


Молекулярно-генетические основы устойчивости семян к окислительному стрессу при хранении

Н.А. Швачко , Е.К. Хлесткина

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

 e-mail: n.shvachko@vir.nw.ru


Аннотация. Сохранение генетического разнообразия растений, в том числе хозяйственно значимых культур, является основой продовольственной безопасности. В мире около 90 % генетического разнообразия культурных растений сохраняется в виде семян в генных банках. В процессе хранения в семенах накапливаются свободные радикалы, в первую очередь активные формы кислорода (АФК). Повышение уровня АФК вызывает окислительный стресс, который негативно влияет на качество семян и может привести к полной потере их жизнеспособности. В обзоре обобщены сведения о биохимических процессах, влияющих на продолжительность жизни семян. Проанализированы данные о деструктивном действии свободных радикалов по отношению к макромолекулам клетки растения и пути устранения избыточного количества АФК в растениях, наиболее важным из которых является аскорбат-глутатионовый путь. Рассматривается вопрос взаимосвязи периода покоя и длительности сохранения семян. В исследованиях на семенах разных видов растений была выявлена отрицательная корреляция между периодом покоя и долголетием семян, тогда как в работах с семенами *Arabidopsis* различные авторы выявили как положительную корреляцию между периодом покоя и длительностью сохранения семян, так и отрицательную. Отрицательная корреляция между периодом покоя и жизнеспособностью, вероятно, свидетельствует о способности семян адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Нами проанализирована информация по генам *Arabidopsis*, связанным с жизнеспособностью семян. В настоящее время выделено значительное количество локусов и генов, влияющих на долголетие семян. Статья знакомит с современными исследованиями жизнеспособности семян ячменя. Локусы количественных признаков (QTL), связанные с долголетием семян ячменя, были определены на хромосомах 2Н, 5Н и 7Н. В изученных областях QTL выявлены гены *Zeo1*, *Ale*, *nud*, *nadp-me* и *HvGR*. Однако вопрос о том, какие гены являются маркерами жизнеспособности семян растений определенного вида, остается открытым. Ключевые слова: семена; ячмень; QTL; гены долголетия семян; генетические маркеры; биохимические маркеры.

Для цитирования: Швачко Н.А., Хлесткина Е.К. Молекулярно-генетические основы устойчивости семян к окислительному стрессу при хранении. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):451-458. DOI 10.18699/VJ20.47-0

Molecular genetic bases of seed resistance to oxidative stress during storage

N.A. Shvachko , E.K. Khlestkina

Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

 e-mail: n.shvachko@vir.nw.ru

Abstract. Conservation of plant genetic diversity, including economically important crops, is the foundation for food safety. About 90 % of the world's crop genetic diversity is stored as seeds in genebanks. During storage seeds suffer physiological stress consequences, one of which is the accumulation of free radicals, primarily reactive oxygen species (ROS). An increase in ROS leads to oxidative stress, which negatively affects the quality of seeds and can lead to a complete loss of their viability. The review summarizes data on biochemical processes that affect seed longevity. The data on the destructive effect of free radicals towards plant cell macromolecules are analyzed, and the ways to eliminate excessive ROS in plants, the most important of which is the glutathione-ascorbate pathway, are discussed. The relationship between seed dormancy and seed longevity is examined. Studying seeds of different plant species revealed a negative correlation between seed dormancy and longevity, while various authors who researched *Arabidopsis* seeds reported both positive and negative correlations between dormancy and seed longevity. A negative correlation between seed dormancy and viability probably means that seeds are able to adapt to changing environmental conditions. This review provides a summary of *Arabidopsis* genes associated with seed viability. By now, a significant number of loci and genes affecting seed longevity have been identified. This review contains a synopsis of modern studies on the viability of barley

seeds. QTLs associated with barley seed longevity were identified on chromosomes 2H, 5H and 7H. In the QTL regions studied, the *Zeo1*, *Ale*, *nud*, *nadp-me*, and *HvGR* genes were identified. However, there is still no definite answer as to which genes would serve as markers of seed viability in a certain plant species.

Key words: seeds; barley; QTL; seed longevity genes; genetic markers; biochemical markers.

For citation: Shvachko N.A., Khlestkina E.K. Molecular genetic bases of seed resistance to oxidative stress during storage. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5): 451-458. DOI 10.18699/VJ20.47-0

Введение

Сохранение генетического разнообразия растений, в том числе хозяйственно значимых культур, является задачей первостепенной важности. С конца прошлого века по всему миру начали создавать генные банки растений. В настоящее время около 90 % образцов сельскохозяйственных культур сохраняется в виде семян в генных банках (Li, Pritchard, 2009; <http://www.fao.org>). Во Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) поддерживается в живом виде более 320 тыс. образцов генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей, из них более 250 тыс. образцов семян сохраняется в Кубанском генбанке, основанном в 1976 г. (Лоскутов, 2009; Силаева, 2012).

