

¹ Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej,
Prawdziwka 2, 02-973 Warszawa, Polska

² Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin –
Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, Polska

³ Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Ogrodnictwa,
Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, Polska

*e-mail: maja.boczkowska@gmail.com

MAJA BOCZKOWSKA^{1,2*}, ANNA RUCIŃSKA¹,
MAŁGORZATA TARGOŃSKA-KARASEK¹, MARCIN OLSZAK¹,
MACIEJ NIEDZIELSKI¹, MONIKA RAKOCZY-TROJANOWSKA³

Starzenie się nasion – złożony problem banków genów. Praca przeglądowa

Aging of seeds – a complex problem of gene banks. A review

Streszczenie. Starzenie prowadzące do śmierci jest procesem uniwersalnym dotyczącym wszystkich żywych organizmów bez względu na stopień ich złożoności. Długość życia, warunkowana tempem zachodzenia procesów starzenia, jest bardzo zróżnicowana, a rośliny wykazują największy zakres jej zmienności. Procesy starzenia dotyczą również nasion zgromadzonych w przechowalniach długoterminowych banków genów. Zachowanie żywotnych nasion ma zasadnicze znaczenie dla ochrony różnorodności biologicznej, która jest skutecznie i systematycznie niszczone. Dotychczasowe badania nad starzeniem się nasion dotyczyły m.in. wyciszenia metabolizmu, powstawania reaktywnych form tlenu i efektów, jakie ich obecność wywołuje, uszkodzeń biomolekuł, metylacji DNA, a ostatnio także małych niekodujących cząsteczek RNA. Celem pracy jest przybliżenie złożonego, wielopoziomowego procesu, który zachodzi w nasionach w trakcie długotrwałego przechowywania.

Słowa kluczowe: Starzenie się nasion, zasoby genowe, metabolizm, uszkodzenia biomolekuł, reaktywne formy tlenu, zmiany epigenetyczne

WSTĘP

Starzenie się prowadzące do śmierci nie dyskryminuje żadnego z żywych organizmów, jest naturalne i uniwersalne. Każda żywa istota zaczyna się starzeć w momencie, w którym powstaje. Długość życia jest cechą charakteryzującą się wysokim poziomem zróżnicowania wśród żywych organizmów. Rośliny wykazują większą jej zmienność niż

ludzie czy inne zwierzęta. Szacuje się, że niektóre osobniki sosny ościstej (*Pinus aristata* Engelm.) rosnące w Kalifornii i Nowadzie mają prawie 5000 lat [Currey 1965]. W odniesieniu do roślin, które rozmnażają się wegetatywnie, wiek ramet może sięgać nawet kilkudziesięciu tysięcy lat – lomatia tasmanica (*Lomatia tasmanica* W.M.Curtis) 42 000 lat [Lynch i in. 1998]. Również w przypadku nasion mamy do czynienia z różnym tempem procesów starzenia i w efekcie z różnym czasem, w którym nasiona pozostają żywotne. W literaturze odnotowano spektakularne przypadki długości życia nasion, którą za pomocą znakowania radiowęglowego określono u daktylowca właściwego (*Phoenix dactylifera* L.) na około 2000 lat [Sallon i in. 2008], a u lotosu orzechodajnego (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) na około 1300 lat [Shen-Miller 2002]. Nasiona zbóż zachowują żywotność przez zdecydowanie krótszy czas. Najstarsze żywotne nasiona jęczmienia i owsa miały 124 lata [Bewley i Black 1982]. Celem poniższej pracy jest przybliżenie złożonego, wielopoziomowego procesu, który zachodzi w nasionach w trakcie długotrwałego przechowywania.

Rys historyczny

Żywotność nasion ma znaczenie dla ludzkości od czasu „rewolucji neolitycznej”, kiedy to nastąpiło przejście od gromadzenia żywności do jej produkcji, tj. część plonów musiała, więc zostać zachowana na następny sezon. Stanowiska archeologiczne w południowo-zachodnich Stanach Zjednoczonych wskazały, że nasiona kukurydzy na nadchodzące zasiewy były przechowywane oddzielnie od tych przeznaczonych do konsumpcji [Amsden 1976]. Świadomość zróżnicowanej długości życia nasion różnych gatunków towarzyszy ludzkości od co najmniej starożytnej Grecji. Ojciec botaniki – Teofrast z Eresos (ok. 372–278 p.n.e.) napisał, że nasiona cebuli traciły żywotność znacznie szybciej niż nasiona prosa. Zauważył również, że przechowywanie nasion na dużych wysokościach, w przewiewnych miejscach pozwoliło zachować ich żywotność przez znacznie dłuższy czas, tj. do około czterdziestu lat [Priestley 1986]. W starożytnym Rzymie Lucjusz Junius Moderatus Columella (I w.n.e.) zauważył, że duża wilgotność powodowała pogorszenie jakości nasion. Podobna obserwacja została dokonana niezależnie przez Fan Sheng-zhi Shu (I w.n.e.) w starożytnych Chinach [Priestley 1986]. Wybitne średniowieczne dzieło na temat rolnictwa „Kitāb al-filā-ḥaḥ”, stworzone przez Ibn al-‘Awwām, zawierało dość wyrafinowane porady dotyczące przechowywania nasion. Zgodnie z tym dojrzałe nasiona powinny być wyczyszczone, wysuszone i umieszczone w odpowiednim naczyniu, uszczelnione gliną i przechowywane w suchym miejscu [Priestley 1986]. W XVIII w. francuski inżynier i botanik Henri-Louis Duhamel du Monceau stwierdził z pewną dokładnością zróżnicowanie długości życia różnych gatunków nasion. Starł się również przedłużyć żywotność nasion poprzez kontrolę temperatury i wilgotności [Priestley 1986]. W następnym stuleciu rozpoczęła się nowoczesna era badań nad starzeniem się nasion. Szwajcarski botanik Augustin Pyrame de Candolle w „Physiologie végétale” wskazał, że ograniczenie lub wykluczenie od jednego do wszystkich czynników niezbędnych do kiełkowania nasion (tlenu, optymalnej temperatury i wody) powinno pomóc w zachowaniu nasion w stanie żywotnym [Priestley 1986]. W tym czasie upowszechniły się, dostarczane poprzez podręczniki rolnicze i ogrodnicze, informacje o przewidywanej długowieczności nasion najpowszechniejszych gatunków. Rozwój w XX w. skutecznych technik przechowywania nasion jest owocem pracy naukowców z końca XIX w., m.in. Friedricha Haberlandta i Nicolausa Dimitriewicza [Priestley

