histogramów, jest większy od rzeczywistego.



Rys.1. Histogram zawartości DNA z dysków liściowych populacji 50 roślin odmiany triploidalnej buraka cukrowego zanieczyszczonej jedną rośliną diploidalną (3C i 6C – jądra roślin triploidalnych; 2C i 4C – jądra rośliny diploidalnej)

Fig.1. DNA-histogram from leaf disks of 50 plants' population of triploid sugar-beet cultivar contaminated by one diploid plant (3C and 6C – nuclei of triploid plants, 2C and 4C – nuclei of diploid plant)

Jedną z przyczyn obserwowanego zjawiska może być niejednakowa wielkość komórek roślin o różnej ploidalności. Pomiar komórek parenchymatycznych liścia (Bormotow i Łopatina 1986) wykazały, że komórki tetraploidów są istotnie większe od komórek diploidów. Oznacza to, że dyski liściowe jednakowej wielkości, ale pochodzące z roślin o różnej ploidalności, zawierają różną liczbę komórek. Skutkiem tego proporcje między liczbą komórek w pobranych tkankach nie odpowiadają proporcjom między liczbą badanych roślin. Inną przyczyną rozbieżności między rzeczywistym a szacowanym na podstawie histogramów udziałem różnych komponentów w próbie może być występowanie tzw. „szumu” w tle histogramu. Jego stosunkowy udział w małym pikie jest większy niż w pikie dużym i stąd mniejsza dokładność w szacowaniu niewielkich domieszek komórek o odmiennej ploidalności. Odpowiednie przygotowanie prób może podnieść jakość histogramów (zmniejszyć poziom „szumu”), jednakże najczęściej wymaga to stosowania bardziej czasochłonnej i kosztownej procedury dwustopniowej (Doležel i Göhde 1995). Aby tego uniknąć, na podstawie wyników uzyskanych w pracy sporządzono wykres umożliwiający odczytanie rzeczywistej zawartości poszczególnych komponentów w populacji anizoploidalnej na podstawie analizy histogramów uzyskanych przy stosowaniu rutynowej, jednostopniowej procedury przygotowania prób (rys. 2).



Rys.2. Zależność między szacowanym na podstawie cytometrii przepływowowej udziałem komponentu o niższej ploidalności a jego rzeczywistym udziałem w anizoploidalnej populacji buraka cukrowego (Śliwińska i Jansen 1997)

Fig.2. Relationship between the share of lower ploidy level component estimated by flow cytometry and its actual share in anisoploid sugar-beet population (Śliwińska and Jansen 1997)

Jak pokazuje wykres, domieszka obcej ploidalności mniejsza niż 10% nie może być precyzyjnie określona. Dlatego jeśli ma być dokładnie oznaczona struktura badanej populacji, liczba roślin analizowanych w jednej próbie nie powinna przekraczać 10. Uzyskane wyniki sugerują, że analiza populacji, zwłaszcza jeśli zostałaby ułatwiona poprzez opracowanie odpowiedniego programu komputerowego, może zastąpić analizę pojedynczych roślin. Zmniejszyłyby to koszty i skróciło czas pomiaru ploidalności.

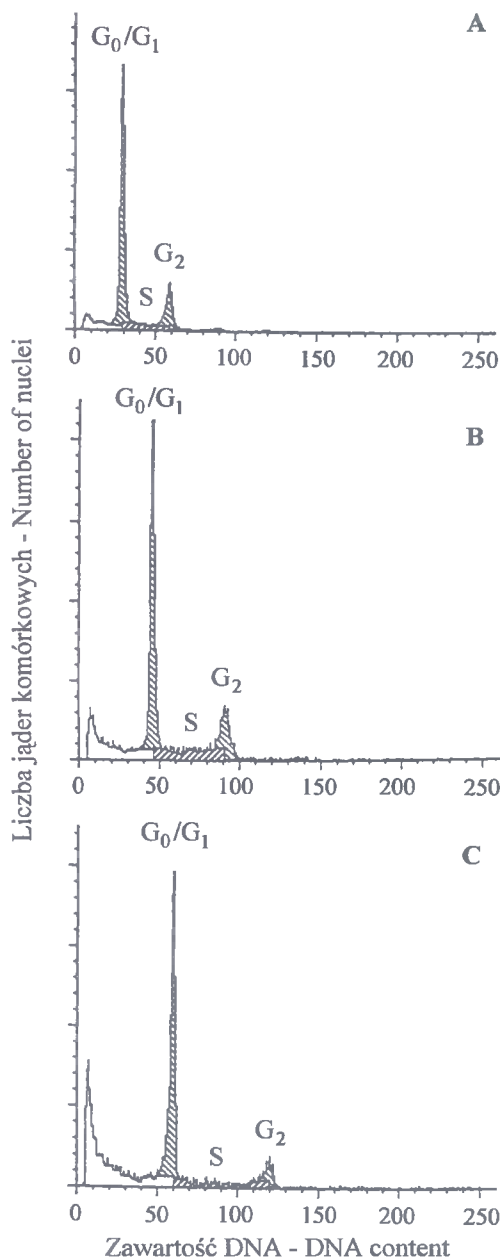
Utrudnieniem w interpretowaniu histogramów, pochodzących z populacji anizoploidalnych roślin diploidalnych i tetraploidalnych, jest jednakowa zawartość DNA ($4C$) w komórkach G_2 diploidów i G_1 tetraploidów. Komórki te na obrazie graficznym stanowią jeden pik i aby je rozgraniczyć, konieczne jest wyznaczenie stosunku G_2/G_1 .

4.2. Cykl komórkowy w liściach buraków o różnym stopniu ploidalności

Na histogramach uzyskanych w wyniku analizy cytometrycznej liści (Śliwińska 1997a), niezależnie od stopnia ich ploidalności, obserwowano obecność dwóch pików, odpowiadających zawartości DNA: $2C$ i $4C$ dla diploidów, $3C$ i $6C$ dla triploidów oraz $4C$ i $8C$ dla tetraploidów (rys. 3). Większość komórek znajdowała się w fazie G_1/G_0 (średnio 65% komórek diploidów, 67% komórek tetraploidów i 69% komórek tetraploidów). Komórki w fazie G_2 stanowiły odpowiednio około 15% komórek diploidów, 12% komórek triploidów i 10% komórek tetraploidów. Pozostałe komórki zawierały pośrednią ilość DNA (faza S). Analiza wariancji wykazała, że w liściach roślin tetraploidalnych udział komórek w fazie G_2 jest mniejszy niż w liściach roślin diploidalnych i triploidalnych. Sugeruje to niższą dynamikę podziałów komórkowych u tetraploidów, co wyjaśniałoby jednocześnie wolniejszy wzrost i rozwój tych form.