Семена представляют собой стадию жизненного цикла, в которой растения испытывают особенно высокий уровень генотоксического стресса, приводящего к нестабильности генома (Waterworth et al., 2011). Старение семян рассматривают как накопление структурных и метаболических повреждений, вызывающих нарушение функций и снижение устойчивости к неблагоприятным внешним условиям, вплоть до потери жизнеспособности (McDonald, 1999; Смоликова, 2014). По поведению при хранении семена классифицируются на ортодоксальные и рекальцитрантные (Walters, 2015). Ортодоксальные семена в конце периода созревания, как правило, теряют воду и высыхают до влажности около 10 %; в таком состоянии они могут храниться многие годы без потери всхожести. Это свойство ортодоксальных семян получило название «устойчивость к высыханию» (desiccation tolerance) (Dekkers et al., 2015). Потеря же воды рекальцитрантными семенами приводит к снижению их всхожести и гибели, поэтому они считаются чувствительными к высыханию (desiccation sensitive). Перед закладкой на хранение в генбанк рекальцитрантные семена в основном не подвергают высушиванию, ортодоксальные же семена высушивают до уровня влажности 5 % и менее или замораживают. Длительность хранения ортодоксальных семян в генбанках, как правило, увеличивается за счет содержания семян при пониженной влажности и температуре (Bewley et al., 2013). Так, семена ячменя сохраняют всхожесть от полугодия до 7–9 лет при температуре воздуха +20 °C и относительной влажности 50 % (Priestley et al., 1985; Nagel, Börner, 2010), тогда как при отрицательной температуре (–18 °C) и влажности 4–8 % сохранение всхожести семян, согласно прогнозируемому расчету, может составить более 80 лет (Walters et al., 2005).

Помимо экологических факторов – влажности, температуры, света, отсутствия патогенных организмов (Schmidt, 2000), скорость старения семян зависит от генетических факторов, определяющих цвет и массу семени, а также

влияющих на активность протекания процессов неферментативного гликирования белков, перекисного окисления липидов, структуру клеточной мембраны, генерацию активных форм кислорода (АФК) и свободных радикалов и их нейтрализацию и другие процессы (Wettlaufer, Leopold, 1991; Ponquett et al., 1992; Khan et al., 1996; Wojtyla et al., 2016; Frolov et al., 2018; Antonova et al., 2019).

Причины снижения всхожести и гибели семян не до конца понятны, поскольку в этом задействовано множество процессов, включая повреждение макромолекул (таких как ДНК, липиды и белки) в результате реакций, вызванных АФК. Данный вопрос изучали многие исследователи. На примерах различных видов растений показано, что скорость, с которой происходит процесс старения семян, зависит от механизмов защиты от стресса и способности семян противостоять изменениям, вызванным АФК. У разных видов растений антиоксиданты по-разному участвуют в устранении избытков АФК. Так, у масличных более высокую роль играют липофильные антиоксиданты (Bailey, 2004; Bahin et al., 2011; Waterworth et al., 2011; Jeevan Kumar et al., 2015; Kong et al., 2015). Исследования, проведенные с использованием материалов генных банков ИРК (Германия) и USDA (США), показали, что продолжительность жизни семян различается не только у разных видов растений, но и у разных генотипов внутри одного и того же вида; при этом межвидовые отличия по длительности хранения семян были выше, чем внутривидовые. Подобные исследования были выполнены для различных видов растений: ячменя, пшеницы, рапса и др. (Walters et al., 2005; Nagel et al., 2009; Nagel, Börner, 2010; Rehman Arif et al., 2017; Rehman Arif, Börner, 2019). Выявленное авторами указанных работ различие в продолжительности жизни семян между генотипами внутри одного и того же вида может служить основой для генетического анализа долголетия семян.

Период покоя и продолжительность жизни семян

Покой семян – это физиологическое состояние, при котором у семян временно отсутствует способность к прорастанию независимо от внешних условий (Николаева, 1982; Николаева, 1999; Baskin J., Baskin C., 2007). Покой является адаптивным признаком, позволяющим семенам пережить длительные периоды неблагоприятных условий (Bewley et al., 2013; Sliwinska, Bewley, 2014). Чтобы оптимизировать прорастание и поддерживать длительные периоды неблагоприятных условий, семена переходят в состояние покоя (Rajjou, Debeaujon, 2008). Регуляция периода покоя семян осуществляется с участием абсцизовой кислоты (АБК) и других биологически активных веществ, таких как фитогормоны гиббереллины, цитокинины и этилен (Nonogaki,

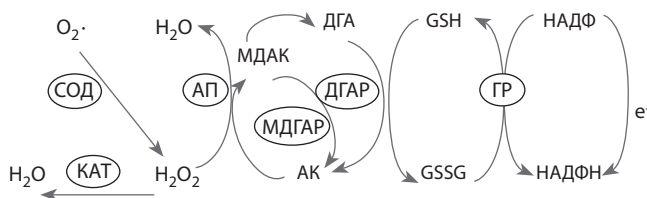
2017). Переход семян в состояние покоя сопровождается значительным увеличением содержания АБК, а выход из покоя, наоборот, связан со снижением содержания АБК.

Вопрос взаимосвязи периода покоя и длительности сохранения семян изучался многими авторами на протяжении десятилетий, и выводы, сделанные в ходе этих исследований, носят противоречивый характер. Так, Clerx с соавторами (Clerx et al., 2004) изучали этот вопрос на растениях *Arabidopsis* с мутациями в определенных путях развития и биохимических путях. Уменьшение продолжительности жизни семян было продемонстрировано ими на мутантах, нечувствительных к абсцизовой кислоте 3 (*abi3*), и на растениях с мутацией, связанной с недостаточной выработкой абсцизовой кислоты 1 (*aba1*). Данные мутации вызывали и сокращение периода покоя семян у *abi3* и *aba1*. Таким образом, авторы предположили положительную корреляцию между долголетием семян и периодом покоя. Miura с коллегами (Miura et al., 2002), исследуя взаимосвязь между периодом покоя и жизнеспособностью семян на рисе, пришли к обратному заключению, что эти два физиологических состояния контролируются различными генетическими факторами. QTL-анализ показал, что локусы долголетия семян расположены на хромосомах 2, 4 и 9, в то время как QTL, связанные с периодом покоя семян, выявлены на хромосомах 1, 3, 5, 7 и 11. Nguyen с соавторами на растениях *Arabidopsis* тоже наблюдали отрицательную корреляцию между продолжительностью жизни семян и периодом покоя (Nguyen et al., 2012). В шести популяциях рекомбинантных инбредных линий (RIL) они выявили пять локусов – *GAAS1-GAAS5*, связанных со способностью прорастания семян после хранения. Обнаружено, что локусы *GAAS* коррелируют с локусами покоя семян, т. е. локусами *DOG*. Корреляция при этом носила отрицательный характер. Детальный анализ QTL *GAAS5* и *DOG1* показал, что локус *DOG1* сокращает продолжительность жизни семян и одновременно увеличивает период их покоя (Nguyen et al., 2012). Гомолог данного гена был аннотирован в работе (Nagel et al., 2019) на хромосоме 3Н ячменя. Авторы в своем исследовании выявили, что локус *DOG1* играет роль в увеличении периода покоя семян ячменя, хотя и менее значимую, чем в случае арабидопсиса.