1986]. Choć od tego czasu systematycznie rozwijana jest wiedza na temat długowieczności nasion, proces ich starzenia się i jego determinanty pozostają niejasne. Dotychczas nie ma jednoznacznej i pełnej odpowiedzi na pytanie, które czynniki (i w jakim stopniu) decydują o tempie starzenia się nasion. Zdecydowanie są to, zarówno czynniki endo-, jak i egzogenne. Wśród najważniejszych czynników zewnętrznych należy wymienić: stan rośliny rodzicielskiej, przebieg pogody podczas dojrzewania i zbioru nasion, technologię przygotowania nasion do przechowywania, czas między zbiorem a przechowywaniem oraz warunki przechowywania [Contreras i in. 2008, 2009]. Zgodnie z zasadą Harringtona żywotność nasion podwaja się wraz ze zmniejszającą się zawartością wilgoci o 1% i obniżeniem temperatury o 5°C [Harrington 1963]. Zasada ta dotyczy jednak tylko nasion typu orthodox, które są bardzo odporne na suszenie i mrożenie. Na podstawie odporności na odwadnianie nasiona dzieli się na trzy kategorie: nasiona orthodox (tolerancja wysychania), „recalcitrant” (brak tolerancji na suszenie) lub pośrednie (umiarkowana tolerancja na wysychanie) [Roberts 1973, Ellis i in. 1991]. Do nasion orthodox zalicza się większość gatunków roślin uprawnych, które występują w regionach świata o umiarkowanym klimacie.

Starzenie się

Starzenie się nasion zostało zdefiniowane jako proces prowadzący do nieodwracalnych zmian powodujących utratę wartości siewnej w czasie [Priestley 1986]. Widocznym efektem tego procesu jest zmniejszenie wigoru i żywotności nasion. Starzenie nasion jest złożoną cechą biologiczną, w którą zaangażowanych jest wiele wzajemnie powiązanych procesów molekularnych, biochemicznych, fizjologicznych i metabolicznych. W ostatnich latach włożono wiele wysiłku w badania nad procesami starzenia się nasion, a mimo to podłoże starzenia się nasion nie zostało jeszcze w pełni odkryte. Badano wiele różnych aspektów aktywności nasion, takich jak cykl rozwojowy nasion, kiełkowanie, żywotność, wigor i długowieczność.

Dojrzałe nasiona typu orthodox nie prowadzą fotosyntezy, są silnie odwodnione i ich metabolizm jest znacząco spowolniony. W trakcie dojrzewania tych nasion aktywowane są różne procesy ochronne w celu zachowania integralności DNA i błon komórkowych podczas wysychania. Należy tu wspomnieć m.in. o obecności systemów antyoksydacyjnych i biomolekuł ochronnych, takich jak liczne białka późnej embriogenezy (LEA late-embryogenesis abundant proteins) oraz aktywacji mechanizmów naprawczych podczas uwadniania jako o procesach komórkowych związanych z tolerancją na odwodnienie i przydatnością do długotrwałego przechowywania w stanie suchym. Podczas długotrwałego przechowywania te mechanizmy słabną i wraz z upływem czasu mogą prowadzić do starzenia się nasion i obniżenia żywotności. Wiele innych czynników i mechanizmów również zostało zidentyfikowanych jako kluczowe dla procesu starzenia, tj. zaprogramowana śmierć komórki, zmiany mitochondrialne i epigenetyczne, zaburzenia w strukturze błon komórkowych, zmiany w strukturze DNA, degradacja biomolekuł, reaktywne formy tlenu, peroksydacja lipidów czy brak równowagi regulatorów wzrostu [Rajjou i Debeaujon 2008, Nonogaki i in. 2010, Ventura i in. 2012, Sreenivasulu i Wobus 2013].

Wyciszenie metabolizmu

W celu przetrwania w stanie suchym nasiona orthodox „opracowały” kilka komórkowych mechanizmów ochronnych. Gdy zawartość wody jest niska lub bardzo niska,

