

DOI: [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2022.1\(50\).259778](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2022.1(50).259778)

УДК 581.148:577.15:633.16

Т. Г. Алексєєва, к. б. н., доцент

В. А. Топтїков, к. б. н., доцент

О. Л. Сїчняк, к. б. н., доцент

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра генетики та молекулярної біології, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: t.alieksieieva@onu.edu.ua

РОЛЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У ФУНКЦІОНУВАННІ МЕХАНІЗМІВ СТАРІННЯ НА ПРИКЛАДІ ЯЧМЕНЮ

Досліджено толерантність насіння до тривалого зберігання у 3 сортів ячменю (*Hordeum vulgare* L.) Росава, Селена Стар і Трудівник. За толерантністю до тривалого зберігання за прямого та цитогенетичного тестів досліджувані сорти розташовувалися наступним чином: Трудівник > Росава > Селена Стар. Показано, що життєздатність насіння після зберігання тісно пов'язана із активністю пероксидази та супероксиддисмутази: більш толерантним сортам властива стабільність загальної активності пероксидази та супероксиддисмутази. У визначенні життєздатності насіння за тривалого зберігання провідну роль мають питома активність середньорухливої фракції пероксидази та мало- і середньорухливої фракції СОД.

Ключові слова: ячмінь, старіння; зберігання насіння; мітоз; хромосомні аномалії; пероксидаза; супероксиддисмутаза

Явище старіння насіння давно відоме і протягом всього часу привертає увагу дослідників. Це обумовлено як господарськими потребами (при створенні страхових фондів, для потреб насінництва), так і важливістю проблеми зберігання генетичних ресурсів рослин – загалом у більш ніж у 1750 генних банках у всьому світі зберігається понад 7,4 млн. зразків зародкової плазми [15]. Відомо, що довговічність насіння залежить як від умов його зберігання, так і від умов формування насіння під час вегетації рослин і післязбирального дозрівання насіння [16]. Однак провідну роль відіграють, беззаперечно, умови зберігання. Незважаючи на пильну увагу до процесу старіння насіння, досі немає однозначної відповіді на питання про механізми старіння. Перші відомості пов'язані з ім'ям М. С. Навашина [22], який вперше виявив в корінні рослин, які розвинулися зі старого насіння *Crepis tectorum*, високу частоту хромосомних аберацій. Пізніше це було підтверджено на різноманітних рослинних об'єктах. Однак залишалось відкритим питання про

молекулярні процеси цього явища. Хоча точні причини старіння насіння досі не з'ясовані остаточно, вважають, що основною причиною цього процесу є активні форми кисню [27], які при зберіганні насіння утворюються внаслідок неферментативних реакцій між відновленими цукрами та молекулами з вільними аміногрупами [21], а також внаслідок перекисного окиснення ліпідів [25]. Накопичені активні форми кисню можуть викликати пошкодження нуклеїнових кислот [18], білків [7], ліпідів [12]. Крім того, активні форми кисню можуть викликати апоптоз внаслідок індукції відкриття перехідних пор мітохондрій та вивільнення цитохрому С [30]. Захисним механізмом, що протидіє шкідливому впливу активних форм кисню є підвищення активності ряду ферментів, які знешкоджують вільні радикали. Зокрема, виявлене збільшення активності супероксиддисмутази у тютюну [19], каталази при висушуванні насіння соняшнику [9]. Навпаки, за старіння насіння цибулі вміст антиоксидантних ферментів, а саме супероксиддисмутази, каталази, дегідрогенази та пероксидази суттєво зменшувався [11].

Останнім часом робляться спроби розглянути генетику ознаки тривалості життя насіння. Докладний огляд на цю тему [8] підіймає широкий пласт проблем та різноманітних підходів. Зокрема, враховуючи, те що життєздатність насіння по суті є комплексною кількісною ознакою, обговорюються численні дослідження QTL та їх впливу на тривалість життя насіння, проведені як на модельних об'єктах, так і на найважливіших сільськогосподарських культурах. В багатьох випадках зазначені маркери були асоційовані з насінневими покриттями, енергетичними процесами, але більшість асоціацій виявлено зі станом антиоксидантної системи рослин, зокрема у рису з алкогольдегідрогеназою та альдокеторедуктазою, у пшениці – з пероксидазою, у кукурудзи – з супероксиддисмутазою та каталазою.

Дослідження з порівняльної протеоміки показали, що у форм, толерантних до старіння, заздалегідь відбувається збагачення білків, пов'язаних з підтриманням окиснювально-відновлювального та вуглецевого гомеостазу, що супроводжувалося підсиленням трансляції таких білків [13].

Цитоплазматичні геноми є суттєвим джерелом природної мінливості і тривалості життя насіння [10], що не викликає подиву, адже з цитоплазматичними геномами пов'язані основні енергетичні процеси – дихання і фотосинтез. Створення різноманітних ядерно-плазматичних гібридів арабідопсису показало, що певні комбінації забезпечували сприятливі ефекти на тривалість життя насіння, інші демонстрували існування субоптимальних ефектів. Виявлені комбінації як гірші, так і кращі за тривалістю життя насіння у порівнянні з природними сполученнями клітинних субгеномів. Дослідження NADP-MALIC ENZYME1 мутантів арабідопсису показало знижену життєздатність насіння у порівнянні з формами дикого типу. З'ясовано, що активність даного ферменту необхідна для захисту насіння від окиснення при їх зберіганні у сухому виді [29].

Зважаючи на вищевказане, **метою** роботи було дослідження впливу тривалого зберігання насіння різних сортів ячменю, попередньо диференційованих за толерантністю до старіння насіння, на стан ферментів антиоксидантної системи.

Матеріали та методи дослідження

У якості матеріалу для дослідження були обрані сорти ячменю (*Hordeum vulgare* L.) Росава, Селена Стар і Трудівник, створені у Селекційно-генетичному інституті – національному центрі насіннезнавства і сортовивчення (м. Одеса). Для дослідження використовували насіння, яке зберігалось у неспеціалізованих умовах лабораторії у конвертах з цупкого паперу протягом 8 років, та свіже насіння, яке пройшло післязбиральне дозрівання; його використовували як контроль. Для диференціації насіння за здатністю зберігати схожість після тривалого зберігання насіння пророщували у чашках Петрі у термостаті + 24 °С на фільтрувальному папері, визначаючи енергію проростання і схожість [2]. Прямий тест доповнювали цитогенетичним дослідженням – ана-телофазним тестом [5]. Вірогідність отриманих результатів у дослідах з пророщенням зерна, врахуванням енергії проростання і ана-телофазного методу визначали за допомогою критерію Ст'юдента [1]. Досліди проводили у чотирьох повторностях.