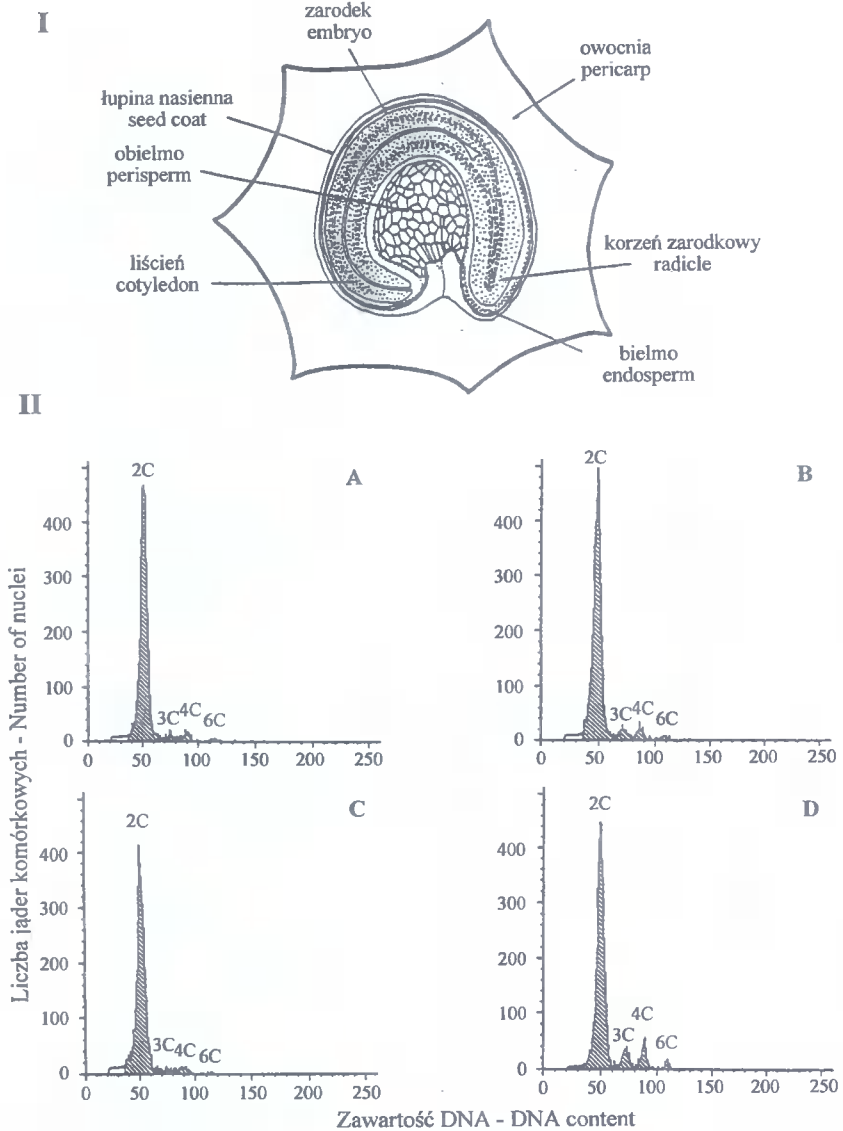
W niektórych próbach stwierdzono dodatkowo obecność niewielkiej liczby komórek o podwyższonej zawartości DNA, powstałych prawdopodobnie w wyniku endoreplikacji. Występowanie tego zjawiska w starszych liściach i w korzeniach buraka było już wcześniej obserwowane w innych doświadczeniach (Butterfass 1966, Damaszk i Łuchniak 1988, Akinerdem 1991).

Porównując udział komórek w fazie G_2 dla poszczególnych odmian i linii w obrębie tego samego poziomu ploidalności stwierdzono, że nie jest on na tyle jednolity, aby można było wyznaczyć stałe wartości współczynnika G_2/G_1 dla danego stopnia ploidalności. Chcąc wykorzystać znajomość cyklu komórkowego do określenia udziału komponentów o różnej ploidalności w populacjach anizoploidalnych (p. 4.1), należy zatem każdorazowo wyznaczać stosunek liczby komórek w fazie G_2 do liczby komórek w fazie G_1 przynajmniej dla jednego z komponentów, których piki się nakładają.



Rys.3. Cykl komórkowy w jądrach liści siewek buraka cukrowego: A – diploidalnego; B – triploidalnego; C – tetraploidalnego (Śliwińska 1997a). Zawartość komórek w fazie G_2 najniższa w liściu rośliny tetraploidalnej

Fig.3. Cell cycle in leaf nuclei of sugar-beet seedlings: A – diploid; B – triploid; C – tetraploid (Śliwińska 1997a). The lowest share of G_2 cells in the leaf of tetraploid plant



Rys.4. Owoc buraka cukrowego (forma diploidalna): I – budowa anatomiczna (wg Bennett i Esau 1936, modyfikowany); II – histogramy zawartości DNA w: A – całym owocu; B – nasieniu właściwym pozbawionym owocnia; C – nasieniu właściwym bez korzenia zarodkowego; D – korzeniu zarodkowym (Śliwińska 1997b). 2C i 4C – jądra komórek zarodka; 3C i 6C – jądra komórek bielma

Fig.4. Sugar-beet fruit (diploid): I – anatomy (from Bennett and Esau 1936, modified); II – DNA-histograms from: A – whole fruit; B – true seed removed from the pericarp; C – true seed without radicle; D – radicle (Śliwińska 1997b). 2C and 4C – nuclei of the embryo cells; 3C and 6C – nuclei of the endosperm cells

4.3. Oznaczanie ploidalności na podstawie analizy cytometrycznej różnych tkanek owocu buraka

Analizie cytometrycznej poddano całe owoce buraka oraz nasiona właściwe, pozbawione owocni. Dodatkowo nasiona właściwe dzielono na dwie części, odcinając korzeń zarodkowy, i analizowano je oddzielnie (Śliwińska 1997b). Na większości histogramów obserwowano obecność czterech pików (rys. 4), z których dwa odpowiadały komórkom zarodka w fazach G_1/G_0 i G_2 (odpowiednio 2C i 4C w zarodkach diploidalnych oraz 3C i 6C w zarodkach triploidalnych) oraz dwa – komórkom bielma (3C i 6C w nasionach triploidalnych oraz 4C i 8C w nasionach triploidalnych). Ponieważ nasiona buraka są w zasadzie bezbielmowe i po dojrzewaniu zawierają tylko pojedynczą warstwę komórek bielma otaczającą korzeń zarodkowy (Artschwager 1927, Bennett i Esau 1936), komórek bielma nie obserwowano na histogramach pochodzących z części nasienia właściwego pozbawionej korzenia zarodkowego. W pozostałych przypadkach udział tych komórek nie przekraczał 10%. Jednocześnie stwierdzono, podobnie jak w nasionach innych gatunków (Bino i in. 1992, 1993), że najwięcej komórek zarodka w fazie G_2 znajduje się korzeniu zarodkowym.

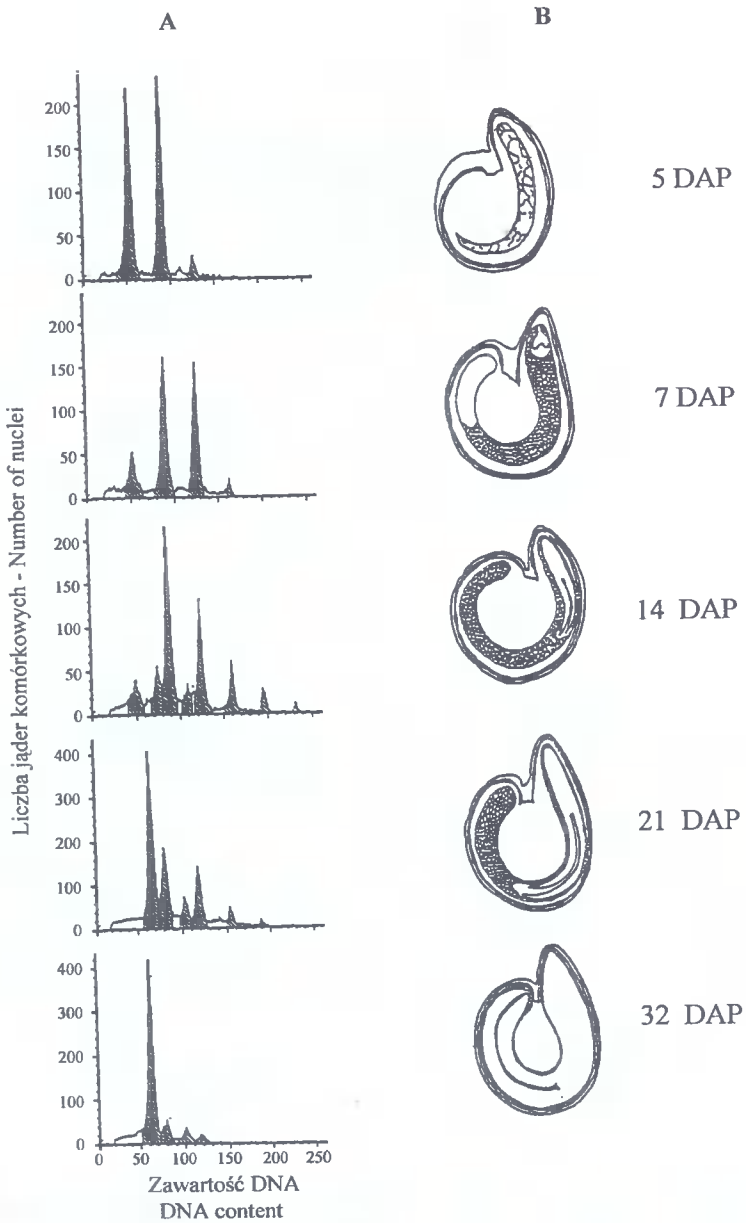
We wszystkich analizowanych próbach ponad 80% stanowiły komórki zarodka w fazie G_1/G_0 , a więc te, które odzwierciedlają ploidalność rośliny. Podobieństwo histogramów, uzyskanych z całych owoców buraka i z nasion właściwych, świadczy o tym, że sucha owocnia (której tkanki pochodzą z rośliny matcznej, a więc są diploidalne) nie zawiera żywych komórek.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że niezależnie od rodzaju analizowanej tkanki, suche nasiona buraka mogą stanowić materiał do określania ploidalności. Pozwala to uniknąć konieczności uzyskiwania do analiz cytometrycznych siewek z liśćmi właściwymi, a tym samym umożliwia szybszą i tańszą analizę badanej partii nasion. Ponadto wykorzystanie do oznaczeń nasion pozwala uniknąć błędu, który może wyniknąć z nierównomiernego tempa wzrostu form różniących się stopniem ploidalności i w konsekwencji – preferencyjnego pobierania liści do analiz cytometrycznych z roślin szybciej rosnących.

