

УДК 581.1 + 577.34.05

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

**ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ  
НА СОДЕРЖАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ БЕЛКОВ ТИОНИНОВ  
В ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE*)**

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, email:shalygo@ibp.org.by*

*(Поступила в редакцию 12.12.2013)*

**Введение.** Реализация потенциала урожайности сельскохозяйственных культур лимитируется неблагоприятными (стрессовыми) факторами внешней среды, такими как недостаток света, влаги, минерального питания, неоптимальной для развития растений температурой, болезнями и вредителями. В растительном организме существует эффективная многокомпонентная система защиты в ответ на стрессовые воздействия, включающая низкомолекулярные антиоксиданты, антиоксидантные ферменты, защитные гены, стрессовые белки, в том числе антимикробные белки и пептиды, что позволяет растениям адаптироваться к абиотическим и биотическим видам стресса.

К абиотическим видам стресса, которым на ранней стадии вегетации все чаще подвергаются растения, относятся низкая температура, засуха, а также избыточное увлажнение (подтопление), что отрицательно сказывается на физиологическом состоянии растений. В ослабленном состоянии растения более подвержены влиянию биотического стресса, вызванного патогенными микроорганизмами. Важную роль в защите растений от патогенов играют антимикробные белки (АМБ), представителями которых являются дефензины и тионины [1–5].

Дефензины – белки, обладающие фунгицидной, инсектицидной и антимикробной активностью [6]. Они обнаружены у всех живых существ от млекопитающих до миксобактерий. Тионины, в отличие от дефензинов, находят только у растений. Тионины токсичны для бактерий, грибов, дрожжей, а также растений и млекопитающих [7, 8]. Впервые тионины были выделены из семян пшеницы [9]. Позднее они были изолированы также из семян других злаков, таких как ячмень [10], овес [11] и рожь [12]. Долгое время предполагалось, что у злаков тионины находятся только в семенах. Однако в 1988 г. из листьев ячменя был выделен белок, очень близкий по своему составу и свойствам к гортотионину, присутствующему в семенах ячменя [13–15]. Три сходных с тионином белка были выделены из листьев и стеблей омелы (*Viscum album*) и получили название вискотоксинов [16]. Тионины также обнаружены в листьях *Arabidopsis thaliana* [17].

Показано, что дефензины растений могут синтезироваться также в ответ на абиотические виды стресса: засуху в листьях сои [18], засоление в листьях табака [19] и пониженные температуры в листьях озимой пшеницы [20]. В это же время данные о накоплении антимикробных белков тионинов в растениях ячменя в условиях абиотического стресса в литературе отсутствуют. Целью настоящей работы является изучение влияния низкой температуры, засухи и подтопления на содержание тионинов в проростках ярового ячменя.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали зеленые проростки ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) разных сортов, выращенные до определенного возраста на воде или в почве при температуре 24 °С и освещенности 100 мкЕ · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup> с фотопериодом 14 ч.

Почвенную засуху моделировали, как описано в работе [21]. Для этого пророщенные в течение 1 сут на влажной фильтровальной бумаге семена сортов Гонар, Вакула и Adagio, обладающие разной устойчивостью к засухе, высаживали в почву с относительным содержанием влаги

52 % и выращивали до 16-дневного возраста без полива. Контрольные растения росли в почве, в которой относительное содержание влаги поддерживалось на исходном уровне.

Для моделирования избыточного оводнения (подтопления) 5-дневные проростки ячменя сортов с разной устойчивостью к данному стрессовому фактору (Гонар, Бровар и Талер), выращенные на воде в условиях погружения в воду только корневой системы, заливали водой на 3 сут так, чтобы под водой были не только корни, но и половина колеоптиля, сохраняя при этом фото-период 14 ч. Контролем служили растения, погруженные в ходе эксперимента в воду корнями.

