

## ВНУТРИВИДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ТРИПСИНИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ У НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *HEDYSARUM* L. (FABACEAE L.)

О.В. ДОРОГИНА, Е.В. ЖМУДЬ

## INTRASPECIFIC VARIABILITY OF TRYPSIN INHIBITORY ACTIVITY IN SOME REPRESENTATIVES OF THE GENUS *HEDYSARUM* L. (FABACEAE L.)

O.V. DOROGINA, E.V. ZHMUD`

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, 630090 Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101  
Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, 630090 Novosibirsk, Zolotodolinskaya st., 101

Fax: +7 (383) 330–19–86; e-mail: olga-dorogina@yandex.ru, elenazhmu@ngs.ru

Проведено исследование трипсинингибирующей активности (ТИА) в листьях представителей 4 видов *Hedysarum* L. (Fabaceae L.): *H. neglectum*, *H. gmelinii*, *H. austrosibiricum*, *H. consanguineum*, и выделены перспективные популяции с наименьшей величиной ТИА. Обнаружено, что наибольшая средняя величина этого признака (29.8 мг/г сухой массы) и высокая амплитуда внутривидовой изменчивости характерны для природных популяций полиморфного вида *H. gmelinii* Ledeb. Наименьший диапазон внутривидовой изменчивости по ТИА был обнаружен у эндемичного вида *H. austrosibiricum* B. Fedtsch. По результатам оценки индивидуальной изменчивости ТИА в листьях растений *H. gmelinii* выявлены формы с низкой величиной активности.

**Ключевые слова:** трипсинингибирующая активность, внутривидовая изменчивость, *Hedysarum* L, *H. neglectum*, *H. gmelinii*, *H. austrosibiricum*, *H. consanguineum*.

Trypsin inhibitory activity (TIA) was studied in leaves of 4 *Hedysarum* L. species (Fabaceae L.). Promising populations with the least TIA were determined. The highest average value of TIA (28.8 mg/g of dry weight) and high amplitude of intrapopulational variability were typical of natural populations of the polymorphic species *H. gmelinii* Ledeb. The least range of intraspecific variability of TIA was found in the endemic *H. austrosibiricum* B. Fedtsch.

Forms of low activity were revealed due to assessment of individual variability of TIA in *H. gmelinii* leaves.

**Key words:** trypsin inhibitory activity, intraspecific variability, *Hedysarum* L, *H. neglectum*, *H. gmelinii*, *H. austrosibiricum*, *H. consanguineum*.

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что пищевую ценность белков бобовых растений в значительной степени снижают природные биологически активные антиалиментарные вещества, среди которых наибольший интерес представляют ингибиторы протеиназ, в частности, трипсина (ИТ) из-за их широкого распространения и высокого содержания в различных частях растений. Именно бобовые растения особенно богаты ингибиторами пищеварительных ферментов (Rackis, 1972; Kakade et al., 1973), которые, взаимодействуя с протеазами, и, в частности, с трипсином и химотрипсином, значительно снижают усвоение белка. Постоянное кормление живот-

ных бобовыми растениями приводит к угнетению роста животных (Мосолов, Валуева, 1993).

У представителей разных видов растений распределение ИТ в различных тканях одного и того же растения может существенно различаться (Хлуднев, Мосолов, 1992; Roy, 1971).

В растениях ИТ выполняют функцию запасных белков, регулируют активность протеолитических процессов, предотвращая преждевременный распад резервных белков; подавляют активность протеиназ внедряющихся насекомых и фитопатогенных микроорганизмов, тем самым защищая растения от поражения (Мосолов, 1990; Валуева,

Мосолов, 1995). Вместе с тем, ингибиторы протеиназ обладают свойством существенно снижать каталитическую активность протеолитических ферментов (трипсина и химотрипсина) желудочно-кишечного тракта животных организмов, образуя с ними неактивные комплексы (Химия..., 1986). Поступление в организм повышенного количества этих антиалиментарными факторами приводит к уменьшению процесса гидролиза белков пищи, снижению эффективности их усвоения и, как следствие, приводит к гипертрофии поджелудочной железы, нарушению функции печени, задержке роста и т. д. (Раджабов, 1980).