Таким образом, взаимосвязь между периодом покоя и длительностью сохранения семян трактуется неоднозначно и необходимо дальнейшее изучение данного вопроса. Наличие локусов, которые увеличивают либо продолжительность жизни, либо продолжительность периода покоя семян в пределах одного образца, может обеспечить адаптивную пластичность, что приведет к проявлению оптимального фенотипа в различных условиях окружающей среды.

Биохимические процессы, влияющие на продолжительность жизни семян

В процессе хранения в семенах накапливаются свободные радикалы, в первую очередь активные формы кислорода. Повышение уровня АФК вызывает окислительный стресс. В ходе окислительного стресса в большинстве случаев происходит образование супероксидного анион-радикала (супероксид-радикал, $O_2^{\cdot-}$), который быстро превраща-



Аскорбат-глутатионовый путь: КАТ – каталаза; СОД – супероксиддисмутаза; АП – аскорбатпероксидаза; МДГАР – монодегидроаскорбат-редуктаза; ДГАР – дегидроаскорбатредуктаза; ГР – глутатионредуктаза; АК – аскорбат; МДАК – монодегидроаскорбат; ДГА – дегидроаскорбат; GSSG – окисленный глутатион; GSH – восстановленный глутатион.

ется в другие формы АФК – пероксид водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал (гидроксил-радикал, $\cdot OH$). Повреждения, вызванные свободными радикалами, влекут за собой нарушения целостности генома в ядре, что в свою очередь может стать причиной полной потери жизнеспособности семян (Bailly, 2004; Kranner et al., 2006; Bailly, Kranner, 2011). Действие свободных радикалов и перекисное окисление липидов приводят к деградации структуры мембран и целостности ДНК, а также сопровождаются снижением активности большинства ферментов в клетке. Одной из причин такого снижения активности могут быть разрушение ферментов либо нарушения в работе белок-синтезирующего комплекса под действием свободных радикалов в целом. Для устранения избыточного количества АФК растения имеют универсальный механизм предотвращения окислительного стресса. Важную роль в системе антиоксидантной защиты клетки играют ферменты супероксиддисмутазы (СОД). Основная функция данных ферментов – это превращение супероксидного радикала в H_2O_2 и кислород (Jajic et al., 2015). В клетках растений выявлено три изоформы СОД, которые различаются по металлам, входящим в состав активного центра: Fe-СОД (хлоропласт), Mn-СОД (митохондрии, пероксисомы) и Cu-Zn-СОД (цитоплазма, хлоропласт, пероксисомы). Пероксид водорода, в свою очередь, разлагается под действием каталазы (КАТ), которая находится в глиоксисомах и пероксисомах (Willekens et al., 1995), за исключением митохондриальной изоформы (Scandalios et al., 1997). Глутатионпероксидаза (GPX) также устраняет избыток H_2O_2 и гидропероксидов (Eshdat et al., 1997).

Значительную роль в антиоксидантной защите клетки играет аскорбат-глутатионовый путь Фойер–Холливе-ла–Асада (Bailly, 2004; Foyer, Noctor, 2005) (см. рисунок). В этом цикле восстановление H_2O_2 с образованием воды катализирует аскорбатпероксидаза. При этом происходит окисление аскорбата до монодегидроаскорбата (МДАК), который может быть восстановлен МДГАР-редуктазой до аскорбата за счет НАДФН. Из МДАК в результате спонтанной окислительно-восстановительной реакции может быть образован дегидроаскорбат, который восстанавливается до аскорбата за счет окисления глутатиона. Завершается этот цикл восстановлением окисленной формы глутатиона с участием НАДФН (Медведев, 2013).

Окислительно-восстановительный потенциал водорастворимого антиоксиданта глутатиона (GSH) является особенно важным регулирующим фактором окисли-

тельно-восстановительного потенциала клетки в случае ортодоксальных семян (Schafer, Buettner, 2001; Noctor et al., 2011). Поскольку ортодоксальные семена содержат незначительное количество аскорбата (Kranner et al., 2006), была выдвинута гипотеза о том, что глутатион – это основной и, вероятно, наиболее древний окислительно-восстановительный буфер, а изменение его окислительно-восстановительного потенциала в GSSG/GSH служит универсальным маркером жизнеспособности семян (Mittler, 2002; Kranner et al., 2006). Помимо водорастворимых, в семенах растений присутствуют жирорастворимые (гидрофобные) антиоксиданты – α -, β -, γ -, σ -токоферолы и каротиноиды (Шарова, 2016), их вклад в антиоксидантную защиту клетки зависит от вида растений. Так, жирорастворимые антиоксиданты более значимы для масличных культур, семена которых богаты жирными кислотами.