4.4. Aktywność cyklu komórkowego w nasionach

4.4.1. Analiza cyklu komórkowego w czasie rozwoju nasion

Analizowano cykl komórkowy w nasionach po 5, 7, 14, 18, 21, 24, 28, 32 i 36 dniach od zapylenia (Śliwińska 1998a). W pierwszych stadiach rozwoju triploidalnego nasienia na histogramach obserwowano jedynie diploidalne komórki załączka (2C i 4C) oraz tetraploidalne komórki bielma (4C i 8C; rys. 5). Liczba komórek zarodka była jeszcze zbyt mała, aby mogły one zostać wykryte przez cytometr. Dopiero po 14 dniach od zapylenia na histogramach można było zauważyć zawierające 3C i 6C DNA komórki zarodka. W miarę rozwoju zarodka zmniejszał się udział komórek bielma, by osiągnąć około 10% wszystkich komórek w dojrzałym nasieniu (tab. 1).



Rys.5. Rozwój triploidalnego ($2x \times 4x$) nasienia buraka cukrowego: A – histogramy zawartości DNA (Śliwińska 1998a); B – przekrój poprzeczny przez nasienie (wg Jassema 1972, modyfikowany); DAP – dni po zapyleniu

Fig.5. Development of triploid ($2x \times 4x$) sugar-beet seed: A – DNA-histograms (Śliwińska 1998a) ; B – cross section of the seed (from Jassem 1972, modified); DAP – days after pollination

Tabela 1. Procentowy udział komórek z zawartością jądrowego DNA wyrażoną liczbą C w rozwijającym się triploidalnym nasieniu buraka cukrowego (Śliwińska 1998a, wersja zmodyfikowana)

Table 1. Percentages of cells with nuclear DNA content expressed as C values in developing triploid sugar-beet seed (Śliwińska 1998a, modified)

Dni od zapylenia Days after pollination	Zawartość jądrowego DNA (powierzchnia pików w %) Nuclear DNA content (peak's area %)						
	2C	3C	4C	6C	8C	16C	32C
5	39,2	–	44,5	–	16,3	–	–
7	18,1	–	34,8	–	30,6	16,4	–
14	6,9	6,5	41,4	4,2	28,6	9,6	2,7
18	3,2	35,8	25,2	10,4	16,8	6,2	2,4
21	–	50,3	20,7	9,5	13,5	4,5	1,6
24	–	58,1	16,5	10,7	10,7	2,7	1,3
28	–	73,6	10,5	9,2	6,8	–	–
32	–	79,8	8,1	7,3	4,8	–	–
36	–	80,9	7,7	7,4	4,0	–	–

W młodym intensywnie rosnącym zarodku udział komórek w fazie G_2 był stosunkowo wysoki, a współczynnik G_2/G_1 kształtował się na poziomie 0,8. Jego wartość jednakże spadała aż do 24-28 dnia po zapyleniu, po czym ustabilizowała się na poziomie około 0,1. W tym czasie ustalił się udział komórek o określonej zawartości DNA i w ciągu następných dni nie obserwowano istotnych zmian w ich wzajemnych proporcjach. Potwierdziło to obserwacje embriologiczne Jassema (1972) który stwierdził, że zarodek osiąga fizjologiczną dojrzałość już 24 dni po zapyleniu, a więc na około 4-5 tygodni przed zbiorem nasion. Ponieważ na tym samym nasienniku buraka znajdują się nasiona w różnym stopniu dojrzałości, wyznaczenie optymalnego terminu zbioru jest w praktyce bardzo trudne. Zwykle 75-90% zebranych nasion (pustych i niedojrzałych) jest odrzucanych w procesie czyszczenia i kalibrowania (Longden 1986, Durrant i Loads 1990). Analiza cyklu komórkowego może ułatwić producentom nasion określenie najbardziej ekonomicznego momentu zbioru, kiedy możliwie największa część nasion jest już w pełni dojrzała.

4.4.2. Zmiany w udziale poszczególnych stadiów replikacji jądrowego DNA w kiełkujących nasionach

W optymalnych warunkach dojrzewania i przechowywania nasion współczynnik G_2/G_1 pozostaje niezmienny. Jego wartość obniża się jedynie nieznacznie po wysuszeniu nasion (Śliwińska, nie publikowane). Aktywność cyklu komórkowego wzrasta ponownie dopiero w czasie kiełkowania.

Nasiona kiełkowały w standardowych warunkach (p. 3.5). Analizowano cykl komórkowy w ciągu 96 godzin od momentu rozpoczęcia pęcznienia, w odstępach dwunastogodzinnych (Śliwińska 1996). Podczas pierwszych 24 godzin kiełkowania nie zaobserwowano w zarodku rozpoczęcia procesu syntezy DNA (tab. 2). Było to najprawdopodobniej spowodowane przebiegającymi w tym czasie procesami naprawy DNA (Deltour 1985). Po 48 godzinach zwiększył się istotnie udział komórek w fazie G_2 (współczynnik G_2/G_1 wzrósł z 0,1 do 0,5), co świadczy o zwiększeniu aktywności cyklu komórkowego. W części komórek zaszedł proces endoreplikacji do 16C. Proces ten nasilał się w miarę zaawansowania kiełkowania i po 72 godzinach można było zauważyć komórki zawierające do 32C DNA. Współczynnik G_2/G_1 osiągnął wartość bliską 1 w momencie wydostania się korzenia zarodkowego z owocni (po 72 godzinach) i 2, kiedy kiełek osiągnął długość około 1 cm (po 84 godzinach). Udział komórek zarodka w fazie G_1 spadł z ponad 90% w suchych nasionach do 24% po 96 godzinach kiełkowania.

Tabela 2. Udział komórek o różnej zawartości DNA oraz współczynnik G_2/G_1 w suchych i kiełkujących diploidalnych nasionach buraka cukrowego (Śliwińska 1996)

Table 2. The share of the cells with different DNA content and the G_2/G_1 ratio in dry and germinating diploid sugar-beet seeds (Śliwińska 1996)

Czas kiełkowania Time of germination (h)	Zawartość jądrowego DNA (powierzchnia pików w %) Nuclear DNA content (peak's area %)					Współczynnik G_2/G_1 G_2/G_1 ratio
	2C	4C	8C	16C	32C	
0	92,1	7,9	0	0	0	0,09 a ¹⁾
12	90,6	9,4	0	0	0	0,11 a
24	88,2	10,2	1,6	0	0	0,15 a
36	75,1	21,3	3,7	0	0	0,30 ab
48	63,5	27,6	7,4	1,5	0	0,53 b
60	60,7	30,4	7,5	1,4	0	0,69 c
72	42,0	38,5	14,4	4,4	0,7	1,14 d
84	23,3	47,0	19,2	8,9	1,6	2,01 e
96	24,4	47,2	18,2	8,7	1,5	1,94 e

¹⁾ wartości oznaczone tą samą literą nie są istotnie zróżnicowane dla $p = 0,05$ (test Duncana) – values followed by the same letter are not significantly different at $p = 0.05$ (Duncan's test)

Przeprowadzone badania wykazały, że cytometria przepływowa umożliwia obserwację wczesnych faz kiełkowania nasion zanim kiełek staje się widoczny. Metoda ta umożliwia zatem wcześniejszą ocenę jakości nasion niż w standardowym laboratoryjnym teście kiełkowania.

