

IZVORNI ZNANSTVENI RAD

Dinamika otpuštanja elektrolita iz sjemena soje u fazi imbibicije

Miroslav Lisjak¹, Luka Andrić², Tomislav Vinković¹, Aleksandar Stanisavljević¹, Krunoslav Karalić¹, Meri Engler¹, Brigita Popović¹, Marija Špoljarević³, Drago Bešlo¹, Aleksandra Sudarić²

¹Poljoprivredni fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera, Trg Svetog Trojstva 3, 31 000 Osijek, Hrvatska (e-mail: mlisjak@pfos.hr)

²Poljoprivredni institut Osijek, Južno predgrađe 17, 31 000 Osijek, Hrvatska

³Odjel za biologiju, Sveučilište J. J. Strossmayera, Trg Ljudevita Gaja 6, 31 000 Osijek, Hrvatska

Sažetak

Električni konduktivitet je analiziran kod tri kultivara soje, u sjemenu starosti 6 i 18 mjeseci. Dinamika otpuštanja elektrolita iz sjemena tijekom imbibicije je kod ispitivanih kultivara bila slična, pri čemu su vidljive genotipske razlike u konduktivitetu, kao i intenzitetu lipidne peroksidacije u sjemenu. Najveći intenzitet lipidne peroksidacije je u prosjeku za sve kultivare i starosti sjemena utvrđen nakon 3 h imbibicije, što znači da u početnoj fazi imbibicije dolazi do intenzivnog stresa i peroksidacije lipida u sjemenu. Osim vrlo značajnog utjecaja kultivara na ispitivane pokazatelje, starost sjemena je također imala vrlo veliki značaj kao i duljina imbibicije.

Ključne riječi: električni konduktivitet sjemena, imbibicija, lipidna peroksidacija, sjeme, soja

Uvod

Osnovni preduvjet klijanja sjemena koje se nalazi u fazi mirovanja je usvajanje dovoljne količine vode za hidrataciju protoplazme i pokretanje staničnog metabolizma. Imbibicijsko oštećenje sjemena leguminoza je klasičan problem u poljoprivredi i proizvodnji hrane (Koizumi i sur., 2008.), koje se javlja kod nepravilnog usvajanja velike količine vode od strane radikule, hipokotila i kotiledona. U fazi imbibicije, biokoloidi sjemena bubre uz povećanje metaboličke aktivnosti, pri čemu se hidratacija tkiva treba odvijati kontrolirano. Smanjena klijavost i povećan električni konduktivitet (EC), se povezuju s poremećajima strukture i funkcije staničnih membrane u sjemenu, a biokemijski procesi lipidne peroksidacije se smatraju primarnim uzrokom oštećenja sjemena soje uslijed njegovog starenja tijekom skladištenja (Halistones i Smith, 1988.; Ferguson i sur., 1990.; Sung i Chiu, 1995.). Test električnog konduktiviteta sjemena je priznat kao jedan od najboljih testova za ocjenu gubitka integriteta staničnih membrane te posljedične koncentracije elektrolita oslobođenih iz sjemena tijekom imbibicije (Carvalho i Marcos Filho, 2002.). Općenito, viša vrijednost EC ukazuje na veći stupanj oštećenja membrana u sjemenu, što može biti povezano s procesom lipidne peroksidacije, uslijed okolišnog stresa u fazi zriobe i tijekom skladištenja, mehaničkim ili imbibicijskim oštećenjima te prirodnim starenjem sjemena (Andrić i sur., 2008). U ovom istraživanju je ispitivana povezanost procesa lipidne peroksidacije s dinamikom otpuštanja elektrolita (test električnog konduktiviteta sjemena) tijekom imbibicije sjemena soje, uz testiranje značajnosti utjecaja kultivara i starosti sjemena.

Materijal i metode

U istraživanju je korišteno sjeme tri kultivara soje (Vita, Tisa i Podravka 95) staro 6 i 18 mjeseci tj. proizvedeno 2006. i 2007. godine na Poljoprivrednom institutu u Osijeku te uskladišteno u uvjetima otvorenog skladišta. Električni konduktivitet (EC) sjemena soje utvrđen je po metodi Hampton i TeKrony (1995.). EC je mjereno konduktometrom nakon 3, 6, 12 i 24 h od postavljanja pokusa i izražen po gramu početne mase sjemena. Za svako mjerenje pripremljen je set od četiri repeticije po 50 zrna soje. U istim uzorcima, nakon utvrđivanja EC, analiziran je intenzitet lipidne peroksidacije u odvojenim klicama, sjemenjači i kotiledonima sjemena, iz čega je izračunata prosječna vrijednost. Lipidna peroksidacija (LP) je utvrđena kao količina produkata lipidne peroksidacije koji reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) prema postupku Heath i Packer (1968.). Dobiveni rezultati su obrađeni trofaktorijalnom analizom varijance (faktor A – kultivar, B – godina proizvodnje ili starost sjemena, C – sati imbibicije).