Для електрофоретичних досліджень в дослідній групі використовували паростки після 8-річного зберігання насіння для сортів Росава і Трудівник. Паростки зі старого насіння сорту Селена Стар не сформували достатньої для проведення аналізу кількості пагонів, тому були змушені використовувати паростки з насіння, яке зберігалось протягом 3 років.

Отримання тканинних гомогенатів для електрофоретичного аналізу ензимів та електрофорез проводили, як описано раніше [6].

Ензими в гелях детектували відповідно рекомендацій [20]. Неспецифічну пероксидазну активність (КФ. 1.11.1.7) виявляли з використанням бензидину як субстрату ензиму, супероксиддисмутазну (КФ 1.15.1.1) – проявляли по відновленню нітротетразолієвого синього.

Електрофореграми документували за допомогою скануючої приставки до комп'ютера і провадили кількісний аналіз отриманих денситограм за комп'ютерною програмою АнаІС [М.А. Поджарский, Д.Г. Рибалка, *podzharsky@ukr.net*]. Визначали кількість множинних форм ферментів, їх відносну електрофоретичну рухливість (R_f) та питому вагу (частку) у відсотках у загальному спектрі. Ферментативну активність оцінювали за площею піків на денситограмах відповідних множинних форм, і розраховували в умовних одиницях (пікселях) на 1 мг сухої тканини (далі в тексті – «од/мг»). Зазначений спосіб не показує істинний рівень ферментативної активності, але є достатньо інформативним для порівняльних досліджень. Кількість повторностей для кожного досліджуваного дорівнювала чотирьом.

Результати дослідження та їх обговорення

Результати дослідження енергії проростання та схожості насіння ячменю після 8-річного зберігання та в контролі наведені у табл. 1.

Таблиця 1

Енергія проростання і схожість ячменю за тривалого зберігання насіння

Термін зберігання	Сорт					
	Енергія проростання, % ($\bar{x} \pm s_p$), n = 500			Схожість, % ($\bar{x} \pm s_p$), n = 500		
	Росава	Селена Стар	Трудівник	Росава	Селена Стар	Трудівник
8 років	10,4±1,4***	6,6±1,1***	17,6±1,7***	13,4±1,5***	6,6±1,1***	22,6±1,9***
Контроль	93,4±1,1	87,0±1,7	73,4±2,0	93,4±1,1	87,0±1,5	81,4±1,7

* – відмінності від контролю достовірні при $p \leq 0,001$

Крім очікуваного ясно вираженого зменшення енергії проростання і схожості насіння з 8-річного зберігання у порівнянні з контролем ($p \leq 0,001$) вдалося диференціювати сорти ячменю за ступенем втрати життєздатності за 8-річного зберігання насіння (табл. 2).

Таблиця 2

Значення критерію Стьюдента за попарного порівняння енергії проростання і схожості насіння після 8-річного зберігання

Показники	Схожість насіння			
	Сорти	Росава	Селена Стар	Трудівник
Енергія проростання	Росава	–	3,57***	4,84***
	Селена Стар	2,13*	–	7,27***
	Трудівник	3,27**	5,45***	–

* – відмінності між сортами достовірні при $p \leq 0,05$

** – відмінності від контролю достовірні при $p \leq 0,01$

*** – відмінності від контролю достовірні при $p \leq 0,001$

Таким чином, нам вдалося диференціювати досліджувані генотипи за толерантністю до старіння насіння: найбільш чутливим виявився сорт Селена Стар, найбільш толерантним – Трудівник.

Дослідження клітин кореневої меристеми ячменю показало наявність як нормальних анафаз і телофаз (рис. 1), так і певної кількості клітин з аномальними поділами, навіть в контролі.

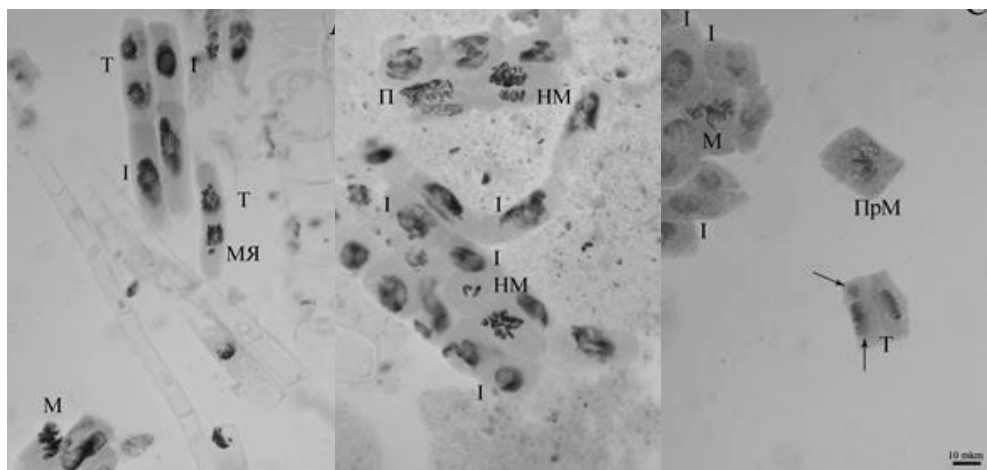


Рис. 1. Клітини кореневої меристеми ячменю сорту Росава.

I – інтерфаза, Т – телофаза, М – метафаза, МЯ – мікроядро (хромосомний фрагмент), НМ – нерівний мітоз, ПрМ – прометафаза. Стрілками вказано асинхронність деспіралізації хромосом, що також може призвести до різноякісності генетичного матеріалу дочірніх клітин. Знято при об. 40×, ок. 15×. Забарвлення ацетокарміном

У табл. 3 наведена частота зустрічальності нормальних і аномальних ана-телофаз у досліджуваного матеріалу.