4.4.3. Związek między udziałem komórek w fazie G_2 a wigorem nasion

Badano próby nasion trzech odmian reprodukowanych w Polsce; dla każdej odmiany nasiona o niskim, średnim i wysokim wigorze, oznaczonym na podstawie laboratoryjnego wskaźnika wigoru (Śliwińska 1997b). Analiza cytometryczna wykazała, że w korzeniu zarodkowym nasion o niskim wigorze udział komórek w fazie G_2 był istotnie wyższy niż w nasionach o średnim i wysokim wigorze (tab. 3). Przyczyną tego zjawiska był prawdopodobnie duży udział nasion niedojrzałych w próbach o niskiej jakości (p. 4.4.1). Nasiona takie, zgodnie z wcześniejszymi badaniami (Grimwade i in. 1987), wykazują obniżoną zdolność kiełkowania.

Tabela 3. Laboratoryjny wskaźnik wigoru i współczynnik G_2/G_1 dla różnych prób nasion trzech odmian buraka cukrowego (Śliwińska 1997b)

Table 3. Seedling length vigour index and G_2/G_1 ratio for different seed lots of three sugar-beet cultivars (Śliwińska 1997b)

Cv.	Laboratoryjny wskaźnik wigoru Seedling length vigour index (%)	Współczynnik G_2/G_1 G_2/G_1 ratio
PN Mono 1 (2x)	20	0,066 a ¹⁾
	45	0,052 a
	52	0,040 b
Jastrza (2x)	20	0,144 a
	31	0,125 a
	48	0,102 b
Maria (3x)	2	0,101 a
	39	0,075 b
	55	0,068 b

¹⁾ wartości dla poszczególnych odmian oznaczone tą samą literą nie są istotnie zróżnicowane dla $p = 0,05$ – values for a particular variety followed by the same letter are not significantly different at $p = 0.05$

Jak stwierdzono (Deltour 1985, Sybenga 1972), komórki w fazie G_2 są bardziej wrażliwe na czynniki stresowe oraz na te, które wpływają na podziały jądrowe i morfologię chromosomów. Zatem nie jest wskazane, aby nasiona przeznaczone do przechowywania zawierały podwyższony udział takich komórek. Jednakże po okresie przechowywania, a przed wysiewem, nasiona buraka standardowo poddawane są takim zabiegom, jak moczenie czy kondycjonowanie, które podwyższają ich wigor (Wiśniewski i Sadowski 1985). Oprócz wypłukiwania inhibitorów i ochrony przed patogenami, procesy te wpływają także na wzrost aktywności cyklu komórkowego (Bino i in. 1992, Lanteri i in. 1993). Powodują, jeszcze przed wysiewem, zachodzenie w jądrze procesów naprawy

i zainicjowanie syntezy DNA (pierwsza faza kiełkowania zgodnie z definicją Bewleya i Blacka 1994). Podobne zjawisko zaobserwowano jako konsekwencję ulewnych deszczy w czasie dojrzewania nasion (p. 4.4.4, Śliwińska i in. 1999). Stwierdzono, że podwyższony przez czynniki inicjujące kiełkowanie współczynnik G_2/G_1 skorelowany był z wyższym wigorem i lepszymi wschodami połowymi (tab. 4).

Tabela 4. Wybrane współczynniki korelacji między cechami: 1 – laboratoryjny wskaźnik wigoru w 15°C; 2 – zdolność kiełkowania po 4 dniach w 15°C; 3 – laboratoryjny wskaźnik wigoru w 20°C; 4 – zdolność kiełkowania po 4 dniach w 20°C; 5 – wschody polowe; 6 – współczynnik G_2/G_1 w suchych nasionach; 7 – współczynnik G_2/G_1 po 24 h kiełkowania; 8 – współczynnik G_2/G_1 po 48 h kiełkowania (Śliwińska i in. 1999)

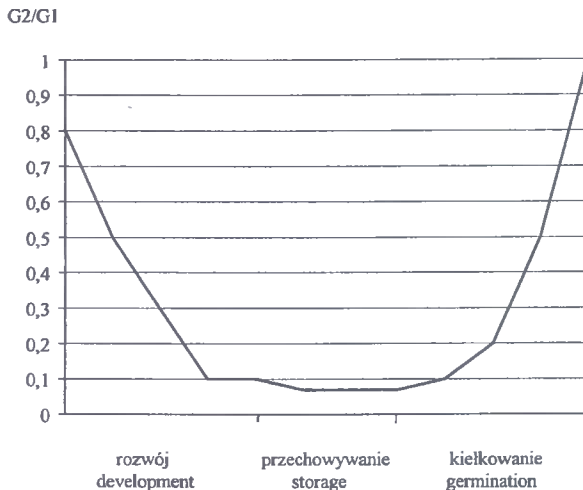
Table 4. Selected coefficients of correlation between the traits of: 1 – seedling length vigour index at 15°C; 2 – germination capacity after 4 days at 15°C; 3 – seedling length vigour index at 20°C; 4 – germination capacity after 4 days at 20°C; 5 – field emergence; 6 – G_2/G_1 ratio in dry seeds; 7 – G_2/G_1 ratio after 24 h germination; 8 – G_2/G_1 ratio after 48 h germination (Śliwińska et al. 1999)

	6	7	8
1	0,890**	0,768**	0,712**
2	0,810**	0,740**	0,707**
3	0,852**	0,800**	0,796**
4	0,862**	0,749**	0,599*
5	0,804**	0,708**	0,610**

* istotne dla $p = 0,05$ – significant at $p = 0,05$

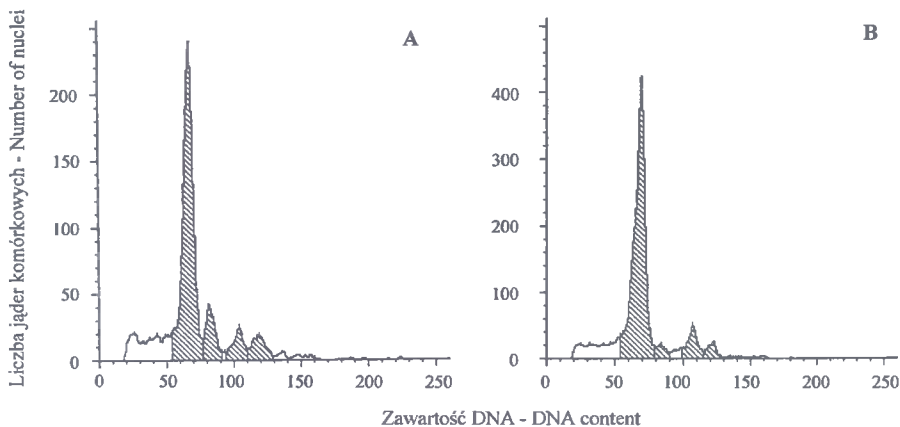
** istotne dla $p = 0,01$ (test t-Studenta) – significant at $p = 0,01$ (Student's t test)

Jak wynika z przeprowadzonych badań, stosunkowo wysoki współczynnik G_2/G_1 występuje zarówno w nasionach niedojrzałych (mających obniżony wigor), jak również w nasionach dojrzałych, w których zostało zainicjowane kiełkowanie (rys. 6). Jeśli te ostatnie zostaną wysuszone i następnie wysiane, mogą charakteryzować się podwyższonym wigorem (Śliwińska 1998b, Śliwińska i in. 1999). Zatem, oceniając jakość badanej partii nasion na podstawie współczynnika G_2/G_1 , trzeba rozważyć przyczynę jego podwyższonej wartości. W tym celu należy równocześnie określać udział bielma, który spada w miarę rozwoju nasion i w dojrzałych nasionach osiąga poziom poniżej 10% komórek. Jak przedstawiono na rysunku 7, na podstawie analizy histogramów możliwe jest ustalenie, czy wysoka aktywność cyklu komórkowego w nasieniu wynika z jego niedojrzałości (rys. 7A), czy też jest skutkiem zadziałania na dojrzałe nasienie czynników inicjujących kiełkowanie (rys. 7B).



