

## BIOHEMIJSKE PROMENE TOKOM STARENJA SEMENA SOJE

BALEŠEVIĆ-TUBIĆ SVETLANA, TATIĆ M.,  
ĐORĐEVIĆ V., ĐUKIĆ V., KOSTIĆ M.<sup>1</sup>

*IZVOD: Biohemijske promene koje se dešavaju u semenu tokom starenja veoma su značajne u pogledu kvaliteta i životne sposobnosti semena, što je posebno važno kod semena sa višim sadržajem lipida. Za ova istraživanja korišćeno je seme šest sorti soje Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad koje je podvrgnuto veštačkom i prirodnom starenju u kontrolisanim i redovnim skladišnim uslovima. Ispitivan je sadržaj malonilaldehida, kao pokazatelja inteziteta lipidne peroksidacije, kao i aktivnost antioksidantnih enzima. Starenje semena, kako veštačko tako i prirodno, prouzrokovalo je pojavu biohemijskih procesa, odnosno lipidne peroksidacije, kao i smanjenje aktivnosti superoksid-dizmutaze i peroksidaze, što je bilo posebno izraženo primenom veštačkog starenja. Na stepen oštećenja i sposobnost semena da se odupre negativnim posledicama starenja imali su uticaja pored dužine perioda starenja, način čuvanja, kao i karakteristike semena ispitivanih sorti soje.*

**Ključne reči:** starenje, lipidna peroksidacija, seme, soja, superoksid-dizmutaza, peroksidaza

UVOD: Pod uticajem nepovoljnih uslova sredine, kao i čuvanja semena, može doći do oksidacionog stresa u biljnom tkivu i nastanka superoksidnog radikala, vodonik peroksida i hidroksilnog radikala, koji su najaktivniji, toksični i destruktivni proizvodi oksidacionog stresa (Smirnoff, 1993). Lipidna peroksidacija je oksidativno oštećenje koje zahvata ćelijske membrane, lipoproteine i druge molekule koji sadrže lipide, u uslovima postojanja oksidativnog stresa. Jednom započeta reakcija

lipidne peroksidacije se nastavlja autokatalitički, ima progresivan tok i dovodi do strukturno-funkcionalnih promena supstrata (Popović, 2006). Najreaktivnije amino kiseline, osetljive na oksidativna oštećenja, po stepenu reaktivnosti su: cistein, histidin, triptofan, metionin i fenilalanin (Larson, 1997; Đorđević i sar., 2000).

Tokom starenja u semenu soje dolazi do biohemijskih promena koje bitno utiču na kvalitet i životnu sposobnost semena. Hemijski sastav semena soje (20-22% ulja) omogućuje

---

Originalni naučni rad (Original scientific paper)

<sup>1</sup> Dr Svetlana Balešević-Tubić, viši naučni saradnik, svetlana.tubic@ifvcns.ns.ac.rs, dr Mladen Tatić, naučni saradnik, mr Vuk Đorđević, istraživač saradnik, mr Vojin Đukić, istraživač saradnik, dipl. inž Miladin Kostić, viši stručni saradnik

nastajanje specifičnih procesa, često vrlo degradativne prirode. Autooksidacija lipida i povećanje sadržaja slobodnih masnih kiselina za vreme skladištenja, najčešće su u literaturi navođeni razlozi za brže oštećenje semena uljanih biljnih vrsta (Lekić, 2003).

Procesi koji se odnose na peroksidaciju dovode do promena koje ubrzavaju proces starenja semena, tako da bi njihovo uklanjanje ili smanjenje pozitivno uticalo na životnu sposobnost semena (McDonald, 1999). Pored citotoksičnosti pojedini slobodni radikali, u zavisnosti od koncentracije u kojoj se nalaze, imaju i ulogu signalnih molekula u biohemijskom odgovoru biljaka u uslovima oksidativnog stresa, prouzrokovanog uticajem različitih činioca spoljne sredine (Delaunau et al., 2000; Lalo i et al., 2004). U istraživanjima većeg broja autora posvećena je posebna pažnja enzimskim aktivnostima, zbog njihove moguće upotrebe kao značajnih indikatora životne sposobnosti ili dugovečnosti semena. Aktivnost sistema detoksikacije slobodnih radikala, prema Reuzeau i Cavalie (1995), semena suncokreta čuvanog na 10 °C i 25 °C bila je u korelaciji sa klijavošću semena. Prema Pristley (1986) u ostarelom semenu obim enzimskih aktivnosti je prisutan u veoma niskom nivou.