Таблиця 3

Частота (%) порушень мітозу кореневої меристеми паростків ячменю за умови довготривалого зберігання ($n_{\text{вар}}$ не менше 600 клітин)

Термін зберігання	Нормальні ана- і телофази	Аномальні ана- і телофази			
		Мости	Фрагменти	Багатополосний мітоз	Нерівний мітоз
Росава					
8 років	71,4±1,8***	10,2±1,2***	12,2±1,8***	2,0±0,6**	4,3±0,8***
Контроль	99,8±0,18 ¹	0,17±0,17 ¹	0,17±0,17 ¹	0,17±0,17 ¹	0,17±0,17 ¹
Селена Стар					
8 років	75,0±1,8***	13,9±1,4***	5,6±0,9*	0,17±0,17 ¹	4,3±0,8***
Контроль	97,1±0,7	0,17±0,17 ¹	2,9±0,7	0,17±0,17 ¹	0,17±0,17 ¹
Трудівник					
8 років	80,0±1,6***	6,7±1,0*	8,3±1,1***	1,7±0,5**	3,3±0,7***
Контроль	97,1±0,7	1,5±0,5	1,5±0,5	0,17±0,17 ¹	0,17±0,17 ¹

¹ – значення середньої та її похибки розраховані по методу Ван-дер-Вардена

* – відмінності від контролю достовірні при $p \leq 0,05$

** – відмінності від контролю достовірні при $p \leq 0,01$

*** – відмінності від контролю достовірні при $p \leq 0,001$

Серед аномалій мітозу досить часто зустрічалися клітини з відставанням хромосом, клітини з мостами, клітини з фрагментами (рис. 1). Явище відставання хромосом у анафазі є однією з найпоширеніших хромосомних аномалій. Вважають, що відставання хромосоми зумовлено порушенням її орієнтації відносно осі поділу. Такі хромосоми зазвичай не потрапляють до дочірніх клітин (вони утворюють мікроядра або фрагментуються), що призводить до гіпоанеуплоїдії дочірніх клітин. Також зустрічалися клітини з багатополюсними (трьохполюсними) мітозами і з різко нерівними мітозами, але значно рідше (рис. 1). Поява багатополюсних мітозів пов'язана з порушенням і фрагментацією «полярної шапочки» – центра, від якого відходять мікротрубочки веретена поділу [28].

Кількість нормальних анафаз і телофаз у кореневих меристемах проростків з насіння, яке зберігалось протягом 8 років коливалася від 71 до 80%. Паростки сорту Трудівник мали найбільш регулярні мітози, достовірно перевершуючи показники сорту Росава ($p \leq 0,01$) і Селена Стар ($p \leq 0,05$). Паростки двох останніх сортів за регулярністю мітозу достовірно не відрізнялися.

Таким чином, за результатами двох тестів сорт Трудівник виявився найбільш толерантним до старіння насіння, а сорт Селена Стар – найбільш чутливим. Спираючись на це було проведено дослідження спектру пероксидази і супероксиддисмутази у зазначених сортів.

У спектрі пероксидаз паростків визначено до 8 фракцій ізоферментів, які умовно розділили на три фракції (табл. 4): малорухливу (Rf 0,03 і 0,09), середньорухливу (Rf 0,14, 0,18 і 0,23) і швидкорухливу (Rf 0,37 і 0,40).

Таблиця 4

Розподіл ізоферментів пероксидази паростків за фракціями в залежності від віку насіння

Сорт	Термін зберігання насіння, роки	Фракції		
		малорухлива	середньорухлива	швидкорухлива
<i>Частка фракції у спектрі ензиму (%)</i>				
Трудівник	1	61,65±3,63	28,09±1,59	10,26±2,35
	8	50,25±2,48 ($t=2,29$)	39,08±2,44 ($t=3,44$)	10,67±0,99
Росава	1	52,64±6,80	36,20±4,00	11,17±2,98
	8	61,38±4,46 ($t=1,08$)	27,50±3,06 ($t=1,73$)	11,12±1,61
Селена Стар	1	45,68±2,69	42,77±1,87	11,55±1,51
	3	50,01±4,62 ($t=0,81$)	37,84±3,02 ($t=1,39$)	12,16±1,70

У сорту Трудівник за старіння насіння спостерігалось достовірне ($p \leq 0,05$) збільшення частки середньорухливої фракції за рахунок малорухливої; частка швидкорухливої фракції майже не змінювалася. У сорту Росава спостерігалася протилежна картина: збільшення частки малорухливої фракції за рахунок середньорухливої; частка швидкорухливої фракції майже не змінювалася. У сорту Селена Стар за рахунок середньорухливої фракції збільшувалася частка малорухливої і, в меншому ступеню, швидкорухливої фракцій, однак ці коливання не були достовірними.

Зміни часток різних фракцій супроводжувалися зміною активності ферментної системи (табл. 5). У паростків сортів Росава і Селена Стар, отриманих зі старого насіння, загальна активність пероксидази зменшувалася, в той час як у паростків сорту Трудівник – збільшувалася. Спостерігали також суттєві відмінності між сортами за питомою активністю окремих фракцій. У сорту Трудівник зростала питома активність швидкорухливої і, особливо, середньорухливої фракцій. У сортів Росава і Селена Стар питома активність всіх фракцій зменшувалася, особливо сильно зменшувалася питома активність середньорухливої фракції. Втім достовірність відмінностей вдалося довести до зниження загальної активності та питомої активності середньорухливої фракції пероксидази паростків сорту Селена Стар та Росава і збільшення питомої активності середньорухливої фракції пероксидази паростків сорту Трудівник.

