

# 1. ЛІСОВЕ ТА САДОВО-ПАРКОВЕ ГОСПОДАРСТВО

УДК 581\*162.6

Проф. Р.Т. Гут, д-р біол. наук – НЛТУ України, м. Львів

## МОБІЛІЗАЦІЯ ЗАПАСНИХ БІЛКІВ ПІД ЧАС ПРОРОСТАННЯ НАСІННЯ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ

Встановлено, що під впливом синтетичних регуляторів росту цитокінінової природи в проростках відбувається загальна стимуляція обміну речовин, а також посилюється мобілізація запасних білків. Отримані результати свідчать про компетентність клітин проростаючого зародка до використаних нами регуляторів росту. Досліджено стимулятивний ефект низки регуляторів росту на процес проростання насіння сосни звичайної, що робить перспективним їх використання для пришвидшення росту проростків, щоб зменшити їх ураження патогенними організмами, які живуть у ґрунті.

**Ключові слова:** гормональна регуляція, проростання насіння, білки, сосна звичайна.

**Вступ.** Важливими завданнями лісового господарства в сучасних умовах є подальше вдосконалення способів і методів відтворення лісових ресурсів і збільшення обсягів робіт із захисного лісорозведення. Постановка таких завдань потребує впровадження найбільш прогресивних технологій вирощування сіянців і лісових культур на базі комплексної механізації та автоматизації; формування лісонасінневої бази на генетико-селекційній основі, отримання насіння з покращеними спадковими властивостями за допомогою спеціального оброблення насіння і садивного матеріалу біологічно активними речовинами [1, 2, 4, 6]. Знаючи, які ендogenous регулятори росту відіграють важливу роль, і на якому етапі кожний із них необхідний для нормального протікання всіх онтогенетичних процесів, можна цілеспрямовано змінювати темпи росту і розвитку рослин і отримати високий вихід стандартних сіянців в однорічному віці [2, 3, 5-9].

Проростання насіння є важливим періодом онтогенезу рослини, що має великий вплив на її подальший ріст, розвиток та продуктивність. На початкових етапах розвитку проростка і його ріст забезпечуються запасними речовинами, які нагромадилися у насінні під час її дозрівання.

**Об'єкти і методика досліджень.** У досліді використано відсортоване життєздатне насіння *Pinus sylvestris* L., отримане з ДП "Буське ЛГ" Львівської області. Насіння, промите дистильованою водою, пророщували в стерильних умовах за температури 26 °C на фільтрувальному папері, змоченому дистильованою водою, в чашках Петрі, герметично закупорених парафіном. Тканини проростків збирали на 1-7-му добу від початку пророщування, заморожували у рідкому азоті та зберігали за температури –80 °C до їхнього використання.

Гомогенати тканин отримували механічним розтиранням у гомогенізаторі Поттера за 4 °C з додаванням лізувального буфера, що містив 50 мМ трис-НС1, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 1 % Тритон X-100 ("Sigma"), 5 мМ ЕДТА, 1 мМ PMSF та інгібітори протеїназ ("Roche"). Отримані лізати центрифугували про-

тягом 25 хв за 13000 g, 4 °C. Концентрацію сумарного білка в надосадовій рідині визначали за методом Бредфорда.

Електрофорез лізатів клітин та очищених препаратів білків проводили у блоках 12 % та градієнтного (5-22 %) ПААГ у буферній системі Леммлі за присутності ДСН [141]. Після електрофорезу гелі забарвлювали для виявлення розділених білків за допомогою фарби, до складу якої входили: 0,2 % Coomassie R-250, 20 % метанолу та 10 % оцтової кислоти, протягом 20 хв з подальшим відмиванням у 20 %-ому метанолі та 5 %-вій оцтовій кислоті, помішуючи. Використовували стандарти молекулярної маси білків: Unstained Precision Protein Standards ("BioRad"), Protein Molecular Weight Markers ("Fermentas").

Електрофоретичне розділення низькомолекулярних білків здійснювали в 15 %-их блоках ПААГ з 3 %-им вмістом бісакриламід у трис-трициновій буферній системі [199]. Анодний буфер містив: 0,1 М трис, 0,0225 М HCl, pH 8,9; катодний – 0,1 М трис, 0,1 М трицин, 0,1 % ДСН; буфер для гелю – 1 М трис, 0,33 М HCl, 0,1 % ДСН, pH 8,45; буфер для зразків – 50 мМ трис-HCl, pH 7,0, 4 % ДСН, 2 % 2-меркаптоетанолу, 10 % гліцерину, 0,015 % Coomassie G-250. Гель забарвлювали фарбою, що містила 0,025 % Coomassie G-250, 50 % метанолу та 10 % оцтової кислоти. Використовували стандарт для низькомолекулярних білків Protein test mixture 5 ("Serva").

