

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 577.112:633.31/37
doi: 10.17223/19988591/19/7

Е.В. Жмудь¹, Н.С. Зиннер², О.В. Дорогина¹

¹Центральный сибирский ботанический сад СО РАН (г. Новосибирск)

²Сибирский ботанический сад Томского государственного университета (г. Томск)

ДИНАМИКА ТРИПСИНИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ *Hedysarum theinum* Krasnob. (Fabaceae Lindl.) В РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ И ПРИ МЕХАНИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РФФИ № 11-04-90768-моб_ст, гранта «Биоразнообразие» Президиума СО РАН № 23 и Интеграционного гранта СО РАН № 20.

Изучена активность ингибиторов трипсина (АИТ) в листьях растений *Hedysarum theinum* Krasnob., произрастающих в разных эколого-географических условиях, при механическом повреждении в зависимости от фазы фенологического развития и при отчуждении листьев. Анализ сезонной динамики активности АИТ в листьях растений, интродуцированных в СибБС ТГУ (г. Томск), показал, что минимальное значение этого признака было выявлено в фазе цветения и сохранялось в течение последующих двух лет наблюдений. Природные и интродуцированные в ЦБС СО РАН (г. Новосибирск) образцы характеризовались одинаковой динамикой АИТ с максимумом в фазе цветения. Установлено, что реакция отдельной особи на механические повреждения индивидуальна. Общей тенденцией было увеличение активности ингибиторов трипсина в первые 5 мин после отчуждения листьев и затем, через 15 мин после начала опыта, возвращение на уровень, близкий к начальному.

Ключевые слова: *Hedysarum theinum* Krasnob.; трипсинингибирующая активность; механическое повреждение растений; адаптация; ингибиторы протеиназ.

Введение

Копеечник чайный (*Hedysarum theinum* Krasnob.) – редкое для Сибири растение, занесенное в Красную книгу Республики Алтай [1]. Он был выделен из копеечника забытого (*Hedysarum neglectum* Ledeb.) как самостоятельный вид [2]. Встречается в пределах Горного Алтая в достаточно узком диапазоне экологических условий – в пределах высокогорного пояса растительности, в прилегающих районах лесного пояса на альпийских, субальпийских и лесных лугах, на каменистых склонах [3]. Вид активно заготов-

ливается в природе, поскольку содержит группу фенольных соединений в надземной части и корнях и активно используется в народной медицине [4, 5]. *H. theinum* успешно интродуцирован в Сибирском ботаническом саду ТГУ (СибБС ТГУ, г. Томск), где выращивается с 1993 г. из семян, собранных с хребта Холзун (Республика Алтай, Усть-Канский район) в кедрово-лиственничном редколесье С.Б. Нечепуренко из Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (ЦСБС СО РАН, г. Новосибирск). *H. theinum* широко используется в народной медицине как сырье для лекарственных препаратов, одним из которых является мангиферин, проявляющий противовирусную активность.

Растения *H. theinum* содержат значительное количество кормового белка и являются его потенциальными источниками. В нем обнаружена высокая активность таких антиалиментарных веществ, как ингибиторы трипсина (ИТ), которые в значительной степени снижают его перспективность в качестве кормового растения [6]. Ингибиторы протеиназ (ИП) составляют группу белков растений, объединяемых общей способностью образовывать с протеолитическими ферментами стереохимические белок-белковые комплексы, что приводит к конкурентному ингибированию их каталитической активности. ИТ в организме человека и животных взаимодействуют с трипсином, который в результате теряет каталитическую активность и возможность расщеплять белки; происходит снижение процесса гидролиза белков пищи и эффективности их усвоения, что способствует резкому снижению активности секрета поджелудочной железы. В результате белок не усваивается организмом, что приводит к обострению его дефицита.