В опытах с низкотемпературным стрессом 6-дневные проростки ячменя сорта Гонар, выращенные на воде, выдерживали в течение 24 ч в холодильной камере в темноте при температуре +4 °С. В отдельном эксперименте опытные растения после холодного стресса дополнительно помещали на 24 ч в темноту при температуре 24 °С. Контрольные растения находились в ходе всего опыта в темноте при 24 °С (1 и 2 сут соответственно).

Пробы для анализа при моделировании засухи и подтопления отбирали через 4 ч после начала светового периода, пробы для анализа при низкотемпературном стрессе отбирали в конце темного периода. Для этого листья срезали над зерновкой, удаляли колеоптиль и делили их на 2 равные части. Навески (по 4 г) составляли из нижних частей листьев, способных к активному накоплению тионинов [22].

Экстракцию тионинов из растительной ткани и их определение проводили по методике, подробно описанной в работе [23]. Количество тионинов рассчитывали в относительных единицах, используя программу TotalLabTL 120. Белок определяли по методу Бредфорд [24].

В работе представлены данные трех независимых экспериментов, проведенных в 3-кратной биологической повторности.

**Результаты и их обсуждение.** Сравнительный анализ содержания тионинов в контрольных и подвергнутых действию засухи проростках ячменя сортов Гонар, Вакула и Adagio позволил установить, что 16-дневные контрольные растения этих сортов различались по количеству тионинов. Низкое содержание тионинов в контроле было зарегистрировано у сорта Гонар, более высокий уровень тионинов отмечен у сорта Вакула, а их самое высокое количество – у сорта Adagio (табл. 1).

Таблица 1. Содержание тионинов в отрезках листьев 16-дневных проростков ячменя в условиях засухи (Опыт) и в растениях, не подвергавшихся действию стрессового фактора (Контроль), отн. ед.

Сорт	Контроль	Опыт	Опыт/контроль
Гонар	18±4	38±7	2,0
Вакула	22±5	89±7	4,0
Adagio	36±6	187±42	5,2

При засухе содержание тионинов увеличилось в проростках всех трех сортов. При этом меньше всего уровень тионинов возрос в растениях сорта Гонар, за ним следовал сорт Вакула и самый высокий прирост содержания тионинов был отмечен в проростках сорта Adagio – 2,0; 4,0 и 5,2 раза по сравнению со своим контролем соответственно (табл. 1). Из полученных данных можно сделать несколько выводов. Во-первых, сорта ячменя исходно различаются по содержанию тионинов, синтез которых происходит конститутивно. Во-вторых, засуха приводит к увеличению содержания тионинов в растениях ячменя. Хотя в природе засуха сама по себе не способствует развитию патогенов, в особенности грибковых, однако она приводит к ослаблению растительного организма [25]. В таких условиях вероятность поражения растений патогенными микроорганизмами увеличивается. В связи с этим более высокий уровень тионинов, регистрируемый в проростках ячменя сорта Adagio, вполне объясним, так как этот сорт менее устойчив к засухе по сравнению с растениями сортов Вакула и Гонар [21].

Избыточное увлажнение посевов (подтопление) увеличивает вероятность поражения растений грибами, защиту от которых призваны обеспечивать антимикробные белки. Моделирование подтопления в лабораторных условиях показало, что контрольные проростки изученных сортов ячменя Гонар, Бровар и Талер различаются по содержанию тионинов. Больше всего конститу-

тивно синтезируемых тионинов содержали растения сорта Гонар, за ним следовали проростки сорта Бровар, а проростки сорта Талер содержали наименьшее количество тионинов (табл. 2). В условиях подтопления (в течение 3 сут) содержание тионинов в растениях сортов Гонар и Бровар увеличилось в 1,2 и 1,6 раза соответственно, тогда как в проростках сорта Талер уровень тионинов, напротив, снизился по сравнению с контролем (табл. 2). Полученные результаты показывают, что менее устойчивые к подтоплению растения ячменя сорта Талер [26], в отличие от более устойчивых к подтоплению сортов Гонар и Бровар [26], не только содержат низкий уровень тионинов, но и не способны индуцировать их синтез в условиях избыточного увлажнения.