Rys.6. Zmiany współczynnika G_2/G_1 w czasie rozwoju, przechowywania i kielkowania nasion buraka (dla optymalnych warunków zewnętrznych)

Fig.6. Changes of G_2/G_1 ratio during development, storage and germination of beet seeds (for optimal environmental conditions)



Rys.7. Histogramy zawartości DNA w triploidalnych nasionach buraka cukrowego: A – nasiono niedojrzałe (współczynnik G_2/G_1 równy 0,1; udział komórek bielma 19%); B – nasiono w pełni dojrzałe na początku kielkowania (współczynnik G_2/G_1 równy 0,1; udział komórek bielma 9%)

Fig.7. DNA-histograms of triploid sugar-beet seeds: A – undeveloped (G_2/G_1 ratio 0.1, proportion of the endosperm cells 19%); B – fully developed at the beginning of germination (G_2/G_1 ratio 0.1, proportion of the endosperm 9%)

4.4.4. Wpływ terminu zbioru i przedsiewnego traktowania nasion na cykl komórkowy

Nasiona dwóch triploidalnych odmian zbierano z pól produkcyjnych w południowej Francji i w centralnej Polsce w terminie uznanym przez producenta za optymalny i dwa tygodnie wcześniej (Śliwińska i in. 1999). Nasiona zebrane w optymalnym terminie charakteryzowały się wyższym wigorem oraz zdolnością kiełkowania i lepszymi wschodami polowymi, a jednocześnie wykazywały większą aktywność cyklu komórkowego niż nasiona z wcześniejszego zbioru. Podwyższony współczynnik G_2/G_1 w nasionach zebranych później (tab. 5) świadczył o tym, że w ciągu ostatnich dwóch tygodni dojrzewania musiały zadziałać czynniki, które pobudziły nasiona do kiełkowania. Czynnikiem takim mogły być ulewne deszcze, występujące w tym czasie zarówno we Francji, jak i w Polsce. Oprócz wypłukania inhibitorów z owocni, mogły one podnieść wilgotność nasion, co zainicjowało syntezę DNA w jądrze i spowodowało wzrost udziału komórek w fazie G_2 w korzeniu zarodkowym. Hipoteza ta została potwierdzona podwyższoną zawartością rozpuszczalnej podjednostki B globuliny 11 S w nasionach zebranych w optymalnym terminie. Podobny efekt wywołuje stymulacja (priming) lub wczesne fazy kiełkowania nasion (Job i in. 1997). Innym białkiem, które może być wskaźnikiem aktywności cyklu komórkowego w nasieniu, jest β -tubulina. Wprawdzie w suchych nasionach nie stwierdzono akumulacji β -tubuliny w żadnym terminie zbioru, jednakże podczas kiełkowania bezsprzecznie akumulacja tego białka cytoskieletowego była szybsza w nasionach zebranych później.

Sugerując korzystny wpływ deszczu na wigor nasion, trzeba jednakże wziąć pod uwagę fakt, że przy podwyższonej zawartości komórek w fazie G_2 nasiona te mogą być bardziej wrażliwe na nieprawidłowe warunki przechowywania. Ponadto nadmierne deszcze mogą spowodować przekroczenie fazy kiełkowania, w której nasiona są odporne na desykcję, i w konsekwencji, zgodnie z badaniami Côme i Thévenot (1982) – ich zamieranie po wysuszeniu.

Część zebranych w różnych terminach nasion została dodatkowo poddana sześciogodzinnemu moczeniu (p. 3.1). Zabieg ten podniósł wigor i kiełkowanie nasion zarówno w laboratorium, jak i w polu, ale nie zainicjował syntezy DNA (tab. 5). Korzystny wpływ na aktywność cyklu komórkowego zastosowanego przedsiewnego traktowania nasion zaobserwowano jednak w czasie kiełkowania. W nasionach kondycjonowanych współczynnik G_2/G_1 wzrastał szybciej niż w nasionach surowych. Nasiona te wykazywały także szybszą akumulację β -tubuliny. Przedsiewne traktowanie nasion buraka może powodować wzrost liczby komórek w fazie G_2 już w suchych nasionach przed ich wysiewem (Śliwińska 1998b), jednak, podobnie jak w przypadku działania deszczy, ważna jest kontrola zaawansowania kiełkowania, aby nie przekroczyć fazy, gdy nasiona stają się nieodporne na desykcję. Kontrola cytometryczna jest w tym przypadku wysoce pożądana.

Tabela 5. Współczynnik G_2/G_1 w korzeniach zarodkowych suchych i kiełkujących nasion (surowych i moczonych) dwóch triploidalnych odmian buraka cukrowego (Śliwińska i in. 1999)

Table 5. G_2/G_1 ratio in radicles of dry and germinating seeds (untreated and soaked) of two triploid sugar-beet cultivars (Śliwińska et al. 1999)

Cv.	Termin zbioru Harvest time	Traktowanie nasion Seed treatment	Czas kiełkowania (h) Time of completion of germination (h)			
			0	24	48	72
A	wczesny early	surowe untreated	0,063 b ¹⁾ B ²⁾	0,069 b B	0,269 b A	0,355 c A
		moczone soaked	0,071 b C	0,060 b C	0,283 b B	0,826 b A
	optymalny optimal	surowe untreated	0,179 a C	0,176 a C	0,491 a B	0,837 b A
		moczone soaked	0,206 a C	0,170 a C	0,591 a B	1,101 a A
B	wczesny early	surowe untreated	0,066 b B	0,064 b B	0,153 c B	0,758 ^{NS} A
		moczone soaked	0,066 b C	0,100 b C	0,490 b B	1,007 A
	optymalny optimal	surowe untreated	0,148 a C	0,161 a C	0,398 b B	0,831 A
		moczone soaked	0,139 a C	0,158 a C	0,794 a B	1,157 A

¹⁾ wartości dla poszczególnych odmian i czasu kiełkowania (w kolumnach) oznaczone tą samą małą literą nie są istotnie zróżnicowane dla $p = 0,05$ (test Duncana) – values for particular cultivar and germination time (in columns) followed by the same small letter are not significantly different at $p = 0.05$ (Duncan's test)

²⁾ wartości dla poszczególnych prób nasion (w rzędach) oznaczone tą samą dużą literą nie są istotnie zróżnicowane dla $p = 0,05$ (test Duncana) – values for particular seed lot (in lines) followed by the same capital letter are not significantly different at $p = 0.05$ (Duncan's test)

^{NS} brak istotnego zróżnicowania – no significant differentiation

Uzyskane wyniki potwierdziły, że warunki zewnętrzne podczas dojrzewania nasion oraz termin zbioru mogą wpłynąć na współczynnik G_2/G_1 . Zabieg kondycjonowania pobudza aktywność cyklu komórkowego w kiełkujących nasionach. Jednocześnie stwierdzono, że połączone analizy cyklu komórkowego za pomocą cytometrii przepływowej oraz oznaczenie zawartości podjednostki B globuliny 11 S i β -tubuliny mogą być pomocne w określaniu stanu fizjologicznego nasion, a tym samym – ich jakości.

5. PODSUMOWANIE

W pracy badano możliwości wykorzystania cytometrii przepływowej w hodowli i nasiennictwie buraka cukrowego. Ze względu na dostępność cytometrów Partec na europejskim rynku, metoda ta stosowana jest obecnie nie tylko w laboratoriach firm zachodnich, ale także w Polsce. Stąd wynika duże zainteresowanie, zarówno firm hodowlano-nasiennych, jak i ośrodków naukowych, możliwością nowych zastosowań tej szybkiej i dokładnej metody.

Jak dotąd, cytometria przepływowa jest wykorzystywana głównie do określania stopnia ploidalności. Pomiar polega na oznaczaniu zawartości jądrowego DNA w młodych liściach pojedynczych roślin. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują, że możliwe jest także określanie ploidalności na podstawie analizy cytometrycznej populacji roślin. Metoda jest wystarczająco precyzyjna dla wykrycia obecności jednej rośliny o niepożądanym ploidalności w populacji składającej się z 50 roślin. Jednakże ścisła ocena składu populacji anizoploidalnej napotyka na trudności. Stwierdzono, że domieszka komórek o innej ploidalności mniejsza niż 10% nie może być dokładnie określona. Dlatego jeśli wymagana jest znajomość składu populacji z większą dokładnością, nie należy oznaczać w jednej próbie więcej niż 10 roślin.

W przypadku, gdy populacja zawiera komponenty o różnej ploidalności, których piki się pokrywają (na przykład diploidy i tetraploidy mające wspólny pik 4C), celem ich rozgraniczenia niezbędna jest znajomość cyklu komórkowego przynajmniej jednego z tych komponentów. Okazało się, że dla różnych odmian lub linii o tej samej ploidalności stosunek G_2/G_1 nie jest jednakowy. Tak więc ustalenie stałego współczynnika dla danego poziomu ploidalności nie jest możliwe i konieczne jest każdorazowe jego wyznaczenie przy analizie poszczególnych odmian.