Cilj ovih istraživanja bio je da se ustanovi uticaj starenja na biohemijske promene u semenu ispitivanih sorti soje i mogućnost predviđanja brzine propadanja semena tokom skladištenja.

### **Materijal i metode**

Za ispitivanje je korišćeno seme šest sorti soje Instituta za ratarstvo i

povrtarstvo, Novi Sad, koje je podvrgnuto veštačkom i prirodnom starenju.

**Veštačko starenje:** Seme je stavljeno u metalne posude, na metalnu rešetku, u vodeno kupatilo na temperaturi od 42 °C i relativnoj vlažnosti vazduha od 100%. Ispitivanja su vršena nakon tri i pet dana trajanja testa.

**Prirodno starenje:** Seme je čuvano na dva načina. Prvi način je bio čuvanje semena u hladnoj komori (kontrolisani uslovi čuvanja) na temperaturi od 4 °C i 80 do 85% relativne vlažnosti vazduha, a drugi način čuvanja bio je u redovnim skladišnim uslovima. Ispitivanje je vršeno nakon šest i 12 meseci skladištenja.

Ekstrakcija malondialdehida (MDA) iz semena soje vršena je pomoću smeše tiobarbiturne (TBA), trihlorsirćetne ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) i perhlorne ( $\text{HClO}_4$ ) kiseline, a koncentracija je određivana spektrofotometrijski na 532 nm (Matkovics et al., 1989). Seme soje (0,5 g) homogenizovano je u avanu sa 4,5  $\text{cm}^3$  rastvora za ekstrakciju MDA i inkubirano u vodenom kupatilu, na temperaturi od 90 °C, 20 minuta. Posle inkubacije, rastvori su ohlađeni i centrifugirani 10 minuta na 5500 o/min. Koncentracija MDA, odnosno intezitet lipidne peroksidacije izražen je u nmol MDA  $\text{g}^{-1}$  sveže mase.

Za određivanje aktivnosti superoksid-dizmitaze (SOD) i peroksidaze (Px) korišćen je ekstrakt dobijen iz 1 g svežeg biljnog materijala (seme soje) i 5 ml 0,1 M fosfatnog pufera pH 7. Isti ekstrakt korišćen je i za određivanje sadržaja proteina u semenu, zbog izražavanja aktivnosti ispitivanih enzima. Dobijeni homogenat centri-

fugiran je na 4500 o/min na temperaturi od 5 °C u trajanju od 10 minuta.

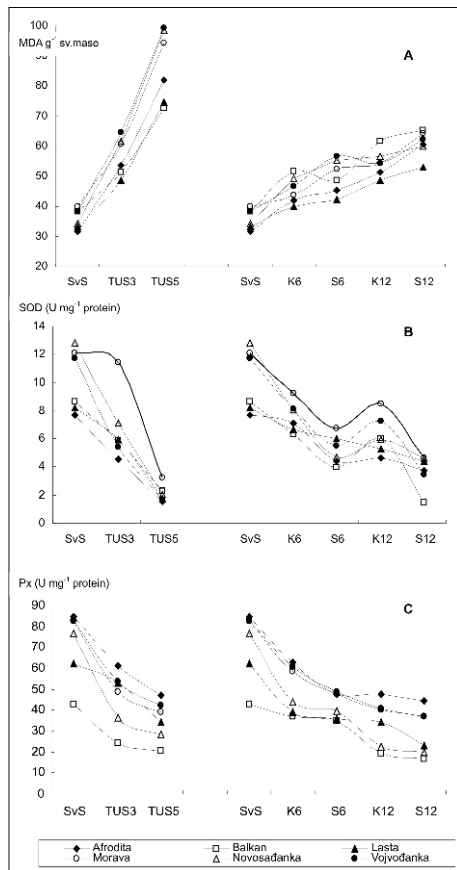
Aktivnost SOD [U mg<sup>-1</sup> (protein)] utvrđena je spektrofotometrijskom metodom, prema Misra i Fridovics (1972), na osnovu reakcije autooksidacije adrenalina do adenohroma. Promena absorbancije rastvora adrenalina merena je na 480 nm u karbo-natnom puferu pH 10,2.