Эффективным путем устранения этих факторов является инактивация ингибиторов протеиназ. Следует отметить, что по сравнению с другими антиалиментарными факторами ИТ обладают достаточно высокой стойкостью к инактивации. Например, после обработки водного экстракта сои, содержащего ингибиторы трипсина, в течение часа при 120 °С, их активность сохранялась на 65–70 % (Раджабов, 1980).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Оценку внутривидовой изменчивости активности ингибиторов трипсина по средней пробе листьев проводили в выборках ценопопуляций (ЦП) четырех видов рода *Hedysarum*: *H. neglectum*, *H. gmelinii*, *H. austrosibiricum* и *H. consanguineum*. Для проведения мониторинга по ТИА и изучения внутривидовой (межпопуляционной) изменчивости этого признака были исследованы средние пробы листьев из 6 ЦП *H. neglectum* (табл. 1) (1–00, 2–00, 3–00, 3а–01, 3б–01, 2–01), 14 ЦП *H. gmelinii*: (1–99, 2–99, 1–00, 2а–00, 2б–00, 3–00, 4–00, 6–00, 1–01, 1–03, 2–03, 3–03, 4–03, 5–03), 7 ЦП *H. austrosibiricum*: (1–82, 1–99, 2–99, 3–99, 4–99, 5–99, 1–00) и 3 ЦП *H. consanguineum*: 1–83, 1–00, и 1–01. В тексте, для краткости, мы будем обозначать эти ценопопуляции так же, как в табл. 1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате ранее проведенного нами исследования у некоторых представителей семейства *Fabaceae* L. было обнаружено, что самой высокой ТИА характеризовались виды рода *Hedysarum* L. (Агафонова и др., 2002; Дорогина и др., 2003; Жмудь, Дорогина, 2005), хотя при сопоставлении, например, с исследованными семенами сои (150–230 мг/г сухой массы), она гораздо ниже. Наличие высокой ТИА в листьях растений рода *Hedysarum*

Таким образом, определяющим этапом в технологическом процессе переработки зернобобовых и, прежде всего, сои является максимальное удаление ингибиторов трипсина путем термообработки исходного сырья (Адамень, Письменов, 1995).

Однако следует иметь в виду, что тепловую обработку проходят семена, используемые для производственных целей (горох, фасоль, соя и др.), а зернофураж и сено, как правило, не подвергаются термическому воздействию. Поэтому для кормовых целей важно использовать такие формы и сорта природных и культурных растений, особенно бобовых, которые отличаются сравнительно низким содержанием ингибиторов протеаз при сохранении остальных положительных качеств.

Целью данной работы было изучение изменчивости и отбор форм с низкой трипсинингибирующей активностью у представителей рода *Hedysarum* L. Растения *H. neglectum* Ledeb. используются как лекарственные и кормовые, а растения *H. consanguineum* DC., и *H. gmelinii* Ledeb. — в основном, в качестве кормовых (Растительные..., 1987).

Для оценки величины индивидуальной изменчивости ТИА исследовали ценопопуляции двух видов — *H. gmelinii* (*H. gm.* 2б–00 и *H. gm.* 1–01) и *H. neglectum* (*H. negl.* 1–00 и *H. negl.* 2–00), характеризовавшиеся наибольшей и наименьшей величиной активности. Каждая выборка из этих ценопопуляций состояла из 12–15 растений, находившихся в средневозрастном генеративном состоянии, в фазе конца цветения — начала плодоношения.

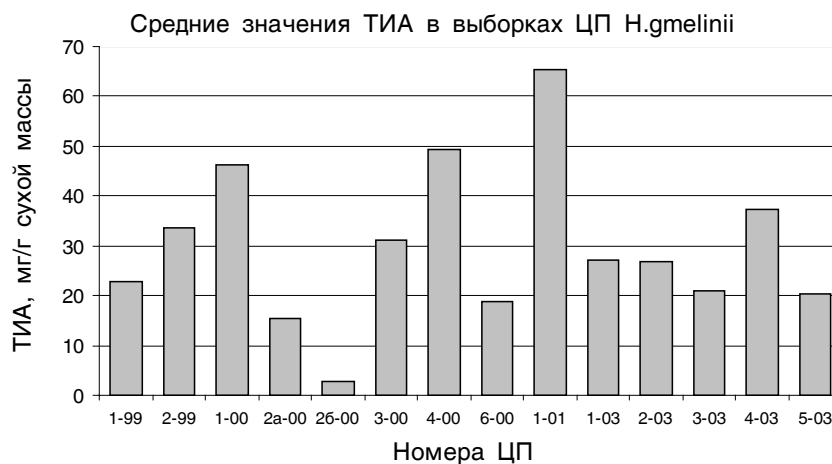
Активность ИТ определялась в микрограммах чистого трипсина, связанного ингибитором, на 1 г воздушно-сухой муки (мг/г сухой массы) по методу Ю.Я. Гофмана и И.М. Вайсблая (1975) и другим методикам (Методы..., 1987). Для сравнения определяли ТИА в семенах сои сорта «Приморская».