**Результати дослідження.** Насіння сосни звичайної характеризується високим вмістом білків і ліпідів, які локалізовані переважно у мегагаметофіті, гаплоїдній тканині материнського походження. Як свідчать результати електрофоретичного аналізу, запасні білки у насінні сосни (рис. 1) представлені поліпептидами із молекулярними масами 46-49, 36-38, 27-29, 25-27, 22-23 та 11-16 кДа і становлять близько 80 % від загального вмісту протеїнів у мегагаметофіті і 50 % – у зародках.

Запасні білки сосни звичайної представлені альбумінами та глобулінами. За літературними даними, поліпептиди із молекулярною масою 36-38, 22,5-23,5 є продуктами дисоціації за редуруючих умов 11S глобуліну, молекулярна маса якого становить 59,6 кДа [11]. 11S глобуліни соснових гомологічні 11S legumin-like proteins, представниками однієї із підгруп глобулінової групи запасних білків насіння. Цей тип запасних білків досить поширений як у голонасінних, так і у покритонасінних рослин. 11S legumin-like protein мають здатність утворювати гексамерні форми, кожна із 6 субодиниць складається із кислого поліпептиду (33-42 кДа) та основного (19-23 кДа), які з'єднані дисульфідним містком. Ці білки є тритон-нерозчинними (рис. 1) [10, 14].

До другої підгрупи глобулінової групи запасних білків належать 7S vicilin-type proteins із молекулярною масою 46-49 кДа. Це тримірні білки, які складаються із неідентичних субодиниць, які не дисоціюють за редуруючих умов. Ці білки описано у декількох видів сосни, двох видів ялини, ялиці, тису та кипариса [10,11,12,14]. Як свідчать результати, наведені на рис. 2, ці білки у сосни звичайної є тритон-розчинними. Тритон-розчинні білки із молекулярними масами 25-27 та 27-29 кДа вірогідно є альбумінами, які описані у деяких видів хвойних [12]. Природа низькомолекулярних запасних білків соснових (11-16 кДа) на цей час є нез'ясованою.

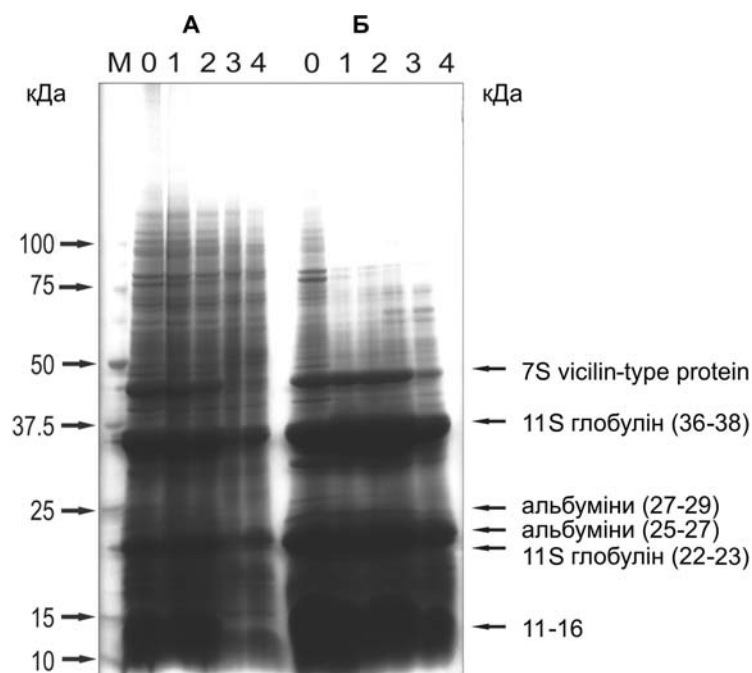


**Рис. 1. Електрофореграма білків проростків (А) і мегагаметофітів (Б) сосни звичайної, фракціонованих у 5-20 % ПААГ за присутності 0,1 % ДСН: 0 – зародки сухого насіння, 1-4-1-ша, 3-тя, 5-та, 7-ма доба проростання**

