

Влияние на предварителната обработка на семена от обикновена зимна пшеница (*Triticum aestivum* L.) с цитокинини върху тяхната жизненост при моделирано ускорено стареене

Радослав Чипилски^{1*}, Ирина Москова², Константина Кочева²

¹Институт по растителни генетични ресурси, Садово, ССА, бул. Дружба № 2, 4122

²Институт по физиология на растенията и генетика, София, 1113, БАН

*E-mail: radotch@abv.bg

Резюме

Семена от два сорта обикновена зимна пшеница Садово 772 и Гея-1, различаващи се по продуктивност и състав, бяха подложени на моделирано ускорено стареене от 100 % относителна влажност на въздуха и температура от 40°C в течение на 72 часа. Преди периода на стареене, семената бяха накснати в 10 mg/l разтвори на два цитокинина – 6-БА и Кинетин. След ускореното стареене, семената бяха подложени на тест за кълняемост, като за анализ бяха използвани 5-дневни колеоптили. Изследвани бяха някои параметри на антистресовия и антиоксидативния отговор на семената, по съдържание на малондиалдехид, водороден пероксид, клетъчна мембранна стабилност, свободен пролин, разтворими феноли и тиолови групи. Целта на изследването беше да се проучи връзката между кълняемостта и антиоксидативния отговор на пред-третираните семена с цитокинини, подложени на тест за ускорено стареене. Беше установено, че семена от сортове с по-ниско белтъчно съдържание показват по-бързо стареене и по-ниска кълняема енергия и кълняемост при ускорено стареене. Тези процеси забавят развитието на колеоптила, а това бе свързано с окислителен стрес, поради по-високо съдържание на водороден пероксид и малондиалдехид. Пред-третирането на семената преди теста за моделирано ускорено стареене с цитокинини подобрява растежа на колеоптила, чрез намаляване на малондиалдехида и водородния пероксид и повишаване на индекса на клетъчната мембранна стабилност. Този растеж е свързан с по-голяма съдържание на пролин, феноли и свободни сулфхидрилни групи.

Ключови думи: тест за ускорено стареене; обикновена зимна пшеница; кълняемост; антиоксидативна ензимна защита

Influence on primed with cytokinins seeds of common winter wheat (*Triticum aestivum* L.) over their vitality in modeled accelerated ageing

Radoslav Chipilski¹, Irina Moskova², Konstantina Kocheva²

¹Institute of Plant Genetics Resources, Sadovo, AA, Druzha, 2, Str., 4122, Bulgaria

²Institute of Plant Physiology and Genetics, Sofia 1113, BAS, Bulgaria

*E-mail: radotch@abv.bg

Citation

Chipilski, R., Moskova, I., & Kocheva, K. (2020). Influence on primed with cytokinins seeds of common winter wheat (*Triticum aestivum* L.) over their vitality in modeled accelerated ageing. *Rastenievadni nauki*, 57(6) 30-40 (Bg).

Abstract

Seeds from contrasting wheat cultivars (Sadovo 772 and Geya-1) differing in productivity and composition were subjected to modeled accelerated aging under laboratory conditions for 72 h. Before induced aging seeds were soaked in cytokinin solutions (either 6-BA or kinetin). After cytokinin treatment seeds were germinated

for 5 days and emerging coleoptiles were used for analysis of some anti-stress parameters and anti-oxidative response-malondialdehyde, hydrogen peroxide, cell membrane stability, free proline, soluble phenols and thiols groups. The aim of the study was to assess the relationship between germination of seeds pre-treated with cytokinin and their stress response to induced accelerated aging. It was concluded that the cultivars with lower productivity and correspondingly lower protein containing seeds demonstrated faster aging and worse germination capacity. Delayed coleoptile development was associated with oxidative stress due to higher hydrogen peroxide and malondialdehyde accumulation. Seed pre-treatment with cytokinins improved coleoptile growth through reducing malondialdehyde and hydrogen peroxide formation and thus enhancing cell membrane stability. Growth was also promoted through the accumulation of free proline, phenols and free thiols groups.

Key words: accelerated ageing; common winter wheat; seed germination; antioxidant enzyme activities

Съкращения: / Abbreviations: АА-тест за ускорено стареене/ test for accelerated ageing; 6-BA-6-бензиламинопурин/ 6-BA 6-benzylaminopurine, MDA– малондиалдехид/ malondialdehyde; H₂O₂-водороден пероксид/ hydrogen peroxide; CMS–клетъчна мембранна стабилност/ cell membrane stability; PP-Растежни регулатори/growth regulators, ЦТК-цитокинини/cytokinins; FW-свежа маса/fresh weight; DW-суха маса/dry weight; ISTA-International Seed Testing Association

Загубата на кълняемост и жизненост на семената поради стареене по време на съхраняване *ex situ* е голям проблем, както за производителите на семена, така и за съхранението на семена в националните генбанки (Chamurliisky & Stoyanova 2012; Agaska-Moldoch et al., 2016; Desheva, 2016). В зависимост от отношението си към съдържание на вода, относителна влажност на въздуха и външна температура при покълване, семената се делят на (orthodox)-съхраними и recalcitrant-трудно съхраними (Roberts, 1973). Установено е, че загубата на жизненост и кълняемост се дължи на повреди в мембранните системи на семето, поради развитие на окислителен стрес (Coolbear, 1995; McDonald, 1999). Между факторите отговорни за стареенето на семената, най-често са реакции на пероксидация на липидите, но също и на белтъците. Това окисление се дължи на образуване на активни кислородни форми, като най-често се определят по съдържание на стабилната форма на водородния пероксид (Davies, 2005; Bailly et al., 2008). Антиоксидативният отговор на семена от обикновена зимна пшеница може да бъде определен по промени в липидния компонент на мембраните, по съдържание на продукти на окислението им, като малондиалдехид (MDA) и по натрупване на активни кислородни форми, като молекули на водороден пероксид (H₂O₂). Тези процеси са свързани с определяне клетъчната мембранна стабилност в процеса на кълнене на семената при различно физиологично състояние (Bailly,