kluczową cechą jest wyłączenie aktywności metabolicznej. Najbardziej rozpowszechnionym mechanizmem jest zwiększanie lepkości komórkowej poprzez akumulację rozpuszczalnych, nieredukujących oligosacharydów (sacharoza, oligosacharydy z rodziny rafinoz – RFO) oraz przekształcanie cytoplazmy w stan szklisty. Wykazano bardzo silną korelację pomiędzy mobilnością molekuł wewnątrz komórek a żywotnością nasion [Buitink i Leprince 2008]. W stanie szklistym RFO chronią białka przed rozwinięciem i ograniczają zaburzenia membranowe, zastępując wodę w miejscach wiązania wodoru i zachowując odstępy między fosfolipidami [Prestrelski i in. 1993, Crowe i in. 1997, 1998]. Szklista cytoplazma jest stabilizowana również przez białka (LEA), np. LEA_1 i LEA_4 [Wolkers i in. 2001, Shih i in. 2010, Shimizu i in. 2010]. Fałdowanie tych hydrofilowych białek jest indukowane przez desykcję podczas wysychania nasion, co sugeruje, że pełnią różne funkcje w zależności od zawartości wody. Białka LEA są kodowane przez dużą rodzinę genów, na przykład u *Arabidopsis* zidentyfikowano 51 genów *LEA*. Związek białek LEA z długowiecznością nasion tego gatunku został zweryfikowany dla *RAB18*, *XERO*, *LEA1* i *LEA4*. Spadek poziomu transkryptów tych genów wpływał na długość życia nasion [Hundertmark i in. 2011]. W mutancie grochu (*vip-1*), który charakteryzuje się nietolerancją na przechowywanie w stanie suchym, stwierdzono istotną redukcję poziomu transkryptu genu *SBP65* i biotynylowanego białka SBP65 (3 grupa białek LEA). Uważa się, że funkcja tego białka polega na przechowywaniu biotyny w okresie dojrzewania oraz uwalnianiu wolnej biotyny w okresie kiełkowania nasion w celu wznowienia aktywności metabolicznej [Dehaye i in. 1997]. Nie można jednak wykluczyć funkcji strukturalnej SBP65 w ochronie struktur komórkowych podczas suszenia i przechowywania nasion [Boudet i in. 2006]. W nasionach istnieje wiele różnych białek LEA, ale ich względny udział w tolerancji na wysuszenie lub długowieczność nasion nie został jeszcze w pełni zbadany. Niezbędne są dalsze badania, aby wykazać, w jaki sposób białka LEA modulują długowieczność nasion. Białka szoku cieplnego (HSPs – heat shock proteins), obficie występujące w dojrzałych nasionach, również odgrywają istotną rolę w długości życia nasion. HSPs są białkami chaperonowymi, odgrywającymi ważną rolę w fałdowaniu i stabilności białek, a także w ochronie białek przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [Job i in. 2005]. Nasiona transgenicznej linii *Arabidopsis*, które nadmiernie akumulowały czynnik transkrypcyjny stresu cieplnego (HSF) wykazywały zwiększoną akumulację HSP i zwiększoną tolerancję na starzenie [Prieto-Dapena i in. 2006].

Detoksykacja

Pomimo wyciszenia metabolizmu i niskiej zawartości wody podczas przechowywania dojrzałych nasion typu orthodox może w nich dochodzić do przemian molekularnych i metabolicznych, w czasie których zachodzi jednostronny proces dysymilacji, polegający na nieenzymatycznym częściowym rozkładzie związków organicznych podczas reakcji utleniania i peroksydacji. Reaktywne formy tlenu (RFT) powstają w wyniku redukcji cząsteczek tlenu (O_2) do nadtlenu wodoru (H_2O_2), rodników hydroksylowych (OH), tlenu singletowego (1O_2) i anionorodnika ponadtlenkowego (O^{2-}). Zmiany w zawartości reaktywnych form tlenu są regulowane przez cały okres życia nasion. Wraz ze stresem oksydacyjnym, który powodują, RFT są powszechnie uważane za główny inicjator naturalnego starzenia się nasion. Wśród RFT szczególnie reaktywny jest rodnik hydroksylowy, który reaguje z większością związków organicznych, takich jak białka, kwasy nukle-

inowe, cukry i lipidy, powodując zaburzenia funkcji komórek [Møller i in. 2007]. Przeciutleniacze, takie jak flawonoidy, tokoferol, tokotrienole lub kwas γ -aminomasłowy (GABA), które są gromadzone w nasionach podczas późnego dojrzewania, przyczyniają się do kontroli potencjału długowieczności [Bouché i in. 2003, Sattler i in. 2004, Horvath i in. 2006, Stevenson i Hurst 2007]. Zaburzenia równowagi w stężeniach peroksydantów i antyoksydantów mogą powodować stres oksydacyjny i prowadzić do postępującej akumulacji RFT. Skala degradacji komórek zależy od zdolności nasion do eliminacji czynników utleniających za pomocą enzymatycznych i nieenzymatycznych systemów antyoksydacyjnych, które występują zarówno w suchych nasionach, jak i podczas kiełkowania [Nandi i in. 1997, Oracz i in. 2007]. Enzymatyczny system antyoksydacyjny składa się z kilku enzymów, w tym katalazy (CAT), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy askorbinianowej (APX) i reduktazy glutationowej (GR) [przegląd w Bailly 2004]. Utrata wigoru nasion jest również związana z obniżeniem poziomu enzymu sulfotransferazy β -merkaptopirogronianowej (MST), który katalizuje transfer siarki z merkaptopirogronianu do akceptorów siarki (tiole lub cyjanek) i prawdopodobnie przyczynia się do detoksykacji cyjaneków [Papenbrock i Schmidt 2000a, 2000b, Rajjou i in. 2008]. Hemoproteiny, jak również peroksydazy i katalazy mogą być hamowane przez cyjanek, więc w celu ochrony struktur komórkowych nasiona muszą zachować zdolność do ich detoksykacji [Ellis i Dunford 1968, Garcia i in. 2007, Rajjou i in. 2008]. W suchych nasionach pobór wody jest konieczny do kiełkowania i aktywacji enzymów antyoksydacyjnych. Reaktywuje on różne procesy metaboliczne, przyczyniając się w ten sposób do produkcji i odkładania się RFT, które mogą hamować kiełkowanie [Wituszyńska i in. 2015]. Z drugiej strony produkcja reaktywnych form tlenu, takich jak H_2O_2 , O^{2-} i rodników hydroksylowych (OH), jest bezpośrednio związana z kiełkowaniem [Schopfer i in. 2001]. Dlatego też skuteczne kiełkowanie w dużej mierze zależy od efektywności procesów antyoksydacyjnych, które mogą utrzymać wystarczająco niski poziom RFT [De Gara i in. 1997].