по сравнению с другими как интродуцированными растениями, так и растениями природной флоры, определяет необходимость проведения скрининга у представителей этого рода для отбора форм с низкой активностью.

Исследование ТИА в листьях природных образцов показало, что каждая ЦП *H. gmelinii* характеризовалась определенной величиной активности (рис. 1). Так, небольшие значения ТИА (до 20 мг/г

Места сбора ценопопуляций видов рода *Hedysarum* L.

№ популяции	Вид, район исследования
<i>H. gmelinii</i>	
1-99	Республика Горный Алтай, Онгудайский р-н, долина р. Кадрин
2-99	Онгудайский р-н, устье р. Чуи
1-00	Онгудайский р-н, окр. с. Иня
2а-00	Кош-Агачский р-н, долина р. Шавла
2б-00	- " -
3-00	- " -
4-00	Республика Горный Алтай, Онгудайский р-н, окр. д. Малый Яломан
6-00	Усть-Канский р-н, окр. с. Яконур
1-01	Онгудайский р-н, устье р. Башкаус
1-03	Кош-Агачский р-н, окр. п. Кош-Агач
2-03	Онгудайский р-н, у перевала Чике-Таман
3-03	Онгудайский р-н, окр. д. Ело
4-03	Усть-Канский р-н, окр. д. Оро
5-03	Усть-Канский р-н, окр. с. Усть-Кан
<i>H. neglectum</i>	
1-00	Республика Горный Алтай, Кош-Агачский р-н, Северо-Чуйский хр., перевал Ачик
2-00	Онгудайский р-н, окр. д. Малый Яломан
3-00	Усть-Канский р-н, оз. Мультигинское
2-01	Улаганский р-н, в 15 км от с. Улаган
3а-01	Улаганский р-н, берег оз. Мертвое
3б-01	- " -
<i>H. austrosibiricum</i>	
1-99	Республика Горный Алтай, Онгудайский р-н, долина р. Айлюгуш, лог Кызыл-Арт
2-99	Онгудайский р-н, Айлюгушский хр., перевал Арамза
3-99	Кош-Агачский р-н, вершина г. Кош-Агаш
4-99	долина р. Малый Дыралу
5-99	- " -
1-00	Республика Горный Алтай, Кош-Агачский р-н, окр. оросительной системы Кызыл-Шин
1-82	Республика Хакасия, Орджоникидзенский р-н, окр. п. Приисковый
<i>H. consanguineum</i>	
1-00	Республика Горный Алтай, Кош-Агачский р-н, окр. оросительной системы Кызыл-шин, берег оз. Бугузун
1-01	Улаганский р-н, окр. оз. Узуккель
1-83	Республика Хакасия, Таштыбский р-н, 12 км до оз. Улук-Мангышхолъ

Рис. 1. ТИА в листьях ЦП *H. gmelinii*

сухой массы) были обнаружены в листьях растений трех популяций — *H. gmelinii* 2а-00, 2б-00 и 6-00. Высокая активность (40-60 мг/г сухой массы) выявлена в средней пробе листьев, собранной в ЦП 1-00, 4-00 и 1-01, а остальные 8 ценопопуляций характеризовались средними значениями ТИА (20-40 мг/г сухой массы) (см. рис. 1).

В результате установлено, что граничные значения ТИА в листьях исследованных ЦП этого вида различались в 24.2 раза.