Среди растений особенно высоким содержанием белков-ингибиторов протеиназ характеризуются представители семейства бобовых [7]. ИТ в семенах являются запасными белками, выступают в роли регуляторов активности эндогенных протеиназ и являются составной частью защитной системы растений, способствуя подавлению активности протеиназ насекомых-вредителей и патогенной микрофлоры [8–14]. ИТ в растениях относятся к белкам группы PR-6 (pathogenesis-related proteins, PR-proteins) [15], синтез которых индуцируется в патологических или сходных с патологическими стрессовых ситуациях, например при холодовых воздействиях, инфицировании микроорганизмами или внедрении патогенов [16–19]. Таким образом, активность ИТ в растениях играет важную адаптивную роль, которая изучена недостаточно для растений разных групп, а тем более для редких видов.

В медицинской практике ИТ применяют при лечении различных воспалительных заболеваний, где имеет место повышенная активность протеолитических ферментов; создаются лекарственные средства на основе ингибиторов протеиназ синтетического и животного происхождения [20]. Проводится поиск растительных источников ингибиторов протеиназ с целью создания лекарственных средств для лечения, например, энзимопатий,

сопровождающихся повышенной активностью протеолитических ферментов [21]. *H. theinum* может быть использован в качестве кормовой добавки с высоким содержанием биологически-активных веществ или может служить источником растительного сырья с высокой трипсинингибирующей активностью, предназначенного для использования в медицинских целях [6].

Целью данной работы является анализ сезонной и годичной динамики АИТ в листьях растений *H. theinum* в различных эколого-географических условиях и при механическом повреждении растений.

Материалы и методики исследования

Исследование годичной динамики активности водорастворимых ингибиторов трипсина (АИТ) в листьях *H. theinum* в СибБС ТГУ было проведено нами в средних образцах у растений средневозрастного онтогенетического состояния 4–6 лет жизни (2009–2011 гг., соответственно в трех повторностях для каждого опыта). В 2010 г. изучена, кроме того, сезонная динамика признака при интродукции в СибБС ТГУ (г. Томск), в ЦСБС СО РАН (г. Новосибирск) и в Горном Алтае (Усть-Коксинский район, подножие горы Красная). В 2010 г. в СибБС ТГУ (фаза бутонизации) и в Горном Алтае (фаза плодоношения) изучена динамика индивидуальной изменчивости признака в растениях при их механическом повреждении (отчуждении листьев), исследованная в обоих случаях на пяти средневозрастных особях. Листья срывались с каждого растения через определенные интервалы времени – 1, 3, 5, 10 и 15 мин. Динамика АИТ при механическом повреждении определялась индивидуально для каждой особи в трех повторностях. АИТ определяли в миллиграммах чистого трипсина, связанного ингибитором, на грамм воздушно-сухой муки листьев по методам [22, 23] с дополнениями [24]. Статистическая обработка данных (вычисление средней величины, ошибки средней и построение соответствующих графиков) проведена с использованием пакета программ «MS Excel».

Для определения использовали следующие реактивы: раствор трипсина в 0,001 н HCl; стандартный трис-HCl 0,02 М CaCl₂ – буфер (pH 7,7); раствор N-α-бензоил-DL-аргинин р-нитроанилида (БАПА) (производство США); 30%-ный раствор ледяной уксусной кислоты. Все растворы хранили в холодильнике не более двух недель. Муку из листьев получали, растирая воздушно-сухое сырье в ступке и просеивая ее через сито с диаметром ячейки 0,1 мм. Исследуемые вещества из муки экстрагировали дистиллированной водой в соотношении 1:400 в течение ночи в холодильнике; полученный экстракт центрифугировали в течение 30 мин при 7 000 g (не менее 11 000 об./мин). Определение активности ингибиторов трипсина проводили при 25°C в полученной надосадочной жидкости (НЖ), для чего прогревали все реактивы и НЖ предварительно в термостате в течение часа. К различным объемам НЖ (0,01–0,20 мл) приливали 1,5 мл стандартного буфера и 0,5 мл раствора трипсина. По истече-

нии 5 мин по секундомеру добавляли 1 мл раствора БАПА. Через 10 мин реакцию останавливали, добавляя 0,5 мл раствора CH_3COOH . Параллельно проводили определение активности чистого трипсина. Для этого к 0,01–0,20 мл экстрагента (дистиллированная вода) добавляли 1,5 мл стандартного буфера и 0,5 мл раствора трипсина. По истечении 5 мин добавляли раствор БАПА. Через 10 мин реакцию останавливали 30%-ной уксусной кислотой. Одновременно готовили контрольные растворы, для чего в контрольные пробирки добавляли раствор CH_3COOH сразу после внесения надосадочной жидкости и буферного раствора. При построении графика прохождения реакции использовали разные объемы надосадочной жидкости. Для определения величины АИТ использовали данные, полученные при ингибировании трипсина, близком к половинному [23].