Uszkodzenia makromolekul

Akumulacja uszkodzeń makromolekularnych (białek, kwasów nukleinowych) wynikających z aktywności RFT jest uważana za jeden z czynników związanych z procesami starzenia. Liczba pęknięć pojedynczej lub podwójnej nici DNA zwiększa się wraz z wiekiem nasion, a fragmentacja DNA może prowadzić do aberracji chromosomowych (strukturalnych i liczbowych), a w konsekwencji do zmniejszenia żywotności. Pęknięcia DNA muszą być naprawione podczas pierwszej fazy kiełkowania, tj. imbibicji [Liu i in. 2005, Waterworth i in. 2015]. Dotychczas wiedza na temat mechanizmów naprawczych u roślin jest ograniczona. Przypuszcza się, że wiodącymi szlakami naprawczymi DNA są naprawa przez wycięcie nukleotydu lub zasady (NER – nucleotide-excision repair, BER – ang. base-excision repair), rekombinacja homologiczna (HR – homologous recombination) i łączenie niehomologicznych zakończeń (NHEJ – non-homologous end joining) [Ventura i in. 2012]. Potwierdzono, że specyficzna dla roślin ligaza DNA VI jest głównym regulatorem jakości i długowieczności nasion *Arabidopsis*. Mutant *AtLIG6* charakteryzował się opóźnionym kiełkowaniem, nadwrażliwością na starzenie się nasion i zmniejszoną żywotnością w porównaniu z roślinami dzikimi [Waterworth i in. 2010]. U drożdży, ssaków i roślin ligaza DNA IV pełni specyficzną rolę w procesie naprawy podwójnych pęknięć poprzez łączenie niehomologicznych zakończeń [Ellenberger

i Tomkinson 2008]. Podwójny mutant *Arabidopsis* z uszkodzonym *AtLIG4* i *AtLIG6* miał mniejszą żywotność po przyspieszonym starzeniu w porównaniu z typem dzikim [Waterworth i in. 2010]. Ponadto locus cechy ilościowej (QTL) *Germination Ability After Storage 6*, kontrolującej długowieczność nasion, nakłada się na region genomowy zawierający *AtLIG4* [Nguyen i in. 2012]. Dlatego też naprawa pęknięć podwójnej nici DNA za pośrednictwem ligaz DNA może być jednym z wyznaczników długowieczności. Również enzymy naprawiające utlenione DNA poprzez usuwanie utlenionych zasad, tj. glikozylaza formamidopirymidynowa (FPG) i glikozylaza / liaza 8-oksoguaniny (OGG1), które pełnią podobne role w ścieżce BER. Profile ekspresji genów *MtOGG1* i *MtFPG* wskazywały na regulację obu genów podczas imbibicji nasion *Medicago truncatula*. W rezultacie mogą być ważne dla naprawy DNA w procesie kiełkowania [Macovei i in. 2011]. Nadekspresja *AtOGG1* w liniach transgenicznych *Arabidopsis* zwiększyła odporność na kontrolowane starzenie w porównaniu z roślinami dziko rosnącymi. Oznacza to, że naprawa przez wycięcie nukleotydu przez *AtOGG1* odgrywa ważną rolę w długowieczności nasion [Chen i in. 2012].

Na wczesnym etapie kiełkowania nasion syntetyzowane są białka potrzebne w tym procesie. Powstają na matrycy mRNA, które zostały zgromadzone w dojrzałych nasionach [Rajjou i in. 2004, Sano i in. 2012]. W dojrzałych suchych nasionach *Arabidopsis* wykryto ponad 10 000 rodzajów mRNA [Nakabayashi i in. 2005]. Postuluje się, że szybkie przywrócenie metabolizmu nasion podczas imbibicji wynika z wczesnej translacji przechowywanych mRNA [Sano i in. 2015]. Integralność RNA, jak również DNA, wpływa na długowieczność nasion. Spadkowi żywotności towarzyszy zmniejszenie całkowitej zawartości RNA i integralności RNA [Kranter i in. 2011]. Molekularne mechanizmy ochrony i naprawy RNA pozostają nieznane.

Podczas długotrwałego przechowywania białka, tak samo jak DNA i RNA, kumulują uszkodzenia, które często dezaktywują ich funkcje [Rajjou i Debeaujon 2008]. Dlatego też trwałość nasion zależy również od systemów naprawy białek. Utlenione białka mogą być odwracalnie naprawiane przez reduktazę sulfotlenku metioniny (MSR). Aktywność MRS była dodatnio skorelowana z długowiecznością nasion *Arabidopsis* i *Medicago truncatula* [Châtelain i in. 2013]. Związana z wiekiem utrata funkcji przez białka wynika również z konwersji reszt L-aspartyłowych lub asparaginyłowych do anormalnych reszt izoaspartyłowych (isoAsp) [Lowenson i Clarke 1992]. Te nieprawidłowe reszty mogą być naprawiane przez *O*-metylotransferazę L-izoaspartyłu (PIMT). Zwiększony poziom nienaprawionych reszt isoAsp odpowiadał zmniejszonej zdolności kiełkowania nasion jęczmienia poddanych procesowi starzenia w stanie stałym lub uwodnionym [Mudgett i in. 1997]. Również podczas kiełkowania nasion *Nelumbo nucifera* obserwowano wysoką aktywność PIMT i jak już wcześniej wspomniano, gatunek ten jest absolutnym rekordzistą w długowieczności nasion [Shen-Miller 2002]. Nadmierna ekspresja *CaPIMT1* i *CaPIMT2* w *Arabidopsis* zwiększa długowieczność nasion [Verma i in. 2013]. Sugeruje to, że naprawa białka przez PIMT jest ważnym składnikiem długowieczności nasion.