Aktivnost Px [U mg<sup>-1</sup> (protein)] određivana je na osnovu transformacije gvajakola u tetra gvajakol i merenjem promene absorbancije na 436 nm u fosfatnom puferu pH 7 (Matkovic et al., 1989).

**Statistika:** Aktivnosti enzima i količina MDA predstavljena je kao aritmetička sredina najmanje tri ponavljanja, za svaku sortu i tretman. Koeficijenti korelacije, između ispitivanih parametara, izračunati su združeno za sorte i tretmane, a zatim je testirana njihova značajnost.

## Rezultati i diskusija

Intenzitet lipidne peroksidacije povećavao se tokom prirodnog starenja semena soje. Utvrđeno je da je nakon šestomesečnog skladištenja semena došlo do vrlo značajnog povećanja sadržaja MDA u semenu većine ispitivanih sorti kako u kontrolisanim, tako i u konvencionalnim skladišnim uslovima. U ovom periodu najviši sadržaj MDA utvrđen je u semenu sorti Vojvođanka i Novosađanka, u varijanti konvencionalnim skladišnim uslovima. Najniži sadržaj MDA utvrđen je u semenu sorti Lasta i Afrodita u varijanti čuvanja semena u kontrolisanim uslovima (Graf. 1A).



Graf. 1. Intenzitet lipidne peroksidacije (MDA) i aktivnost superoksid-dizmutaze (SOD) i peroksidaze (Px) tokom veštačkog i prirodnog starenja semena soje (SvS-sveže seme, TUS-test ubrzanog starenja 3 i 5 dana, K-komora (kontrolisani uslovi) i S-konvencionalni skladišni uslovi, nakon 6 i 12 meseci)

Fig. 1. Lipid peroxidation (LP) and activity of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (P) during accelerated and natural aging of soybean seed (SvS-fresh seed; TUS-accelerated aging after 3 and 5 days; K-controlled conditions and S-conventional storage conditions, after 6 and 12 months)

Nakon 12 meseci prirodnog starenja u semenu svih ispitivanih sorti nastavljen je trend porasta sadržaja MDA u obe varijante čuvanja semena. Ipak najniži intenzitet lipidne peroksidacije utvrđen je ponovo u semenu sorti Lasta i Afrodita, u kontrolisanim uslovima čuvanja, dok je u konvencionalnim skladišnim uslovima najniži intenzitet lipidne peroksidacije utvrđen u semenu sorti Lasta i Novosađanka. Najviši sadržaj MDA u semenu ustanovljen je kod sorti Balkan i Morava u obe varijante čuvanja.

Dobijenim rezultatima potvrđena je mogućnost određivanja stepena lipidne peroksidacije u semenu preko utvrđivanja sadržaja derivata malonildialdehida (MDA). Ovu konstataciju potvrđuju u svojim istraživanjima Sung i Jeng (1994), koji navode da je u embrionu i kotiledonima semena kikirikija podvrgnutog veštačkom starenju, nakon tri dana došlo do značajnog povećanja MDA, što potvrđuje da je bila povećana i lipidna peroksidacija. Zbog postojanja razlika između sorti može se zaključiti da i genotipske osobine semena imaju uticaja na peroksidativne promene tokom njegovog čuvanja. Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima koje su dobijali drugi istraživači koji su se bavili izučavanjem oštećenja semena tokom starenja. Tako, Wilson i McDonald (1986) ističu da je osetljivost semena na peroksidativne promene različita u zavisnosti od sastava masnih kiselina u semenu. Takođe rezultati Malenčić i sar. (2003) govore u prilog tezi da se lipidna peroksidacija može uzeti kao jedan od indikatora osetljivosti pojedinih genotipova soje na pojavu oksidativnog stresa.