На долготелетие семян влияют и некоторые другие соединения, такие как полифенолы, флавоноиды и пероксидредоксины, имеющие антиоксидантную функцию (Landry et al., 1995; Sattler et al., 2004; Шарова, 2016). Необходимо отметить, что антиоксидантные механизмы клетки контролируют содержание АФК, но не устраняют их полностью. Это связано с тем, что в небольшом количестве АФК являются важными сигнальными молекулами, участвующими в росте растений, развитии и реакции на стресс. В семенах АФК играют важную роль, связанную с жизнеспособностью и преодолением периода покоя. Избыток АФК приводит к потере жизнеспособности семян, однако выработка АФК необходима для выхода семян из периода покоя и способствует их прорастанию (Bailly, 2004; Oracz et al., 2009).

Таким образом, АФК выполняют двоякую роль в физиологии семени. С одной стороны, они обладают чрезвычайно высокой реакционной способностью: способны индуцировать цепные реакции и окислять практически любые органические соединения, приводить к необратимым окислительным повреждениям важнейшие биомолекулы, такие как белки, липиды и ДНК. С другой стороны, АФК участвуют в регулировании роста клеток, обеспечении защиты от патогенов и контроле окислительно-восстановительного статуса клеток. АФК действуют также как положительный сигнал в высвобождении покоя семян и их прорастании (Bahin et al., 2011; Jeevan Kumar et al., 2015).

Гены-кандидаты продолжительности жизни семян, выявленные у *Arabidopsis thaliana* (L.)

Роль важных факторов, влияющих на продолжительность жизни семян, анализировали с использованием мутантов *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и трансгенных линий. Известно, что созревание семян генетически контролируется четырьмя основными регуляторами: *ABI3* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE3*), *LEC1*, *LEC2* (*LEAFY COTYLEDON 1* и *2*) и *FUS3* (*FUSCA3*) (Raz et al., 2001). Мутации в этих ключевых регуляторах приводят к быстрой потере жизнеспособности семян при хранении. Так, мутанты *abi3*, *lec1* и *fus3* демонстрировали снижение продолжительности жизни семян (Ooms et al., 1993; Clerkx et al., 2004). К значительному сокращению продолжительности жизни семян приводят и мутации семенной оболочки. Семенная оболочка выступает в качестве структурного барьера

для защиты от биотических и абиотических стрессов. Например, мутанты *tt* (*transparent testa*), *tig* (*transparent testa glabra*) и *ats* (*aberrant testa shape*) имели более низкую продолжительность жизни семян по сравнению с контрольными растениями (Debeaujon et al., 2000; Clerkx et al., 2004). Снижение продолжительности жизни семян продемонстрировали мутанты *vte1* и *vte2*, вовлеченные в биосинтез витамина Е (липофильный антиоксидант), а также те, у которых полностью отсутствовали токоферолы (Sattler et al., 2004).

Мутанты арабидопсиса с дефицитом биосинтеза флавоноидов после воздействия обнаружили увеличение уровня перекисного окисления липидов на 60 %, что коррелирует с уменьшением жизнеспособности семян (Landry et al., 1995). Содержание некоторых олигосахаридов, таких как галактинол, коррелирует с продолжительностью жизни семян (Obendorf, 1997). Исследования, проведенные на арабидопсисе, капусте и томатах, выявили положительную корреляцию между содержанием галактинола и продолжительностью жизни семян этих культур (de Souza Vidigal et al., 2016). Низкую жизнеспособность семян по сравнению с растениями дикого типа имели мутанты *Arabidopsis*, лишенные функционального фермента малатдегидрогеназы (Yazdanpanah et al., 2019). Авторы этого исследования предполагают, что деятельность NADP-ME1 требуется для защиты семян от окисления при длительном хранении. Окислительный стресс негативно влияет на качество семян, о чем свидетельствует снижение всхожести мутанта *frol1*, который конституционально накапливает АФК (Lee et al., 2002; Clerkx et al., 2004). В то же время в исследованиях Clerkx с коллегами не выявлено достоверного снижения всхожести семян для двух мутантов, задействованных в антиоксидантных механизмах защиты от АФК: мутанта с дефицитом витамина С1-1 (*vtc1-1*) и мутанта, чувствительного к кадмию (*cad2-1*), у которого проявляется дефицит глутатиона.

В настоящее время выделено значительное количество локусов и генов, связанных с долготелетием семян арабидопсиса. По механизмам действия на жизнеспособность семян гены можно объединить в несколько групп. Наиболее значимыми являются группы генов, механизмы действия которых связаны с фитогормонами, такими как абсцизовая и гибберелловая кислоты, а также с окислительно-восстановительными процессами.

Гены-кандидаты продолжительности жизни семян, выявленные у *Hordeum vulgare* (L.)

Исследования продолжительности жизни семян, проведенные для различных видов растений: арабидопсиса (Clerkx et al., 2004; Bentsink et al., 2006), ячменя (Nagel et al., 2009), пшеницы (Landjeva et al., 2010; Rehman Arif, Börner, 2019), риса (Miura et al., 2002), эгилопса (Landjeva et al., 2010), кукурузы (Revilla et al., 2009), салата (Schwember, Bradford, 2010) и др., показали, что долготелетие семян контролируется несколькими генетическими факторами, что позволяет обнаруживать локусы количественных признаков (QTL). QTL для продолжительности жизни семян были определены в ряде работ на разных видах растений с использованием методов естественного и искусственного старения. Методики искусственного

