

УДК 581.1+577.34.05

М. С. РАДЮК, И. Н. ДОМАНСКАЯ, Е. А. БУДАКОВА, И. А. ДРЕМУК, Н. В. ШАЛЫГО

## О НАКОПЛЕНИИ ТИОНИНОВ В ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE*)

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, email:radmes@mail.ru

(Поступила в редакцию 17.10.2013)

**Введение.** Тионины – антимикробные белки, которые принадлежат к 13-му классу PR-белков (pathogenesis-related proteins) и обозначаются как PR13 [1]. Они являются представителями семейства основных белков с низким молекулярным весом, богатых серосодержащими аминокислотами. Благодаря высокому содержанию цистеина, образующего между собой дисульфидные мостики, тионины обладают высокой структурной стабильностью, что позволяет им сохранять активность при нагревании до 100 °С [2]. Тионины проявляют токсичность в отношении различных патогенных микроорганизмов (бактерий, грибов, дрожжей). Кроме того, они могут быть токсичными также для растений и млекопитающих [2, 3]. Впервые сообщение о том, что в семенах пшеницы содержится вещество, угнетающе действующее на дрожжи, появилось еще в конце XIX века [цит. по 4]. В 1942 г. это вещество было выделено из эндосперма семян пшеницы и кристаллизовано. Выделенное соединение оказалось белком с низким молекулярным весом и высоким содержанием серы и получило название пуротионин [5]. Позднее тионины были выделены из семян других злаковых культур, таких как рожь (секалетионин) [6], овес ( $\alpha$ - и  $\beta$ -авенотионины) [7], ячмень ( $\alpha$ - и  $\beta$ -гордотионины) [8], а также из этиолированных листьев ячменя [9–11]. Однако работы по динамике накопления тионинов в этиолированных, зеленеющих и зеленых проростках ячменя практически не проводились. Не исследовалось также накопление тионинов в зависимости от возраста проростков.

Цель настоящей работы – изучение содержания тионинов в листьях ячменя в зависимости от возраста растений и световых условий.

**Материалы и методы исследования.** Для исследования использовали отрезки листьев зеленых, зеленеющих и этиолированных проростков ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Гонар, выращенные на воде при температуре 24 °С.

Зеленые проростки росли при интенсивности света  $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  с фотопериодом 14 ч, а этиолированные – в полной темноте. Зеленеющие растения получали путем освещения этиолированных проростков при указанной выше интенсивности света. В отдельных случаях зеленые проростки на определенный промежуток времени помещали в темноту.

В опытах использовали как листья, срезанные над зерновкой, так и отрезки листьев, полученные при разделении срезанных над зерновкой листьев на 2 равные части – верхнюю и нижнюю часть соответственно.

Определение тионинов проводили, как описано в работе [12]. Для этого навеску листьев ячменя весом 4 г измельчали, помещали в фарфоровую ступку, добавляли 0,3 мл 1 М Трис-НСl буфера рН 8,5 и растирали до получения гомогенной массы. Полученный гомогенат фильтровали через 2 слоя капроновой ткани, нагревали в течение 15 мин при 80 °С, используя термоблок (Termomixer comfort, Germany), затем центрифугировали 15 мин при 13 000 g. Осадок отбрасывали. К супернатанту добавляли сульфат аммония из расчета 0,35 г/мл, выдерживали при температуре +4 °С в течение 30 мин и центрифугировали 15 мин при 13 000 g. Осадок отбрасывали. К супернатанту добавляли сульфат аммония в количестве 0,15 г/мл, выдерживали при температуре +4 °С в течение 60 мин и центрифугировали 15 мин при 13 000 g. Супернатант удаляли, осадок

растворяли в 0,1 мл 0,1 М Трис-НСl буфера рН 8,5. Далее последовательно проводили восстановление дисульфидных групп и алкилирование, чтобы предотвратить повторное образование дисульфидных связей [13]. Для восстановления дисульфидных групп к 0,1 мл полученного раствора антимикробных белков добавляли 20 мкл 10 % SDS-Na, 2 мкл меркаптоэтанола и инкубировали в течение 10 мин при 60 °С, после чего смесь охлаждали на воздухе до комнатной температуры. Для алкилирования к раствору восстановленных тионинов добавляли 0,5 мкл 4-винилпиридина и выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре.