Primenom tretmana veštačkog starenja semena nakon tri i pet dana došlo je do značajnog povećanja intenziteta lipidne peroksidacije u semenu svih ispitivanih sorti, a najviši sadržaj MDA bio je nakon petog dana veštačkog starenja. Ekstremni uslovi kao što su 40 °C i 100% relativne vlažnosti vazduha, dovode do veoma izražene peroksidativne degradacije lipida u semenu u veoma kratkom roku. Peroksidaciju nezasićenih masnih kiselina navode Bewley i Black (1982) u svojim istraživanjima starenja semena soje čuvanog na visokoj temperaturi i relativnoj vlažnosti vazduha. Dobijeni rezultati su u skladu sa zaključcima koje iznose i drugi autori u svojim istraživanjima na soji, ali i drugim biljnim vrstama (Buchvarov i Gantcheff, 1984; Gidrol et al., 1989).

Pri ekstremnim uslovima starenja (veštačko starenje) procesi lipidne peroksidacije u semenu mnogo su intenzivniji nego tokom prirodnog starenja semena. Na osnovu rezultata iznetih u ovom radu, uočava se mogućnost predviđanja stepena lipidne peroksidacije u semenu tokom čuvanja primenom testa ubrzanog starenja. Poređenjem veštačkog i prirodnog starenja ustanovljeno je da je sadržaj MDA u semenu posle testa ubrzanog starenja u trajanju tri dana bio približno jednak sadržaju MDA u semenu čuvanom 12 meseci.

Aktivnost SOD opadala je tokom prirodnog starenja semena (Graf. 1B). Utvrđeno je da je nakon šestomesečnog čuvanja semena došlo do značajnog i vrlo značajnog opadanja aktivnosti SOD u semenu svih ispitivanih sorti kako u kontrolisanim, tako i u konvencionalnim skladišnim uslovima, u odnosu na aktivnost SOD

u svežem semenu. Nakon 12 meseci prirodnog starenja u semenu svih ispitivanih sorti nastavljen je trend opadanja aktivnosti SOD u obe varijante čuvanja semena. Najniža aktivnost ovog enzima utvrđena je u semenu sorti Balkan i Novosađanka, u obe varijante čuvanja. Najviša aktivnost SOD u semenu ustanovljena je kod sorti Afrodita, Vojvođanka i Morava u obe varijante čuvanja. Razlika između ovih najviših i najnižih utvrđenih vrednosti za aktivnost SOD u prirodno ostarenom semenu bila je značajna.

U uslovima oksidativnog stresa SOD se javlja kao regulator uticaja spoljašnjih uslova na jačinu stresa u biljnim ćelijama (Scandalos, 1993). Puntarulo i Boveris (1990) su zabeležili povećanje aktivnosti SOD pri bubrenju kod svežih embriona semena soje, dok je kod ostarelog semena bila značajno inhibirana. Balešević-Tubić S. i sar. (2005) navode smanjenje aktivnosti SOD u ostarelom semenu suncokreta. Prema Alscher et al. (2002), SOD igra ključnu ulogu u suzbijanju oksidativnog stresa izazvanog različitim uticajima.