2004; Oenel et al., 2017). В същото време се анализират и съдържанието на други антистресови и антиоксидативни клетъчни фактори като свободен пролин, общи феноли и тиолови групи в семената подложени на изкуствено стареене и пред-третиран с изследваните цитокинини Кинетин и 6-БА (Simic et al., 2005). Съществуват различни подходи на въздействие на семената за увеличаване на тяхната защитна енергия срещу прояви на окислителен стрес. Това могат да бъдат различни въздействия на физично, физико-химично или физиологично ниво, известни като средства за пред-третиране (priming) на семената (Gill & Tuteja, 2010; Kerchev et al., 2020). Част от тези средства са пред-третирания с растежни регулатори (PP) от цитокининов тип, като се смята, че могат да спомогнат за решаване на този проблем (Halmer et al., 1984; Hare et al., 1997; Afzal et al., 2011). Предполага се, че третиране с PP може да отключи метаболитни процеси, отговарящи за защитните и адаптивни механизми в клетките. Сред прилаганите PP за преодоляване на изкуствен покой на семената са и тези от групата на цитокинините /ЦТК/. Цитокинините са важни регулатори на растежа и развитието, които стимулират деленето на клетките и биосинтетичните процеси, диференциацията на листата и корена, образуването на проводящата система, усилват защитното действие върху развитие на кислороден и други видове стрес (Banowetz, 1999; Mok & Mok, 2001; Shani et al., 2006; Cossani & Reynolds, 2012). Не

на последно място, цитокинините са основния растителен хормон, който забавя и регулира стареенето на растителните тъкани (Gregersen et al., 2008; Zwack & Aaron, 2013). Ролята на цитокинините като фактори, действащи срещу стареенето и развитието на кислороден стрес е изследвано при различни семена, но е слабо проучено при пшеницата. Има малко данни за връзката между процесите на стареене в семената и образуване на други активни антистресови молекули, като свободен пролин, свободни сулфхидрилни /тиолни/ групи и разтворими феноли. Всички тези процеси се отразяват на кълняемата енергия, кълняемостта и жизнеността на прорастъците (Lehner et al., 2008). По-слабо е проучен ефекта на екзогенно пред-третиране на семена в покой с разтвори на цитокинини за преодоляване на стреса от покоя, ускоряване на имбибицията, кълняемата енергия и кълняемостта на семена, съхранявани при естествени условия. За да се прояви този ефект на цитокинините, се прилагат условия на моделирано ускорено стареене, което е и основен подход за имитиране на стресови условия при дългосрочно съхранение на семена (Hampton & TeKrony, 1995; Walters et al., 2005).

Целта на изследването беше да се проучи влиянието на 24 часово пред-третиране с цитокинините 6-БА и кинетин на семена от пшеница, подложени след това на моделирано ускорено стареене за 72 часа, върху кълняемата енергия, кълняемостта и жизнеността на кълновете от два сорта пшеница Гея-1 и Садово772, различаващи се по продуктивност и качества на семената.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В опитите бяха използвани семена от два сорта обикновена зимна пшеница (*Triticum aestivum* L.) реколта 2018 година. Сортовете Гея-1 и Садово 772 са създадени в ИРГР „Константин Малков”, Садово и се характеризират с различна продължителност на вегетационния период, състав на зърната им, година на създаване и продуктивност. Сорт Гея-1 е по-нов сорт, който е с по-дълъг вегетационен период, по-голяма абсолютна маса на зърната и по-висока продуктивност. Семената от двата сорта се раз-

личаваха и по състав на общ белтък. За опитите бяха използвани стандартни вещества на два цитокинина – 6-бензиламинопурин /6-БА/, който е синтетичен цитокинин и естествения кинетин (Jablonska-Трупас et al., 2016). И двата цитокинина имат различна активност и действие в зависимост от условията и генетичния материал. Разтворите за третиране на семената, бяха в концентрации от 10 mg/l съгласно схемата на опита. Всички вещества бяха химически чисти за анализ и закупени от Sigma.

Семената бяха подлагани на няколко варианта на третиране:

1 вариант - контрола – киснене в дестилирана вода за 24 h и след това прехвърляне на петриеви блюда за отчитане по стандартна методика на кълняемост от 5 дни.

2 вариант – киснене 24 h в дестилирана вода и прехвърляне в съдове за подлагане на 72 часа на ускорено стареене/АА/, след което се прехвърлят на петриеви блюда за кълняемост от 5 дни по стандартна методика.

3 вариант – пред-третиране с разтвори на 10 mg/l кинетин за 24 h в съдчета и прехвърляне на семената в съдове за подлагане на ускорено стареене за 72 h, след което се прехвърлят в петриеви блюда за кълняемост от 5 дни по стандартна методика.

4 вариант – пред-третиране на семена с разтвори на 10 mg/l 6-БА за 24 h и прехвърляне в съдове за подлагане на ускорено стареене за 72 h., след което се прехвърлят на петриеви блюда за кълняемост от 5 дни по стандартна методика.

Тест за изкуствено стареене (АА). Семената бяха подлагани на АА по методиката на ISTA от 2008. Проба от 100 семена бяха поставяни в специални съдове при условия на 100 % относителна влажност на въздуха и температура на въздуха от 40 °C в термостат за период от 72 h и след това са прехвърляни в петриеви блюда за кълняемост по стандартна методика.

Кълняемата енергия и кълняемост на семената бе определена по методиката на ISTA, 2008. Две повторения по 50 семена от всеки сорт на съд бяха поставени в термостат при температура от 22 ±0.5°C. Семената се подреждат в две петриеви блюда на вариант с ширина от 14 cm между два диска от филтърна хартия отдолу и отгоре, и след това се налива в тях 20 ml дести-

лирана вода. Кълняемата енергия и кълняемост се отчетоха съответно на 3-ти и 5-ти ден, като семената се считат за покълнали, когато колеоптила достигне дължина над 2 mm. Свежото тегло и сухото тегло на колеоптила бяха отчетени на 5-ят ден от развитието на кълна. Сухото тегло се постига след сушене при 104 °C до постоянно тегло (Beadle, 1993).

Клетъчна мембрална стабилност (CMS) на прорастъците беше определена по индекса на увреждане по методика на Premachandra et al. (1990). Средна проба от по 100 mg прорастъци бяха изрязани и поставени в бехерови чашки от 25 ml съдържащи 10 ml дестилирана вода. Едната проба се загрява до 40 °C за 30 min, а другата се загрява до 100°C във вряща вода за 15 min. След изстиване на двете проби се отчита кондуктивност като C1 и C2 с кондуктометър Combo tester H98129, произведен от фирма Hanna. Крайният резултат се изчислява по формулата:

$$CMS = [1 - (C1/C2)] \times 100, \%$$

Липидна пероксидация. Степента на липидна пероксидация на клетките бе определена по метода на Heath & Packer (1968). 0.1 g свежа маса се екстрахира с 0.5% трихлороцетна киселина (ТСА). След центрофугиране при 15 000 g на студено супернатантата (СН) се смесва с 0.5% тиобарбитурова киселина (ТВА) и отново се центрофугира при 15 000g за 5 min. Реакцията се спира с лед и бистрата СН се измерва спектрометрична на две дължини на вълната 532 и 600 nm. Резултатите се изчисляват като съдържание на малондиалдехид (MDA) в единица свежо тегло ($\mu\text{mol MDA}$) g FW с използването на моларен екстинкционен коефициент от 155 mmol/cm.