Таблиця 5

Активність пероксидази паростків, вирощених з насіння різного терміну зберігання

Сорт	Термін зберігання насіння, роки	Фракції			Загальна активність ферменту
		малорухлива	середньорухлива	швидкорухлива	
<i>Питома активність (од/мг)</i>					
Трудівник	1	12,97±1,76	5,82±0,39	2,13±0,54	20,91±2,13
	8	13,05±2,21	9,96±0,94	2,70±0,20	25,70±3,14
	% від контролю	100,6 ¹ (t=0,03)	171,1 (t=4,10)	126,8 (t=0,98)	122,9 (t=1,26)
Росава	1	13,48±1,79	9,26±1,02	2,85±0,75	25,60±1,74
	8	11,70±1,58	5,12±0,29	2,08±0,30	18,90±1,51
	% від контролю	86,8 (t=0,77)	55,3 (t=3,91)	73,0 (t=0,95)	73,8 (t=2,91)
Селена Стар	1	19,46±2,32	18,00±0,55	4,89±0,72	42,35±3,11
	3	14,16±1,59	10,65±0,77	3,43±0,50	28,25±1,43
	% від контролю	72,7 (t=1,89)	59,2 (t=7,74)	70,1 (t=1,66)	66,7 (t=3,38)

¹ – дані контролю прийняті за 100%

У спектрі супероксиддисмутази проростків ячменю було виявлено до 8 фракцій ізоферментів, які умовно розділили на три фракції: малорухливу (Rf 0.03, 0.12 і 0.15), середньорухливу (Rf 0.48, 0.53) і швидкорухливу (Rf 0.66, 0.70 і 0.76) (табл. 6). У сорту Трудівник за старіння насіння спостерігалось збільшення частки малорухливої фракції за рахунок швидкорухливої; частка середньорухливої фракції майже не змінювалася. У сорту Селена Стар, навпаки, за рахунок малорухливої фракції збільшувалася частка швидкорухливої фракції. Частка середньорухливої фракції майже не змінювалася. У сорту Росава спостерігалися випадкові флуктуації зазначених показників.

Таблиця 6

Розподіл ізоферментів супероксиддисмутази паростків за фракціями в залежності від віку насіння

Сорт	Термін зберігання насіння, роки	Фракції		
	Порівнювані варіанти	малорухлива	середньорухлива	швидкорухлива
<i>Частка фракції у спектрі ензиму (%)</i>				
Трудівник	1	50,94±3,31	2,55±0,48	46,51±3,77
	8	64,58±3,03	2,08±0,40	33,34±3,29
	% від контролю	126,8 (t=3,04)	81,6	71,7 (t=2,63)
Росава	1	52,29±4,13	3,89±0,31	43,83±4,20
	8	53,10±3,62	2,98±0,55	43,93±4,13
	% від контролю	101,5	76,6	100,2
Селена Стар	1	64,95±1,19	2,79±0,23	32,27±1,11
	3	54,76±4,53	3,53±0,35	41,71±4,39
	% від контролю	83,3 (t=2,18)	126,5	129,3 (t=2,08)

Загальна і питома (по фракціях) активність супероксиддисмутази наведена у табл. 7. У сорту Трудівник загальна активність СОД паростків, а також питома активність усіх фракцій за старіння насіння достовірно не змінювалися, хоча й спостерігалася тенденція до збільшення питомої активності малорухливої фракції і зменшення – інших фракцій. У сорту Росава проявилася тенденція до зменшення як загальної активності СОД, так і її окремих фракцій, але це зменшення було недостовірним. Натомість у паростків сорту Селена Стар виявлене достовірне ($p \leq 0,05$) зменшення загальної активності СОД та питомої активності середньорухливої і, особливо, малорухливої фракцій.

Таким чином, сорт Трудівник, який показав кращі результати у попередніх тестах (на енергію проростання і схожість насіння та регулярність мітозу в кореневій меристемі) продемонстрував відмінності у стані досліджуваних ген-

ензимних систем у порівнянні з іншими сортами. Зокрема, загальна активність як пероксидази, так і СОД майже не змінювалася. Разом з тим, зростала питома активність середньорухливої фракції пероксидази, що супроводжувалося збільшенням її частки у спектрі за рахунок малорухливої фракції. В той же час, у найбільш чутливого до старіння насіння за результатами попередніх тестів сорту Селена Стар змін у спектрі досліджуваних ген-езимних систем не спостерігалася, натомість виявлене достовірне ($p \leq 0,05$) зниження загальної активності пероксидази і СОД, що супроводжувалося зменшенням питомої активності середньорухливої фракції пероксидази і малорухливої і середньорухливої фракції СОД.

Таблиця 7

Активність супероксиддисмутази паростків, вирощених з насіння різного терміну зберігання

Сорт	Термін зберігання насіння, роки	Фракції			Загальна активність ферменту
	Порівнювані варіанти	малорухлива	середньорухлива	швидкорухлива	
<i>Питома активність (од/мг)</i>					
Трудівник	1	2,66±0,20	0,13±0,02	2,43±0,14	5,22±0,22
	8	3,41±0,39	0,11±0,03	1,78±0,30	5,30±0,59
	% від контролю	128,2 (t=1,70)	84,6	73,3	101,5
Росава	1	3,74±0,42	0,28±0,03	3,12±0,35	7,13±0,45
	8	2,80±0,27	0,16±0,03	2,42±0,52	5,37±0,69
	% від контролю	74,9 (t=1,88)	57,1	77,6	75,3
Селена Стар	1	8,20±1,02	0,35±0,03	4,01±0,31	12,55±1,36
	3	4,16±0,50	0,26±0,01	3,14±0,39	7,56±0,53
	% від контролю	50,7 (t=3,54)	74,3 (t=3,00)	78,3 (t=1,74)	60,2 (t=3,42)

Відомо, що за проростання насіння відбувається значна інтенсифікація дихальних процесів і ензиматичної мобілізації запасних речовин [4]. Пробудження рослин автоматично спричиняє небезпечне підвищення в тканинах кількості активних форм кисню [3]. Тому адекватне реагування антиоксидантної системи є дуже важливим при проростанні насіння. Очевидно, що виявлене зниження активності таких важливих антиоксидантних ензимів як пероксидаза і СОД (загальне, або окремих фракцій) тісно зв'язане з погіршенням схожості, а також з регулярністю мітозу в кореневій меристемі паростків.

Схожі результати були отримані в дослідженнях на ячменю та інших культурах. Дослідження активності антиоксидантних ферментів іранських сортів

ячменю показало, що сорти з меншою енергією проростання та схожістю схожістю насіння мають меншу активність каталази та пероксидази [26]. Дослідження проведені на сафлорі, показали суттєве збільшення вмісту H_2O_2 за прискореного старіння насіння, що супроводжувалося збільшенням активності СОД і зменшенням активності каталази, в той час як для пероксидази не було виявлено суттєвого збільшення або зменшення активності, але активність цього ферменту була специфічною для конкретних генотипів [24].