старения семян предназначены для прогнозирования способности образцов семян к длительному хранению (Сафина, Филипенко, 2013; Смоликова, 2014). Суть их состоит в искусственном ускорении процесса старения путем экспозиции семян в течение непродолжительного времени при повышенной температуре и влажности, близкой к критической для данной культуры. Общепринятыми являются два метода искусственного старения семян: AA (accelerated aging) и CD (controlled deterioration). Согласно тесту AA, семена подвергаются в течение короткого периода времени воздействию высоких температуры и относительной влажности (100 %). Тест CD отличается от AA тем, что семена короткое время хранятся при высокой влажности (MC) (18–20 %) и температуре запечатанными в пакеты из алюминиевой фольги (Nagel et al., 2009, 2015). По стандартам ISTA (International Seed Testing Association), предписывается определенное значение MC для теста CD в соответствии со следующей формулой:

$$m_{H_2O} = \left(\frac{100 - smc_1 (\%)}{100 - smc_t (\%)} \right) \times m_1,$$

где m_{H_2O} – количество добавленной воды, г; smc_1 и smc_t – первоначальная и конечная влажность семян, %; m_1 – первоначальная навеска семян, г.

Необходимо отметить, что при искусственном старении семена находятся в условиях высоких влажности и температуры воздуха. В такой ситуации основными негативными процессами, протекающими в семенах, будут перекисное окисление липидов и потеря мембранами фосфолипидов. В случае же длительного хранения сухих семян будут происходить в основном неферментативные реакции, не требующие присутствия большого количества воды (Walters, 1998; Murthy et al., 2003; Веселовский, Веселова, 2012; Frolov et al., 2018; Antonova et al., 2019). Поэтому вопрос о том, насколько процессы, происходящие в семенах при искусственном старении, будут совпадать с процессами долговременного старения при длительном хранении, остается открытым (Agacka-Mołodoch et al., 2016; Bankin et al., 2018). Тем не менее методы искусственного старения широко применяются различными авторами в работах по изучению жизнеспособности семян.

Развитие новых технологий секвенирования, достижения в области широкого спектра аналитических технологий и появление процедур биоинформатики способствовали повышению качества исследований не только на модельных видах, но и на сельскохозяйственных растениях. Несколько существенных особенностей ячменя *H. vulgare* (L.), такие как диплоидный характер генома сортового ячменя с высокой степенью самоопыления, небольшое количество достаточно крупных хромосом ($2n = 14$), легкость скрещивания и простота выращивания в широком диапазоне климатических условий, способствуют широкому использованию этой культуры в генетических исследованиях. С помощью современных ДНК-технологий на различных образцах ячменя были определены возможные гены-кандидаты, ответственные за увеличение срока жизни семян. Так, Nagel и сотрудники (Nagel et al., 2009) при помощи методов искусственного старения AA и CD идентифицировали QTL, коррелирующие с долголетием семян ячменя, с использованием сле-

дующих популяций растений: OWB, S × M ('Steptoe' × 'Morex') и W766. Исследователи обнаружили, что наибольшее количество QTL, коррелирующих с долголетием семян, расположено на хромосомах 2Н, 5Н и 7Н. Один значимый QTL был найден в дистальной области хромосомы 2Н, связанной с локусом гена *Zeol* (*Zeocriton 1*). Ген *Zeol* определяет высоту растения и компактность колоса. Известно, что такие растения отличаются низкой фертильностью. Ген *Ale* (*Aleurain*), кодирующий тиоловую протеазу, был выявлен в QTL, расположенном в проксимальной области длинного плеча хромосомы 5Н. Экспрессия *Ale* регулируется гибберелловой и абсцизовой кислотами, которые играют важную роль в прорастании семян (Nagel et al., 2009). Ген *nud*, определяющий голозерность/пленчатость зерна, был идентифицирован как ген-кандидат для QTL на хромосоме 7Н. В 2016 г. Nagel с коллегами провели дополнительные исследования по изучению долголетия семян. Большинство QTL, связанных с долголетием семян, как и в работе 2009 г., были обнаружены в двух областях: на хромосоме 2Н на участке, расположенном в диапазоне между 110 и 172 сМ – место локализации гена *Zeol*, а также в центромерной области хромосомы 7Н на участке от 73 до 95 сМ, включающем ген *nud*.

Дальнейшая аннотация функций генов в изученных областях QTL выявила нахождение в этой области фермента глутатионредуктазы, что указывает на связь с окислительным стрессом (Meyer, Hell, 2005; Rouhier et al., 2008; Nagel et al., 2016). Bahin с соавторами в работе по изучению жизнеспособности семян подсолнечника и ячменя установили, что в процессе хранения семян ячменя, в отличие от подсолнечника, не происходит накопления АФК (Bahin et al., 2011). Авторы предполагают, что избыток АФК нейтрализует антиоксидант глутатион (GSH), который мог бы быть маркером для исследований долголетия семян ячменя. Wozny с коллегами в работе 2018 г. предлагает использовать в качестве гена-кандидата для дальнейших исследований долголетия семян ячменя фермент NADP-зависимую малатдегидрогеназу (NADP-ME) (Wozny et al., 2018). Местонахождение данного фермента было определено на хромосоме 2Н ячменя в области QTL, коррелирующих с продолжительностью жизни семян для изученных образцов ячменя.

Таким образом, большинство QTL, связанных с долголетием семян ячменя, были определены на хромосомах 2Н, 5Н и 7Н. В изученных областях QTL обнаружены гены *Zeol*, *Ale*, *nud*, *nadp-me*, *HvGR*. Различные авторы предлагают разные гены-кандидаты для дальнейших исследований долголетия семян ячменя. Однако какого-либо надежного универсального маркера потери жизнеспособности семян ячменя в настоящее время не выявлено. Генетические маркеры, связанные с долголетием семян, которые были бы удобны для определения оптимальной частоты репродуцирования образцов, пока до конца не установлены.

