

## СЕЗОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ МЕМБРАННЫХ ФОСФО- И БЕТАИНОВЫХ ЛИПИДОВ *PTERIDIUM AQUILINUM* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ОБИТАНИЯ

© 2004 О.А. Розенцвет<sup>1</sup>, Е.С. Богданова<sup>1</sup>, В.Г. Козлов<sup>1</sup>, С.В. Саксонов<sup>1</sup>,  
Е.А. Ужамецкая<sup>1</sup>, В.П. Юнина<sup>2</sup>, М.В. Сидоренко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти

<sup>2</sup> Нижегородский государственный университет

Исследованы липидные компоненты мембран в листьях папоротника орляк *Pteridium aquilinum* в зависимости от условий обитания. На протяжении одного сезона роста определяли содержание общих липидов, фосфолипидов (ФЛ), бетаинового липида ДГТС, соотношение индивидуальных ФЛ в развернувшихся вайях (листовых пластинках) орляка, собранных с различных экспериментальных площадок. Площадки охватывают биотопы, наиболее характерные для распространения орляка в районе Средней Волги и отличаются по ландшафтно-экологическим, биогеографическим условиям и степени антропогенного влияния. Показано, что мембранные глицеролипиды в листьях орляка, произрастающего в разных условиях в пределах одного географического района, претерпевают качественные и количественные изменения в процессе роста. Поведение ФЛ имеет сходный характер изменчивости независимо от условий обитания. Содержание бетаинового липида ДГТС менялось по-разному на каждой из выбранных площадок на протяжении всего вегетационного сезона.

Все живые клетки отделены от окружающей среды поверхностью, называемой клеточной мембраной. Для эукариотных организмов характерно еще образование нескольких внутриклеточных компартаментов (органелл), имеющих свои внутренние мембраны [1].

Клеточные мембраны представляют собой подвижные текучие структуры, состоящие из липидного бислоя и белков. Белки и липиды в мембране образуют подвижную, гибкую, временно связанную в единое целое структуру, способную к структурным перестройкам [2].

Основная часть липидов всех биологических мембран представлена полярными липидами [3,4]. В процессе эволюции как строительные блоки для мембран развились различные полярные липиды. В животных организмах и дрожжах главными мембранными липидами являются фосфолипиды (ФЛ). У растений, наряду с ФЛ, синтезируются гликолипиды (ГЛ), называемые хлоропластными мембранными липидами. Третий тип полярных липидов, обнаруженный преимущественно в растениях, представлен бетаиновыми липидами (БЛ), из которых наи-

более часто встречаемым липидом является 1(3),2-диацилглицеро-О-4-(N,N,N-триметил)гомосерин (ДГТС)[5]. Если первые два типа липидов являются эссенциальными компонентами клеточного гомеостаза, то третий тип можно отнести к вторичным метаболитам, поскольку он распространен в ограниченном числе живых организмов [6]. Несмотря на то, что БЛ являются одними из главных липидов во многих растениях, об их биологической роли известно мало.

Считается, что структура мембран и их сборка хорошо отрегулированы в процессе эволюции и закреплены генетически. Однако условия обитания, такие как свет, тепло, достаточность и доступность минерального питания, антропогенные загрязнения, могут существенно повлиять на состояние мембранных компонентов, а, следовательно, на все формы функциональной активности биологических мембран. В частности, температура окружающей среды может изменить насыщенность и длину жирных кислот, входящих в состав полярных глицеролипидов [7]; влияние ксенобиотиков меняет количественное соотношение фосфолипидов [8], ограничение в содержании фосфата в среде обитания

способно изменить глицеролипидный синтез в сторону увеличения нефосфорных мембранных липидов [9].

Учитывая вышесказанное, нам представлялось целесообразным проверить, насколько условия обитания, отражаются на составе мембранных фосфо – и бетаиновых глицеролипидов у одного из распространенного вида, папоротников - орляка обыкновенного (*Pteridium aquilinum*). С этой целью мы сравнили образцы липидов клеточных мембран из листьев орляка, обитающего в различных экологических условиях. На протяжении одного сезона роста в листьях папоротника определяли содержание общих липидов (ОЛ), ФЛ и ДГТС, соотношение индивидуальных ФЛ. Данная работа является продолжением серии работ, проводимых нами по изучению изменчивости липидов растений в зависимости от условий обитания [10, 11].