Однак виявлені закономірності висвітлюють лише одну сторону процесу старіння насіння. З'ясовано, що втрата схожості внаслідок старіння насіння пов'язана з окисненням запасних та мембранних ліпідів, яке здійснюється ферментативним та неферментативним шляхом [23]. Останнім часом механізми старіння насіння намагаються пов'язати із деградацією збереженої у насінні фрагменту іРНК. Експерименти на арабідопсисі, м'якій пшениці і канолі (канадські сорти рапсу з олією пониженої кислотності) показали, що швидкість деградації іРНК корелює з часом зберігання насіння або з розмірами фрагменту іРНК, в той час як якість тотальної РНК мало змінювалася за старіння насіння [31]. Чималу увагу приділяють і деградації регуляторних малих РНК (мРНК), які залучені до участі у регуляції генів, що кодують антиоксидантні ферменти [17]. Дослідження, проведені на сої показали, що за старіння насіння не відбувається окиснення або деградації ДНК, разом з тим вказується на негативну динаміку антиоксидантних ферментів [14]. Отже, механізми старіння насіння пов'язані з багатьма системами, однак антиоксидантні ферменти відіграють ключову роль у функціонуванні зазначених механізмів.

Висновки

1. За результатами оцінки енергії проростання та схожості насіння і анателофазого тесту сорт Трудівник виявився найбільш толерантним до старіння насіння, а сорт Селена Стар – найбільш чутливим.

2. У толерантного до старіння насіння сорту ячменю Трудівник виявлена стабільність загальної активності пероксидази та супероксиддисмутази, а також підвищена активність середньорухливої фракції пероксидази.

3. У найбільш чутливого до старіння насіння сорту ячменю Селена Стар виявлене достовірне ($p \leq 0,05$) зниження загальної активності пероксидази і СОД, що супроводжувалося зменшенням питомої активності середньорухливої фракції пероксидази і малорухливої і середньорухливої фракції СОД.

Список використаної літератури

1. Атраментова Л.О. Статистичні методи в біології / Л.О. Атраментова, О.М. Утевська. – Х.: ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2007. – 288 с.
2. ДСТУ 4138-2002. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. – Київ: Держстандарт України, 2003. – 173 с.
3. Колупаев Ю. Е Антиоксидантная система растений: участие в клеточной сигнализации и адаптации к действию стрессоров / Ю.Е. Колупаев, Ю.В. Карпец, А.И. Обозный // Вісн. ХНАУ. Серія Біологія. – 2011. – Т. 22, вип. 1. – С. 6–34.

4. Лисиченко М.Л. Інтенсифікація біохімічних процесів у насінні сільськогосподарських культур / М.Л. Лисиченко, О.В. Панкова // Інженерія природокористування. – 2016. – № 2(6). – С. 44–47.
5. Лісовська Т.П. Генетичні основи селекції рослин: метод. рек. / Т.П. Лісовська / – Луцьк: Друк ПП Іванюк В.П., 2016. – 64 с.
6. Топтиков В.А. Экспрессивность антиоксидантных оксидоредуктаз и белковый профиль тканей проростков озимых и яровых форм злаков при экстремальных колебаниях температуры / В.А. Топтиков, Л.Ф. Дьяченко, В.Н. Тоцкий // Цитология и генетика. – 2012. – Т. 46, № 3. – С. 41–54.
7. Almoguera C. The HaDREB2 transcription factor enhances basal thermotolerance and longevity of seeds through functional interaction with HaHSFA9 / C. Almoguera, P. Prieto-Dapena, J. Diaz-Martin, J.M. Espinosa, R. Carranco, J. Jordano // BMC Plant Biol. – 2009. – Vol. 9. – P. 75. – doi: 10.1186/1471-2229-9-75
8. Arif M.A.R. Genetic aspects and molecular causes of seed longevity in plants – A Review / M.A.R. Arif, I. Afzal, A. Börner // Plants. – 2022. – Vol. 11, I. 5. – P. 598. – <https://doi.org/10.3390/plants11050598>
9. Bailly C. Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying / C. Bailly, J. Leymarie, A. Lehner, S. Rousseau, D. Côme, F. Corbineau // Journal of Experimental Botany. – 2004. – Vol. 55. – I. 396. – P. 475–483. – <https://doi.org/10.1093/jxb/erh050>
10. Boussardon C. Novel cytonuclear combinations modify *Arabidopsis thaliana* seed physiology and vigor / C. Boussardon, M.-L. Martin-Magniette, B. Godin, A. Benamar, B. Vittrant, S. Citerne, T. Mary-Huard, D. Macherel, L. Rajjou, F. Budar // Front. Plant Sci. – 2019. – Vol. 10, I. 32. – <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00032>
11. Brar N.S. Assessment of natural ageing related physio-biochemical changes in onion seed / N.S. Brar, P. Kaushik, B.S. Dudi // Agriculture. – 2019. – Vol. 9(8). – P. 163. <https://doi.org/10.3390/agriculture9080163>
12. Bueso E. *Arabidopsis thaliana* HOMEBOX25 uncovers a role for gibberellins in seed longevity / E. Bueso, J. Munoz-Bertome, F. Campos, V. Brunaud, L. Martinez, E. Sayas, P. Ballester, L. Yenush, R. Serrano // Plant Physiol. – 2014. – Vol. 164. – P. 999–1010. – doi: 10.1104/pp.113.232223
13. Chen X. Comparative proteomics at the critical node of vigor loss in wheat seeds differing in storability / X. Chen, A. Börner, X. Xin, M. Nagel, J. He, J. Li, N. Li, X. Lu, G. Yin // Front Plant Sci. – 2021. – Vol. 12. – P. 707184. – doi: 10.3389/fpls.2021.707184
14. Ebone L.A. Biochemical profile of the soybean seed embryonic axis and its changes during accelerated aging / L.A. Ebone, A. Caverzan, D.C. Silveira, L. d'O. Siqueira, N.C. Lângaro, J. L.T. Chiomento, G. Chavarria // Biology. – 2020. – Vol. 9(8). – P. 186. – <https://doi.org/10.3390/biology9080186>
15. Fu Y.-B. Patterns of SSR variation in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds under *ex situ* genebank storage and accelerated ageing / Y.-B. Fu, M.-H. Yang, C. Horbach, D. Kessler, A. Diederichsen, F.M. You, H. Wang // Genet. Resour. Crop Evol. – 2017. – Vol. 64. – P. 277–290. – doi: 10.1007/s10722-015-0349-9
16. Hay F. What do we know about the genetics of seed longevity? / F. Hay // Forest Genetics 2017: Health and Productivity under Changing Environments. A Joint Meeting of WFGA and CFGA, University of Alberta, Edmonton, AB, June 26–29, 2017. – Режим доступу до тез: <http://www.fsl.orst.edu/wfga/wfga2017/files/documents/FionaHay.pdf>
17. Huang B. Integration of small RNA, degradome and proteome sequencing in *Oryza sativa* reveals a delayed senescence network in tetraploid rice seed / B. Huang, L. Gan, D. Chen, Y. Zhang, Y. Zhang, X. Liu, S. Chen, Z. Wei, L. Tong, Z. Song, X. Zhang, D. Cai, C. Zhang, Y. He // PLoS ONE. – 2020. – 15(11): e0242260. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242260>
18. Kimura M. Stored and neosynthesized mRNA in *Arabidopsis* seeds: effects of cycloheximide and controlled deterioration treatment on the resumption of transcription during imbibition / M. Kimura, E. Nambara // Plant Mol. Biol. – 2010. – Vol. 73. – P. 119–129. – doi: 10.1007/s11103-010-9603-x
19. Lee Y.P. Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn-superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions / Y.P. Lee, K.H. Baek, H.S. Lee, S.S. Kwak, J.W. Bang, S.Y. Kwon // J. Exp. Bot. – 2010. – Vol. 61. – P. 2499–2506. – doi: 10.1093/jxb/erq085
20. Manchenko G.P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels / G.P. Manchenko. – CRC Press LLC. – 2003. – 592 p.
21. Murthy N.U.M. Protein modification by the Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation / N.U.M. Murthy, W.Q. Sun // Journal of Experimental Botany. – 2000. – Vol. 51, I. 348. – P. 1221–1228.
22. Nawaschin M. Natur und ursachen der mutationen. I. Das verhalten und die zytologie der pflanzen, die aus infolge alterns mutierten keimen stammen / M. Nawaschin, H. Gerassimowa // Cytologia. – 1936a. – V. 7, № 3. – P. 324–362.