Chromosomy eukariotyczne są zakończone specjalnymi strukturami nukleoproteinowymi zwanymi telomerami. Do tej pory wpływ telomerów na starzenie się nasion i ich długowieczność nie jest do końca jasny, choć wyniki kilku badań wykazały związek między starzeniem się nasion a długością telomerów. Z powodu utraty żywotności zarodków sekwencje telomerów zniknęły z DNA o dużej masie cząsteczkowej, podczas gdy w tym samym czasie pojawiły się we frakcji o małej masie cząsteczkowej. Tworze-

nie telomerów pozachromosomalnych było skorelowane z ogólną fragmentacją genomowego DNA, która zachodzi podczas przechowywania nasion w stanie suchym. W nasionach żywotnych w ciągu 3–6 godzin imbibicji, sekwencje telomerów powróciły do frakcji o dużej masie cząsteczkowej DNA, co sprawia że mogą być związane z procesami naprawy w nasionach [Bucholc i Buchowicz 1992, 1995, Boubriak i in. 2007, Balestrazzi i in. 2011]. Zauważono również, że degradacja telomerów jest powodowana przez poważne uszkodzenia oksydacyjne [Wang i in. 2010]. Ekspresję genu kodującego telomerazę *TERT* obserwowano podczas kiełkowania nasion *Arabidopsis* [Balestrazzi i in. 2011]. Jest to zgodne ze zwiększoną aktywnością telomerazy w końcówkach korzeni kiełkujących nasion lepnicy białej (*Silene latifolia* Poir.) [Riha i in. 1998]. Ponadto szczyt ekspresji kompleksu CST utrzymującego integralność telomerów zaobserwowano na wczesnym etapie imbibicji nasion *Arabidopsis* [Balestrazzi i in. 2011].

Zmiany epigenetyczne

Podejrzewa się, że metylacja DNA odgrywa istotną rolę w procesie starzenia się i długości życia nasion. Udział metylacji DNA w procesie kiełkowania nasion został potwierdzony przez wrażliwe na metylację markery MSAP (methylation-sensitive amplification polymorphism) [Meng i in. 2012]. Poziom metylacji DNA był ujemnie skorelowany z zawartością wody w nasionach gruszy [Michalak i in. 2013]. Wraz z czasem przechowywania nasion pszenicy obserwowano wzrost poziomu metylacji [Singh i in. 2013]. Metylacja DNA była również inhibitorem kiełkowania nasion *Arabidopsis* [Cho i in. 2012].

Małe niekodujące cząsteczki RNA

W ostatnim czasie uwaga biologów molekularnych skupia się na małych niekodujących cząsteczkach RNA (miRNA). Są to krótkie, tj. 20–24 nukleotydy długie, endogenne, niekodujące RNA, które odgrywają ważną rolę w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Niewiele wiadomo o roli miRNA w kiełkowaniu nasion. W kukurydzy geny biorące udział we wczesnym stadium kiełkowania nasion (24 h) były regulowane przez 115 miRNA [Wang i in. 2011]. Podczas kiełkowania *N. nucifera* zidentyfikowano 145 znanych miRNA należących do 47 grup i 78 nowych miRNA [Hu i in. 2016]. Sugeruje się, że wiele miRNA może być zaangażowanych w regulację kiełkowania nasion i długowieczności. Dalsze badania są niezbędne do rozpoznania funkcji miRNA w procesie starzenia się nasion i długowieczności.

PODSUMOWANIE

Długoterminowa ochrona *ex situ* 7,4 mln obiektów, które obecnie znajdują się w bankach genów na całym świecie, jest misją stanowiącą wyzwanie, aby zapewnić ludziom bezpieczeństwo żywnościowe i zachować bioróżnorodność [FAO 2010]. Postęp, jaki dokonał się w ostatnich latach w zakresie biologii nasion i w badaniach multiomicznych, tworzy perspektywę bardziej efektywnego zarządzania plazmą zarodkową w przechowalniach długoterminowych. Długoterminowe przechowywanie nasion mimo swojej skuteczności nie pozwala na całkowite zahamowanie procesów starzenia nasion,

które manifestują się poprzez utratę zdolności kiełkowania w czasie [Van Treuren i in. 2013]. Mimo iż opracowano normy, które powinny gwarantować utrzymanie żywotności nasion, i wdrożono je w postaci procedur efektywnego zarządzania bankami genów, to długość życia nasion różni się w zależności od gatunku i genotypu, a przechowywane nasiona i tak z czasem tracą żywotność do poziomu, na którym wymagana jest ich regeneracja [Nagel i in. 2009, Van Treuren i in. 2013, FAO 2014]. Regeneracja jest procedurą kosztowną i może mieć negatywny wpływ na integralność genetyczną zgromadzonych obiektów poprzez ryzyko wystąpienia dryfu genetycznego, selekcji, zamieszania i błędów ludzkich. Dlatego tak istotne jest, aby zmaksymalizować długość okresu, w którym nasiona pozostają żywotne, a to nie dokona się bez przełomu w badaniach nad starzeniem się nasion.