Результаты исследования и обсуждение

Проведенное нами изучение годичной динамики АИТ в листьях растений *H. theinum* показало, что активность ИТ в листьях растений этого вида в СибБС ТГУ в 2009 и 2011 гг. была наибольшей по сравнению с другими ранее исследованными видами [24]. Нами обнаружено, что АИТ в листьях средневозрастных растений изучаемого вида в фазе цветения в 2010 г. была в среднем в 3 раза ниже, чем в 2009 г. Основываясь на ранее полученных результатах, максимальной АИТ характеризовались растения одной из популяций *H. gmelinii*, произраставшей в Горном Алтае (65,5 мг/г сухого веса) [25, 26]. Также выявлено, что АИТ в листьях *H. theinum* в культуре в 2009 и 2011 гг. была сопоставима с величиной этого признака в исследованных ранее семенах сои (90–250 мг/г сухого веса), которые являются эталоном [25]. АИТ этих образцов равнялась $132 \pm 15,4$ мг/г сухого веса муки листьев в фазе плодоношения в 2009 г. и в фазе цветения в 2011 г. – 83,1 мг/г сухого веса муки листьев соответственно (рис. 1).

Сезонная динамика АИТ в листьях *H. theinum* в СибБС ТГУ отличалась от выявленной ранее активности для других бобовых растений. Так, в листьях интродуцированных в ЦСБС СО РАН некоторых видов бобовых растений величина АИТ понижалась к фазе плодоношения [25, 27]. По нашим данным, в листьях интродуцированного в СибБС ТГУ *H. theinum* величина признака была наименьшей в фазе цветения и увеличивалась в фазе плодоношения растений. Такая сезонная динамика признака, когда минимальное его значение приходилось на фазу цветения, сохранялась в течение двух лет наблюдений (2009 и 2010 гг.) (рис. 1). Сравнение величины и динамики признака в средневозрастных растениях с природными образцами, интродуцированными в ЦСБС СО РАН, проведенное в 2010 г., показало, что в этом году величина АИТ в фазе цветения была наибольшей в природных условиях и на эту фазу приходилось максимальное значение признака. Такой же динамикой АИТ характеризовались растения

вида, интродуцированные в ЦСБС СО РАН, где величина этого признака была вдвое ниже, но его максимум приходился также на фазу цветения растений (рис. 1).

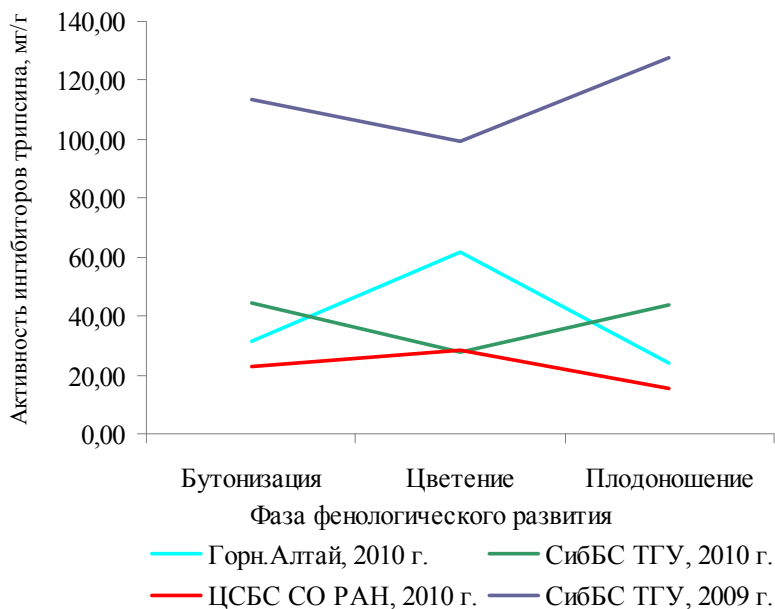


Рис. 1. Годичная и сезонная динамика АИТ в средних образцах листьев средневозрастных растений *H. theinum* в различных эколого-географических условиях, 2009–2010 гг.