Tokom prirodnog starenja semena takođe je utvrđeno opadanje aktivnosti Px. Tako je nakon šestomesečnog čuvanja semena došlo do vrlo značajnog opadanja aktivnosti Px u semenu svih ispitivanih sorti kako u kontrolisanim, tako i u konvencionalnim skladišnim uslovima, u odnosu na aktivnost ovog antioksidantnog enzima u svežem semenu (Graf. 1C). Nakon 12 meseci prirodnog starenja u semenu svih ispitivanih sorti nastavljen je trend opadanja aktivnosti Px u obe varijante čuvanja semena. Prema istraživanjima drugih autora (Dey i Mukherjee, 1986; Puntarulo S. i

Boveris, 1990; Zhang i Kirkham, 1996), tokom prirodnog kao i indukovano starenja semena, takođe dolazi do postepenog smanjivanja aktivnosti peroksidaze.

Primenom testa ubrzanog starenja, aktivnost SOD i Px u semenu značajno je opala kod svih ispitivanih sorti. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima koje navode Anderson i Baker (1983) uočavajući smanjenje aktivnosti SOD u semenu soje podvrgnutom veštačkom starenju.

Izlaganjem semena soje veštačkom i prirodnom starenju, dobijena je vrlo značajna negativna korelacija između sadržaja MDA i aktivnosti SOD u semenu ( $r = -0,43$ ). Utvrđena je i vrlo značajna negativna korelacija između sadržaja MDA i aktivnosti Px u ostarelom semenu ( $r = -0,69$ ). Između aktivnosti dva antioksidantna enzima utvrđena je vrlo značajna pozitivna korelaciona zavisnost ( $r = 0,56$ ). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima koje navodi Balešević-Tubić S. (2001) u ispitivanjima procesa starenja semena suncokreta.

### **Zaključak**

Povećanjem perioda čuvanja semena soje, povećavao se sadržaj malondialdehida (MDA) u semenu, na osnovu čega se može zaključiti da je lipidna peroksidacija bila intenzivnija u ostarelom semenu. Najintenzivnija lipidna peroksidacija bila je posle petog dana testa ubrzanog starenja. Sadržaj MDA u semenu podvrgnutom tri dana veštačkom starenju bio je približno jednak sadržaju MDA u semenu čuvanom 12 meseci u konvencionalnim skladišnim uslovima. Starenjem semena suncokreta opadala je aktivnost supero-

ksid-dizmutaze i peroksidaze, što je bilo posebno izraženo primenom veštačkog starenja.

Poboljšanje genotipskih svojstava sorti soje na delovanje nepovoljnih endogenih i egzogenih činilaca zadatak su oplemenjivača. Kreiranjem novih sorti čije bi seme bilo otpornije

na unutrašnje degradativne promene tokom čuvanja, povećala bi se životna sposobnost i dugovečnost semena soje. Ovo je od izuzetnog značaja kako za semensku proizvodnju, tako i za očuvanje genetske raznovrsnosti ove biljne vrste.