**Таблица 2. Содержание тионинов в отрезках листьев 8-дневных проростков ячменя, находившихся в течение последних 3 сут в условиях подтопления (Опыт), и в растениях, не подвергавшихся действию стрессового фактора (Контроль), отн. ед.**

Сорт	Контроль	Опыт	Опыт/контроль
Гонар	260±30	318±31	1,2
Бровар	154±30	246±35	1,6
Талер	86±20	66±15	0,77

В отличие от засухи и подтопления, при действии которых уровень тионинов в растениях возрастал, содержание тионинов в проростках ячменя, находившихся в течение 24 ч в холодильной камере в темноте при температуре + 4 °С, оказалось практически в 4 раза ниже, чем в контроле (табл. 3). Перемещение опытных растений из холодильной камеры на 24 ч в нормальные условия выращивания, при которых находились контрольные растения, привело к тому, что в опытном варианте уровень тионинов увеличился. Тем не менее в конечном итоге количество тионинов в проростках ячменя, испытавших на себе воздействие низкотемпературного стресса, было в 2 раза ниже, так как за это время уровень тионинов в контрольных растениях также возрос (табл. 3). Из этого следует, что более низкое содержание тионинов в проростках ячменя, находившихся в течение 24 ч в условиях действия низкотемпературного стресса, связано только с замедлением накопления тионинов при температуре + 4 °С. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что восстановление уровня тионинов в опытных растениях ячменя после снятия действия низкой температуры происходит медленно.

**Таблица 3. Изменение содержание тионинов в листьях проростков ячменя сорта Гонар при моделировании низкотемпературного стресса (Опыт) и в растениях, не подвергавшихся действию стрессового фактора (Контроль), отн. ед.**

Вариант	Контроль	Опыт
24 ч, + 4 °С	443±4	108±4
(24 ч, + 4 °С) + (24 ч, + 24 °С)	620±40	330±3

**Заключение.** Установлено, что содержание антимикробных белков тионинов в проростках ячменя при низкотемпературном стрессе (24 ч, + 4 °С) снижается по сравнению с контрольными растениями, что обусловлено замедлением накопления тионинов при низкой температуре. В условиях засухи и подтопления количество тионинов в проростках ячменя возрастает в несколько раз. При этом превышение уровня тионинов в растениях ячменя под влиянием засухи зависит от сорта ячменя и находится в обратной зависимости от его засухоустойчивости. Напротив, степень возрастания содержания тионинов под влиянием подтопления находится в прямой зависимости от устойчивости проростков ячменя к данному стрессору. Полученные результаты позволяют предположить, что уровень тионинов, зарегистрированный в условиях действия абиотических факторов внешней среды, с одной стороны, можно использовать как показатель устойчивости растений к биотическому стрессу, с другой стороны, он может быть составной частью оценки комплексной устойчивости растений ячменя к биотическому стрессу и абиотическим видам стресса, по крайней мере к засухе и к подтоплению.