Разделение тионинов и их производных осуществляли методом денатурирующего гель-электрофореза на установке Amersham Biosciences, USA. Перед стартом к растворам белков добавляли подкрашенный бромфенолом голубым 30%-ный глицерин из расчета 10 мкл глицерина на 50 мкл экстракта. На старт в лунки помещали по 10 мкл раствора. Гель-электрофорез проводили используя 15%-ный разделяющий и 5%-ный концентрирующий гели и трициновый буфер (0,1М, рН 8,25), согласно протоколу [14]. Электрофорез проходил при напряжении 40 В до вхождения белков в разделяющий гель, после чего напряжение увеличивали до 100 В и продолжали электрофорез еще в течение 4 ч. Визуализацию белков в геле проводили используя краситель Coomassie R-250. Для количественной оценки содержания тионинов окрашенный гель сканировали (HP Scanjet G3110). Количество тионинов рассчитывали в относительных единицах, используя программу TotalLabTL 120. Белок определяли по методу Бредфорд [15]. В работе представлены данные трех независимых экспериментов.

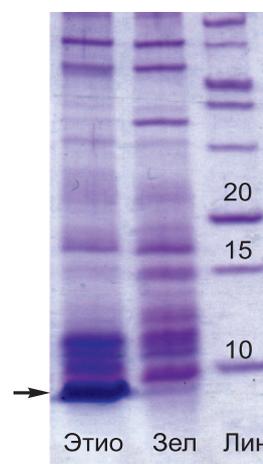
**Результаты и их обсуждение.** Содержание тионинов в этиолированных проростках существенно превышает их количество в зеленых растениях, что отчетливо видно визуально (полосы в области 5–6 кДа) после окрашивания геля (рисунок). Количественный анализ показал, что уровень тионинов в этиолированных листьях практически в 4,5 раза выше по сравнению с зелеными листьями (табл. 1), что согласуется с литературными данными [9, 11]. Такое соотношение между содержанием тионинов в этиолированных и зеленых листьях характерно для листа в целом. Если срезанный над зерновкой лист разделить на 2 равные части, то для верхней части листьев это превышение составит 28 раз, а для нижней части листьев 3 раза.

Т а б л и ц а 1. Содержание тионинов в целом листе, в верхней и нижней частях листа зеленых и этиолированных 7-дневных проростков ячменя, отн. ед.

Вариант	Зеленые проростки	Этиолированные проростки
Целый лист	77±9	344±15
Верхняя часть листа	9±3	255±28
Нижняя часть листа	145±20	434±42

Различаются по содержанию тионинов также верхняя и нижняя части листа одного и того же варианта. В частности, уровень антимикробных белков в нижней части этиолированного листа превышает их количество в его верхней части в 1,7 раза, а зеленом листе это различие составляет 16 раз. Высокое содержание тионинов в нижней части срезанного над зерновкой листа обусловлено их большим уровнем в ткани самого листа, так как в колеоптиле тионины не обнаружены [10]. Такое распределение антимикробных белков в листе, по-видимому, связано с тем, что нижняя часть листа располагается ближе к почве, в которой находятся патогенные грибы и микроорганизмы. Антимикробные белки, имеющиеся в этой части листьев, наряду с антимикробными белками зерновки могут препятствовать развитию патогенных организмов, тем самым защищая проросток от болезней.

Содержание тионинов в верхней части зеленых листьев с возрастом имеет тенденцию к снижению. Напротив, уровень антимикробных белков в нижней части зеленых листьев с возрастом проростков увеличивается (табл. 2). Известно, что проростки ячменя, выращенные на чистой



Содержание тионинов в верхней части этиолированных (Этио) и зеленых (Зел) проростков ячменя одного возраста. Электрофоретические полосы, соответствующие тионинам, обозначены стрелкой. Цифры над полосами белковых маркеров обозначают их молекулярный вес в кДа

воде, начинают стареть с 7-дневного возраста, когда питательные вещества зерновки полностью расходуются. При этом, как показал наш опыт, общее содержание белков в проростках ячменя при увеличении их возраста с 6 до 9 дней снижается с  $12,5 \pm 0,1$  до  $10,0 \pm 0,3$  мг/г сырой массы. Тем не менее содержание тионинов в нижней части стареющих 9-дневных проростков ячменя почти в 2 раза выше, чем в более молодых 6-дневных (см. табл. 2).