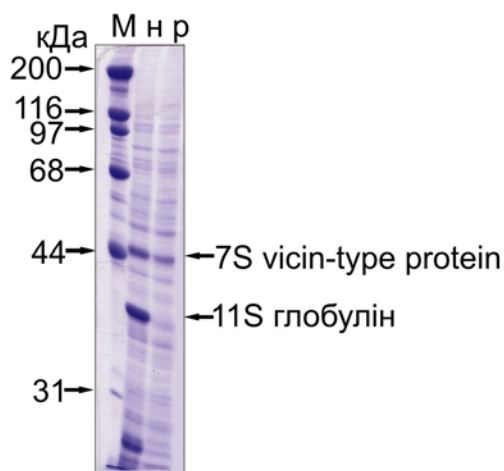


**Рис. 2. Електрофоретичний аналіз запасних білків насіння сосни:**

*М – маркери;  
н – тритон-нерозчинні білки;  
р – тритон-розчинні білки*

Під час проростання насіння сосни у зародках та мегагаметофіту відбувається протеоліз запасних білків, який проходить у декілька стадій. Спочатку розпадаються запасні білки, які локалізовані в осьових органах зародка. Ми проаналізували динаміку утилізації запасних білків насіння сосни у процесі його проростання. Як свідчать результати, які представлені на рис. 2, протеоліз запасних білків зародка відбувається швидше, ніж мегагаметофіта – так на 5-у добу проростання майже на 80 % гідролізують 7S vicilin-type proteins та низькомолекулярні білки (11-16 кДа). Помітне зменшення резервних білків у мегагаметофіті сосни спостерігається лише на сьому добу. За літературними даними у хвойних запасні білки мегагаметофіта розщеплюються протеолітичними ензимами до вільних амінокислот, які транспортуються до меристематичних тканин проростка, в яких відбуваються інтенсивні процеси синтезу нових білків. Для глобулінів хвойних рослин характерний високий вміст амінокислоти аргініну – 23,4 %, яка є джерелом азоту для проростків і за участі аргінази асимілює у метаболічні та біосинтетичні шляхи останнього [13].

Ці дані свідчать, що насіння сосни звичайної містить запасні білки, які подібні до виявлених в інших видів хвойних рослин, і які є пластичним та енергетичним резервом для забезпечення проростання зародка та початкових стадій росту проростка. Деякі автори пропонують використовувати кількісний та якісний склад запасних білків насіння для характеристики його якості [14].

**Вплив регуляторів росту рослин (РРР) на протеоліз запасних білків насіння.** Швидке проростання насіння є бажаним з огляду на те, що зменшується ймовірність пошкодження проростаючої насінини мікроорганізмами і грибами, які живуть у ґрунті. Тому актуальним є дослідження біологічно активних речовин із метою підвищення швидкості проростання.

На попередньому етапі роботи ми переконалися, що нові українські стимулятори росту триман-1, емістим С, зеастимулін та агростимулін здійснюють стимулятивний ефект на ріст проростків сосни звичайної. Довжина 7-денних проростків насіння, обробленого згаданими стимуляторами, перевищувала контроль на 25,7-32,4 %. Це свідчить про активацію синтетичних процесів у проростках сосни та стимуляцію поділу клітин. Оскільки у цей період джерелом будівельного матеріалу для проростків є запасні білки мегагаметофіту, то варто було очікувати, що РРР можуть впливати і на швидкість їх утилізації.

Ми дослідили вміст резервних білків у мегагаметофітах насіння сосни звичайної на сьому добу його проростання за дії різних стимуляторів росту і виявили, що зеастимулін, емістим С та триман-1 істотно підвищували швидкість протеолізу тритон-розчинних запасних білків альбумінової групи з молекулярною масою 24-25 та 27-29 кДа (рис. 3, доріжки 2, 6, 8 відповідно) і не впливали на білки глобулінової групи (46-49 кДа).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 К