Съдържанието на водороден пероксид (H_2O_2) бе определено по методика, описана от Alexieva et al. (2001). След екстракция на растителния материал с 0.1% трихлороцетна киселина (ТСА) и центрофугиране за 15 min на 15000g, 0.5 ml от супернатантата реагира в инкубационната среда с буфер и 1M калиев йодид. При окислението на калиев йодид до йод се получава оцветяване, което се измерва при 390 nm. Съдържанието на H_2O_2 се отчете по направена стандартна крива.

Съдържанието на свободен пролин (Bates, 1973) се определи по реакцията между нинхи-

дрин и пролин, като полученото цветно съединение се измерва на 520 nm. 0.5 g растителен материал се хомогенизира на студено с 10 ml 3% сулфосалицилова киселина и се центрофугира за 10 min при 7000 g. След това 2 ml от супернатантата се инкубира заедно с 2 ml ледена оцетна киселина и 2 ml нинхидринов реагент за 1 час на кипяща водна баня. Реакцията се прекратява чрез поставяне в ледена водна баня. След temperиране до стайна температура се измерва оптичната плътност при 520 nm.

Количеството свободен пролин се определя по стандартна крива за пролин и се представя като $\mu\text{mol/g FW}$ (свежо тегло).

Количеството на свободни тиолови (сулфхидрилни) групи се определи по методиката на Elman (1959), модифицирана от Edreva & Hadzhiyska (1984). Растителният материал се стрива на студено с 2.5% сулфосалицилова киселина, след което хомогената се центрофугира 15 min на 15000 g. Към трисбуфер с рН 7.8 и 20 mM натриева сол на EDTA се прибавят 0.320 ml от супернатантата и 30 μl 12 mM DTNB (реагент на Елман). Пробите престояват на стайна температура, при непрекъснато разклащане. Екстинкцията се измерва на 412 nm. Количеството свободни тиолови групи се изчислява с екстинкционен коефициент 13.6 $\mu\text{mol/cm}$. Резултатите се представят в $\mu\text{mol/g FW}$ (свежо тегло).

Общото количество свободни феноли се определи с реагент Folin-Ciocalteu, добавен към натриев карбонат и отчетен спектрофотометрично на дължина на вълната 725 nm по метода на Swain & Goldstein (1964). Галова киселина се използва като стандарт.

Резултатите са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната аритметична (SE) от 3 до 10 измервания. За доказване на разлики в средните стойности е извършен еднофакторен дисперсионен анализ one-way ANOVA в рамките на вариантите от всеки сорт, последван от LSD анализ по Фишер тест.

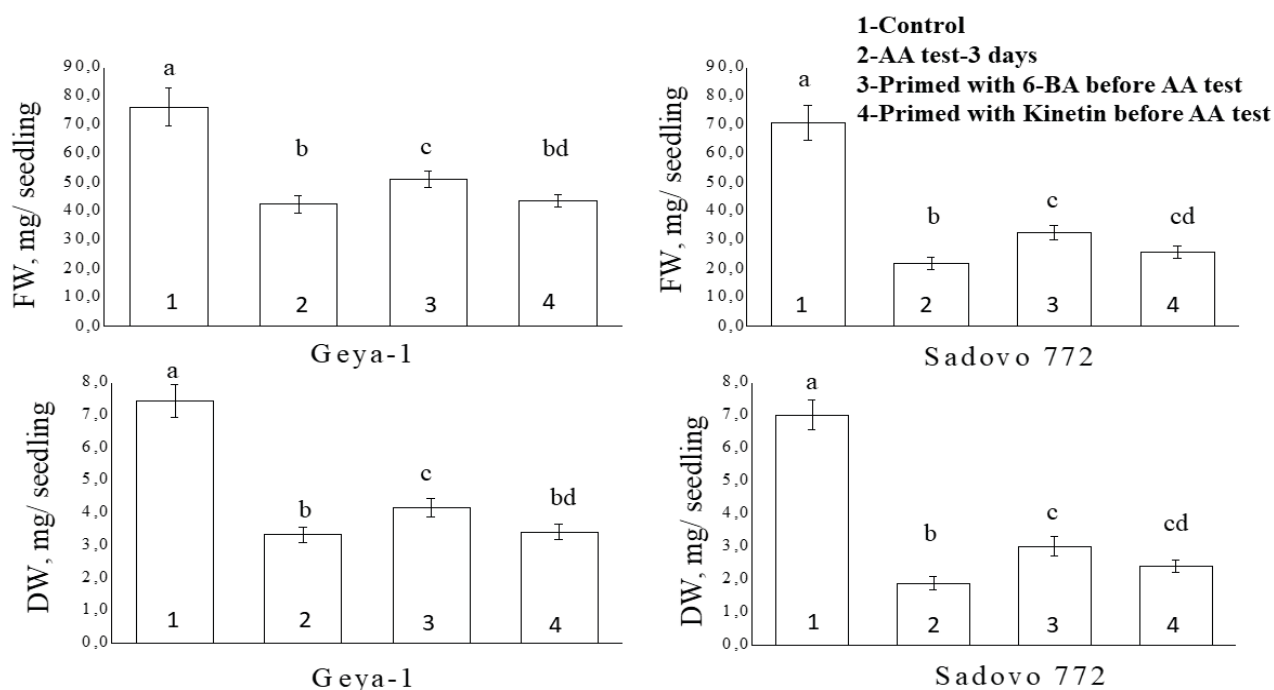
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Подложените семена на моделирано ускорено стареене за 72 часа значително понижават жизнеността си и при двата сорта. Стойността на кълняемата енергия и кълняемостта на се-