**Т а б л и ц а 2. Содержание тионинов в отрезках листьев зеленых проростков ячменя в зависимости от их возраста, отн. ед.**

Вариант	Возраст проростков, дни			
	6	7	8	9
Верхняя часть листа	$1,0 \pm 0,15$	$0,98 \pm 0,13$	$0,96 \pm 0,10$	$0,86 \pm 0,12$
Нижняя часть листа	$1,0 \pm 0,20$	$1,20 \pm 0,12$	$1,61 \pm 0,12$	$1,87 \pm 0,10$

П р и м е ч а н и е. За 1,0 принято содержание тионинов в листьях 6-дневного возраста

Возможно, это связано с тем, что стареющие в отсутствие минерального питания листья быстро ослабевают и становятся менее устойчивыми к патогенным микроорганизмам. Увеличение количества антимикробных белков в нижней части таких листьев может быть защитной реакцией на возможную атаку патогенов.

Содержание тионинов в проростках ячменя может регулироваться светом. Из литературы известно [9, 10], что синтез мРНК, кодирующей предшественник тионинов, и их процессинг блокируется сразу же после переноса этиолированных растений на свет. Проведенные нами эксперименты показали, что в ходе освещения этиолированных проростков количество тионинов в верхней части зеленеющих листьев уменьшалось быстрее, чем в нижней, где уровень тионинов снижался очень медленно (табл. 3). Так, освещение этиолированных растений в течение 1 сут не привело к достоверному снижению уровня антимикробных белков в нижней части листьев и только через 2 сут освещения содержание тионинов снизилось на 22 % от его количества, имевшегося в этой части листьев в темноте до начала освещения. Полученные данные указывают на высокую устойчивость молекул тионинов, если принять за основу отсутствие их синтеза *de novo*, как указано в работе [9]. Это, по-видимому, обеспечивает защиту проростков от патогенных организмов после их выхода из почвы,

**Т а б л и ц а 3. Изменение содержания тионинов при зеленении 6-дневных этиолированных проростков ячменя в зависимости от продолжительности освещения, отн. ед.**

Вариант	Время освещения, ч			
	0	8	24	48
Верхняя часть листа	$1,0 \pm 0,10$	$0,74 \pm 0,18$	$0,67 \pm 0,08$	$0,72 \pm 0,11$
Нижняя часть листа	$1,0 \pm 0,05$	$1,06 \pm 0,06$	$0,98 \pm 0,06$	$0,78 \pm 0,10$

П р и м е ч а н и е. За 1,0 принято содержание тионинов в листьях до начала освещения, где они находились в этиолированном состоянии.

Блокировка синтеза тионинов светом не является необратимой. На это указывают полученные нами результаты по накоплению антимикробных белков при затемнении зеленых проростков ячменя. В частности, помещение зеленых растений в темноту через 4 ч приводит к значительному накоплению тионинов в нижней части листа по сравнению с количеством, зарегистрированным на свету (в 1,44 раза), а через 2 сут затемнения различие достигает уже 12 раз (табл. 4). Тем не менее содержание тионинов в нижней части зеленых листьев даже через 2 сут темноты остается в 2,5 раза ниже уровня тионинов, содержащихся в этиолированных листьях –  $165 \pm 25$  и  $408 \pm 65$  отн. ед. соответственно. В верхней части листьев количество антимикробных белков в темноте достоверно не изменяется (табл. 4).

Модулирующее действие света на содержание антимикробных белков можно объяснить тем, что в природе отсутствие света в ночные периоды, как правило, сопровождается возрастанием влажности. При этом увеличивается вероятность заражения растений грибковыми патогенами.

Т а б л и ц а 4. Изменение содержания тионинов в отрезках листьев зеленых 6-дневных проростков ячменя в зависимости от продолжительности их затемнения, отн. ед.

Вариант	Время затемнения, ч				
	0	4	8	24	48
Верхняя часть листа	1,0±0,05	1,08±0,06	1,03±0,05	0,82±0,06	0,92±0,08
Нижняя часть листа	1,0±0,15	1,44±0,18	2,37±0,24	6,74±0,30	12,00±0,35

П р и м е ч а н и е. За 1,0 принято содержание тионинов в листьях до начала затемнения.