Rezultati i rasprava

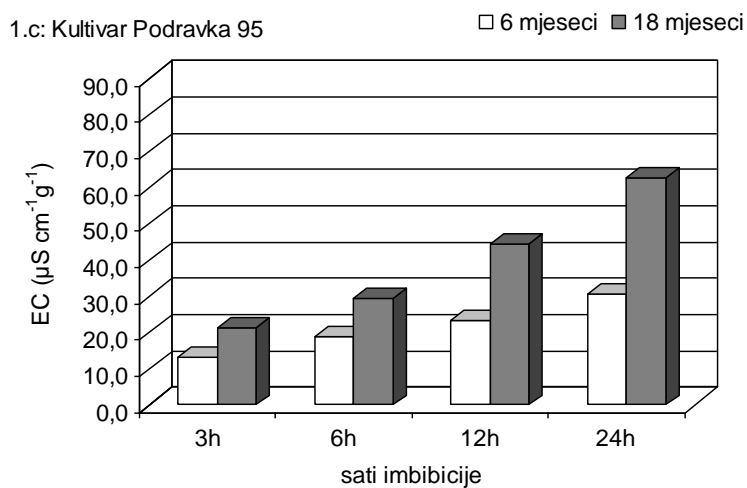
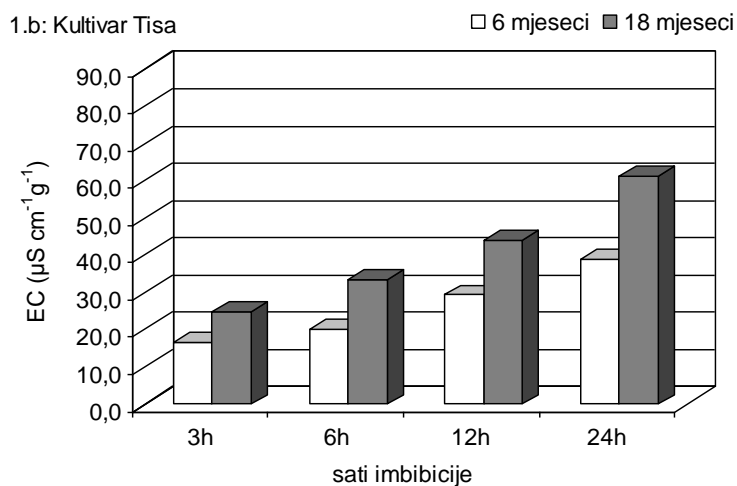
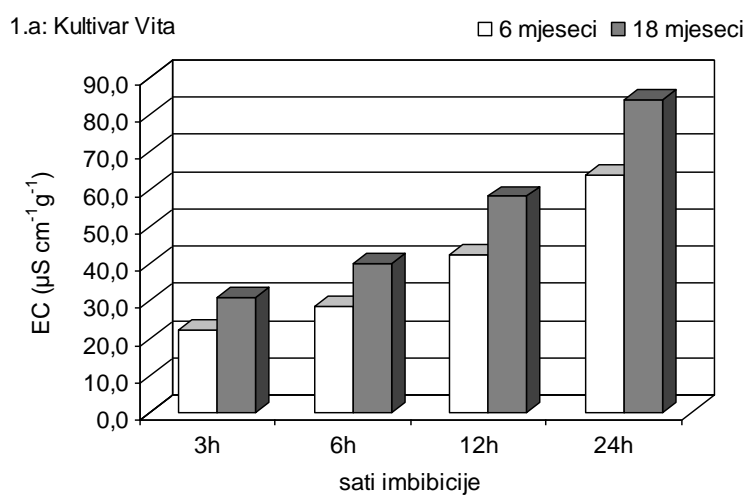
Test konduktiviteta sjemena reflektira oba glavna uzroka niskog vigora kod zrnatih leguminoza: starenje sjemena i imbibicijsko oštećenje, pri čemu su membrane čiji je integritet smanjen starenjem sjemena podložnije fizičkom oštećenju uslijed brze imbibicije (Powell, 1998.). U ovom istraživanju, starije sjeme (proizvedeno 2006. godine) je imalo znatno veći prosječni konduktivitet i ujedno značajno veći intenzitet lipidne peroksidacije u fazi imbibicije (Tablica 1.), čiji su mogući uzroci oštećenje sjemenjače, destrukcija staničnih membrana uslijed starenja sjemena tijekom skladištenja i/ili smanjeni potencijal obrane od oksidacijskog stresa uslijed imbibicije u starijem sjemenu.