Нами впервые в 2010 г. была исследована динамика АИТ в растениях *H. theinum* при механическом повреждении (отчуждении листьев). Она была неодинаковой в растениях в фазе бутонизации (СиБС ТГУ) и в фазе плодоношения (Горный Алтай). Так, в фазе бутонизации в 4 растениях из 5 АИТ возросла в течение 1 мин в 1,1–2,4 раза по сравнению с контролем; через 5 мин ее значения были выше контрольных в 1,3–2,9 раза, затем активность незначительно снизилась и через 15 мин после первого повреждения оставалась на уровне в 1,2–1,9 раза выше контрольного (рис. 2).

В фазе плодоношения в природных условиях характер изменчивости признака в растениях *H. theinum* при механических повреждениях отличался от предыдущего опыта (рис. 3). Так, АИТ в течение минуты после повреждения возросла в двух растениях из пяти в 1,7 и 3,5 раза, а в трех других растениях не изменилась. Через 5 мин в листьях всех исследуемых особей произошло ее увеличение в 1,2–4 раза. К десятой минуте после повреждения растений значения АИТ уменьшились в 1,3–7,8 раза во всех растениях, в одном из них — до нуля (растение 5). Через 15 мин АИТ восстановилась до первоначального уровня, превысив в растении № 5 исходную величину в 5,5 раза.

Таким образом, установлено, что каждое растение на механическое повреждение реагировало индивидуально. Очевидно, что средняя величина не отражает характер реакции каждого из растений на повреждение. Общим для реакции растений на повреждение в фазе бутонизации было сохранение высокого уровня АИТ через 15 мин после повреждения.

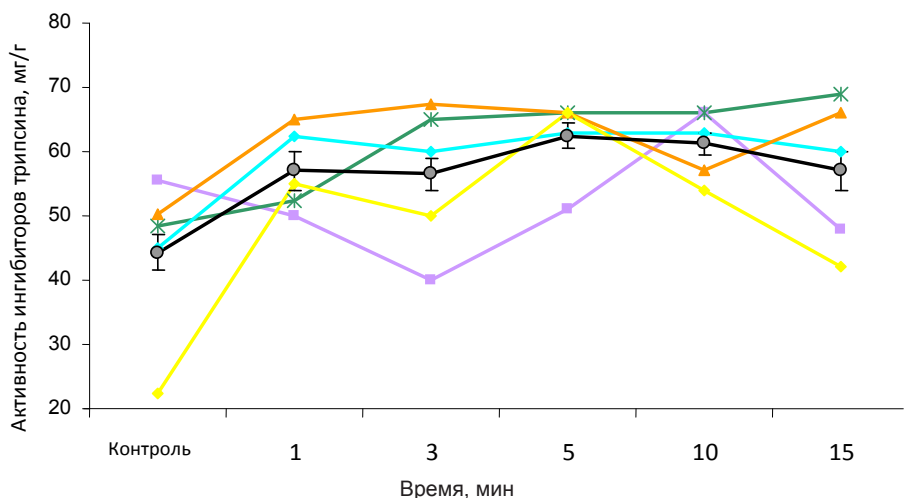


Рис. 2. Динамика АИТ при механическом повреждении растений *H. theinum* (СибБС ТГУ, 2010 г., фаза бутонизации). Здесь и далее линиями показаны реакции отдельных особей; на линии средней величины показано среднее значение признака с ошибкой

