



УДК 582.632.2:547.96:58.02

© 2008

О. М. Вінниченко, О. В. Колесніченко, член-кореспондент
НАН України І. П. Григорюк, І. В. Барабанова

**Гетерогенність запасних білків насіння гіркокаштана
звичайного (*Aesculus hippocastanum* L.) за дії
полютантів металургійного виробництва**

It is shown that the seed lobes of horst chestnut seeds are poorer in the quantitative and qualitative spectra of the total reserve proteins on a polluted region of metallurgical industry.

У механізмах стійкості і адаптації рослин гіркокаштана звичайного до промислових забруднювачів ключову роль відіграють запасні білки як інтегральні показники перебігу фізіолого-біохімічних процесів у репродуктивних органах. Серед запасних речовин насіння гіркокаштана білки становлять майже 10%, вуглеводи — 50%. Порівняно з іншими деревними декоративними рослинами, гіркокаштан виявляє високу чутливість до аерогенних викидів коксохімічних виробництв та металургійних заводів і відрізняється максимальною пилозатримувальною здатністю (1395 мг/м²) [1]. У результаті дії токсикантів металургійних підприємств органічної (фенольні сполуки) та неорганічної природи (сполуки сірки, вуглецю, важкі метали) зменшується період цвітіння, кількість квіток, суцвіть та продуктивність плодоношення [2]. Під загрозою загибелі знаходяться рослини форм гіркокаштана звичайного в промислових містах України [3]. З огляду на це актуальності набувають дослідження запасних білків насіння гіркокаштана звичайного на забруднених полютантами територіях як потенційного матеріалу в селекційному процесі на стійкість до факторів антропогенного навантаження.

Насіння гіркокаштана звичайного відбирали у 2006–2007 рр. з умовно чистої території (с. Дослідне Дніпропетровського району Дніпропетровської області) та забрудненої полютантами зони металургійного виробництва (Дніпровський металургійний комбінат ім. Ф. Е. Дзержинського (ДМКД), м. Дніпродзержинськ). Одночасно в кожній зоні досліджували по 15 дерев гіркокаштана звичайного 25–30-річного віку. З кожного дерева відбирали по 50 насінин масою 30–35 г, в яких визначали кількісний вміст [4] та якісний склад запасних білків, що вилучали сольовим розчином (1 М NaCl в 0,1 М *трис*-HCl, рН 8,0) у співвідношенні наважка/буфер 1 : 10. Електрофоретичний аналіз білків сім'ядолей насіння здійснювали в 12,5%-му поліакриламідному гелі [5]. Біотестування рослин проводили

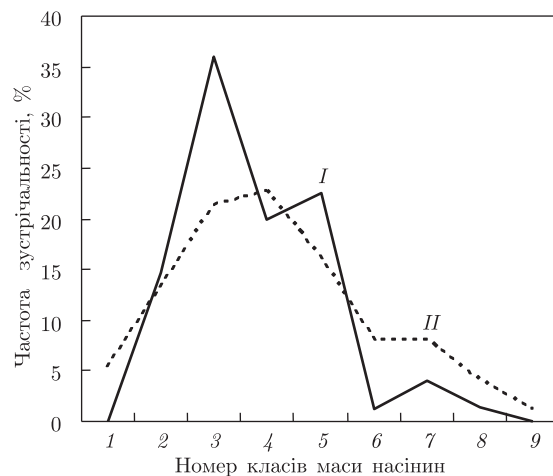


Рис. 1. Варіаційні криві маси насіння гіркокаштана звичайного з умовно чистої території с. Дослідне (I) та промислової зони ДМКД (II):

1 – 2,3–3,2 г; 2 – 3,3–4,2 г; 3 – 4,3–5,0 г; 4 – 5,1–6,0 г; 5 – 6,1–6,9 г; 6 – 7,0–7,8 г; 7 – 7,9–8,7 г; 8 – 8,8–9,6 г; 9 – 9,7–10,5 г

згідно з варіаційними кривими розподілу показників маси насіння [6]. Статистична обробка результатів досліджень стандартна [7].

У проведених нами експериментах на забрудненій полютантами території металургійного виробництва ДМКД встановлено достовірне підвищення маси, середньої і медіани та варіабельності насіння гіркокаштана, що відповідає змінам величини коефіцієнта варіації (табл. 1).