## LITERATURA

- ALSCHER, R.G., ERTURK, N., HEATH, L.S. (2002): Role of super-oxid dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.*, 53: 1331-1341.
- ANDERSON, J.D., BAKER, J.E. (1983): Deterioration of seed during aging. *Phytopathology*, 53: 321-325.
- BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S. (2001): Uticaj procesa starenja na životnu sposobnost i biohemijske promene semena suncokreta. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S., MALENČIĆ, Đ., TATIĆ, M., MILADINOVIĆ, J. (2005): Influence of aging process on biochemical changes in sunflower seed. *Helia*, 28 (42): 107-114.
- BEWLEY, J.D., BLACK, M. (1982): *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination In Two Volumes. 2 Viability, Dormancy and Environmental Control*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York: 48-54.
- BUCHAROV, P., GANTCHEFF, TS. (1984): Influence of accelerated and natural aging on free radical levels in soybean seeds. *Physiol. Plant.*, 60: 53-56.
- DELAUNAU, A., ISNARD, A.D., TOLEDANO, M.B. (2000): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap 1 transcription factor. *EMBO J*, 19: 5157-5166.
- DEY, G., MUKHERJEE, R.K. (1986): Deteriorative change in seeds during storage and its control by hydration-dehydration pretreatments. *Seed Research*, 14: 49-59.
- DORĐEVIĆ, V. B., PAVLOVIĆ, D. D., KOCIĆ, G. M. (2000): Biohemija slobodnih radikala. Medicinski fakultet, Niš str. 308.
- GIDROL, X., SERGHINI, H., NOUBHANI, A., MOCOQUOT, B., MAZLIAK, P. (1989): Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds. I. Lipid peroxidation and membrane damage. *Physiol. Plant.*, 76: 591-597.
- LALOI, C., APEL, K., DANON, A. (2004): Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7: 323-328.
- LARSON, R.A. (1997): *Naturally Occurring Antioxidants*. Lew is Publ. Boca Raton.
- LEKIĆ, S. (2003): Životna sposobnost semena. Društvo selekc. i semen. Srbije, Beograd.
- MALENČIĆ, Đ., POPOVIĆ, M., MILADINOVIĆ, J. (2003): Stress tolerance parameters in different genotypes of soybean. *Biol. Plant.* 46: 141-143.
- MATKOVICS, B., GAŠIĆ, O., VARGA, SZ., ŠTAJNER, D., KRALJEVIĆ-BALALIĆ, M. (1989): The antioxidant enzyme activities in wheat

- seeds and their F1 hybrids, *Cereal Res. Commun.*, 17: 113-119.
- MCDONALD, M.B. (1999): Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Sci. and Technol.*, 27: 177-237.
- MISRA, H.D., FRIDOVICS, I. (1972): The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple measurement for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.*, 247: 3170-3175.
- POPOVIĆ, B. (2006): Uticaj ā- zračenja na antioksidantni sistem odabranih genotipova soje i pojava oksidativnog stresa. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Novi Sad.
- PRIESTLEY, D.A. (1986): Seed aging implications for seed storage and persistence in the soil. Comstock Publishing Associates, A division of Cornell University Press Ithaca and London: 137-165.
- PUNTARULO, S., BOVERIS, A. (1990): Effect of natural and accelerated aging on the hydroperoxide metabolism of soybean embryonic axes. *Plant Sci.*, 68: 27-32.
- REUZEAU, C., CAVALIE, G. (1995): Activities of free radical processing enzymes in dry sunflower seeds. *New Phytol.*, 130: 59-66.
- SCANDIALOS, J.G. (1993): Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.*, 101: 7-12.
- SMIRNOFF, N. (1993): The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.*, 125: 27-58.
- SUNG, J.M., JENG, T.L. (1994): Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. *Physiol. Plant.*, 91: 51-55.
- WILSON, D.O., MCDONALD, M.B. (1986): The lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Sci. and Technol.*, 10: 269-300.
- ZHANG, J., KIRKHAM, M. B. (1996): Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid, and propyl gallate. *J. Plant Physiol.*, 35: 489-493.

## BIOCHEMICAL CHANGES DURING AGING OF SOYBEAN SEED

BALEŠEVIĆ-TUBIĆ SVETLANA, TATIĆ M.,  
ĐORĐEVIĆ V., ĐUKIĆ V., KOSTIĆ M.

### SUMMARY

Biochemical changes that occur in the seed as a result of ageing are very significant for seed quality and longevity. Because of its characteristic composition, processes occurring in the seed of oil crops during storage will be typical as well. Six soybean varieties developed in Institute of field and vegetable crops Novi Sad, submitted to accelerated and natural aging, under controlled and conventional storage conditions were used in these trials. The content of malondialdehyde, superoxide dismutase and peroxidase activities were studied. The biochemical processes i.e. lipid peroxidation, as well as the decrease in

superoxide dismutase and peroxidase activities (especially pronounced by applied accelerated aging) were caused by both type of aging. The degree of seed damage and the ability of seed to resist the negative consequences of aging were influenced, beside duration of aging period, by type of storage and characteristics of soybean varieties.

**Key words:** aging, lipid peroxidation, seed, soybean, superoxide dismutase, peroxidase