Закключение

Механизмы снижения всхожести семян и их гибели в результате длительного хранения у разных видов растений могут различаться. У ячменя они установлены лишь частично. Имеющиеся на сегодняшний день данные по

выявлению генов, связанных с долголетием семян ячменя, получены с использованием методов искусственного старения семян, которые, как известно, не совсем точно моделируют естественное старение. Генетические маркеры, связанные с долголетием семян, которые были бы удобны для определения оптимальной частоты репродукции образцов, пока до конца не установлены. В качестве гена-кандидата для дальнейших исследований долголетия семян ячменя может быть предложена глутатионредуктаза. Этот фермент напрямую участвует в нейтрализации избытков АФК в растениях, в антиоксидантной защите и клеточном сигналинге.

Список литературы / References

- Веселовский В.А., Веселова Т.В. Перекисное окисление липидов, гидролиз углеводов и реакция Амадори–Майларда на ранних этапах старения сухих семян. *Физиология растений*. 2012; 59(6):763-770.
[Veselovsky V.A., Veselova T.V. Lipid peroxidation, carbohydrate hydrolysis, and Amadori–Maillard reaction at early stages of dry seed aging. *Russ. J. Plant Physiol.* 2012;59(6):811-817.]
- Лоскутов И.Г. История мировой коллекции генетических ресурсов растений в России. СПб., 2009.
[Loskutov I.G. The History of the World Collection of Plant Genetic Resources in Russia. St. Petersburg, 2009. (in Russian)]
- Медведев С.С. Физиология растений. СПб., 2013.
[Medvedev S.S. Plant Physiology. St. Petersburg, 2013. (in Russian)]
- Николаева М.Г. Покой семян. В: Физиология семян. М., 1982.
[Nikolaeva M.G. Dormancy of seeds. In: The Physiology of Seeds. Moscow, 1982. (in Russian)]
- Сафина Г.Ф., Филипенко Г.И. Долговечность семян при хранении и ее прогнозирование методом ускоренного старения. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2013;174:123-130.
[Safina G.F., Filipenko G.I. Longevity of seeds at storage and its prediction by the accelerated ageing method. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2013;174:123-130. (in Russian)]
- Силаева О.И. Хранение коллекции семян мировых растительных ресурсов в условиях низких положительных температур – оценка, состояние, перспективы. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2012;169:230-239.
[Silaeva O.I. Storage of seeds collection of the world's plant resources in conditions low positive temperatures – assessment, status, prospects. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2012;169:230-239. (in Russian)]
- Смоликова Г.Н. Применение метода ускоренного старения для оценки устойчивости семян к стрессовым воздействиям. *Вестн. СПбГУ. Сер. 3: Биология*. 2014;2:82-93. <https://biocomm.spbu.ru/article/view/1138/992>
[Smolikova G.N. Application of the method of accelerated aging to evaluate the stress tolerance of seeds. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya 3: Biologiya = Bulletin of St. Petersburg State University. Ser. 3: Biology*. 2014;2:82-93. Available at: <https://biocomm.spbu.ru/article/view/1138/992> (in Russian)]
- Шарова Е.И. Антиоксиданты растений. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2016.
[Sharova E.I. Plant Antioxidants. St. Petersburg, 2016. (in Russian)]
- Agacka-Moldoch M., Rehman A.M.A., Lohwasser U., Doroszewska T., Qualset C.O., Börner A. The inheritance of wheat grain longevity: a comparison between induced and natural ageing. *J. Appl. Genet.* 2016;57(4):477-481. DOI 10.1007/s13353-016-0348-3.
- Antonova K., Vikhnina M., Soboleva A., Mehmood T., Heymich M., Leonova T., Bankin M., Lukasheva E., Gensberger-Reigl S., Medvedev S., Smolikova G., Pischetsrieder M., Frolov A. Analysis of chemically labile glycation adducts in seed proteins: case study of methylglyoxal-derived hydroimidazolone 1 (MG-H1). *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(15):3659. DOI 10.3390/ijms20153659.
- Bahin E., Bailly C., Sotta B., Kranner I., Corbineau F., Leymaruie J. Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant Cell Environ.* 2011;34(6):980-993. DOI 10.1111/j.1365-3040.2011.02298.x.
- Bailly C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 2004;142:93-107. DOI 10.1079/SSR2004159.
- Bailly C., Kranner I. Analyses of reactive oxygen species and antioxidants in relation to seed longevity and germination. In: Kermod A.R. (Ed.). *Seed Dormancy: Methods and Protocols*. Humana Press, 2011;343-367. DOI 10.1007/978-1-61779-231-1_20.
- Bankin M.P., Bilova T.E., Dubovskaya A.G., Gavrilova V.A., Frolov A.A., Smolikova G.N., Medvedev S.S. Biochemical changes induced in *Brassica napus* L. seeds after longstorage and accelerated aging. In: Abstract Book for the Plant Biology Europe Conference in Copenhagen, 18–21 June 2018. Copenhagen, 2018;161.
- Baskin J.M., Baskin C.C. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 2007;14:1-16. DOI 10.1079/SSR2003150.
- Bentsink L., Jowett J., Hanhart C.J., Koornneef M. Cloning of *DOG1*, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(45):17042-17047. DOI 10.1073/pnas.0607877103.
- Bewley J.D., Bradford K.J., Hilhorst H.W.M., Nonogaki H. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. 3rd edn. Springer, New York, 2013. DOI 10.1007/978-1-4614-4693-4.
- Clerx E.J.M., Blankestijn-de Vries H., Ruys G.J., Groot S.P.C., Koornneef M. Genetic differences in seed longevity of various *Arabidopsis* mutants. *Physiol. Plant.* 2004;121(3):448-461. DOI 10.1111/j.0031-9317.2004.00339.x.
- Debeaujon I., Léon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2000;122(2):403-414. DOI 10.1104/pp.122.2.403.
- Dekkers B.J.W., Costa M.C.D., Maia J., Bentsink L., Ligterink W., Hilhorst H.W.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. *Planta*. 2015;241:563-577. DOI 10.1007/s00425-014-2240-x.
- de Souza Vidigal D., Willems L., van Arkel J., Dekkers B.J.W., Hilhorst H.W.M., Bentsink L. Galactinol as marker for seed longevity. *Plant Sci.* 2016;246:112-118. DOI 10.1016/j.plantsci.2016.02.015.
- Eshdat Y., Holland D., Faltin Z., Ben-Hayyim G. Plant glutathione peroxidases. *Physiol. Plant.* 1997;100(2):234-240. DOI 10.1111/j.1399-3054.1997.tb04779.x.
- Foyer C., Noctor G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 2005;28:1056-1071. DOI 10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x.
- Frolov A., Mamontova T., Ihling C., Lukasheva E., Bankin M., Chantseva V., Vikhnina M., Soboleva A., Shumilina J., Mavropolo-Stolyarenko G., Grishina T., Osmolovskaya N., Zhukov V., Hoehnwarter W., Sinz A., Tikhononovich I., Wessjohann L., Bilova T., Smolikova G., Medvedev S. Mining seed proteome: from protein dynamics to modification profiles. *Bio. Comm.* 2018;63:43-58. DOI 10.21638/spbu03.2018.106.
- Jajic I., Sarna T., Strzalka K. Senescence, stress, and reactive oxygen species. *Plants*. 2015;4:393-411. DOI 10.3390/plants4030393.
- Jeevan Kumar S.P., Rajendra Prasad S., Banerjee R., Thammineni C. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Ann. Bot.* 2015;116(4):663-668. DOI 10.1093/aob/mcv098.
- Khan M.M., Hendry G.A.F., Atherton N.M., Vertucci-Walters C.W. Free radical accumulation and lipid peroxidation in testas of rapidly aged soybean seeds: a light-promoted process. *Seed Sci. Res.* 1996; 6(03):101-106. DOI 10.1017/S0960258500003123.