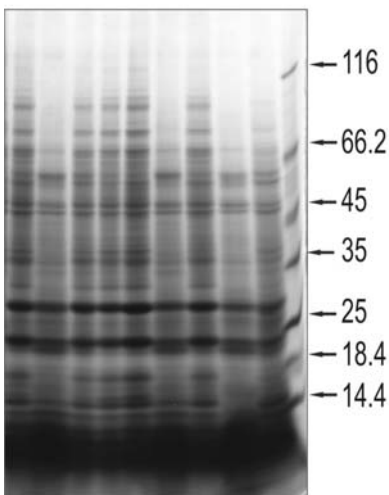


**Рис. 3. Електрофоретичні спектри тритон-розчинних білків мегагаметофітів на сьому добу проростання насіння сосни звичайної за умов дії регуляторів росту рослин:** 1 – необроблене насіння; 2 – насіння, оброблене зеастимуліном (1 мл/л); 3 – івіном (1 мл/л), 4 – ауксином ( $10^{-5}$  М); 5 – ауксином ( $4 \cdot 10^{-5}$  М); 6 – емістимом С (1 мл/л); 7 – абсцизовою кислотою (0,001 %); 8 – триманом (0,01 %); 9 – агростимуліном (1 мл/л)

Як видно із електрофореграми (рис. 3), у мегагаметофітах насіння, оброблених згаданими вище РРР, проходить третя стадія протеолізу запасних речовин, коли деградують структурні білки. Про це свідчить зникнення у електрофоретичних спектрах високомолекулярних білків і накопичення низькомолекулярних продуктів деградації. З літератури відомо, що такі процеси у необробленому насінні спостерігаються на 9-10-й день проростання. Вплив агростимуліну є подібним до дії цих РРР, але виражений меншою мірою. Варто зазначити, що дані РРР створено на основі N-окиснених піридинових сполук і для них характерна цитокінінова активність. Як відомо, в основі ростових

ефектів цитокініну лежить насамперед стимуляція мітозу. Під впливом цих фітогормонів відбувається загальна стимуляція обміну речовин, насамперед, синтезу РНК та білків. Цитокініни здатні атрагувати рухомі метаболіти, зокрема амінокислоти, до оброблених ним клітин. Зважаючи на ці фізіологічні ефекти, закономірним є посилення мобілізації запасних білків мегагаметофіту, яке ми спостерігали під час обробляння насіння РРР цитокінінової природи. Отримані результати свідчать про компетентність клітин проростаючого зародка до використаних нами регуляторів росту.

Гальмівний ефект на утилізацію запасних білків мегагаметофіта спостерігався за дії ауксину за концентрації  $4 \cdot 10^{-5}$  М та абсцизової кислоти (рис. 3, доріжки 5, 7). Відомо, що АБК є сильним інгібітором проростання насіння за рахунок блокування деяких етапів процесу транскрипції і трансляції [2], а ауксин, у концентрації, вищій за фізіологічну, може мати токсичну дію. Ауксин за концентрації  $10^{-5}$  М та івін, РРР з ауксиною активністю, не впливали на швидкість протеолітичного розщеплення запасних білків мегагаметофіту сосни порівняно з контролем (рис. 3, доріжки 3, 4).

**Висновок.** Отримані результати свідчать про стимулятивний ефект низки синтетичних регуляторів росту (триман-1, емістим С, зеастимулін та агростимулін) на процес проростання насіння сосни звичайної, що робить перспективним їх використання для пришвидшення росту проростків, щоб зменшити їх ураження патогенними організмами, які живуть у ґрунті.