PIŚMIENNICTWO

- Amsden C.A., 1976. Prehistoric Southwesterners from Basketmaker to Pueblo. AMS Press, Los Angeles.
- Bailly C., 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 14, 93–107, <https://doi.org/10.1079/SSR2004159>.
- Balestrazzi A., Confalonieri M., Macovei A., Carbonera D., 2011. Seed imbibition in *Medicago truncatula* Gaertn.: expression profiles of DNA repair genes in relation to PEG-mediated stress. *J. Plant Physiol.* 168(7), 706–713, <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.10.008>.
- Bewley J.D., Black M., 1982. Viability and longevity. *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination*. Springer, Berlin–Heilderberg, 1–59.
- Boubriak I., Polischuk V., Grodzinsky A., Osborne D.J., 2007. Telomeres and seed banks. *Cytol. Genet.* 41, 18–24.
- Bouché N., Fait A., Bouchez D., Møller S.G., Fromm H., 2003. Mitochondrial succinyl-semialdehyde dehydrogenase of the γ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6843–6848, <https://doi.org/10.1073/pnas.1037532100>.
- Boudet J., Buitink J., Hoekstra F.A., Rogniaux H., Larré C., Satour P., Leprince O., 2006. Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiol.* 140, 1418–1436, <https://doi.org/10.1104/pp.105.074039>.
- Bucholc M., Buchowicz J., 1992. Synthesis of extrachromosomal DNA and telomere-related sequences in germinating wheat embryos. *Seed Sci. Res.* 2, 141–146.
- Bucholc M., Buchowicz J., 1995. An extrachromosomal fragment of telomeric DNA in wheat. *Plant Mol. Biol.* 27, 435–439, <https://doi.org/10.1017/S0960258500001264>.
- Buitink J., Leprince O., 2008. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *C. R. Biol.* 331, 788–795, <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.08.002>.
- Châtelain E., Satour P., Laugier E., Vu B.L., Payet N., Rey P., Montrichard, F., 2013. Evidence for participation of the methionine sulfoxide reductase repair system in plant seed longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 3633–3638, <https://doi.org/10.1073/pnas.1220589110>.
- Chen H., Chu P., Zhou Y., Li Y., Liu J., Ding Y., Tsang E.W., Jiang L., Wu K., Huang S., 2012. Overexpression of AtOGG1, a DNA glycosylase/AP lyase, enhances seed longevity and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 63, 4107–4121, <https://doi.org/10.1093/jxb/ers093>.
- Cho J.-N., Ryu J.-Y., Jeong Y.-M., Park J., Song J.-J., Amasino R.M., Noh B., Noh Y.-S., 2012. Control of seed germination by light-induced histone arginine demethylation activity. *Dev. Cell* 22 (4), 736–748, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.01.024>.

- Contreras S., Bennett M.A., Metzger J.D., Tay D., 2008. Maternal light environment during seed development affects lettuce seed weight, germinability, and storability. *HortScience* 43, 845–852.
- Contreras S., Bennett M.A., Metzger J.D., Tay D., Nerson H., 2009. Red to far-red ratio during seed development affects lettuce seed germinability and longevity. *HortScience* 44(3), 130–134.
- Crowe J.H., Carpenter J.F., Crowe L.M., 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60(1), 73–103, <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.73>.
- Crowe J.H., Oliver A.E., Hoekstra F.A., Crowe L.M., 1997. Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification. *Cryobiology* 35(1), 20–30, <https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2020>.
- Currey D.R., 1965. An ancient bristlecone pine stand in eastern Nevada. *Ecology* 46(4), 564–566, <https://doi.org/10.2307/1934900>.
- De Gara L.d., De Pinto M., Arrigoni O., 1997. Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiol. Plant* 100(4), 894–900, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb00015.x>.
- Dehaye L., Duval M., Viguier D., Yaxley J., Job D., 1997. Cloning and expression of the pea gene encoding SBP65, a seed-specific biotinylated protein. *Plant Mol. Biol.* 35(5), 605–621.
- Ellenberger T., Tomkinson A.E., 2008. Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights. *Ann. Rev. Biochem.* 77, 313–338, <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061306.123941>.
- Ellis R., Hong T., Roberts E., 1991. Seed moisture content, storage, viability and vigour. *Seed Sci. Res.* 1(4), 275–279, <https://doi.org/10.1017/S0960258500001008>.
- Ellis W.D., Dunford H.B., 1968. The kinetics of cyanide and fluoride binding by ferric horseradish peroxidase. *Biochemistry* 7(6), 2054–2062, <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00846a006>.
- FAO, 2010. The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp. 370. *Exp. Agric.* 47(3), 574, <https://doi.org/10.1017/S0014479711000275>.
- FAO, 2014. Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture. Rome.
- Garcia P., Saenz de Miera L., Vences F., Benchacho M., Perez de la Vega M., 2007. Conservation of Spanish wild oats: *Avena canariensis*, *A. prostrata* and *A. murphyi*. In: Maxted, N., Ford-Lloyd, B., Kell, S., Iriondo, J., Dulloo, M., Turok, J. (eds.), *Crop wild relative conservation and use*. CAB International North America, 413–428.
- Harrington J.F., 1963. Practical advice and instructions on seed storage. *Proc. ISTA* 28, 989–994.
- Horvath G., Wessjohann L., Bigirimana J., Monica H., Jansen M., Guisez Y., Cauberg, R., Horemans N., 2006. Accumulation of tocopherols and tocotrienols during seed development of grape (*Vitis vinifera* L. cv. Albert Lavallée). *Plant Physiol. Bioch.* 44(11–12), 724–731, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.10.010>.
- Hu J., Jin J., Qian Q., Huang K., Ding Y., 2016. Small RNA and degradome profiling reveals miRNA regulation in the seed germination of ancient eudicot *Nelumbo nucifera*. *BMC Genom.* 17(1), 684, <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3032-4>.
- Hundertmark M., Buitink J., Leprince O., Hinch D.K., 2011. The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Seed Sci. Res.* 21(3), 165–173, <https://doi.org/10.1017/S0960258511000079>.
- Job C., Rajjou L., Lovigny Y., Belghazi M., Job D., 2005. Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiol.* 138(2), 790–802, <https://doi.org/10.1104/pp.105.062778>.
- Kranner I., Chen H., Pritchard H.W., Pearce S.R., Birtić S., 2011. Inter-nucleosomal DNA fragmentation and loss of RNA integrity during seed ageing. *Plant Growth Regul.* 63(1), 63–72.
- Liu W., Li P., Qi X., Zhou Q., Zheng L., Sun T., Yang Y., 2005. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere* 61(2), 158–167, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.078>.