Analiza populacji, aczkolwiek wymagająca dodatkowych obliczeń, znacznie przyspiesza i ogranicza koszty oznaczania zanieczyszczeń partii nasion buraka domieszkami o niepożądanym ploidalności oraz składu odmian anizoploidalnych.

Dalsze korzyści ekonomiczne może przynieść wykorzystanie jako materiału do analiz nasion, zamiast liści siewek. Jak wykazały badania zarówno całe suche nasiona buraka, jak i ich części stanowią dobry materiał do oznaczania ploidalności. Bez względu na rodzaj analizowanej tkanki nasienia, większość komórek widocznych na histogramie stanowią komórki zarodka w fazie G_1/G_0 , a więc te, które odzwierciedlają ploidalność rośliny.

Oprócz określania ploidalności, analiza cytometryczna dostarcza również informacji o aktywności cyklu komórkowego w badanej tkance. Przeprowadzone badania wskazują, że szczególnie ważne dla producentów nasion mogą być obserwacje prowadzone w czasie dojrzewania i kiełkowania nasion. Wyznaczając stosunek G_2/G_1 można powiązać jego wartość ze stanem fizjologicznym nasienia. Stwierdzono, że do prowadzenia takich badań najbardziej przydatny jest

korzeń zarodkowy, w którym względna zawartość komórek w fazie G_2 jest najwyższa.

Badając cykl komórkowy w rozwijającym się nasieniu buraka zaobserwowano, że po początkowo bardzo intensywnym procesie syntezy DNA w zarodku ($G_2/G_1 = 0,8$ czternaście dni po zapyleniu), zawartość komórek w fazie G_2 maleje i stabilizuje się po 24-28 dniach od zapylenia na poziomie około 10% wszystkich komórek zarodka. Świadczy to o zahamowaniu aktywności cyklu komórkowego już w tak młodym nasieniu i można to powiązać z osiągnięciem przez zarodek stanu fizjologicznej dojrzałości. W optymalnych warunkach dojrzewania, suszenia i przechowywania nasion współczynnik G_2/G_1 pozostaje po tym czasie na stałym poziomie, jedynie obniża się nieco w czasie wysychania nasion. Jednakże warunki zewnętrzne w czasie dojrzewania nasion mogą wpływać na jego zmianę. Wpływ obfitych opadów w czasie dojrzewania na aktywność cyklu komórkowego w zarodku, został zauważony przy analizie cytometrycznej nasion zebranych dwa tygodnie przed i w optymalnym terminie zbioru. Stwierdzono, że w nasionach zebranych później współczynnik G_2/G_1 był wyższy, co świadczyło o rozpoczęciu syntezy DNA, a tym samym kiełkowania nasion. Potwierdziła to wysoka zawartość rozpuszczalnej podjednostki B globuliny 11 S oraz szybsze gromadzenie białka cytoszkieletowego β -tubuliny w tych nasionach. Jednocześnie podwyższył się ich wigor i zdolność kiełkowania, co należy tłumaczyć zarówno wymyciem inhibitorów z owocni, jak i podwyższeniem aktywności cyklu komórkowego. Jednakże oceniając skutki obfitych opadów jako pozytywne, trzeba pamiętać o tym, że nasiona zawierające wysoką zawartość komórek w fazie G_2 mogą być mniej odporne na warunki stresowe w czasie przechowywania, a także – że istnieje niebezpieczeństwo przekroczenia fazy kiełkowania, w której nasiona są jeszcze odporne na desykcję i mogą one obumierać w procesie suszenia.

Przed wysiewem nasiona buraka często poddawane są różnym zabiegom uszlachetniającym, które podnoszą ich wigor. Przeprowadzone badania wykazały, że wpływ kondycjonowania to nie tylko zredukowanie poziomu inhibitorów w owocni i działanie ochronne fungicydów na kiełki. Zabieg ten może wpływać także bezpośrednio na aktywność cyklu komórkowego w zarodkach. Zaobserwowano, że w nasionach kondycjonowanych zawartość komórek w fazie G_2 w czasie kiełkowania wzrasta szybciej niż w nasionach surowych. Najprawdopodobniej jest to skutkiem wcześniejszego (już w czasie przedsiewnego moczenia nasion) zajścia procesów naprawy DNA, które normalnie przebiegają w pierwszych godzinach kiełkowania. W celu uniknięcia zainicjowania zbyt zaawansowanego kiełkowania w czasie przedsiewnego traktowania nasion, wskazana jest kontrola cytometryczna. Jak wykazano, stosując cytometrię przepływową, jeszcze przed wydostaniem się kiełka z owocni, można obserwować na histogramach wczesne fazy kiełkowania, a więc uzyskać informacje potrzebne do oceny efektywności stosowanego zabiegu.

Współczynnik G_2/G_1 , jako wskaźnik stanu fizjologicznego nasion, może być pomocny w ocenianiu jakości poszczególnych partii uzyskanych z różnych rejonów produkcji i od różnych producentów. Stwierdzono, że koreluje on zarówno z wigorem, jak i ze zdolnością kiełkowania oraz wschodami polowymi. Jednakże oceniając nasiona na podstawie analizy cytometrycznej, trzeba mieć na względzie fakt, że podwyższona zawartość komórek w fazie G_2 może być skutkiem zarówno obecności w próbie nasion niedojrzałych, jak i zainicjowania procesu kiełkowania. Zawartość komórek bielma, która maleje w miarę dojrzewania nasienia, może być pomocna w ustaleniu stopnia zaawansowania rozwoju nasion.

Jak zaznaczono wcześniej, badania były prowadzone we współpracy z krajowymi i zagranicznymi firmami hodowlano-nasiennymi i ośrodkami naukowymi. Wyniki były przekazywane zarówno na konferencjach naukowych, jak i bezpośrednio instytucjom oraz osobom zainteresowanym, dzięki czemu mogły zostać szybko wdrożone do praktyki. Są one obecnie wykorzystywane głównie przez Kutnowską Hodowlę Buraka Cukrowego (Kutno, Polska) oraz Danisco Seed (Holeby, Dania), a współpraca jest kontynuowana.

LITERATURA

- AKINERDEM F., 1991. Determination of the ploidy level of pure and mixed plant populations of sugar beet (*Beta vulgaris L.*) by flow cytometry. *Plant Breeding* 107: 333-337.
- ARTSCHWAGER E., 1927. Development of flowers and seed in the sugar beet. *J. Agr. Res.* 34(1): 1-25.
- BENNETT C., ESAU K., 1936. Further studies on the relation of the curly-top virus to plant tissues. *J. Agr. Res.* 53: 595-620.
- BEWLEY J.D., BLACK M., 1994. *Seeds: physiology of development and germination.* Plenum Press, New York and London.
- BINO R.J., BERGERVOET J.H.W., DE VOS C.H.R., KRAAK H.L., LANTERI S., VAN DER BURG W.J., ZHENG X.Y., 1996. Comparison of nuclear replication activity and protein expression patterns during tomato seed germination. *Field Crops Res.* 45: 71-77.
- BINO R.J., BERGERVOET J.H.W., LANTERI S., 1995. The use of cell cycle activity as an early indicator for the start of the germination process. Fourth National Symposium on Stand Establishment of Horticultural Crops, UC-Davis USA: 11-17.
- BINO R.J., DE VRIES J.N., KRAAK H.L., VAN PIJLEN J.G., 1992. Flow cytometric determination of nuclear replication stages in tomato seeds during priming and germination. *Ann. Bot.* 69: 231-236.
- BINO R.J., LANTERI S., VERHOEVEN H.A., KRAAK H.L., 1993. Flow cytometric determination of nuclear replication stages in seed tissues. *Ann. Bot.* 72: 181-187.
- BORMOTOW W.E., ŁOPATINA T.I., 1986. Poliploidiya i polimorfizm rastenii po velichine kletok. *Nauka i Technika, Mińsk.*
- BROWN S.C., DEVAUX P., MARIE D., BERGOUNIOUX C., PETIT P.X., 1991. Cytométrie en flux: Application à l'analyse de la ploïdie chez les végétaux. *Le Technoscope de Biofutur* 47: 2-14.
- BUTTERFASS T., 1966. Neue Aspekte der Poplyploïdieforschung und -züchtung. *Mitteilungen aus der Max-Plank-Gesellschaft, Heft 1:* 47-58.
- CÔME D., THÉVENOT C., 1982. Environmental control of embryo dormancy and germination. W: *The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination*, Khan, A.A. (ed.) Elsevier Biomedical Press: 271-298.
- DAMASZ B., ŁUCHNIAK P., 1988. Nuclear DNA endoreplication and plastid index in mesophyll of some dicotyledonous species. *Acta Soc. Bot. Pol.* 57(3): 303-316.
- DEAN P.I., GRAY J.W., DOLBEARE F.A., 1982. The analysis and interpretation of DNA distributions measured by flow cytometry. *Cytometry* 3(3): 188-195.
- DE CASTRO R.D., HILHORST H.W.M., BERGERVOET J.H.W., GROOT S.P.C., BINO R.J., 1998. Detection of β -tubulin in tomato seeds: optimisation of extraction and immunodetection procedures. *Phytochemistry* 47: 689-694.