Каждая выборка из 6 исследованных ценопопуляций *H. neglectum* также характеризовалась определенной величиной ТИА (рис. 2). При этом небольшая активность (до 20 мг/г сухой массы) была обнаружена в выборках из ЦП *H. negl.* 1-00, 2-01 и 3а-01 и 3б-01. В выборках из ЦП *H. negl.* 2-00 и 3-00 выявлена средняя величина ТИА, не превышающая 30 мг/г сухой массы (см. рис. 2).

Таким образом, листья изученных представителей *H. neglectum* характеризовались невысокой

внутривидовой изменчивостью ТИА, граничные значения которой различались в 2.2 раза.

Для каждой ЦП *H. austrosibiricum* также характерна определенная средняя величина ТИА, граничные значения которой различались в 2.1 раза. Минимальная активность была обнаружена в ЦП *H. austr.* 2-99. Небольшой ТИА характеризовались ЦП 5-99 и 1-82, а в выборках из ЦП 3-99, 1-99, 1-00 и 4-99 была зафиксирована средняя величина активности (рис. 3).

То есть, у данного вида выявлен небольшой диапазон изменчивости по исследуемому признаку.

Было обнаружено, что у 3 ЦП *H. consanguineum* пределы изменчивости по ТИА меньше, чем у *H. gmelinii*, но больше, чем у *H. austrosibiricum*. При этом ТИА у ценопопуляций *H. consanguineum* с высокой и низкой активностью различалась в 5.1 раза. В выборке *H. cons.* 1-00 была обнаружена наибольшая активность, а низкая — в листьях двух других исследованных ЦП этого вида, причем величина

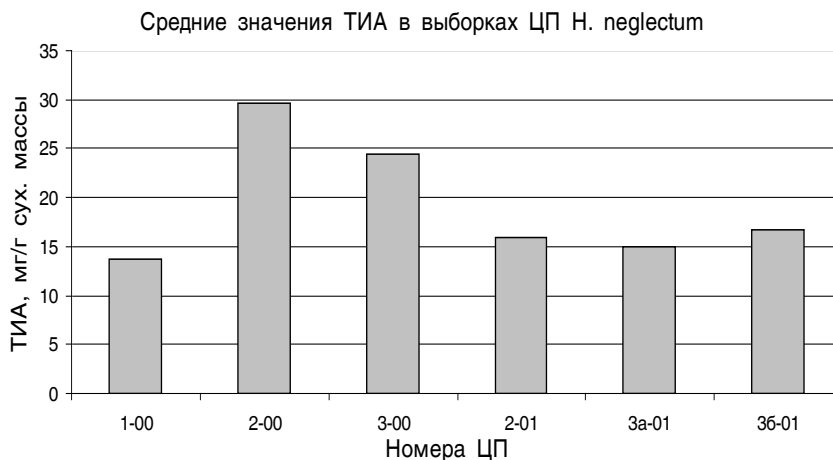


Рис. 2. ТИА в листьях ЦП *H. neglectum*

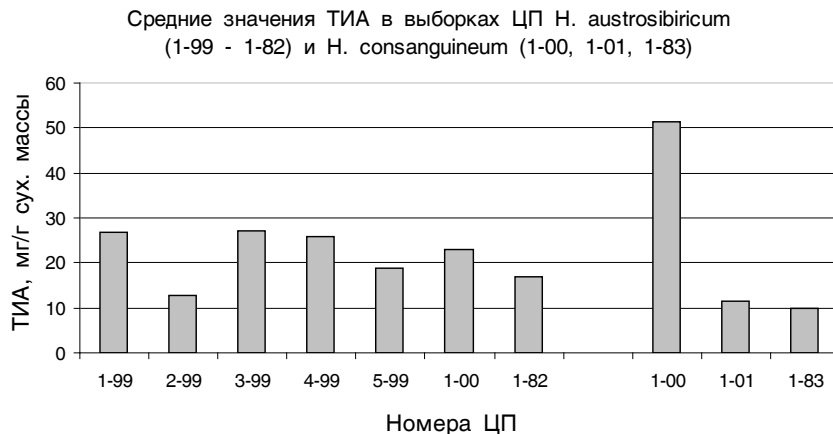


Рис. 3. ТИА в листьях ЦП *H. austrosibiricum* и *H. consanguineum*

Пределы изменчивости ТИА в выборках из ценопопуляций *H. gmelinii* и *H. neglectum*

Вид	№ ценопопуляции	Число измерений	ТИА, мг/г сухой массы
<i>H. gmelinii</i>	26–00	14	0.7–4.9
	1–01	12	50.9–78.3
<i>H. neglectum</i>	1–00	14	2.7–19.3
	2–00	15	13.5–37.8

ТИА в ценопопуляциях 1–01 и 1–83 отличалась незначительно (см. рис. 3).