Tablica 1. Dinamika električnog konduktiviteta (EC, $\mu\text{Scm}^{-1}\text{g}^{-1}$ sjemena) soje i lipidne peroksidacije (LP, nM g^{-1} sjemena) tijekom imbibicije sjemena u vodi, prosječno za kultivare, starost sjemena i trajanje imbibicije.

	Kultivar			Starost sjemena		Sati imbibicije			
	Vita	Tisa	Podravka 95	6 mj.	18 mj.	3	6	12	24
EC	46,26 ^a	33,55 ^b	30,47 ^c	28,99 ^b	44,53 ^a	21,48 ^a	28,43 ^b	40,21 ^c	56,92 ^d
LP	11,91 ^a	8,71 ^b	9,62 ^b	9,64 ^b	10,52 ^a	11,58 ^a	9,55 ^b	9,93 ^b	9,25 ^b

(a,b,c,d – prosjeci tretmana označeni različitim slovima razlikuju se prema $\text{LSD}_{P \leq 0,01}$)

Panobianco i sur. (2007.) zaključuju da je oslobađanje većih količina elektrolita iz sjemena graška u njihovom istraživanju bilo povezano s nižim fiziološkim potencijalom, ukazujući na veći intenzitet dezorganizacije staničnih membranskih sustava. Najveći intenzitet lipidne peroksidacije je u prosjeku za sve kultivare i starosti sjemena utvrđen nakon 3 h namakanja sjemena u vodi, nakon čega se nije značajnije mijenjao, što znači da u prvim satima imbibicije dolazi do intenzivnog stresa i peroksidacije lipida u sjemenu. Sjeme kultivara Vita proizvedeno 2006. godine je imalo ukupno najveći intenzitet lipidne peroksidacije ($14,74 \text{ nM g}^{-1}$) izmjeren nakon tri sata imbibicije (podaci nisu prikazani), uz najveći početni EC ($30,85 \mu\text{Scm}^{-1}\text{g}^{-1}$, Grafikon 1a), i ukupni EC nakon 24 h imbibicije ($84,04 \mu\text{Scm}^{-1}\text{g}^{-1}$, Grafikon 1a).



Grafikon 1.a-c: Dinamika električnog konduktiviteta sjemena tijekom imbibicije kod tri kultivara soje ovisno o starosti sjemena (6 i 18 mjeseci).

McDonald (1988.) navodi da intaktna sjemenjača usporava ulazak vode u klicu, kotiledone i cijelo sjeme u prvih osam sati imbibicije. U istraživanju Modi i McDonald (1999.), povećanje ispiranja tvari iz sjemena soje je utvrđeno do trenutka probijanja sjemenjače radikulom, tj. trend ispiranja nije bio linearan. Prema rezultatima Meyer i sur. (2007.), imbibicija sjemena soje se odvija u dvije faze. U početnoj, koja se odvija relativno sporo, dolazi do hidratacije sjemenjače, nakon čega slijedi rapidno upijanje vode kao rezultat hidratacije kotiledona. Prema Kühn i Borchert (2002.), uslijed oksidacije lipidnog dvosloja u biomembranama one mogu izgubiti svoju ulogu barijere, čime postaje ugrožen integritet staničnih organela i cijele stanice.

Kod navedenog kultivara, konačna vrijednost konduktiviteta kod sjemena iz 2007. godine je bila na razini ostala dva kultivara, ali starog sjemena, proizvedenog 2006. godine (Grafikon 1.a - c). Kod sva tri kultivara je dinamika ispiranja elektrolita tijekom 24-satne imbibicije bila slična, s tom razlikom da su najmanje vrijednosti konduktiviteta utvrđivane kod kultivara Podravka 95, osim u varijanti nakon 24 sata imbibicije starog sjemena. Osim vrlo značajnog utjecaja kultivara na oba ispitivana pokazatelja (F-test; $P \leq 0,01$), starost sjemena je također imala vrlo veliki značaj kod EC (F-test; $P \leq 0,01$), a duljina imbibicije na oba pokazatelja (F-test; $P \leq 0,01$). Na oba ispitivana pokazatelja su također značajno utjecale interakcije glavnih faktora, (za EC: A*C i B*C na razini $P \leq 0,01$; A*B*C na razini $P \leq 0,05$; za LP: A*C na razini $P \leq 0,01$; A*B na razini $P \leq 0,05$).