мената се редуцират до 50.0 % спрямо контролата (Фигури 1 и 2). От друга страна, пред-третирането на семената с цитокинини за 24 часа преди ускорено стареене за 72 часа повишава кълняемата енергия, кълняемостта и растежа на колеоптилите при двата сорта пшеница спрямо варианта ускорено стареене (Фигура 1 и 2). Кълняемата енергия и кълняемостта на семената от сорт Гeya-1 бяха по-силно положително повлияни от пред-третирането с 10 mg/l 6-БА, за разлика от Садово 772. Обратно въздейства кинетина, който значимо ускорява кълняемата енергия и кълняемостта на Садово 772, спрямо вариант изкуствено стареене при същия сорт. При сорт Гeya-1 влиянието на кинетина върху кълняемата енергия и кълняемостта е по-слабо и незначимо статистически за първия показател. Подобни закономерности на двата сорта бяха открити за свежото и сухо тегло на прорастъците след пред-трети-

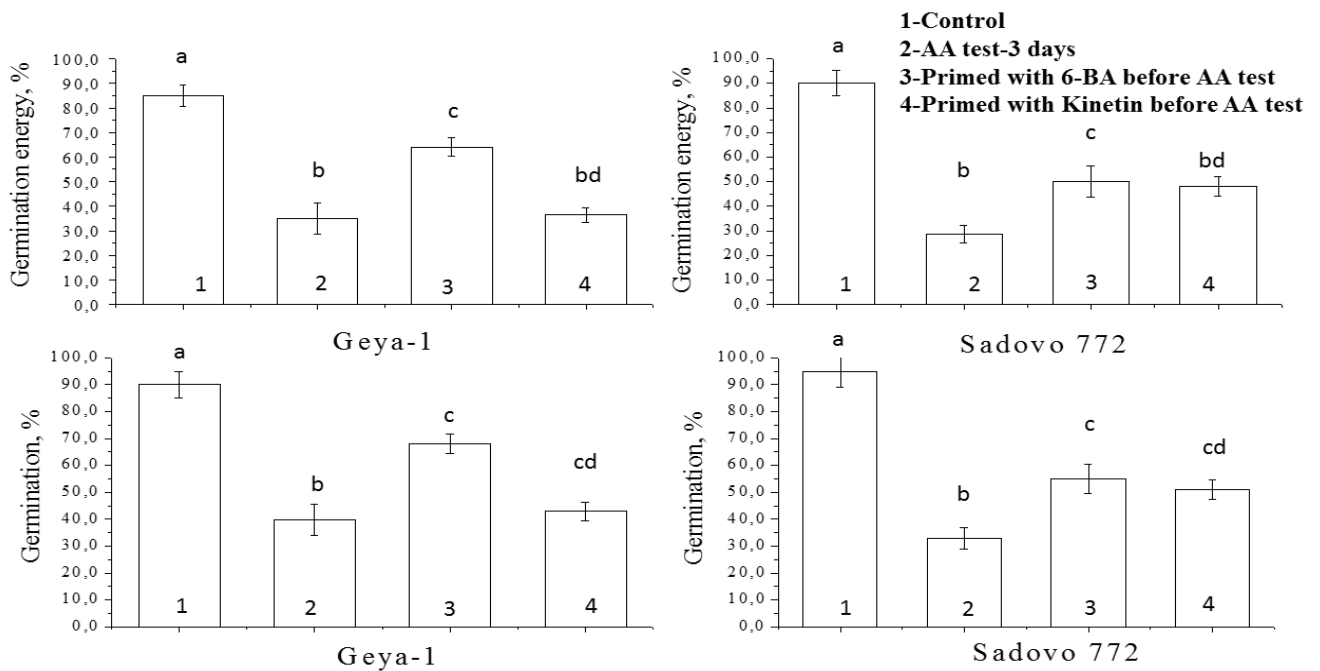
ране с цитокинини на семена (Фигура 1 и 2). Също така от данните в Фигура 1 и Фигура 2 се вижда, че при сорт Гeya-1 всички изследвани показатели са с по-високи стойности за всички варианти на опита.

От Фигура 3 се вижда, че приложеното моделирано ускорено стареене значимо увеличава изтичането на електролити от клетките на 5 дневни колеоптили на семена, преживели 3 дневно стареене (72 h). От друга страна, пред-третирането с 10 mg/l цитокинини 6-БА и кинетин намалява статистически значимо стойността на клетъчната мембранна стабилност на 5 дневните колеоптили от семена, преживели преди това 3 дневно стареене (72 h). За двата сорта този индекс, измерващ способността на клетките да запазват вътреклетъчните електролити, остава по-нисък спрямо не третирани с цитокинини и стресирани чрез ускорено стареене семена средно с 37.0 %.



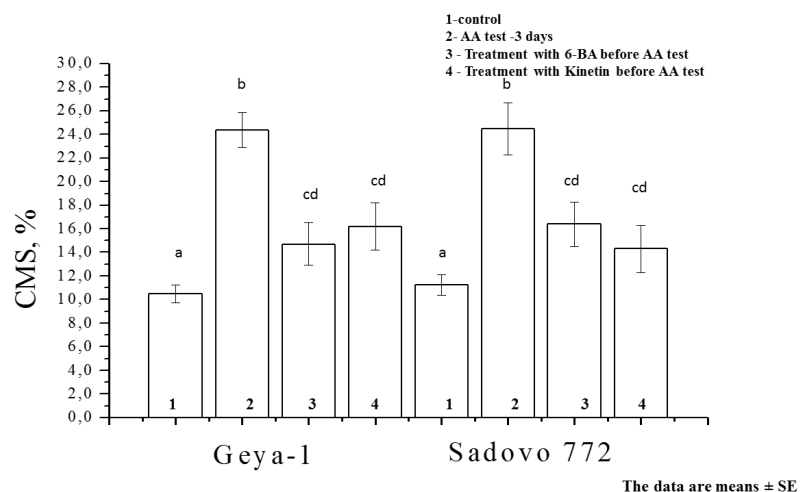
Фигура 1. Свежо и сухо тегло на колеоптили на пред-третирани с 10 mg/l разтвори 6-БА и кинетин за 24 часа и подложени на моделирано ускорено стареене за 72 часа семена на обикновена зимна пшеница. Различните букви показват значима разлика изчислена чрез дисперсионен анализ one-way ANOVA с използване на LSD тест по Фишер.

Figure 1. Fresh and dry weight of coleoptiles of subjected to modeled accelerated ageing /AA/ wheat seeds for 72 hours, preliminarily primed with 10 mg/l 6-BA and kinetin solutions for 24 hours. The different letters indicate significant differences assessed by the Fisher LSD test ($P \leq 0.05$) after performing one-way ANOVA analysis.