- Lowenson J.D., Clarke S., 1992. Recognition of D-aspartyl residues in polypeptides by the erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis. *J Biol. Chem.* 267(9), 5985–5995.
- Lynch A., Barnes R., Vaillancourt R., Cambecèdes J., 1998. Genetic evidence that *Lomatia tasmanica* (*Proteaceae*) is an ancient clone. *Aust. J. Bot.* 46(1), 25–33, <https://doi.org/10.1071/BT96120>.
- Macovei A., Balestrazzi A., Confalonieri M., Faé, M., Carbonera D., 2011. New insights on the barrel medic MtOGG1 and MtFPG functions in relation to oxidative stress response in planta and during seed imbibition. *Plant Physiol. Bioch.* 49(9), 1040–1050, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.05.007>.
- Meng F.-R., Li Y.-C., Yin J., Liu H., Chen X.-J., Ni Z.-F., Sun Q.-X., 2012. Analysis of DNA methylation during the germination of wheat seeds. *Biol. Plant.* 56(2), 269–275.
- Michalak M., Barciszewska M.Z., Barciszewski J., Plitta B.P., Chmielarz P., 2013. Global changes in DNA methylation in seeds and seedlings of *Pyrus communis* after seed desiccation and storage. *PloS One* 8(8), e70693, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070693>.
- Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A., 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev. Plant Biol.* 58, 459–481, <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946>.
- Mudgett M.B., Lowenson J.D., Clarke S., 1997. Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in plants (phylogenetic distribution and the accumulation of substrate proteins in aged barley seeds). *Plant Physiol.* 115(4), 1481–1489, <https://doi.org/10.1104/pp.115.4.1481>.
- Nagel M., Vogel H., Landjeva S., Buck-Sorlin G., Lohwasser U., Scholz U., Börner A., 2009. Seed conservation in *ex situ* genebanks – genetic studies on longevity in barley. *Euphytica* 170(1–2), 5–14.
- Nakabayashi K., Okamoto M., Koshiba T., Kamiya Y., Nambara E., 2005. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant J.* 41(5), 697–709, <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02337.x>.
- Nandi S., Sen-Mandi S., Sinha T., 1997. Active oxygen and their scavengers in rice seeds (*Oryza sativa* cv. IET 4094) aged under tropical environmental conditions. *Seed Sci. Res.* 7(3), 253–260, <https://doi.org/10.1017/S0960258500003603>.
- Nguyen T.-P., Keizer P., van Eeuwijk F., Smeekens S., Bentsink L., 2012. Natural variation for seed longevity and seed dormancy are negatively correlated in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 160, 2083–2092, <https://doi.org/10.1104/pp.112.206649>.
- Nonogaki H., Bassel G.W., Bewley J.D., 2010. Germination – still a mystery. *Plant Sci.* 179(6), 574–581, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.010>.
- Oracz K., Bouteau H.E.M., Farrant J.M., Cooper K., Belghazi M., Job C., Job D., Corbineau F., Bailly C., 2007. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant J.* 50(3), 452–465, <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03063.x>.
- Papenbrock J., Schmidt A., 2000a. Characterization of a sulfurtransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* 267(1), 145–154, <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.00980.x>.
- Papenbrock J., Schmidt A., 2000b. Characterization of two sulfurtransferase isozymes from *Arabidopsis thaliana*. *The FEBS J.* 267(17), 5571–5579, <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01623.x>.
- Prestrelski S.J., Tedeschi N., Arakawa T., Carpenter J.F., 1993. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J.* 65(2), 661–671, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81120-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81120-2).
- Priestley D.A., 1986. Seed aging: implications for seed storage and persistence in the soil. Comstock Associates, Ithaca.