- Kong L., Huo H., Mao P. Antioxidant response and related gene expression in aged oat seed. *Front. Plant Sci.* 2015;6:158. DOI 10.3389/fpls.2015.00158. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00158/full>
- Kranner I., Birtić S., Anderson K.M., Pritchard H.W. Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radic. Biol. Med.* 2006;40(12):2155-2165. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2006.02.013.
- Landjeva S., Lohwasser U., Börner A. Genetic mapping within the wheat D genome reveals QTL for germination, seed vigour and longevity, and early seedling growth. *Euphytica*. 2010;171(1):129-143. DOI 10.1007/s10681-009-0016-3.
- Landry L.G., Chapple C., Last R.L. *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol.* 1995;109(4):1159-1166. DOI 10.1104/pp.109.4.1159.
- Lee B., Lee H., Xiong L., Zhu J.-K. A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. *Plant Cell*. 2002; 14(6):1235-1251. DOI 10.1105/tpc.010433.
- Li D., Pritchard H.W. The science and economics of *ex situ* plant conservation. *Trends Plant Sci.* 2009;14(11):614-621. DOI 10.1016/j.tplants.2009.09.005.
- McDonald M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Sci. Technol.* 1999;27:177-237.
- Meyer A.J., Hell R. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynth. Res.* 2005;86(3):435-457. DOI 10.1007/s11120-005-8425-1.
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2002;7(9):405-410. DOI 10.1016/S1360-1385(02)02312-9.
- Miura K., Lin S., Yano M., Nagamine T. Mapping quantitative trait loci controlling seed longevity in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2002;104(6):981-986. DOI 10.1007/s00122-002-0872-x.
- Murthy U.M.N., Kumar P.P., Sun W.Q. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. *J. Exp. Bot.* 2003;54(384):1057-1067. DOI 10.1093/jxb/erg092.
- Nagel M., Alqudah A.M., Bailly M., Rajjou L., Pistrick S., Matzig G., Börner A., Kranner I. Novel loci and a role for nitric oxide for seed dormancy and preharvest sprouting in barley. *Plant Cell Environ.* 2019;42(4):1318-1327. DOI 10.1111/pce.13483.
- Nagel M., Börner A. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Sci. Res.* 2010;20:1-12. DOI 10.1017/S0960258509990213.
- Nagel M., Kodde J., Pistrick S., Mascher M., Börner A., Groot S.P.C. Barley seed aging: genetics behind the dry elevated pressure of oxygen aging and moist controlled deterioration. *Front. Plant Sci.* 2016; 7:1-11. DOI 10.3389/fpls.2016.00388.
- Nagel M., Kranner I., Neumann K., Rolletschek H., Seal C.E., Colville L., Fernandez-Marin B., Börner A. Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background and developmental and environmental conditions in barley. *Plant Cell Environ.* 2015;38(6):1011-1022. DOI 10.1111/pce.12474.
- Nagel M., Vogel H., Landjeva S., Buck-Sorlin G., Lohwasser U., Scholz U., Börner A. Seed conservation in *ex situ* genebanks – genetic studies on longevity in barley. *Euphytica*. 2009;170(1-2):5-14. DOI 10.1007/s10681-009-9975-7.
- Nguyen T.P., Keizer P., van Eeuwijk F., Smeekens S., Bentsink L. Natural variation for seed longevity and seed dormancy are negatively correlated in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2012;160(4):2083-2092. DOI 10.1104/pp.112.206649.
- Nikolaeva M.G. Patterns of seed dormancy and germination as related to plant phylogeny and ecological and geographical conditions of their habitats. *Russ. J. Plant Physiol.* 1999;46:369-373.
- Noctor G., Queval G., Mhamdi A., Chaouch S., Foyer C.H. Glutathione. *The Arabidopsis Book*. 2011;9(1):1-32. DOI 10.1199/tab.0142.
- Nonogaki H. Seed biology updates – highlights and new discoveries in seed dormancy and germination research. *Front. Plant Sci.* 2017;8: 1-16. DOI 10.3389/fpls.2017.00524.
- Obendorf R.L. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Sci. Res.* 1997;7(2):63-74. DOI 10.1017/S096025850000341X.
- Ooms J., Leon-Kloosterziel K.M., Bartels D., Koornneef M., Karsen C.M. Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana* (a comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants). *Plant Physiol.* 1993;102(4):1185-1191. DOI 10.1104/pp.102.4.1185.
- Oracz K., El-Maarouf-Bouteau H., Kranner I., Bogatek R., Corbineau F., Bailly C. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiol.* 2009;150(1):494-505. DOI 10.1104/pp.109.138107.
- Ponquett R.T., Smith M.T., Ross G. Lipid autooxidation and seed ageing: putative relationships between seed longevity and lipid stability. *Seed Sci. Res.* 1992;2(1):51-54. DOI 10.1017/S0960258500001100.
- Priestley D.A., Cullinan V.I., Wolee J. Differences in seed longevity at the species level. *Plant Cell Environ.* 1985;8(8):557-562. DOI 10.1111/j.1365-3040.1985.tb01693.x.
- Rajjou L., Debeaujon I. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus Biologies.* 2008;331:796-805. DOI 10.1016/j.crv.2008.07.021.
- Raz V., Bergervoet J.H., Koornneef M. Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development*. 2001;128(2): 243-252.
- Rehman Arif M.A., Börner A. Mapping of QTL associated with seed longevity in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *J. Appl. Genet.* 2019;60(1):33-36. DOI 10.1007/s13353-018-0477-y.
- Rehman Arif M.A., Nagel M., Lohwasser U., Börner A. Genetic architecture of seed longevity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Biosci.* 2017;42(1):81-89. DOI 10.1007/s12038-016-9661-6.
- Revilla P., Butron A., Rodriguez V.M., Malvar R.A., Ordas A. Identification of genes related to germination in aged maize seed by screening natural variability. *J. Exp. Bot.* 2009;60(14):4151-4157. DOI 10.1093/jxb/erp249.
- Rouhier N., Lemaire S.D., Jacquot J. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008;59(1):143-166. DOI 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092811.
- Sattler S.E., Gilliland L.U., Magallanes-Lundback M., Pollard M., DellaPenna D. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell*. 2004;16(6): 1419-1432. DOI 10.1105/tpc.021360.
- Scandalios J.G., Lingqiang G., Polidoros A.N. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. 1997;343-406. DOI 10.1101/087969502.34.343.
- Schafer F.Q., Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 2001;30(11):1191-1212. DOI 10.1016/S0891-5849(01)00480-4.
- Schmidt L.H. Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed. Danida Forest Seed Centre, 2000.
- Schwember A.R., Bradford K.J. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. *J. Exp. Bot.* 2010;61(15):4423-4436. DOI 10.1093/jxb/erq248.
- Sliwinska E., Bewley J.D. Overview of seed development, anatomy and morphology. In: Gallagher R.S. (Ed.). *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. 3rd edn. CAB International, 2014;1-17. DOI 10.1079/9781780641836.000.
- Walters C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Sci. Res.* 1998;8(2):223-244. DOI 10.1017/S096025850000413X.