23. Oenel A. Enzymatic and non-enzymatic mechanisms contribute to lipid oxidation during seed aging / A. Oenel, A. Fekete, M. Krischke, S. C. Faul, G. Gresser, M. Havaux, M. J. Mueller, S. Berger // *Plant and Cell Physiology*. – 2017. – Vol. 58. – I.5. – P. 925–933. – <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx036>
24. Önder S. Determination of hydrogen peroxide content and antioxidant enzyme activities in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds after accelerated aging test / S. Önder, D. Güvercin, M. Tonguç // *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. – 2020. – Vol. 24(3). – P. 681–688. – doi: 10.19113/sdufenbed.793621
25. Sharma S. Positional effects on soybean seed composition during storage / S. Sharma, A. Kaur, A. Bansal, B. S. Gill // *Journal of food science and technology*. – 2013. – Vol. 50, I. 2. – P. 353–359. – <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0341-0>
26. Tavakol A. R. Some effects of seed aging on germination characteristics and activities of catalase and peroxidase antioxidant enzymes in barley genotypes (*Hordeum vulgare*) / A. R. Tavakol, F. Ghasem, H. N. Majnoun, H. Alizadeh, M. Bihamta // *Iranian journal of agricultural sciences*. – 2007. – Vol. 38–1, № 2, P. 337–346. – <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=143692>
27. Yao Z. Developmental and seed aging mediated regulation of antioxidative genes and differential expression of proteins during pre- and post-germinative phases in pea / Z. Yao, L. W. Liu, F. Gao, C. Rampitsch, D. M. Reinecke, J. A. Ozga, B. T. Ayele // *J. Plant Physiol.* – 2012. – Vol. 169. – P. 1477–1488. – doi: 10.1016/j.jplph.2012.06.001
28. Yamada M. Mitotic spindle assembly in land plants: molecules and mechanisms / M. Yamada, G. Goshima // *Biology* – 2017. – Vol. 6(1). – P. 6. – doi:10.3390/biology6010006
29. Yazdanpanah F. NADP-MALIC ENZYME1 affects germination after seed storage in *Arabidopsis thaliana* / F. Yazdanpanah, V. G. Maurino, T. Mettler-Altmann, G. Buijs, M. Bailly, M. Karimi Jashni, L. Willems, L. I. Sergeeva, L. Rajjou, H. W. Hilhorst // *Plant Cell Physiol.* – 2019. – Vol. 60, № 2. – P. 318–328. – <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy213>
30. Zhang K. Deterioration of orthodox seeds during ageing: Influencing factors, physiological alterations and the role of reactive oxygen species / K. Zhang, Y. Zhang, J. Sun, J. Meng, J. Tao // *Plant Physiol Biochem.* – 2021. – Vol. 158. – P. 475–485. – doi: 10.1016/j.plaphy.2020.11.031.
31. Zhao L. Analysis of stored mRNA degradation in accelerated aged seeds of wheat and canola in comparison to *Arabidopsis* / L. Zhao, H. Wang, Y. B. Fu // *Plants*. – 2020. – Vol. 9(12). – P. 1707. – doi: 10.3390/plants9121707

Стаття надійшла до редакції 22.03.2022

Т. Г. Алексєєва, В. А. Топтєков, О. Л. Січняк

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра генетики та молекулярної біології, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: t.aliexsieieva@onu.edu.ua

РОЛЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У ФУНКЦІОНУВАННІ МЕХАНІЗМІВ СТАРІННЯ НА ПРИКЛАДІ ЯЧМЕНЮ

Резюме

Проблема. Незважаючи на пильну увагу до процесу старіння насіння, досі немає однозначної відповіді на питання про механізми старіння. Розв'язання цих питань обумовлено як господарськими потребами, так і необхідністю зберігання генетичних ресурсів рослин.