Аналіз варіаційних кривих виявив деякі особливості формування насіння гіркокаштана звичайного за дії полютантів металургійного виробництва (рис. 1). Встановлено, що форма варіаційної кривої зразків насіння гіркокаштана звичайного з умовно чистої зони (с. Дослідне) має два додаткових максимуми, а деяка частина зразків із забрудненої зони (ДМКД) формує видовжене плече в області більших значень показника (від 7,8 до 10,5 г). Стає очевидним, що відхилення функціонування фізіолого-біохімічних процесів від оптимального рівня індукує зміни маси та деформації насіння гіркокаштана [8]. Разом з тим окремі усереднені характеристики насіння не дають цілісної картини стосовно особливостей формування внутрішньої структури рослини. А отже, важливим є застосування параметра розподілу маси насіння гіркокаштана за дії полютантів різної природи. Розрахунки свідчать про те, що основна кількість зразків насіння, зібраного з промислової зони ДМКД, зосереджена навколо значень від 3,4 до 6,4 г, а з чистої зони (с. Дослідне) – від 4,3 до 5,2 г.

У серії експериментів нами проведено визначення кількісного вмісту запасних білків у сім'ядолях насіння гіркокаштана звичайного. Виявлено, що середня концентрація сумарних запасних білків у насінні, зібраному в с. Дослідне (умовно чиста екологічна зона), ко-

Таблиця 1. Параметри розподілу маси насіння гіркокаштана звичайного

Місце відбору зразків	Середнє арифметичне, $X \pm m_x$	Медіана, Me	Мода, Mo	Коефіцієнт варіації, C_v
с. Дослідне	5,25 ± 0,13	4,99	4,72	21,97
ДМКД	5,64 ± 0,19	5,58	7,07	29,86

ливається від 1,9 до 6,2 мг/мл. Водночас мінімальну (1,9 мг/мл) і максимальну (6,2 мг/мл) концентрації білків у насінні зафіксовано лише в одному випадку (табл. 2).

За різних екологічних умов найчастіше зустрічаються дерева гіркокаштана з концентрацією білка в стиглому насінні 2,0–3,0 мг/мл (73,3%), а також 4 мг/мл (20%). У більшості насінин дерев з промислової зони ДМКД (40%) вміст білків менший за 1 мг/мл, водночас у насіння із с. Дослідне таких низьких концентрацій запасного білка не спостерігалось. Порівняно з умовним контролем практично в усіх насінинах гіркокаштана звичайного з ДМКД зафіксовано зниження рівня запасних білків на 22–35%.

Для ґрунтовнішого уявлення щодо особливостей внутрішньоклітинної структури і популяції рослин у цілому використовують метод електрофорезу поліморфних білків, що дозволяє виявити приховану генетичну мінливість [9]. Видові зміни білкового спектра можна зареєструвати також при аналізі 3–4 насінин, відібраних з одного чи різних місць зростання рослин [10]. Нами вперше методом SDS-електрофорезу отримано спектри, що відображають гетерогенність сумарних запасних білків у насінні дерев гіркокаштана звичайного в умовно чистій і забрудненій полотантами екологічних зонах (рис. 2). Для спрощення ідентифікації електрофоретичний спектр розбивали за допомогою маркерів молекулярних мас білків на α -, β -, γ - та ω -зони [11]. До зони α відносили білки з мол. масою 70–90 кДа, β — білки з мол. масою 51–63 кДа, γ — білки з мол. масою 22–38 кДа та ω — білки з мол. масою 19–20 кДа. Найбільшу кількість запасних білків у насінні визначено в ω -зоні (у середньому 52% основної кількості поліпептиду спектра), при цьому найваріабельнішими за наявністю — відсутністю окремих поліпептидів виявилися α -, β - та γ -зони. У рослин гіркокаштана, які зростали на забрудненій хімічними сполуками території ДМКД, значно більша кількість насіння мала збіднений кількісний і якісний спектр сумарного білка. Найістотніші коливання змін вмісту білків відзначено в β - і γ -зонах. На території металургійного виробництва встановлено істотне підвищення вмісту в насінні гіркокаштана сумарних запасних білків. Характерною ознакою є висока частота зустрічальності індивідуальних насінин гіркокаштана звичайного з низьким вмістом запасних білків. Значний поліморфізм запасних білків насіння дозволяє використовувати електрофоретичні спектри для визначення внутрішньопопуляційного складу, характеристики і реєстрації генофонду гіркокаштана звичайного.