## Література

1. Кефели В.И. Химические регуляторы роста / В.И. Кефели, Л.Д. Прусакова. – М. : Изд-во "Знание", 1985. – 63 с.
2. Лихолат Т.В. Регуляторы роста древесных растений / Т.В. Лихолат. – М. : Изд-во "Лесн. пром-сть", 1983. – 240 с.
3. Маттис Г.Я. Интенсификация выращивания посадочного материала для защитного лесоразведения / Г.Я. Маттис. – М. : Изд-во "Лесн. пром-сть", 1976. – 144 с.
4. Меняйло Л.Н. Гормональная регуляция ксилогенеза хвойных / Л.Н. Меняйло. – Новосибирск : Изд-во "Наука", 1987. – 185 с.
5. Муромцев Г.С. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений / Г.С. Муромцев, Д.И. Чкаников, О.Н. Кулаева, К.З. Гамбург. – М. : ТзОВ "Агропромиздат", 1987. – 384 с.
6. Ракитин Ю.В. Химическая регуляция жизнедеятельности растений / Ю.В. Ракитин. – М. : Изд-во "Наука", 1983. – 259 с.
7. Синников А.С. Выращивание сеянцев хвойных пород в полиэтиленовых теплицах / А.С. Синников, Б.А. Молчанов, В.Н. Драчков. – М. : ТзОВ "Агропромиздат", 1986. – 126 с.
8. Смирнов Н.А. Выращивание посадочного материала для лесовосстановления / Н.А. Смирнов. – М. : Изд-во "Лесн. пром-сть", 1981. – 169 с.
9. Терек О.И. Рост растений и физиологически активные вещества / О.И. Терек. – К. : Вид-во УМК ВО, 1990. – 52 с.
10. Allona I. Seed storage proteins from *Pinus pinaster* Ait. Homology of major components with 11S proteins from angiosperms / I. Allona, R. Casado, C. Aragoncillo // Plant Sci. – 1992. – Vol. 87. – P. 9-18.
11. Baker S.S. Genes encoding 11S-globulin-like proteins are expressed in the megagametophyte soon after fertilization in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) / S.S. Baker, C.L. Rugh, F.W. Whitmore [et al.] // Int. J. Plant Sci. – 1996. – Vol. 157, № 4. – P. 453-461.
12. Flinn B.S. Evaluation of somatic embryos of interior spruce. Characterization and developmental regulation of storage proteins. / B.S. Flinn, D.R. Roberts, I.E.P. Taylor // Physiol Plant. – 1991 a. – Vol. 82. – P. 624-632.

**13. King J.** Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth / J. King, D. Gifford // Plant. Physiol. – 1997. – Vol. 113. – P. 1125-1135.

**14. Klimaszewska K.** Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobus* and in somatic embryos from different maturation treatments / K. Klimaszewska, F. Morency, C. Jones-Overtona [et al] // Physiol. Plant. – 2004. – Vol. 121. – P. 682-690.

**Гут Р.Т. Мобилизация запасных белков при прорастании семян сосны обыкновенной**

Установлено, что под воздействием синтетических регуляторов роста цитокининовой природы в проростках происходит общая стимуляция обмена веществ, а также усиление мобилизации запасных белков. Полученные результаты свидетельствуют о компетентности клеток прорастающего зародыша к использованным нами регуляторам роста. Исследован стимулирующий эффект ряда регуляторов роста на процесс прорастания семян сосны обыкновенной, что делает перспективным их использование для ускорения роста проростков, чтобы уменьшить их поражение патогенными организмами, которые живут в почве.

**Ключевые слова:** гормональная регуляция, прорастание семян, белки, сосна обыкновенная.

**Gout R.T. Increased mobilization of reserve proteins occurs during seed germination of Scots pine**

It is well established that the induction of cellular metabolism and the increase in the mobilisation of reserve proteins take place in seedlings in response to synthetic growth regulators of cytokinin's nature. The results of this study indicate that cells of germinating seeds effectively respond to tested growth regulators. We found that a panel of growth regulators significantly stimulate the process of germination of Scots pine's seeds, indicating their potential use for the acceleration of seed germination which can increase their resistance to a variety of phytopathogens in the soil.

**Keywords:** hormonal regulation, germinating seeds, proteins, Scots pine.

**УДК 599.735.31** Доц. І.В. Делеган, канд. с.-г. наук – НЛТУ України, м. Львів;  
проф. В.І. Домніч, д-р біол. наук – Запорізький НУ

**ОСОБЛИВОСТІ МИСЛИВСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
І ПОЛЮВАННЯ В ДЕРЖАВНИХ ЛІСАХ СЛОВАЧЧИНИ**

З'ясовано особливості організації ведення мисливського господарства в державних лісах Словаччини. Наведено матеріали, що відображають видовий склад, і обсяги добування мисливської фауни, показано ціни на послуги, зокрема на відстріл основних видів мисливської фауни.

**Ключові слова:** мисливство, державні ліси, Словаччина.

Вивчення прогресивного досвіду має вагоме значення для докорінного реформування ведення мисливського господарства в Україні [1]. Досвід організації ведення мисливського господарства і надання послуг мисливцям вивчали загальноприйнятими методами під час закордонних поїздок (1996-2010 рр.) та шляхом використання інформаційної системи державних лісів Словаччини [2-10].

Словаччина (49036 км<sup>2</sup>) характеризується значною лісистістю – 40,8 % і високим рівнем ведення мисливського господарства. Частка державних лісів у Словаччині становить 42,7 %, решта, приватні (14,9 %), суспільні та ін.