Unatoč tome što prosječne vrijednosti ispitivanih pokazatelja upućuju na njihovu povezanost na morfo-fiziološkoj razini, između njih nije utvrđena statistički značajna korelacija. Obzirom da su izmjerene vrijednosti konduktiviteta kumulativne, tj. temelje se na količini ispranih elektrolita iz sjemena tijekom određenog razdoblja imbibicije, a intenzitet lipidne peroksidacije predstavlja koncentraciju produkata ovog procesa u trenutku analize, takva statistički slaba međusobna zavisnost nije nelogična. Također, potrebno je naglasiti da proces lipidne peroksidacije može obuhvatiti i druge molekule lipida, koji ne sudjeluju u građi staničnih membrana. Stoga, smatramo da bi bilo interesantno detaljnije analizirati ovaj fiziološki proces na staničnoj razini te druge aspekte metabolizma sjemena u fazi imbibicije, a naročito kemijski sastav tvari koje se ispiru iz sjemena.

Zaključak

Osim vrlo značajnog utjecaja kultivara na konduktivitet sjemena i intenzitet lipidne peroksidacije u sjemenu soje tijekom 24-satne imbibicije u vodi, starost sjemena je također imala vrlo veliki značaj kao i duljina imbibicije. Najveći intenzitet lipidne peroksidacije je u prosjeku za sve kultivare i godine proizvodnje sjemena utvrđen nakon 3 h namakanja sjemena u vodi, nakon čega se nije značajnije mijenjao, što znači da u prvim satima imbibicije dolazi do intenzivnog stresa i peroksidacije lipida u sjemenu. Kod sva tri kultivara je dinamika ispiranja elektrolita tijekom 24-satne imbibicije bila slična, međutim, konačne vrijednosti konduktiviteta ukazuju na genotipske razlike u vigoru sjemena.

Literatura

- Andrić L., Bešlo D., Plavšić H. (2008). Lipid peroxidation and proline content in soybean seedlings under influence of germination conditions. *Cereal Research Communications*. 36(Suppl. 5): 1035-1038
- Carvalho N. M., Marcos Filho J. (2002). Potassium leakage and maize seed physiological potential. *Scientia Agricola*. 59(2): 315-319
- Ferguson J. M., TeKrony D. M., Egli D. B. (1990). Changes during early soybean seed and axes deterioration: II. Lipids. *Crop Sciences*. 30: 179-182

- Halistones M. D., Smith M. T. (1988). Lipid peroxidation in relation to declining vigour in seed of soya (*Glycine max* L.) and cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Plant Physiology*. 133: 452-456
- Hampton J. G., TeKrony D. M. (1995). *Handbook of Vigour Test Methods*. ISTA, 3rd Edition: 117 p
- Heath R. L., Packer L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I - Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics*. 125: 189-198
- Koizumi M., Kikuchi K., Isobe S., Ishida N., Naito S., Kano H. (2008). Role of seed coat in imbibing soybean seeds observed by micro-magnetic resonance imaging. *Annals of Botany*. 102: 342-353
- Kühn H., Borchert A. (2002). Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 33(2): 154-172
- McDonald M. C. (1988). Seed Coat Regulation of Soybean Seed Imbibition. *Crop Sciences*. 28: 987-992
- Meyer C. J., Steudle E., Peterson C. A. (2007). Patterns and kinetics of water uptake by soybean seeds. *Journal of Experimental Botany*. 58(3): 717-732
- Modi A. T., McDonald M. B. (1999). Differential leakage of substances from two soybean genotypes during imbibition is influenced by seed coat pore characteristics. *Acta Horticulturae*. 504:161-176
- Panobianco M., Vieira R. D., Perecin D. (2007). Electrical conductivity as an indicator of pea seed ageing of stored at different temperatures. *Scientia Agricola*. 64(2): 119-124
- Powell A. A. (1998). Seed improvement by selection and invigoration. *Scientia Agricola*. 55: 126-133
- Sung, J. M., Chiu, C. C. (1995). Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. *Plant Sciences*. 110: 45-52

Soybean seed leakage dynamics during imbibition

Abstract

The seed electrical conductivity was analyzed in three soybean cultivars, using 6 and 18 months old seed. The seed leakage dynamics during the imbibition was similar in tested cultivars, with apparent genotypic differences in seed conductivity and lipid peroxidation rate of imbibed seed. The highest lipid peroxidation intensity, considering all cultivars and seed age, was observed after 3 hours of imbibition, meaning that intensive stress and lipid peroxidation occurs in the initial stage of imbibition. The seed age and imbibition period, as well as cultivar influences were highly significant for the evaluated parameters.

Key words: electrical conductivity, imbibition, lipid peroxidation, seed, soybean