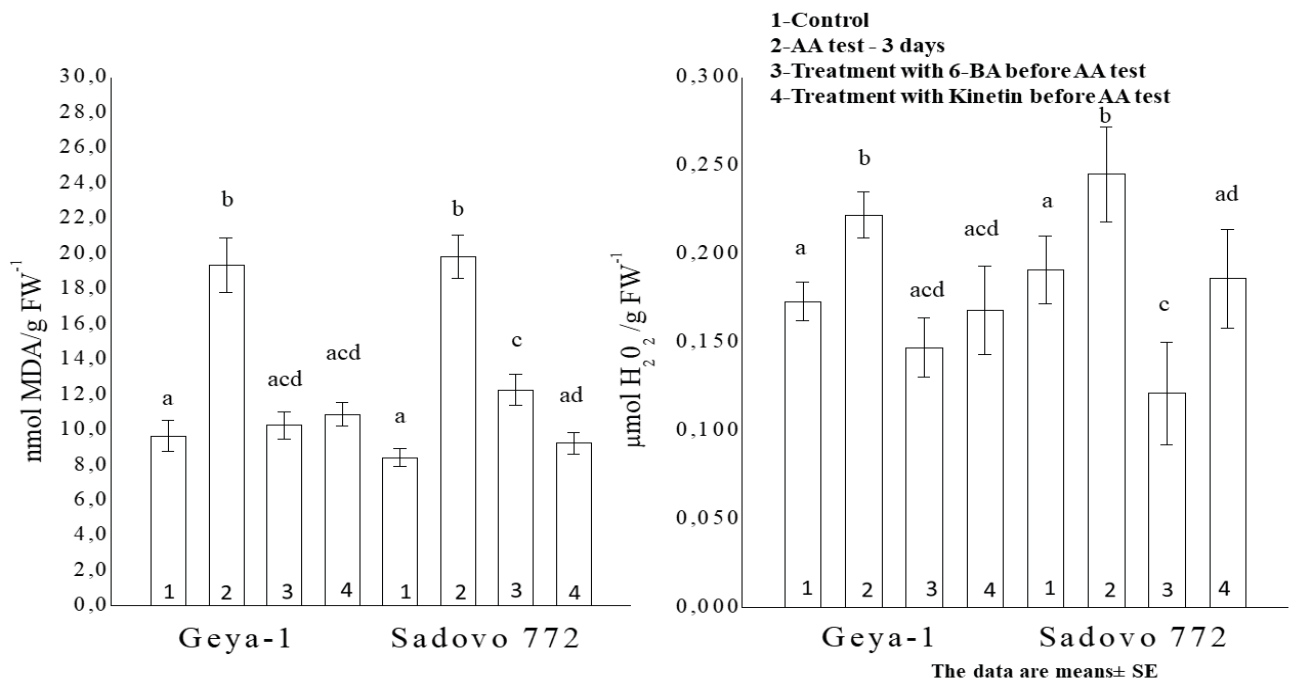
Фигура 2. Кълняема енергия и кълняемост на пред-третиранни с 10 mg/l разтвори на 6-БА и Кинетин семена от обикновена зимна пшеница, предварително подложени на ускорено стареене за 72 часа. Различните букви показват значима разлика изчислена чрез дисперсионен анализ ANOVA с използване на LSD тест по Фишер.

Figure 2. Germination energy and germination of wheat seeds subjected to modeled accelerated ageing /AA/ for 72 hours, preliminarily primed with 10 mg/l 6-BA and kinetin solutions for 24 hours. The different letters indicate significant differences assessed by the Fisher LSD test ($P \leq 0.05$) after performing one-way ANOVA analysis.



Фигура 3. Стабилност на клетъчните мембрани /CMS/ на 5 дневни прорастъци на варианти от семена подложени на моделирано ускорено стареене /AA/ и пред-третиранни с разтвор на цитокинини преди прилагане на ускорено стареене от 72 часа. Различните букви показват значима разлика изчислена чрез дисперсионен анализ ANOVA с използване на LSD тест по Фишер.

Figure 3. Cells membrane stability of coleoptiles of primed with 10mg/l 6-BA and kinetin solutions for 24 hours before of modeled accelerated ageing seeds application for 72 hours. Different letters indicate significant differences assessed by the Fisher LSD test ($P \leq 0.05$) after performing one-way ANOVA analysis.



Фигура 4. Съдържание на малондиалдехид и водороден пероксид в 5 дневни прорастъци от семена, преживяли тест за ускорено стареене /AA/ и пред-третиран с 10 mg/l разтвори на 6-БА и Кинетин преди стреса семена обикновена зимна пшеница. Различните букви показват значима разлика изчислена чрез дисперсионен анализ ANOVA с използване на LSD тест по Фишер.

Figure 4. MDA and hydrogen peroxyde contents of 5 days-old coleoptiles primed with cytokinins 10mg/l 6-BA and Kinetine solutions before subjection to 3 days accelarated ageing /AA/ stress. Different letters indicate significant differences assessed by the Fisher LSD test ($P \leq 0.05$) after performing ANOVA analysis.

От Фигура 4 се вижда, че ускореното стареене на семена от пшеница води до 100 % увеличение на процесите, свързани с пероксидация на липидите в 5 дневни колеоптили в сравнение с контролата. 24 часовото пред-третиране на семената с 10 mg/l разтвори на ЦТК води до снижаване на нивата на MDA в тъканите на 5 дневните колеоптили, преживяли и 3 дневно изкуствено стареене (72 h). Това снижение е по-силно при Гейя-1, като достига нивото на контролните семена и има е налице незначима статистически разлика. В същото време нивото на H₂O₂ в тъканите на 5 дневните прорастъци от семена, претърпели 3 дневно ускорено стареене, се увеличава статистически значимо на 30.0 % спрямо контролните семена. Пред-третирането на семена за 24 часа с 10 mg/l разтвор на ЦТК намалява нивото на водороден пероксид до нормалните нива на контролите, но по-силно при вариантите с 6-БА.