- Walters C. Orthodoxy, recalcitrance and inbetween: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta*. 2015;242:397-406. DOI 10.1007/s00425-015-2312-6.
- Walters C., Hill L.M., Wheeler L.J. Dying while dry: kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. *Integr. Comp. Biol.* 2005;45(5):751-758. DOI 10.1093/icb/45.5.751.
- Waterworth W.M., Drury G.E., Bray C.M., West C.E. Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. *New Phytol.* 2011;192(4):805-822. DOI 10.1111/j.1469-8137.2011.03926.x.
- Wettlaufer S.H., Leopold A.C. Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. *Plant Physiol.* 1991;97(1):165-169. DOI 10.1104/pp.97.1.165.
- Willekens H., Inzé D., Van Montagu M., van Camp W. Catalases in plants. *Mol. Breeding*. 1995;1(3):207-228. DOI 10.1007/BF02277422.
- Wojtyła K., Lechowska K., Kubala S., Garnczarska M. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1-16. DOI 10.3389/fpls.2016.00066.
- Wozny D., Kramer K., Finkemeier I., Acosta I.F., Koornneef M. Genes for seed longevity in barley identified by genomic analysis on near isogenic lines. *Plant Cell Environ.* 2018;41(8):1895-1911. DOI 10.1111/pce.13330.
- 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.M., Bentsink L. NADP-MALIC ENZYME 1 affects germination after seed storage in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2019;60(2):318-328. DOI 10.1093/pcp/pcy213.

ORCID ID

N.A. Shvachko orcid.org/0000-0002-1958-5008
E.K. Khlestkina orcid.org/0000-0002-8470-8254

Благодарности. Работа выполнена в рамках госзадания № 0481-2019-0001.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.10.2019. После доработки 08.01.2020. Принята к публикации 17.01.2020. Опубликована онлайн 29.06.2020.