Мета. Метою роботи було дослідження впливу тривалого зберігання насіння різних сортів ячменю, попередньо диференційованих за толерантністю до старіння насіння, на стан ферментів антиоксидантної системи.

Методика. Дослідження проводили на трьох сортах ячменю (*Hordeum vulgare* L.) Росава, Селена Стар і Трудівник, що зберігалися у неспеціалізованих умовах лабораторії у паперових конвертах протягом 8 років. Оцінку життєздатності

насіння визначали за енергією проростання і схожістю [ДСТУ 4138–2002, 2003]. Прямий тест доповнювали цитогенетичним дослідженням: ана-телофазним тестом. Стан антиоксидантної системи характеризували електрофоретичним методом за вивчення неспецифічної пероксидази та супероксиддисмутази в пророслих пагонах. Визначали кількість множинних форм ферментів, їх відносну електрофоретичну рухливість та питому вагу (частку) у відсотках у загальному спектрі. Ферментативну активність оцінювали за площею піків відповідних множинних форм на денситограмах.

Основні результати. За толерантністю до тривалого зберігання за прямого та цитогенетичного тестів досліджуванні сорти розташовувалися наступним чином: Трудівник > Росава > Селена Стар. Показано, що життєздатність насіння після зберігання тісно пов'язана із активністю пероксидази та супероксиддисмутази: більш толерантним сортам властива стабільність загальної активності пероксидази та супероксиддисмутази.

Висновки. У визначенні життєздатності насіння за тривалого зберігання провідну роль мають питома активність середньорухливої фракції пероксидази та мало- і середньорухливої фракцій СОД.

Ключові слова: ячмінь, старіння, зберігання насіння, мітоз, хромосомні аномалії, пероксидаза, супероксиддисмутаза

T. G. Aliksieieva, V. A. Toptikov, O. L. Sechniak

Odesa National Mechnykov University, department of genetics
and molecular biology,

2 Dvorianska Str, Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: t.aliksieieva@onu.edu.ua

ROLE OF THE ANTIOXIDANT IN FUNCTIONING OF THE AGING MECHANISMS ON THE EXAMPLE OF BARLEY

Abstract

Introduction. Despite close attention to the process of seed aging, there is still no unambiguous answer to questions about the mechanisms of aging. The solution of these issues is due to both economic needs and the need to store plant genetic resources.

Aim. The aim was to study the effect of long-term storage of seeds of different barley varieties, previously differentiated by tolerance to seed aging, on the state of the antioxidant system enzymes.

Methods. The studies were carried out on three varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.) Rosava, Selena Star and Trudivnik which had been stored under non-specialized laboratory conditions in paper envelopes for 8 years. The seed viability was assessed by germination energy and germinating ability according to the state standards. The direct test was supplemented with a cytogenetic study: an anelophase test. The condition of the antioxidant system was characterized by an electrophoretic method for studying nonspecific peroxidase and superoxide dismutase in germinated shoots. The number of multiple forms of enzymes, their relative electrophoretic mobility and specific gravity (share) in percent in the total spectrum were determined. Enzymatic activity was assessed by the area of the peaks of the corresponding multiple forms on the densitograms.

Results. In terms of tolerance to long-term storage in direct and cytogenetic tests, the varieties were arranged as follows: Trudivnik > Rosava > Selena Star. It has been shown that the viability of seeds after storage is closely related to the activity of peroxidase and superoxide dismutase: more tolerant varieties are characterized by the stability of the total activity of peroxidase and superoxide dismutase.

Conclusion. The specific activity of the medium-mobile peroxidase fraction and low- and medium-mobile SOD fractions plays a leading role in determining the viability of seeds during long-term storage.

Key words: barley; aging; seed storage; mitosis; chromosomal abnormalities; peroxidase; superoxide dismutase.

References

1. Atramentova L.O., Utevska O.M. (2007) *Statistical methods in biology*. [Statystychni metody v biolohii] Kh: VN Karazin KhNU, 288 p.
2. DSTU4138–2002. (2003) *Seeds of agricultural crops. Methods for quality determining* [Nasinnia silskohospodarskykh kultur. Metody vyznachennia yakosti], Kyiv, State Standard of Ukraine, 173 p.
3. Kolupaev Yu. E., Karpets Yu. V., Obozny A.I. (2011) Antioxidant system of plants: participation in cellular signaling and adaptation to the action of stressors [Antyoksydantnaia systema rastenyi: uchastye v kletochnoi syhnalyzatsyy i adaptatsyy k deistviyu stressorov] *Visn. KhNU. Biology series*, 22, 1, pp. 6–34.
4. Lysychenko M.L., Pankova O.V. Intensification of biochemical processes in seeds of agricultural crops [Intensyfikatsiia biokhimichnykh protsesiv u nasinni silskohospodarskykh kultur] *Environmental Engineering*, 2016, 2(6), pp. 44–47.
5. Lisovska T.P. *Genetic bases of plant selection: method. guid.* [Henetychni osnovy selektsii roslyn: metod. rek.], Lutsk, Print PE Ivanyuk VP, 2016, 64 p.
6. Toptikov V.A., Dyachenko L.F., Totsky V.N. (2012) Expressiveness of antioxidant oxidoreductases and protein profile of seedlings' tissues of winter and spring forms of cereals at extreme temperature fluctuations [Ekspressyvnost antyoksydantnykh oksydoreduktaz i bilkovyi profyl tkanei prorostkov ozymykh y yarovykh form zlakov pry ekstremalnykh kolebaniakh temperatury] *Cytology and Genetics*, 46, 3, pp. 41–54.
7. Almoguera C., Prieto-Dapena P., Diaz-Martin J., Espinosa J.M., Carranco R., Jordano J. (2009) The HaDREB2 transcription factor enhances basal thermotolerance and longevity of seeds through functional interaction with HaHSFA9, *BMC Plant Biol.*, 9, 75 – doi: 10.1186/1471-2229-9-75
8. Arif M.A.R., Afzal I., Börner A. (2022) Genetic aspects and molecular causes of seed longevity in plants – A Review, *Plants*, 11, 5, 598, <https://doi.org/10.3390/plants11050598>
9. Bailly C., Leymarie J., Lehner A., Rousseau S., Côme D., Corbineau F. (2004) Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying, *Journal of Experimental Botany*, 55, 396, 475–483, <https://doi.org/10.1093/jxb/erh050>
10. Boussardon C., Martin-Magniette M.-L., Godin B., Benamar, A., Vittrant B., Citerne S., Mary-Huard T., Macherel D., Rajjou L., Budar F. (2019) Novel cytonuclear combinations modify *Arabidopsis thaliana* seed physiology and vigor, *Front. Plant Sci*, 10, 32, <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00032>
11. Brar N. S., Kaushik P., Dudi B. S. (2019) Assessment of Natural Ageing Related Physio-Biochemical Changes in Onion Seed, *Agriculture*, 9(8), 163, <https://doi.org/10.3390/agriculture9080163>
12. Bueso E., Munoz-Bertomeu J., Campos F., Brunaud V., Martinez L., Sayas E., et al. (2014). *Arabidopsis thaliana* HOMEBOX25 uncovers a role for gibberellins in seed longevity, *Plant Physiol*, 164, 999–1010, doi: 10.1104/pp.113.232223
13. Chen X, Börner A, Xin X, Nagel M, He J, Li J, Li N, Lu X, Yin G (2021) Comparative proteomics at the critical node of vigor loss in wheat seeds differing in storability, *Front. Plant Sci*, 12, 707184, doi: 10.3389/fpls.2021.707184
14. Ebone L. A, Caverzan A., Silveira D. C., Siqueira L. d'O., Lângaro N. C., Chiomento J.L. T., Chavarria G. (2020) Biochemical profile of the soybean seed embryonic axis and its changes during accelerated aging, *Biology*, 9(8), 186, <https://doi.org/10.3390/biology9080186>
15. Fu Y.B., Yang M.H., Horbach C., Kessler D., Diederichsen A., You F.M. et al. (2017) Patterns of SSR variation in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds under *ex situ* genebank storage and accelerated ageing, *Genet. Resour. Crop Evol.*, 64, 277–290, doi: 10.1007/s10722-015-0349-9