- Prieto-Dapena P., Castaño R., Almoguera C., Jordano J., 2006. Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant Physiol.* 142(3), 1102–1112, <https://doi.org/10.1104/pp.106.087817>.
- Rajjou L., Debeaujon I., 2008. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *C. R. Biol.* 331(10), 796–805, <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.021>.
- Rajjou L., Gallardo K., Debeaujon I., Vandekerckhove J., Job C., Job D., 2004. The effect of α -amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiol.* 134(4), 1598–1613, <https://doi.org/10.1104/pp.103.036293>.
- Rajjou L., Lovigny Y., Groot S.P., Belghazi M., Job C., Job D., 2008. Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis: a comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiol.* 148(1), 620–641, <https://doi.org/10.1104/pp.108.123141>.
- Riha K., Fajkus J., Siroky J., Vyskot B., 1998. Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants. *Plant Cell* 10(10), 1691–1698, <https://doi.org/10.1105/tpc.10.10.1691>
- Roberts E.H., 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci. Technol.* 1, 499–514.
- Sallon S., Solowey E., Cohen Y., Korchinsky R., Eglí M., Woodhatch I., Simchoni O., Kislev M., 2008. Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. *Science* 320(5882), 1464–1464, DOI: 10.1126/science.1153600.
- Sano N., Ono H., Murata K., Yamada T., Hirasawa T., Kanekatsu M., 2015. Accumulation of long-lived mRNAs associated with germination in embryos during seed development of rice. *J. Exp. Bot.* 66, 4035–4046, <https://doi.org/10.1093/jxb/erv209>.
- Sano N., Permama H., Kumada R., Shinozaki Y., Tanabata T., Yamada T., Hirasawa T., Kanekatsu M., 2012. Proteomic analysis of embryonic proteins synthesized from long-lived mRNAs during germination of rice seeds. *Plant Cell Physiol.* 53(4), 687–698, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs024>.
- Sattler S.E., Gilliland L.U., Magallanes-Lundback M., Pollard M., DellaPenna D., 2004. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* 16(6), 1419–1432, <https://doi.org/10.1105/tpc.021360>.
- Schopfer P., Plachy C., Frahry G., 2001. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol.* 125(4), 1591–1602, <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1591>.
- Shen-Miller J., 2002. Sacred lotus, the long-living fruits of China Antique. *Seed Sci. Res.* 12(3), 131–143, <https://doi.org/10.1079/SSR2002112>.
- Shih M.-d., Hsieh T.-y., Lin T.-p., Hsing Y.-i.C., Hoekstra F.A., 2010. Characterization of two soybean (*Glycine max* L.) LEA IV proteins by circular dichroism and Fourier transform infrared spectrometry. *Plant Cell Physiol.* 51(3), 395–407, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq005>.
- Shimizu T., Kanamori Y., Furuki T., Kikawada T., Okuda T., Takahashi T., Mihara H., Sakurai M., 2010. Desiccation-induced structuralization and glass formation of group 3 late embryogenesis abundant protein model peptides. *Biochemistry* 49(6), 1093–1104, <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi901745f>.
- Singh M., Singh S., Randhawa H., Singh J., 2013. Polymorphic homoeolog of key gene of RdDM pathway, ARGONAUTE4_9 class is associated with pre-harvest sprouting in wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One* 8(10), e77009, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077009>.
- Sreenivasulu N., Wobus U., 2013. Seed-development programs: a systems biology – based comparison between dicots and monocots. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 189–217, <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120215>.
- Stevenson D.E., Hurst R.D., 2007. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? *Cell. Mol. Life Sci.* 64(22), 2900–2916.

- Van Treuren R., de Groot E., van Hintum T.J., 2013. Preservation of seed viability during 25 years of storage under standard genebank conditions. *Genet. Resour. Crop Evol.* 60(4), 1407–1421.
- Ventura L., Donà M., Macovei A., Carbonera D., Buttafava A., Mondoni A., Rossi G., Balestrazzi A., 2012. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. *Plant Physiol. Bioch.* 60, 196–206, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.031>.
- Verma P., Kaur H., Petla B.P., Rao V., Saxena S.C., Majee M., 2013. Protein L-isoaspartyl methyltransferase2 is differentially expressed in chickpea and enhances seed vigor and longevity by reducing abnormal isoaspartyl accumulation predominantly in seed nuclear proteins. *Plant Physiol.* 161, 1141–1157, <https://doi.org/10.1104/pp.112.206243>.
- Wang L., Liu H., Li D., Chen H., 2011. Identification and characterization of maize microRNAs involved in the very early stage of seed germination. *BMC Genom.* 12(1), 154, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-154>.
- Wang Z., Rhee D.B., Lu J., Bohr C.T., Zhou F., Vallabhaneni H., de Souza-Pinto N.C., Liu Y., 2010. Characterization of oxidative guanine damage and repair in mammalian telomeres. *PLoS Genetics* 6(5), e1000951, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000951>.
- Waterworth W.M., Bray C.M., West C.E., 2015. The importance of safeguarding genome integrity in germination and seed longevity. *J. Exp. Bot.* 66(12), 3549–3558, <https://doi.org/10.1093/jxb/erv080>.
- Waterworth W.M., Masnavi G., Bhardwaj R.M., Jiang Q., Bray C.M., West C.E., 2010. A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. *Plant J.* 63(5), 848–860, <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04285.x>.
- Wituszyńska W., Szechyńska-Hebda M., Sobczak M., Rusaczonek A., Kozłowska-Makulska A., Witoń D., Karpiński S., 2015. Lesion simulating disease 1 and enhanced disease susceptibility 1 differentially regulate UV-C-induced photooxidative stress signalling and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 38(2), 315–330, <https://doi.org/10.1111/pce.12288>.
- Wolkers W.F., McCready S., Brandt W.F., Lindsey G.G., Hoekstra F.A., 2001. Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta – Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1544(1–2), 196–206, [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00220-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00220-X).

Źródło finansowania: dotacja podmiotowa dla PAN Ogród Botaniczny – CZRB w Powsinie.

Summary. Aging leading to death is a universal process affecting all living organisms regardless their degree of complexity. Life longevity, determined by the pace of aging processes, is very diverse and plants show the largest range of variability. Aging processes also affect the seeds stored in long-term gene bank units. Preservation of viable seeds is essential for the protection of biodiversity, which is effectively and systematically destroyed. Studies on aging of seeds conducted so far have concerned, among others, silencing of metabolism, formation of reactive oxygen species and effects their presence causes, damage to biomolecules, DNA methylation, and recently, also small non-coding RNA molecules. The aim of this work is to present a complex, multilevel process that takes place in seeds during the long-term storage.

Key words: seed aging, genetic resources, metabolism, biomolecules damage, reactive oxygen species, epigenetic changes

Otrzymano/ Received: 18.10.2018
Zaakceptowano/ Accepted: 28.11.2018