Анализ внутривидовой изменчивости ТИА по среднему образцу листьев позволяет определить лишь перспективные для использования ценопопуляции. Однако для дальнейшего выявления и отбора форм с наименьшей ТИА, которые можно было бы использовать в качестве доноров, необходима оценка индивидуальной изменчивости растений по данному признаку.

Размах индивидуальной изменчивости ТИА в ценопопуляциях с наименьшим и наибольшим средним значением признака был неодинаковым у представителей двух видов рода. Так, в выборке ЦП *H. gm.* 26–00, характеризовавшейся наименьшей средней величиной ТИА, амплитуда изменчивости признака колебалась в широких пределах, граничные значения которых различались в 6.6 раза, а в выборке растений *H. gm.* 1–01, характеризовавшейся высокими средними значениями ТИА, граничные значения различались всего в 1.5 раза (табл. 2).

Граничные значения индивидуальной изменчивости ТИА в листьях *H. negl.* 1–00 с наименьшими средними значениями активности различались в 2.2 раза, а в выборке растений *H. negl.* 2–00 с более высокими средними значениями признака — в 2.8 раза (см. табл. 2).

Основываясь на полученных данных по индивидуальной изменчивости ТИА в листьях представителей *H. gmelinii* и *H. neglectum*, следует отметить, что для обоих видов в ценопопуляциях с низкой средней величиной активности для ЦП граничные значения различаются существенно (*H. gmelinii* — в 6.6 раза, *H. neglectum* — в 2.8 раза.). В ЦП с высокой средней активностью — в меньшей степени, соответственно, в 1.5 и 2.2 раза.

Анализ природных ценопопуляций по средним величинам ТИА в листьях показал, что небольшая величина активности для вида (16.5 мг/г), была обнаружена у *H. neglectum*, а средние величины активности — у эндемичного вида *H. austrosibiricum* (21.6 мг/г) и *H. consanguineum* (24.3 мг/г). Сравнительно более высокая ТИА обнаружена у полиморфного вида *H. gmelinii*, представленного в данном исследовании наибольшим числом популяций. Граничные значения изменчивости по ТИА у представителей этого вида различались в 24.2 раза (см. рис. 1).

Отсюда видно, что характеристика ценопопуляций, и тем более, видов, данная только по средним величинам ТИА, очень приближительна. С этой точки зрения, более информативными являются результаты по анализу индивидуальной изменчивости этого признака. Такой подход позволяет выявлять формы с наименьшей ТИА. В результате проведенных исследований из природной ЦП 26–00 *H. gmelinii*, произрастающей в Кош-Агачском р-не Республики Горный Алтай, были выделены формы, характеризовавшиеся наименьшей ТИА, равной 0.7 мг/г сухой массы (см. табл. 2). Эти формы перспективны для использования в качестве доноров генов для создания сортов с пониженной ТИА.

Перспективными в кормовом отношении следует считать ценопопуляции: *H. negl.* 1–00 (13.7 мг/г); *H. gm.* 26–00 (2.7 мг/г); *H. austr.* 2–99 (12.9 мг/г); *H. cons.* 1–01 (11.4 мг/г) и 1–83 (10.0 мг/г), характеризовавшиеся относительно небольшой ТИА.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об эффективности проведения скрининга по ТИА в ценопопуляциях видов рода *Hedysarum* L. с целью отбора как популяций, так и форм с низкой трипсинингибирующей активностью.

## ВЫВОДЫ

1. Каждый вид рода *Hedysarum* L. характеризовался определенной средней величиной ТИА, причем наименьшая активность была обнаружена у *H. neglectum* (19.2 мг/г), а наибольшая — у полиморфного вида *H. gmelinii* (29.8 мг/г).