16. Hay F. (2017) What do we know about the genetics of seed longevity? *Forest Genetics. Health and Productivity under Changing Environments*. A Joint Meeting of WFGA and CFGA, University of Alberta, Edmonton, AB, June 26–29, <http://www.fsl.orst.edu/wfga/wfga2017/files/documents/FionaHay.pdf>
17. Huang B., Gan L., Chen D., Zhang Y., Zhang Y., Liu X. et al (2020) Integration of small RNA, degradome and proteome sequencing in *Oryza sativa* reveals a delayed senescence network in tetraploid rice seed, *PLoS ONE*, 15, 11, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242260>
18. Kimura M., Nambara E. (2010) Stored and neosynthesized mRNA in *Arabidopsis* seeds: effects of cycloheximide and controlled deterioration treatment on the resumption of transcription during imbibition, *Plant Mol. Biol*, 73, 119–129. doi: 10.1007/s11103-010-9603-x
19. Lee Y.P., Baek K.H., Lee H.S., Kwak S.S., Bang J.W., Kwon S.Y. (2010). Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn-superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions, *J. Exp. Bot.*, 61, 2499–2506, doi: 10.1093/jxb/erq085
20. Manchenko G.P. (2003) *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*, CRC Press LLC, 592 p.
21. Murthy N.U.M., Sun W.Q. (2000) Protein modification by the Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation, *Journal of Experimental Botany*, 51, 348, pp. 1221–1228.
22. Nawaschin M., Gerassimowa H. (1936a) Natur und Ursachen der Mutationen. I. Das Verhalten und die Zytologie der Pflanzen, die aus infolge Alterns mutierten Keimen stammen, *Cytologia*, 7, 3, 324–362.
23. Oenel A., Fekete A., Krischke M., Faul S.C., Gresser G., Havaux M., Mueller M.J., Berger S. (2017) Enzymatic and non-enzymatic mechanisms contribute to lipid oxidation during seed aging, *Plant and Cell Physiology*, 58, 5, pp. 925–933, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx036>
24. Önder S., Güvercin D., Tonguç M. (2020) Determination of hydrogen peroxide content and antioxidant enzyme activities in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds after accelerated aging test, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24, 3, 681–688. DOI: 10.19113/sdufenbed.793621
25. Sharma S., Kaur A., Bansal A., Gill B.S. (2013). Positional effects on soybean seed composition during storage, *Journal of food science and technology*, 50, 2, 353–359, <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0341-0>
26. Tavakol A.R., Ghasem F., Majnoun H.N., Alizadeh H., Bihanta M. (2007) Some effects of seed aging on germination characteristics and activities of catalase and peroxidase antioxidant enzymes in barley genotypes (*Hordeum vulgare*), *Iranian journal of agricultural sciences* 38–1, 2, pp. 337–346. <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=143692>
27. Yao Z., Liu L.W., Gao F., Rampitsch C., Reinecke D.M., Ozga J.A. et al. (2012). Developmental and seed aging mediated regulation of antioxidative genes and differential expression of proteins during pre- and post-germinative phases in pea, *J. Plant Physiol*, 169, 1477–1488, doi: 10.1016/j.jplph.2012.06.001
28. Yamada M, Goshima G. (2017) Mitotic spindle assembly in land plants: molecules and mechanisms, *Biology (Basel)*, 6(1), 6, doi:10.3390/biology6010006
29. Yazdanpanah F., Maurino V.G., Mettler-Altmann T., Buijs G., Bailly M., Karimi Jashni M., Willems L., Sergeeva L.I., Rajjou, L., Hilhorst H.W. (2019) NADP-MALIC ENZYME1 affects germination after seed storage in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.*, 60, 2, 318–328, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy213>
30. Zhang K., Zhang Y., Sun J., Meng J., Tao J. (2021) Deterioration of orthodox seeds during ageing: Influencing factors, physiological alterations and the role of reactive oxygen species, *Plant Physiol Biochem*, 158, 475–485, doi: 10.1016/j.plaphy.2020.11.031.
31. Zhao L., Wang H., Fu Y.B. (2020) Analysis of Stored mRNA degradation in acceleratedly aged seeds of wheat and canola in comparison to *Arabidopsis*, *Plants*, 9(12), 1707, doi: 10.3390/plants9121707