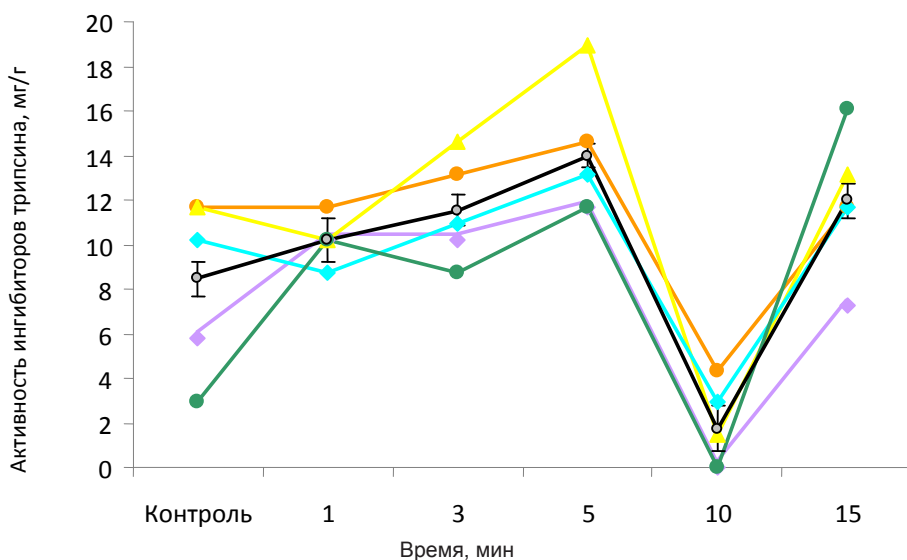


Рис. 3. Динамика АИТ при механическом повреждении растений *H. theinum* (Горный Алтай, 2010 г., фаза плодоношения)

Ранее было показано, что в растениях копеечника альпийского в ЦСБС СО РАН во время цветения АИТ в растениях увеличивалась почти в 2 раза в течение 5 мин после механического повреждения растений и уже через 15 мин возвращалась к контрольным значениям, что указывает на активное участие ИТ в защитных реакциях растений при механических повреждениях [28]. В растениях *H. theinum* в фазе плодоношения во всех исследованных особях произошло резкое снижение АИТ, наблюдавшееся через 10 мин после начала эксперимента, что, вероятно, свидетельствует об определенном снижении их защитных сил, наступившее в конце вегетационного периода.

Заключение

Нами выявлено, что в растениях *H. theinum* на протяжении вегетационного периода наблюдалась неодинаковая динамика АИТ в разных эколого-географических условиях, что свидетельствует о реализации различных приспособительных реакций у растений. При механических повреждениях их надземной части каждое растение реагирует индивидуально, но общим являются увеличение АИТ в первые минуты после отчуждения листьев и возвращение на уровень, близкий к контролю, либо иногда сохранение его на уровне незначительно выше контрольного через 15 мин после первого срывания листьев. Индукция ингибиторов протеиназ, в частности трипсина, сопровождающаяся усилением их активности, происходит, кроме того, при некрозах тканей, в том числе наступивших, например, из-за низкотемпературного воздействия и при повреждении насекомыми [13, 18]. Очевидно, что при механическом повреждении ткани неизбежно происходит инфицирование, поэтому рассматривать отдельно такие стрессовые для растения воздействия, как повреждение насекомыми, патогенами, низкими температурами или поранение, в данном случае не представляется возможным. Характер реакции каждого из растений на эти воздействия не однотипен и судить о процессах восстановления целостности организма по уровню средних значений признака было бы некорректно.

Таким образом, механическое повреждение, а именно отчуждение листьев, является удобной моделью для изучения роли АИТ в процессах адаптации растений. Изменение АИТ в растениях этого вида в течение вегетационного периода и при механических повреждениях отражает процесс, в который вовлечен целый ряд факторов их иммунной системы, что следует учитывать в процессе интродукции этого редкого для Сибири вида в новых условиях, а также при его практическом использовании.

Литература

1. Красная книга Республики Алтай (растения): Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений. Новосибирск, 1996. С. 23–24.
2. Красноборов И.М., Азовцев Г.Р., Орлов В.П. Новый вид рода *Hedysarum* (Fabaceae) из Южной Сибири // Ботанический журнал. 1985. Т. 70, № 7. С. 968–973.