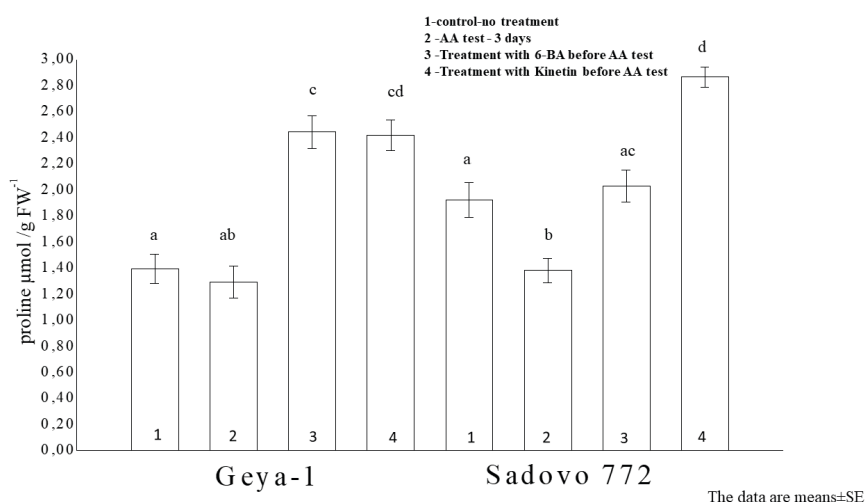
Изкуственото стареене от 3 дни намалява значимо съдържанието на свободен пролин в

прорастъците от семената на Гейя-1 и Садово 772 (Фигура 5). Пред-третирането с ЦТК води до увеличаване концентрацията на свободен пролин в тъканите на 5 дневни прорастъци еднакво при Гейя-1. При сорт Садово 772, кинетина действа по силно на натрупания пролин отколкото при Гейя-1. Свободните тиолни групи намаляват при стареене от 3 дни и при двата сорта (Фигура 7). Пред-третирането с ЦТК увеличава свободните тиолни групи повече при Гейя-1, отколкото при Садово 772, което може да се разглежда като по-силна реакция на антиоксидативния отговор на семената след стреса от стареене. Фенолите се намаляват при стареене еднакво при двата сорта, и също се увеличават при пред-третиране с ЦТК на едно ниво (Фигура 6). По-силно антистресово въздействие на 6-БА върху пролина, фенолите и сулфхидрилните групи при Гейя-1 корелира по-добре с нивото на намалено MDA и H₂O₂ съдържание в сравнение със Садово 772. Тези промени могат да се разглеждат като връз-

ка с продуктивността на сорта и да се свържат с по-високото белтъчно съдържание на семената.

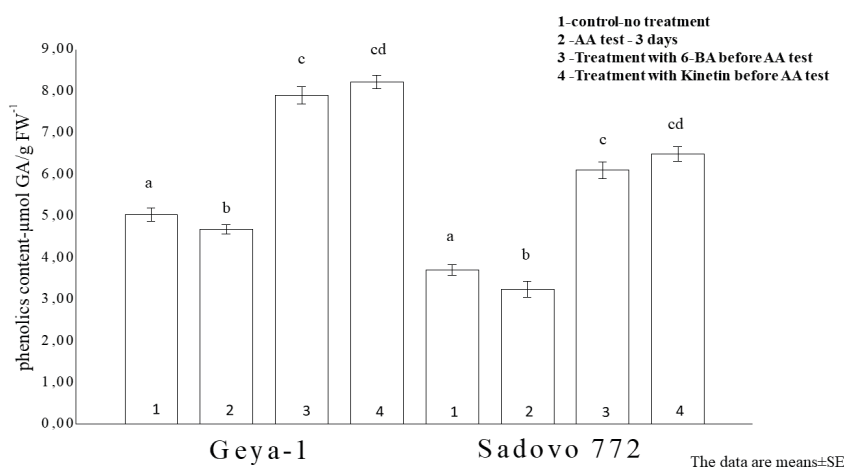
Нашите резултати показват отчетливо, че третирането с цитокинини има положителен ан-

тистресов и антиоксидативен ефект върху стареещи семена на пшеница. Ускореното стареене предизвиква намалена кълняемост на семената, като се наблюдава и различна реакции на сорто-



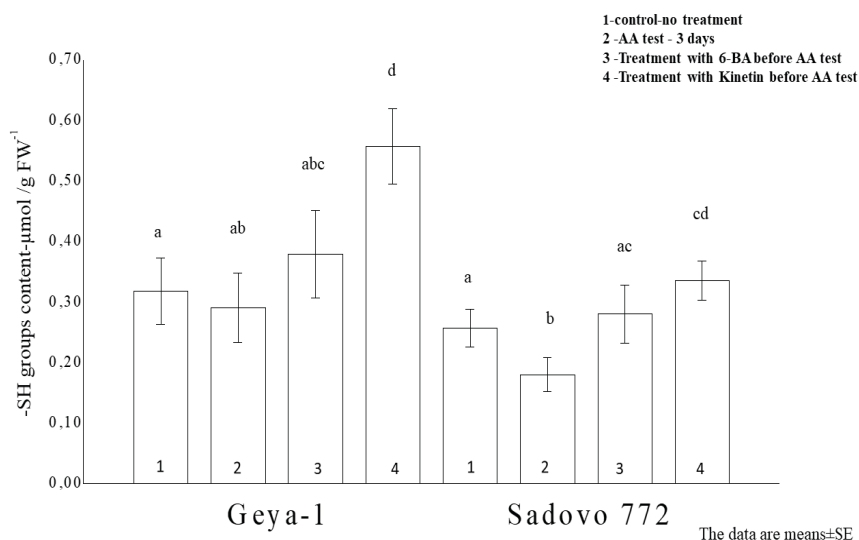
Фигура 5. Съдържание на свободен пролин в 5 дневни прорастъци на пшеница от семена, преживяли 3 дневен тест на моделирано ускорено стареене /AA/ и предтретиран с 10 mg/l разтвори на цитокинини за 24 часа преди стреса. Различните букви показват значима разлика изчислена чрез дисперсионен анализ ANOVA с използване на LSD тест по Фишер.

Figure 5. Contents of free proline of 5 days–old coleoptiles of wheat seeds survived 3 days treatment of modeled accelerated ageing /AA/ and primed before with 10 mg/l cytokinins for 24 hours before stress. Different letters indicate significant differences assessed by the Fisher LSD test ($P \leq 0.05$) after performing ANOVA analysis.



Фигура 6. Съдържание на разтворими феноли в 5 дневни прорастъци на пшеница от семена преживяли 72 часа тест за моделирано ускорено стареене/AA/ и пред-третиране с разтвор на цитокинини за 24 часа преди стреса. Различните букви показват значима разлика изчислена чрез дисперсионен анализ ANOVA с използване на LSD тест по Фишер.

Figure 6. Contents of total free phenolics of 5 days–old coleoptiles of wheat seeds surviving 3 days test for modeled accelerated ageing /AA/ and primed with 10 mg/l cytokinins solutions for 24 hours before stress. Different letters indicate significant differences assessed by the Fisher LSD test ($P \leq 0.05$) after performing ANOVA analysis.