В солнечную и сухую погоду такая вероятность уменьшается. Кроме того, вероятность грибковой патогенной атаки в пасмурную или дождливую погоду возрастает, особенно в нижних ярусах культурных фитоценозов, где освещенность ниже, а влажность выше, чем в верхних ярусах.

**Заключение.** Показано, что содержание антимикробных белков тионинов в этиолированных проростках ячменя на порядок выше уровня тионинов, зарегистрированного в зеленых растениях. В нижней части зеленого листа количество тионинов значительно превышает их содержание в верхней части листа. Установлено, что с увеличением возраста проростков содержание тионинов увеличивается только в нижней части листьев. При помещении зеленых проростков в темноту уровень тионинов возрастает, однако он не достигает количества тионинов, регистрируемых в этиолированных листьях этого же возраста. Предполагается, что высокий уровень содержания тионинов в нижней части проростков и его увеличение в темноте согласуется с общей стратегией защиты растений от патогенов и обусловлено тем, что в природе нижняя часть растений контактирует с почвой (располагается ближе к почве), где из-за наличия патогенных микроорганизмов и их спор, а также повышенной влажности, особенно в ночное время, велика вероятность заражения.

### Литература

1. Van Loon L. C., Van Strien E. A. // *Physiol. and Mol. Plant Pathology*. 1999. Vol. 55. P. 85–97.
2. Broekaert W. F., Cammue B. P. A., DeBolle M. F. C. et al. // *Crit. Rev. Plant Sci*. 1997. Vol. 16. P. 297–323.
3. Stec B. // *Cell. Mol. Life Sci*. 2006. Vol. 63. P. 1370–1385.
4. Castro M. S., Fontes W. // *Protein Peptide Lett*. 2005. Vol. 12. P. 11–16.
5. Balls A. K., Hale W. S., Harris, T. H. // *Cereal Chem*. 1942. Vol. 19. P. 279–288.
6. Hernandez-Lucas C., Carbonero P., Garcia-Olmedo F. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1978. Vol. 26, N 4. P. 794–796.
7. Bekes F., Laszity R. // *Cereal Chem*. 1981. Vol. 58. P. 360–361.
8. Ponz F., Paz-Ares J., Hernández-Lucas C. et al. // *EMBOJ*. 1983. Vol. 2, N 7. P. 1035–1040.
9. Bohlmann H., Apel K. // *Mol. Gen. Genet*. 1987. Vol. 207. P. 446–454.
10. Bohlmann H., Clausen S., Behnke S., Giese H. et al. // *The EMBO Journal*. 1988. Vol. 7, N 6. P. 1559–1565.
11. Reimann-Philipp U., Schrader G., Martinoia E. et al. // *The Journal of Biol. Chem*. 1989. Vol. 264, N 15. P. 8978–8984.
12. Радюк М. С., Доманская И. Н., Будакова Е. А., Спивак Е. А., Шалыго Н. В. // *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук*. 2013. №3. С. 67–72.
13. Fullmer C. S. // *Anal. Biochem*. 1984. Vol. 142. P. 336–339.
14. Schagger H., von Jagow G. // *Anal. Biochem*. 1987. Vol. 166. P. 368–379.
15. Bradford M. // *Analyt. Biochem*. 1976. Vol. 72. P. 248–254.

M. S. RADYUK, I. N. DOMANSKAJA, E. A. BUDAKOVA, I. A. DREMUК, N. V. SHALYGO

#### ABOUT ACCUMULATION OF THIONINS IN BARLEY SEEDLING (*HORDEUM VULGARE*)

#### Summary

The localization and dynamics of an antimicrobial protein thionin in green and etiolated barley seedlings cv Honar was studied. It was shown that the content of thionin in etiolated barley seedlings is much higher than that registered in green plants. In the bottom of the green leaf the content of thionin greatly exceeds that of the upper part of the sheet. It was found that only in the bottom part of the leaf thionin content increases with age of the seedlings. When placed in a dark, green seedlings show increasing thionin content but it does not reach the amount registered in the etiolated leaves of the same age. It was assumed that the high level of thionin in the lower part of seedlings and increase of it in darkness is consistent with the general strategy of plant defence against pathogens and caused by the fact that the nature of the lower part of the plant is contacted with the soil (located closer to the ground), where due to the presence of pathogenic micro-organisms and their spores as well as high humidity, especially at night, chances of infection are high.