- DE CASTRO R.D., ZHENG X.Y., BERGERVOET J.H.W., DE VOS C.H.R., BINO R.J., 1995. Beta-tubulin accumulation and DNA replication in imbibing tomato seeds. *Plant Physiol.* 109: 499-504.
- DELTOUR R., 1985. Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. *J. Cell Sci.* 75: 43-83.
- DOLEŽEL J., 1991. Flow cytometric analysis of nuclear content in higher plants. *Phytochemical Analysis* 2: 143-154.
- DOLEŽEL J., GÖHDE W., 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 19: 103-106.
- DURRANT M.J., LOADS A.H., 1990. Some changes in sugar beet seeds during maturation and after density grading. *Seed Sci. Technol.* 18: 11-21.
- GALBRAITH D.W., 1984. Flow cytometric analysis of the cell cycle. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* 1: 765-777.
- GALBRAITH D.W., 1989. Analysis of higher plants by flow cytometry and cell sorting. *Int. Rev. Cytol.* 116: 165-228.
- GALBRAITH D.W., HARKINS K.R., MADDOX J.M., AYRES N.M., SHARMA D.P., FIROOZABADY E., 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220: 1049-1051.
- GRIMWADE J.A., GRIERSON D., WHITTINGTON W.J., 1987. The effect of differences in time to maturity on the quality of seed produced by different varieties of sugar beet. *Seed Sci. Technol.* 15: 135-145.
- ISTA (International Seed Testing Association), 1985. International Rules for Seed Testing. *Seed Sci. Technol.* 13: 322-447.
- JASSEM M., 1972. Badania embriologiczne nad rozwojem diploidalnych, triploidalnych i tetraploidalnych nasion jednokiełkowych buraków cukrowych. Bydg. Tow. Nauk., Prace Wydz. Nauk Przyr., Ser. B 15: 69-121.
- JASSEM M., ŚLIWIŃSKA E., ZORNOW A., 1993. The influence of substrate moisture on germination capacity of sugar-beet seeds. *Seed Sci. Technol.* 21: 203-211.
- JOB C., KERSULEC A., RAVASIO L., CHAREYRE S., PEPIN R., JOB D., 1997. The solubilization of the basic subunit of sugarbeet seed 11-S globulin during priming. *Seed Sci. Res.* 7: 225-243.
- LANTERI S., SARACCO F., KRAAK H.L., BINO R.J., 1994. The effects of priming on nuclear replication activity and germination of pepper (*Capsicum annuum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. *Seed Sci. Res.* 4: 81-87.
- LIU Y., HILHORST H.W.M., GROOT S.P.C., BINO R.J., 1997. Amounts of nuclear DNA and internal morphology of gibberellin- and abscisic acid-deficient tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds during maturation, imbibition and germination. *Ann. Bot.* 79: 161-168.
- LONGDEN P.C., 1986. Influence of the seed crop environment on the quality of sugar beet seed. *Proceedings of 49th Winter Congress of IIRB:* 1-16.
- MUIRHEAD K.A., HORAN P.K., POSTE G., 1985. Flow cytometry: present and future. *Bio/Technology* 3: 337-356.

- ORMEROD M.G., 1994. Flow cytometry. A practical approach. Oxford University Press.
- SADOWSKI H., 1991. Poprawa jakości nasion buraka cukrowego metodami chemicznymi. Biul. IHAR 177: 71-82.
- SYBENGA J., 1972. General cytogenetics. New York, Elsevier: 34-56.
- ŚLIWIŃSKA E., 1993. Cytometria przepływowa - nowa metoda analizy cyklu komórkowego i genomu roślin wyższych. Hodowla Roślin i Nasiennictwo 1: 10-15.
- ŚLIWIŃSKA E., 1996. Flow cytometric analysis of the cell cycle of sugar-beet seed during germination. Gen. Pol. 37A: 254-257.
- ŚLIWIŃSKA E., 1997a. Analiza cyklu komórkowego buraków cukrowych o różnym stopniu ploidalności za pomocą cytometrii przepływowej. Biul. IHAR 202: 35-40.
- ŚLIWIŃSKA E., 1997b. Flow cytometric analysis of sugar-beet seeds different in vigour. W: Basic and Applied Aspects of Seed Biology, Ellis R.H., Black M., Hong T.D. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 577-584.
- ŚLIWIŃSKA E., 1998a. Cell cycle activity during development of sugar-beet seed. W: Plant Cytogenetics, Małuszyńska J. (ed.). Prace Naukowe Uniwersytetu Śląskiego nr 1696: 51-59.
- ŚLIWIŃSKA E., 1998b. Effect of seed treatment on DNA replication activity in the embryo of sugar beet. J. Appl. Genet. 39A: 118-119.
- ŚLIWIŃSKA E., JANSEN R., 1997. Estimation of the share of components of different ploidy in anisoploid sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) populations by flow cytometry. J. Appl. Genet. 38(2): 151-160.
- ŚLIWIŃSKA E., JING HAI-CHUN, JOB C., JOB D., BERGERVOET J.H.W., BINO R.J., GROOT S.P.C., 1999. Effect of harvest time and soaking treatment on cell cycle activity in sugar-beet seeds. Seed Sci. Res. 9 (w druku).
- ŚLIWIŃSKA E., STEEN P., 1995. Flow cytometric estimation of ploidy in anisoploid sugar-beet populations. J. Appl. Genet. 36(2): 111-118.
- WIŚNIEWSKI K., SADOWSKI H., 1985. Kondycjonowanie nasion buraków cukrowych. Biul. IHAR 156: 151-160.

Oznaczanie zawartości jądrowego DNA i badanie cyklu komórkowego w liściach i nasionach buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.) za pomocą cytometrii przepływowej

Streszczenie

Cytometria przepływowa, metoda służąca do pomiaru zawartości jądrowego DNA, jest stosowana w hodowli i nasiennictwie buraka cukrowego do ustalania stopnia ploidalności. Najczęściej do testowania linii i partii nasion mieszańcowych używa się młodych liści pojedynczych roślin. Badanie pojedynczych roślin jest jednak czasochłonne, co ogranicza liczbę prób, jakie można przetestować. Przebadano zatem możliwość zastąpienia analizy pojedynczych roślin przez określanie składu cytologicznego populacji. Stwierdzono, że za pomocą cytometrii przepływowej może być wykryta nawet niewielka domieszka komórek o innej ploidalności (np. jedna roślina diploidalna w populacji 50 roślin triploidalnej odmiany). Jednakże dokładne określenie ilościowej struktury anizoploidalnej populacji napotyka na trudności. Jednym z problemów jest to, że pomimo pobierania do analizy dysków liściowych tej samej wielkości, zawierają one różną liczbę komórek w zależności od stopnia ploidalności. Przyczyną tego zjawiska jest niejednakowa wielkość komórek roślin o różnej ploidalności. Ponieważ komórki roślin o niższej ploidalności są zwykle mniejsze, może się okazać, że oszacowanie udziału takiego komponentu jest zbyt wysokie w porównaniu z rzeczywistym. Inną trudnością jest brak możliwości odróżnienia diploidalnych komórek w fazie G_2 od tetraploidalnych komórek w fazie G_1 i G_0 , ponieważ wszystkie one mają tę samą zawartość DNA. Aby odróżnić komórki roślin diploidalnych od tetraploidalnych, konieczne jest obliczenie współczynnika G_2/G_1 dla jednego z tych komponentów. Niestety, jak wykazały przeprowadzone badania, nie można określić współczynnika G_2/G_1 uniwersalnego dla danego stopnia ploidalności i musi on być każdorazowo empirycznie ustalany dla badanego materiału roślinnego.