Таблиця 2. Вміст сумарних запасних білків у сім'ядолях насіння гіркокаштана звичайного, мг/мл

Номер дерева	с. Дослідне	ДМКД
1	2,83 ± 0,17	1,90 ± 0,43
2	3,16 ± 0,42	3,44 ± 0,99
3	2,82 ± 0,14	1,82 ± 0,57
4	2,92 ± 0,19	0,81 ± 0,19
5	4,59 ± 0,59	3,35 ± 0,23
6	4,40 ± 0,09	3,74 ± 0,13
7	6,19 ± 0,23	4,89 ± 0,40
8	4,03 ± 0,38	4,10 ± 0,24
9	1,92 ± 0,39	3,69 ± 0,56
10	2,11 ± 0,60	0,42 ± 0,04
11	2,12 ± 0,63	0,76 ± 0,13
12	2,63 ± 0,27	0,63 ± 0,06
13	3,08 ± 0,29	1,09 ± 0,09
14	2,52 ± 0,32	0,74 ± 0,16
15	2,73 ± 0,33	0,74 ± 0,11

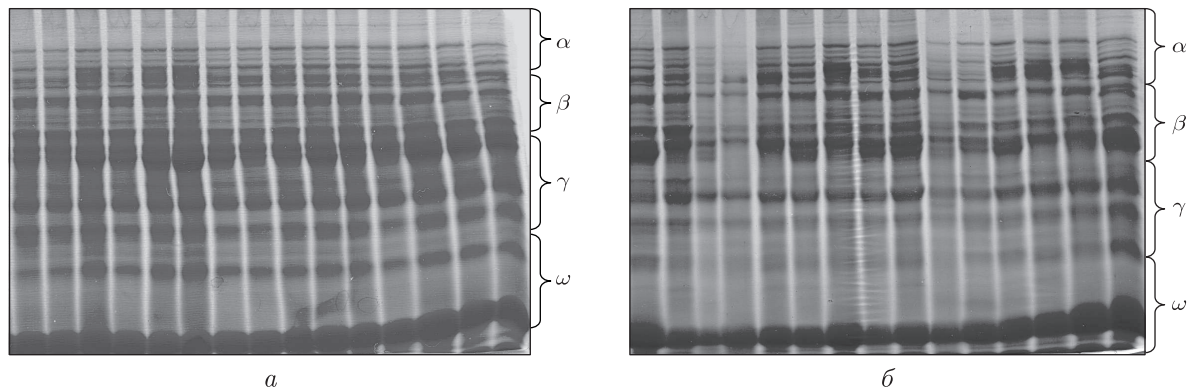


Рис. 2. Електрофоретичне розділення запасних білків сім'ядолей індивідуальних насінин гіркокаштану звичайного:

a — с. Дослідне; *б* — ДМКД; α , β , γ , ω — зони електрофоретичного спектра запасних білків. Маркери молекулярних мас компонентів: альбумін яечний (45 кДа), трипсин (24 кДа), бичачий сироватковий альбумін (66 кДа), РНКаза (13,6 кДа)

Отже, шляхом порівняльного аналізу можна прослідкувати за зміною структури окремих дерев гіркокаштану і встановити втрату типовості білкових спектрів в умовах техногенного забруднення середовища, що рекомендовано враховувати в селекційному процесі.

1. Коршиков И. И. Адаптация растений к условиям техногенного загрязнения среды. — Киев: Наук. думка, 1996. — 238 с.
2. Антипов В. Г. Устойчивость древесных растений к промышленным газам. — Минск: Наука и техника, 1979. — 216 с.
3. Григорюк І. П., Машковська С. П., Яворовський П. П., Колесніченко О. В. Біологія каштанів. — Київ: Логос, 2004. — 380 с.
4. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // *Anal. Biochem.* — 1976. — **8**. — P. 248–254.
5. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of Bacteriophage T. 54 // *Nature.* — 1979. — **227**, No 529. — P. 680–686.
6. Орлов В. В. Взаимосвязь кривой распределения показателей качества семян с их биологическими характеристиками // *Биометрический анализ в биологии.* — Москва: Наука, 1982. — С. 62–66.
7. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. — Москва: Агропромиздат, 1985. — 351 с.
8. Гумилевская Н. А., Азаркович М. И. Белки осевых органов покоящихся и прорастающих семян конского каштана. 1. Общая характеристика белков // *Физиология растений.* — 2001. — **48**, № 1. — С. 5–7.
9. Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях — Москва: Наука, 1989. — 327 с.
10. Орехова Т. П. Сравнительный анализ белкового комплекса семян дальневосточных растений для оценки их родства и филогенетического возраста // *Физиология растений.* — 1998. — **45**, № 3. — С. 456–465.
11. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. Теоретические основы селекции. Т. 1. / Под ред. В. Г. Конарева. — Москва: Колос, 1993. — 447 с.

НДІ біології Дніпропетровського
національного університету
Національний аграрний університет, Київ

Надійшло до редакції 06.02.2008