Фигура 7. Съдържание на свободни тиолови групи в 5 дневни прорастъци на пшеница от семена, преживяли предтретиране с 10 mg/l разтвори на цитокинини за 24 часа и 72 часа тест за ускорено стареене/AA/. Различните букви показват значима разлика изчислена чрез дисперсионен анализ ANOVA с използване на LSD тест по Фишер.

Figure 7. Contents of free thiols groups of 5 days-old coleoptiles of wheat seeds primed with 10 mg/l cytokinins solution for 24 hours and subjected to 72 hours test of modeled accelerated ageing (AA). Different letters indicate significant differences assessed by the Fisher LSD test ($P \leq 0.05$) after performing ANOVA analysis.

вете. Основно, това е свързано с увеличение на окислителните процеси и натрупване на MDA и H_2O_2 (Zurani et al., 2015). Това уврежда мембраните и нарушава редица жизнени функции като покълване и прорастване. Пред-третирането на семената преди стареене с ЦТК намалява инхибиторния ефект на стареенето. Известно е, че ЦТК имат антистресов ефект при редица семена (Blokina et al., 2003; Yang et al., 2016). Установено е, че навлизането на ЦТК в семената в процеса на пред-третиране за 24 часа е обусловено от добре развита система за пренос през мембраните на клетките. Тази система е генетично заложена в растенията и е установено като двустепенна, като се оприличава на тази при бактериите (Yang et al., 2016). Това позволява на молекулите на ЦТК да достигат до важни метаболитни звена в семената. На първо място е известно, че семената са богати на цитокинини, но през времето на покой те не са активни. Възможно е, при пред-третиране да се повлияват и процеси на тяхното активиране (Hare et al., 1997; Blokina et al., 2003; Cossani & Reynolds, 2012). ЦТК преди всичко влияят на процеса на имбибиция на

семената, което е свързано с активиране на механизми на поглъщане на вода отвън и може да се свърже освен с механично навлизане, но и на активиране на метаболитно активни аквапори. Водата в клетките активира на редица метаболитни процеси и води до кълнене (McDonald, 1999). На първо място е активирането на въгледрият метаболитизъм с оглед разграждане на резервни скорбелни зърна до ниско молекулни захари, които могат да се окисляват и доставят на семето въглеродни скелети - енергия и редуктори, под формата на АТФ и НАДН. Това става в отсъствие на фотосинтеза, тъй като тези процеси протичат на тъмно. Така се активират ензимни синтези и гени за синтеза на белтъци. Те повлияват и редица антистресови синтези, като тези на свободния пролин, който е един първите продукти на регулатор на осмотичното налягане в семената. В същото време пролина е и защитна молекула на някои мембрани и макромолекули (Shaheed & Abassi, 2014). Фенолите са продукти на вторичния метаболитизъм, но са резултат или от разграждане или от синтеза на нови клетъчни стени, които съдържат лигнин и хемицелулоза

(Simic et al., 2005). Фенолите като инхибитори могат да играят и антибактериална и антимицотна функция на защита на семената, ако се излъчват в апопластта (Simic et al., 2005; Zagorchev et al., 2013). Най-важна роля за окислително-редукционното равновесие на семената играят свободните тиолни групи, които са основно продукт на метаболизма на глутатиона (Dell Aquilla, 1994). Всички тези процеси повлияват защитните сили на семената и намаляват нивото на окислителния стрес, предизвикан от ускореното стареене. Като цяло най-важната функция на екзогенни ЦТК е да активира някои ензимни системи на ниво транскрипция и трансляция, за да активират метаболитни промени водещи до преодоляване на антиоксидативния стрес от реактивните форми в семената, образувани при стареенето.

ИЗВОДИ

1. Установено е, че моделираното ускорено стареене от 72 часа (3 дни) при семена от обикновена зимна пшеница предизвиква значително намаляване на кълняемата енергия, кълняемостта и жизнеността на семената.

2. Моделираното ускорено стареене (72 часа) увеличава съдържанието на малондиалдехид и водороден пероксид в семената и предизвиква по-интензивно изтичане на електролити, което е признак за увеличени окислителни процеси в семената.

3. Пред-третирането на семена с 10mg/l разтвори на кинетин и 6-БА за 24 часа преди прилагане на тест за ускорено стареене намалява окислителните процеси в семената по съдържание на малондиалдехид и водороден пероксид и повишава кълняемостта и растежа на колеоптилите при двата сорта пшеница спрямо варианта ускорено стареене.

4. Пред-третирането с 10mg/l разтвори на кинетин и 6-БА за 24 часа има сортов ефект върху кълняемата енергия и кълняемостта на семена от пшеница, като това се свързва с продуктивността и модерността на сорта.

5. Доказано е, че пред-третирането с 10 mg/l разтвори на кинетин и 6-БА за 24 часа преди прилагане на ускорено стареене от 72 часа има положителен антистресов и антиоксидативен ефект върху растежа на колеоптилите от пше-

ница, което е свързано с повишеното съдържание на пролин, свободни феноли и тиолови групи в тъканите на колеоптилите.

Благодарности

Тази работа беше извършена с финансовата подкрепа на Фонд научни изследвания (ФНИ) към МОН за конкурс за фундаментални научни изследвания на млади учени и постдокторанти по договор № КП-06-М26/2 „Изследване антистресовото действие на някои растежни фактори върху жизнеността на семена, съхранявани при ниски температури“ от 2018 година.

Acknowledgements

This study was carried out with the financial support of the Bulgarian National Science Fund (BNSF) by the Ministry of Education and Science to the project №КР-06-М26/2 “Study of anti-stress effect of some growth factors on seeds stored in low temperatures from 2018.