3. Курбатский В.И. Флора Сибири. Т. 9: *Fabaceae (Leguminosae)*. Новосибирск : Наука, 1994. С. 153–166.
4. Сыева С.Я., Шурова М.В. Содержание химических веществ в растениях видов рода *Hedysarum* L. Горного Алтая // Материалы VI Международной научно-практической конференции. Барнаул, 2007. Кн. 2. С. 192–197.
5. Зиннер Н.С., Кукушкина Т.А., Высочина Г.И., Свиридова Т.П. Биологически активные вещества *Hedysarum alpinum* L. и *H. theinum* Krasnob. (*Fabaceae*), интродуцируемых в Томскую область // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2010. № 4(12). С. 116–122.
6. Жмудь Е.В., Зиннер Н.С. Содержание белка и активность ингибиторов трипсина в листьях интродуцируемых в Западную Сибирь *Hedysarum alpinum* и *H. theinum* (*Fabaceae*) // Растительные ресурсы. 2011. Вып. 3. С. 103–111.
7. Мосолов В.В., Валуева Т.А. Растительные белковые ингибиторы протеолитических ферментов. М., 1993. 207 с.
8. Мосолов В.В., Валуева Т.А. Протеолитические ферменты. М. : Наука, 1997. 414 с.
9. Валуева Т.А., Мосолов В.В. Белки-ингибиторы протеиназ в семена. Физиологические функции // Физиология растений. 1999. Т. 46, № 3. С. 379–387.
10. Дунаевский Я.Е., Цыбина Т.А., Белякова Г.А. и др. Ингибиторы протеиназ как анти-стрессовые белки высших растений // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41, № 4. С. 392–396.
11. Литвиненко Н.А., Адамовская В.Г., Молодченкова О.О., Моцный И.И. Генетическая устойчивость пшеницы к фузариозу и ее связь с активностью ингибитора трипсина в зерне // Цитология и генетика. 2002. Т. 36, № 2. С. 30–34.
12. Кладницкая Г.В., Валуева Т.А., Ермолова Н.В. и др. Накопление ингибиторов протеиназ в диффузатах клубней картофеля при инфицировании возбудителем фитофтороза // Физиология растений. 1996. Т. 43, № 5. С. 701–706.
13. Ибрагимов Р.И. Влияние фитотоксичных метаболитов патогенных грибов на активность трипсиноподобных протеиназ и ингибиторов трипсина в проростках пшеницы // Физиология и биохимия культурных растений. 1998. Т. 30, № 2. С. 150–154.
14. Фролова С.А. Влияние низкой температуры на активность протеиназно-ингибиторной системы растений : автореф. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2008. 23 с.
15. Metraux J.P., Nawrath C., Genoud T. Systemic acquired resistance // Euphytica. 2002. Vol. 124. P. 237–243.
16. Aglika Edreva. Pathogenesis – related proteins: research progress in the last 15 years // Genetic Applied Plant Physiology. 2005. Vol. 31(1–2). P. 105–124.
17. Green T.R., Ryan C.A. Wound-Induced Proteinase Inhibitor in Plant Leaves-Possible Defense Mechanism against Insects // Science. 1972. Vol. 175. P. 776.
18. Van Loon L.C., Pierpoint W.S., Boller T., Conejero V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins // Plant Molecular Biology Reporter. 1994. Vol. 12. P. 245–264.
19. Трифонова Е.А., Кочетов А.В., Шумный В.К. Молекулярные механизмы системной устойчивости растений к вирусным инфекциям и способы повышения вирусоустойчивости путем трансгенеза // Успехи современной биологии. 2007. Т. 127, № 1. С. 13–24.
20. Веремеенко К.Н. Протеолитические ферменты и их ингибиторы. Новые области применения // Врачебное дело. 1994. № 1. С. 8–13.
21. Сичкарь Л.А., Корчагина Л.Н., Дихтярев С.И. Поиск растительных источников ингибиторов протеиназ // Фармаком. 2001. № 1. С. 1–4.
22. Гофман Ю.Я., Вайсблай И.М. Определение ингибитора трипсина в семенах гороха // Прикладная биохимия и микробиология. 1975. Т. 11, № 5. С. 777–783.
23. Методы биохимического исследования растений / под ред. А.И. Ермакова. Л., 1987. С. 44–45.