2. Наибольшая амплитуда межпопуляционной изменчивости была выявлена у представителей полиморфного вида *H. gmelinii*, при этом граничные значения ТИА в выборках природных ценопопуляций различались в 24.2 раза. Возможно,

это объясняется несколько большим количеством исследованных ценопопуляций данного вида по сравнению с представителями других видов.

3. Представители эндемичного вида *H. austrosibiricum* характеризовались наименьшим диапазоном внутривидовой изменчивости по ТИА, причем граничные значения по этому признаку различались в 2.1 раза.

4. В результате изучения индивидуальной изменчивости ТИА в листьях ценопопуляции

*H. gmelinii* выделены формы с наименьшей активностью (0.7 мг/г сухой массы), перспективные для использования в качестве доноров с низкой ТИА.

Авторы выражают искреннюю благодарность за любезно предоставленный материал к.б.н. Н.А. Карнауховой и за помощь в экспериментальной работе к.б.н. Т.С. Черниковой.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 11.13 Президиума РАН «Биоразнообразии генофондов».

## ЛИТЕРАТУРА

- Агафонова О.В., Жмудь Е.В., Крогулевич Р.Е., Черникова Т.С. Содержание флавоноидов, белка и активность ингибиторов трипсина в листьях *Trifolium pratense* Jacq., выращиваемого в Новосибирске // Раст. ресурсы. 2002. Вып. 1. С. 86–91.
- Адамень Ф.Ф., Письменов В.Н. Использование сои в народном хозяйстве. Симферополь, 1995. 200 с.
- Валуева Т.А., Мосолов В.В. Белки-ингибиторы протеолитических ферментов у растений // Прикладная биохимия и микробиология. 1995. Т. 31. № 6. С. 579–89.
- Гофман Ю.Я., Вайсблай И.М. Определение ингибитора трипсина в семенах гороха // Прикладная биохимия и микробиология. 1975. Т. 11. № 5. С. 777–783.
- Дорогина О.В., Жмудь Е.В., Карнаухова Н.А., Черникова Т.В. Изменчивость морфологических признаков и активности ингибиторов трипсина в листьях растений природных популяций *Hedysarum gmelinii* Ledeb., произрастающих в различных экологических условиях Горного Алтая // Сибирский экологический журнал. 2003. № 1. С. 29–32.
- Жмудь Е.В., Дорогина О.В. Эколого-морфологические особенности и трипсинингибирующая активность листьев *Astragalus austrosibiricus* (Fabaceae) Горного Алтая // Раст. ресурсы. 2005. Вып. 1. С. 47–54.
- Методы биохимического исследования растений / Под. ред. А.И. Ермакова. Л., 1987. 429 с.
- Мосолов В.В. Ингибиторы протеолитических ферментов как защитные белки растений // Фитонциды. Бактериальные болезни растений: Материалы конф. Ч. 1. Киев, 1990. С. 50–51.
- Мосолов В.В., Валуева Т.А. Растительные белковые ингибиторы протеолитических ферментов. М., 1993. 207 с.
- Раджабов Л.Р., Нигмонов М., Шибнев В.А. Содержание белка, масла и активность ингибитора трипсина в различных сортах сои // Химия природных соединений. 1980. № 1. С. 84–88.
- Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейство Hydrangeaceae-Haloragaceae. СПб., 1987. 326 с.
- Химия и биохимия бобовых растений / Пер. с англ. К.С. Спектрова; под ред. Д.В. Хлуднева. 1986. 336 с.
- Хлуднев Д.В., Мосолов В.В. Поведение белка-ингибитора  $\alpha$ -амилазы 2 из зерна пшеницы при прорастании // Физиология растений. 1992. Т. 39. С. 120–125.
- Kakade M.L., Hoffa D.E., Liener I.E. Contribution of trypsin inhibitors to the deleterious effects of unheated soybeans fed to rats // J. Nutr. 1973. Vol. 103. P. 1772–1778.
- Rackis J.J. Biologically active components // Soybeans: chemistry and technology / Eds. A.K. Smith, S.J. Circle / AVJ Publ. Co. Nestport, Connecticut. 1972.
- Roy D.N., Rao S.P. Evidence isolation, purification and properties of a trypsin inhibitor in *Lathyrus sativus* // J. Agr. Food. Chem. 1971. Vol. 19. № 2. P. 257–261.