ЛИТЕРАТУРА

- Agaska-Moldoch, M., Abdul Rehman Arif, M., Lohwasser, U., Doroszewska, T. C., Qualset, C., & Börner, A. (2016) The inheritance of wheat grain longevity: a comparison between induced and natural ageing, *Journal Appl Genetics*, 57,477-481.
- Afzal, I., Basra, S. M. A., Ahmad, N., Cheema, M A., Haq, M. A., Kazmi, M. H., & Irfan, S. (2011). Enhancement of antioxidant defense system induced by hormonal priming in wheat. *Cereal Research Communications* 39, (3), 334-342.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001), The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Cell Environ.*, 24, 1337-1344.
- Bailly C., (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14, 93–107.
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., & Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies*, 33, 806–814.
- Banowitz, G. M., Ammar, K., & Chen, D. D. (1999). Post-anthesis temperatures influence cytokinin accumulation and wheat kernel weight, *Plant Cell Environ.*, 22, 309-316.
- Bates, L., Waldern, S. R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39, 205-207.
- Beadle, C. L. (1993). Growth Analysis. In: *Photosynthesis and Production in a Changing Environment: A Field and Laboratory Manual*, 36-46, Hall, D.O., Scurlock,

- J.M.O., Bolharnordenkampfh, R., Leegood, R.C. and Long, S.P., Eds., Chapman and Hall, London.
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K V.** (2003). Antioxydants, oxidative damage, and oxygen deprivation stress. *Rev. Ann. Bot.*, 91, 179-194.
- Chamurliisky, P., & Stoyanova, S.** (2012). Ex situ storage of germplasm of common wheat (*T.Aestivum L.*) during past 10 years in selection collection. *Agrarni nauki*, 4, (11), 157- 163. (Bg).
- Coolbear, P.** (1995). Mechanisms of seed deterioration; In *Seed Quality: Basic mechanisms and agricultural implications*, 223–277, (eds). AS Basra (Food Product Press, New York).
- Cossani, C. M., & Reynolds, M .P.** (2012). Physiological traits for improvement heat tolerance in wheat. *Pl. Physiol.*, 160, 561-575.
- Davies, M. J.,** (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1703, 93–109.
- Dell Aquilla, A.** (1994). Wheat seed ageing and embryo protein degradation . *Seed Sci Research*, 4, (3), 293-298.
- Desheva, G.** (2016). The longevity of crop seeds stored under long-term conditions in natural gene bank of Bulgaria. *Agriculture*, 62, (3), 90-100.
- Edreva, A., & Hadzhiyska, E.** (1984). About determination of sulfhydryl (thiols) groups content in plant tissues. *Fiziologiya na rasteniyata*, 10(3), 73-83. (Bg).
- Elman, G. L.** (1959). Tissue sulfhydryl groups, *Archives of Biochem. And Biophys.* 82, 70-75.
- Gill, S. S., & Tuteja, N.** (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
- Gregersen, P. L., Holm, P. B., & Krupinska, K.** (2008). Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biol.* 10, 37–49. doi: 10.1111/j.1438-8677.2008.00114.x.
- Halmer, P., & Bewley, J. D.** (1984). A physiological perspective on seed vigor testing. *Seed Sci. Technol.* 12, 561-575.
- Hampton, J G., TeKrony, D. M., & the Vigour Test Committee,** (1995). Handbook of vigour test methods, 3rd edn. International Seed Testing Association, Zurich, 117pp.
- Hare, P. D., Cress, W. A., & Staden, J. V.** (1997). The involvement of cytokinins in plant response to environmental stress. *Plant Growth Regula.* 23, 79-103.
- Heath, R. L., & Packer, L.** (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts I Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189-198.
- ISTA** (2008). International rules for seed testing. International Seed Testing Association, Bassersdorf
- Jablonska- Trypuc, M., Matejczyk, R., & Czerpak, P.** (2016). N-6BA and Kinetin Influence autooxidative stress parameters in human skin fibroblasts. *Mol. Cell Biochem.* 413, 97-107.
- Kerchev, P., van der Meerc, T., Sujeethe, N., Verleef, A., Stevensf, C., Van Breusegemc, F., & Gechev, T.** (2020). Molecular priming as an approach to induce tolerance against abiotic andoxidative stresses in crop plants *Biotechnology Advances*, 40, 107503 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107503>
- Lehner. A., Mamadoua, N., Poelsb, P., Comea, D., Baillya, C., & Corbineaua, F.** (2008). Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during ageing in wheat grains. *Journal of Cereal Science*, 47, 555–565.
- McDonald, M B.** (1999). Seed deterioration: Physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*, 27, 177–237.
- Mok, D. W. S., & Mok, M C.** (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev, Plant Physiol Plant Mol Biol.* 52, 89–118. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.89.
- Oenel, A., Fekete, A., Krischke, M., Faul, S., Gresser, G., Mueller, M. J., & Berger, S.** (2017) Enzymatic and non-enzymatic mechanisms contribute to lipid oxidation during seed aging. *Plant and Cell Physiology*, 58(5), 925-933. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx036>
- Premachandra, G.S., Saneoka, H. & Ogata. S.** (1990). Cell membrane stability an indicator of drought tolerance as affected by applied nitrogen in soyabean. *Journal of Agricultural Science*, 115, 63-66.
- Roberts E.H.** (1973) Predicting the storage life of seeds, *Seeds sciences and technology*, 1, 499-514.
- Shaheed, A., & Abase F.** (2014) Biochemical changes during accelerated ageing conditions of mung bean seeds and their field performance. *Sci. papers, Ser. A, Agronomy*, LVII, 325-330.
- Shani, E., Yanai, O., & Ori, N.** (2006). The role of hormones in shoot apical meristem function. *Curr Opin Plant Biol*, 9, 484–489. doi: 10.1016/j.pbi.2006.07.008.
- Simic, A., Sredojevic, S., Todorovic, M., Dukanovic, L., & Damjanovic, M.** (2005). Estimation of total phenolics in soybean exudates and seed quality during accelerated ageing. *Seed Sci. Technol.* 33,761-765.
- Swain., T., & Goldstein J. L.** (1964). The quantitative analyses of phenolic compounds. In: *Methods in polyphenol chemistry*. 131-146, Pridham JB, editor Pergamon Press, Oxford,
- Walters., C., Wheeler, L. M., & Grotenhuis, J. M.** (2005). Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Sciences Research*, 15, 1–20.
- Yang, D., Li, Y. Li, D. Shi, Y. Cui, Zh., Luo, Y. Zheng, M. Chen, J. Li, Y. Jin, Y. & Wang, Zh.** (2016). Exogenous cytokinins increase grain yield of winter wheat cultivars by improving stay-green characteristics under stress. *PLOS, 1*, 1-19.
- Zagorchev, L., Seal, C., Kranner, I., & M.Odjakova, M.** (2013). A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *Int. J. Mol. Sci.* ,14, 7405-7432.
- Zurani, I. S., Khandaker, K., Mat, N., & Boyce, A.** (2015) Effect of hydrogen peroxide on growth, development and quality of fruits. *A review. Journal of Agronomy*, 14(4), 331- 335.
- Zwack, P. J., & Aaron, M.** (2013) Cytokinin inhibition of leaf senescence *Rashotte Plant Signal Behav.* 8(7): e 24737. doi: 10.4161/psb.24737