24. Агафонова О.В. (Дорогина), Жмудь Е.В., Крогулевич Р.Е., Черникова Т.С. Содержание флавоноидов, белка и активность ингибиторов трипсина в листьях *Trifolium repens* Jacq., выращиваемого в Новосибирске // Растительные ресурсы. 2002. Т. 38, вып. 1. С. 86–92.
25. Дорогина О.В., Жмудь Е.В. Трипсинингибирующая активность некоторых представителей сем. *Fabaceae* // Растительные ресурсы. Вып. 1. 2010а. С. 126–133.
26. Жмудь Е.В., Дорогина О.В., Карнаухова Н.А. Межпопуляционная изменчивость и трипсинингибирующая активность *Hedysarum gmelinii* (*Fabaceae*) в Горном Алтае // Растительные ресурсы. 2007. Вып. 2. С. 24–30.
27. Дорогина О.В., Жмудь Е.В. Трипсинингибирующая активность в листьях кормовых бобовых растений // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2010б. № 10. С. 23–28.
28. Жмудь Е.В., Килина Ю.Г., Дорогина О.В. Трипсинингибирующая активность в листьях растений копеечника альпийского при их отчуждении // Материалы VII Международной научно-практической конференции «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии» (21–24 октября 2008 г.). Барнаул, 2008. С. 90–92.

Поступила в редакцию 29.05.2012 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2012. № 3 (19). P. 100–109

Elena V. Zhmud¹, Nadejda S. Zinner², Olga V. Dorogina¹

¹Central Siberian Botanical Garden of Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

²Siberian Botanical Garden of Tomsk State University, Tomsk, Russia

DYNAMICS OF TRYPSIN INHIBITOR ACTIVITY IN *Hedysarum theinum* Krasnob. (*Fabaceae* Lindl.) PLANT LEAVES IN DIFFERENT ECOLOGICAL AND GEOGRAPHICAL CONDITIONS AND BY MECHANICAL DAMAGE

This work was carried out with the support of RFFI grant (project № 11-04-90768– mob_st)

The object of research was Hedysarum theinum Krasnob, a valuable medicinal plant listed in the Red book of the Republic of Altai. The species is spread in the Altai Mountains in a narrow range of ecological conditions: within the limits of a high-mountainous zone of vegetation, in surrounding areas of the wood belt on alpine, subalpine and wood meadows as well as on rocky slopes. Earlier it was revealed, that high trypsin inhybitor activity (TIA) in leaves does not allow to recommend this species as a perspective fodder plant. It can be used either as a fodder additive with the high maintenance of biologically-active substances or it can be a source of vegetative raw material with high TIA, intended for being used for medical purposes. Besides, TIA plays an important adaptive role in plants which is studied insufficiently for plants of different groups and, furthermore, for rare species. The purpose of this research is to analyze both seasonal and annual dynamics of TIA in leaves of the H. theinum in different ecological and geographical conditions: introduction to the Siberian Botanical Garden TSU (Tomsk), Central Siberian Botanical Garden SB RAS (Novosibirsk) and in Mountain Altai (Ust-Koksinsky district, piedmont Red) and mechanical damage: the estrangement of the leaves at regular intervals – 1', 3', 5', 10' and 15 minutes.

The analysis of seasonal activity dynamics in the leaves of the plants, cultured in the Botanical Garden of Tomsk University, showed that the minimum value of this sign had been revealed in a phase of flowering and it was the case within two years of supervision. Both wild samples and those cultured in the Central Siberian Botanical Garden (Novosibirsk) were characterized by identical TIA dynamics with a maximum in a flowering phase. It is established that the reaction of a separate plant to mechanical damages is individual. The TIA activity was tended to increase within the first 5 minutes after mechanical damage of leaves and then, 15 minutes later after the beginning of the experience, the return to the level close to initial was a general tendency. It is established that a mechanical damage (the estrangement of leaves) is a convenient model for studying the role of TIA in the processes of plant adaptation. The change of the TIA in the plants of this species during the growing season and mechanical damage reflects a process that is involved in a number of factors of the immune system, which should be considered in the process of introduction of plants of this rare species in Siberia to the new conditions, including its practical use.

Key words: *Hedysarum theinum* Krasnob.; trypsin inhibitor activity; adaptation; dynamic.

Received May 29, 2012