Na podstawie histogramów, otrzymanych z anizoploidalnych populacji złożonych z roślin diploidalnych, triploidalnych i tetraploidalnych w różnych stosunkach liczbowych, sporządzono wykres pozwalający na określenie rzeczywistych proporcji komponentów o różnej ploidalności. Może on pomóc hodowcom w stosowaniu analizy cytometrycznej populacji roślin w hodowli i nasiennictwie i, dzięki temu, skrócić czas oraz obniżyć koszty oceny ploidalności.

Inną możliwością zwiększenia efektywności oznaczania ploidalności jest analiza nasion, zamiast liści siewek. Wykazano, że histogramy otrzymane z nasion zapewniają dokładne określenie stopnia ploidalności. Nasiona buraka cukrowego są w zasadzie bezbielmowe. Pozostałością bielma w dojrzałym nasieniu jest jedynie pojedyncza warstwa komórek otaczająca korzeń zarodkowy.

Jednakże większość komórek nasienia (ponad 80%) stanowią komórki zarodka w fazie G_1/G_0 cyklu komórkowego, a więc te, które określają ploidalność.

Oprócz określania ploidalności, zawartość DNA w komórce informuje, w jakim jest ona stadium cyklu komórkowego. Zbadano za pomocą cytometrii przepływowej zmiany aktywności cyklu komórkowego w nasionach buraka podczas ich rozwoju, dojrzewania i kiełkowania. W czasie rozwoju i wzrostu zarodka współczynnik G_2/G_1 początkowo obniża się, a po 24-28 dniach od zapylenia aktywność cyklu komórkowego ustala się na określonym poziomie (wartość współczynnika G_2/G_1 stabilizuje się). Oznacza to, że zarodek już w tak wczesnym stadium jest w pełni fizjologicznie rozwinięty. W optymalnych warunkach dojrzewania, suszenia i przechowywania nasion, współczynnik G_2/G_1 zwykle pozostaje niezmienny. Jego wartość obniża się jedynie nieznacznie po wysuszeniu nasienia. Ulega on ponownie podwyższeniu po 24-48 godzinach kiełkowania, po zakończeniu procesów naprawy DNA.

Na uwagę zasługuje to, że warunki panujące podczas dojrzewania nasion, szczególnie obfite deszcze, mogą również podwyższyć współczynnik G_2/G_1 w zarodku. Na podstawie analizy nasion zebranych w optymalnym terminie (nasiona dojrzałe) i dwa tygodnie wcześniej (nasiona niedojrzałe), stwierdzono wyższy współczynnik G_2/G_1 w zarodkach nasion dojrzałych niż niedojrzałych. Nasiona zebrane później zawierały również więcej rozpuszczalnej podjednostki B globuliny 11 S, co jest typowe dla nasion kiełkujących lub moczonych. W nasionach dojrzałych podczas kiełkowania następowała także szybsza akumulacja białka cytoskieletowego β -tubuliny. To zjawisko podwyższonej aktywności cyklu komórkowego wywołane było najprawdopodobniej przez opady i temperatury niższe od optymalnych w czasie ostatnich dwóch tygodni dojrzewania. Spowodowało to zainicjowanie kiełkowania jeszcze na roślinie matecznej.

Moczenie nasion przez 3 godziny w wodzie i następnie 3 godziny w roztworze fungicydów spowodowało podwyższenie aktywności cyklu komórkowego podczas kiełkowania, a także poprawę wigoru, zdolności kiełkowania i wschodów polowych. Nie obserwowano jednakże bezpośredniego wpływu kondycjonowania na cykl komórkowy w zarodku. Korzystny wpływ tego zabiegu na kiełkowanie zarodka polegał prawdopodobnie na tym, że procesy naprawy DNA zaszły już przed rozpoczęciem pęcznienia nasion.

Stwierdzono dodatnią korelację między współczynnikiem G_2/G_1 w dojrzałych nasionach a wigorem, zdolnością kiełkowania i wschodami polowymi, co sugeruje, że współczynnik ten może być stosowany jako wyznacznik fizjologicznego stanu nasienia. Na podstawie przeprowadzonych badań nasuwa się wniosek, że analiza cytometryczna może być pomocna w badaniu i ocenie jakości nasion buraka cukrowego.



Estimation of nuclear DNA content and analysis of the cell cycle in leaves and seeds of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by flow cytometry

Summary

Flow cytometry, a method for measuring nuclear DNA content, is used in sugar-beet breeding and seed production as a tool for ploidy estimation. Routinely, it is the young leaves of individual plants that are used for testing lines and hybrid seed lots. This use of individual plants is time consuming, however, and limits the number of samples that can be tested. Thus the possibility of replacing individual plant analyses by estimating the cytological composition of populations was investigated. It was found that even a small admixture of different ploidy cells (e.g. one diploid plant in a population of 50 triploid cultivar plants) can be determined by flow cytometry. However, it is difficult to obtain an exact estimation of the quantitative structure of an anisoploid population. One problem is that although the same amount of the tissue is taken for analysis from the plants of different ploidy, each contains a different number of cells, because of their unequal size. Since cells from plants of a lower ploidy are usually smaller, an overestimation of the lower ploidy component can occur. Another difficulty is the inability to discriminate between diploid cells in the G_2 phase and tetraploid cells in the G_1 and G_0 phases, all of which have the same DNA content. To distinguish diploid cells from tetraploid ones, the G_2/G_1 ratio in one of the components (diploid or tetraploid) has to be established. Unfortunately, as proven in the present experiments, there is no universal G_2/G_1 ratio for any particular ploidy level and it has to be empirically estimated for each plant material to be tested.

On the basis of the histograms obtained from combinations of diploid, triploid and tetraploid plants in different amounts, a graph for estimating the actual proportions of the different ploidy components was constructed. This can help breeders to apply flow cytometric analysis of plant populations in breeding and seed production and thus reduce time and costs of ploidy estimation.

Another way to more efficiently obtain an estimation of ploidy is by direct analysis of the seeds instead of the leaves. Work here confirms that flow cytometric histograms obtained from seeds give an accurate estimation of ploidy level. Sugar-beet seed is virtually endospermless, having only a single layer of endosperm cells enclosing the lower part of the radicle. Most of the cells in the dry mature seed (over 80%) are embryo cells arrested in the G_1/G_0 phase of the cell cycle, and account for the ploidy of the seed.

Beside estimating ploidy, the content of DNA in a cell provides information about which stages of the cell cycle it is in. In the present experiments flow cytometry was used to study the changes in the cell cycle activity in sugar-beet seed during development, maturation and germination. During embryo development and growth the G_2/G_1 ratio decreases up to 24-28 days after pollination

and then the cell cycle activity is arrested (the G_2/G_1 ratio becomes constant). This is an indication that the embryo is already physiologically fully developed at this early stage. Under optimal conditions of maturation, drying and storage of the seeds, the G_2/G_1 ratio usually remains constant, decreasing slightly only after drying. It increases again after 24-48 hours of imbibition, after completing DNA repair processes.

It is noteworthy that prevailing environmental conditions during maturation of the seed, especially heavy rainfalls, can also increase the G_2/G_1 ratio of embryonic cells. When the seeds were collected at commercial harvest time (mature seeds) and two weeks before this (immature seeds), higher G_2/G_1 ratios were observed in the embryos of mature seeds, as compared with those from immature seeds. Later collected seeds contained more soluble B-subunit of the 11 S globulin, typical of germinating or primed seeds. Also during germination the cytoskeleton protein β -tubulin accumulated faster in these seeds. This phenomenon was most probably due to rainfall and lower than optimal temperatures during the last two weeks of maturation, which induced germination while the seeds were still attached to the mother plant.

When seeds were soaked for 3 hours in water, and subsequently 3 hours in fungicide, the rate of cell cycle activation during germination was increased, as well as vigour, germination capacity and field emergence. However, no direct influence on the cell cycle in the embryo was observed. The beneficial effect of this treatment on embryo germination was probably the consequence of DNA repair processes occurring already before the start of imbibition on water.

A correlation was found between the G_2/G_1 ratio in mature seed, vigour and laboratory and field test parameters, which suggests that this ratio can be used as an indicator of the physiological status of a seed. It is concluded that flow cytometric analysis can be helpful in understanding and predicting sugar-beet seed quality.

P

Biblioteka Główna ATR w Bydgoszczy

81685



ISSN 0209-0597