## Литература

1. Broekaert W. F., Cammue B. P. A., DeBolle M. F. C. et al. // Crit. Rev. Plant Sci. 1997. Vol. 16. P. 297–323.
2. Garcia-Olmedo F., Molina A., Alamillo J. M., Rodriguez-Palenzuela P. // Biopolymers (Peptide Sci.). 1998. Vol. 47. P. 479–491.
3. Garcia-Olmedo F., Rodriguez-Palenzuela P., Molina A. et al. // FEBS letters. 2001. Vol. 498. P. 219–222.
4. Одинцова Т. И., Коростылева Т. В., Уткина Л. Л. и др. // Вавилов. журн. генетики и селекции. 2012. Т. 16, № 1. С. 107–115.
5. Егоров Ц. А., Одинцова Т. И. // Биоорг. химия. 2012. Т. 38, № 1. С. 7–17.
6. Комалетдинова Ф. М. // С.-х. биология. 2009. № 5. С. 8–16.
7. Stotz H. U., Thomson J. G., Wang Y. // Plant Signal Behav. 2009. Vol. 4. P. 1010–1012.
8. Stec B. // Cell. Mol. LifeSci. 2006. Vol. 63. P. 1370–1385.
9. Balls A. K., Hale W. S., Harris T. H. // Cereal Chem. 1942. Vol. 19. P. 279–288.
10. Ponz F., Paz-Ares J., Hernández-Lucas C. et al. // EMBOJ. 1983. Vol. 2, N 7. P. 1035–1040.
11. Bekes F., Lasztity R. // Cereal Chem. 1981. Vol. 58. P. 360–361.
12. Hernandez-Lucas C., Carbonero P., Garcia-Olmedo F. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1978. Vol. 26, N 4. P. 794–796.
13. Bohlmann H., Apel K. // Mol. Gen. Genet. 1987. Vol. 207. P. 446–454.
14. Bohlmann H., Clausen S., Behnke S. et al. // The EMBO Journal. 1988. Vol. 7, N 6. P. 1559–1565.
15. Reimann-Philipp U., Schrader G., Martinoia E. et al. // The Journal of Biological Chemistry. 1989. Vol. 264, N 15. P. 8978–8984.
16. Samuelsson G. // System. Zool. 1973. Vol. 22. P. 566–569.
17. Epple P., Apel K., Bohlmann H. // Plant Physiol. 1995. Vol. 109, N 3. P. 813–820.
18. Maitra N., Cushman J. C. // Plant Physiol. 1998. Vol. 118. P. 1536.
19. Yamada S., Komori T., Imaseki H. // Plant Physiol. 1997. Vol. 115. P. 314.
20. Koike M., Okamoto T., Tsuda S. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. Vol. 298, N 1. P. 46–53.
21. Доманская И. Н., Самович Т. В., Будакова Е. А. и др. // Междунар. науч. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». Мн., 2010. С. 347.
22. Радюк М. С., Доманская И. Н., Будакова Е. А. и др. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2014. № 3. С. 42–45.
23. Радюк М. С., Шалыго Н. В., Доманская И. Н., Будакова Е. А. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2013. № 3. С. 67–72.
24. Bradford M. // Analyt. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
25. Жолкевич В. Н., Гусев Н. А., Капля А. В. и др. Водный обмен растений. М., 1989.
26. Дремук И. А., Шалыго Н. В. // Междунар. науч.-практ. конф. «Практико-ориентированные биотехнологические исследования в растениеводстве, животноводстве и медицине». Брест, 2013. С. 10–13.

M. C. RADYUK, I. N. DOMANSKAYA, E. A. BUDAKOVA, I. A. DREMUK, N. V. SHALYGO

### EFFECT OF ABIOTIC ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE CONTENT OF ANTIMICROBIAL PROTEINS THIONINS IN BARLEY (*HORDEUM VULGARE*)

#### Summary

It is found that the content of antimicrobial proteins thionins in barley is reduced during low temperature stress compared to control plants and that it is caused by a slowdown in the accumulation of thionins at a low temperature. Under conditions of drought and flooding the amount of thionins in barley increases several times. The increase in thionin levels in barley plants during drought depends upon the variety of barley and is inversely dependent upon its drought resistance. In contrast, the rate of increase in thionin content during flooding is in direct dependence upon tolerance of barley seedlings to this stressor. The acquired results suggest that the level of thionins registered under the action of abiotic environmental factors can be used as an indicator of biotic stress tolerance and also that it can be a part of a comprehensive evaluation of barley plants tolerance to biotic and different types of abiotic stresses, at least to drought and flooding.