### Объекты и методы исследования

Объект исследования - орляк обыкновенный *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. В отечественных флорах и определителях род обычно включают в семейство Гиполеписовые, или Орляковые- *Hypolepidiaceae* [12].

Развернувшиеся вайи (листовые пластинки) орляка собирались с различных экспериментальных площадок, заложенных на территории города Тольятти и на территории Жигулевского государственного заповедника им. Спрыгина летом 2001 года. Пробы отбирались на протяжении одного вегетационного периода, с июня по сентябрь, с периодичностью один раз в месяц. На экспериментальных площадках отобрали образцы почвы, которые проанализировали на pH и содержание  $P_2O_5$ . Анализ почвы сделан в специализированной лаборатории Института ВолгоНИИгипрозем (г. Самара).

Образцы листьев весом 1-2 г деферментировали в кипящем изопропанол, затем гомогенизировали и экстрагировали смесью хлороформа и метанола [13]. Разделение липидов проводили методом высокоэффективной двумерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на стеклянных пластинках раз-

мером 6 x 6 см с закрепленным слоем силикагеля (“Хаапсалу”, Эстония) с использованием систем растворителей: хлороформ - метанол - бензол - аммиак (130:60:20:12) (первое направление), хлороформ - метанол - бензол - ацетон - уксусная кислота (140:60:20:10:8) (второе направление).

Липиды проявлялись после обрызгивания 10%-ым раствором  $H_2SO_4$  в метаноле и сжигания при температуре 180 °С в течение 15 мин. Для идентификации фосфолипидов использовали специфичные реагенты: молибденовый синий [14], для холинсодержащих липидов - реактив Драгендорфа [15] для аминокислотсодержащих липидов - 0.2% -ый раствор нингидрина в ацетоне [15].

Количество ОЛ в экстрактах определяли весовым методом. Содержание ФЛ определяли по содержанию фосфора [14]. Количество ДГТС определяли спектрофотометрически после сжигания в  $H_2SO_4$  [16]. Калибровочную кривую строили по известным количествам предварительно выделенного и очищенного ДГТС [17].

### Результаты и их обсуждение

Орляк считают космополитным видом, произрастающим на всех пяти обитаемых континентах в разных климатических зонах, исключая лишь тундры и аридные зоны [18]. Он распространен в лесной (кроме ее крайнего севера), лесостепной, субтропической и тропической зонах, в горно-лесных поясах почти всего Земного шара.

Древнее происхождение этого вида в сочетании с широким распространением, непосредственно связанным с деятельностью человека, является одним из примеров взаимоотношений растения с условиями среды обитания [19].

В таблице приведены геоботанические и эдатописические характеристики точек отбора образцов папоротника. Площадки выбирались таким образом, чтобы были охвачены биотопы, наиболее характерные для распространения орляка в районе Средней Волги. По орографическим показателям выбранные площадки различаются как полого – волокнистая поверхность (площадки 1,3),

**Таблица.** Геоботаническая и эдатопиская характеристики выбранных площадок обитания папоротника *Pteridium aquilinum*

№ площадки	Геоботаническая характеристика		Эдатопиская характеристика		
	Рельеф	Тип леса	Тип почвы	pH почвы	Содержание P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> в почве мг на 100г
1 Тольятти	Полого-волнистая поверхность 4-й надпойменной террасы р. Волги	Сосняк разнотравный	Дерново-подзолистая слабодифференцированная рыхлопесчаная	7,6	2,4
2 Тольятти	Бугристо-западинный участок 4-й надпойменной террасы р. Волги	Сосняк с кленом, липой и вязом	Дерново-подзолистая слабодифференцированная связнопесчаная	7,71	4,3
3 Тольятти	Полого-волнистый участок 4-й надпойменной террасы р. Волги	Сосняк с дубом	Темно-серая лесная супесчаная	7,79	3,1
4 Тольятти	Дюнно-бугристо-западинная поверхность 3-й надпойменной террасы р. Волги	Сосняк орляковый	Дерново-подзолистая слабодифференцированная рыхлопесчаная	7,64	19,9
5 Жигулевский заповедник	Склон отрога Бахиловой горы, верхняя часть склона ЮЮЗ экспозиции	Сосняк лещиновый остепненный	Дерново-карбонатная типичная супесчаная на элювии известняка	7,53	21,8
6 Жигулевский заповедник	Подножье склона Большой Бахиловой горы	Липняк хвощово-орляковый	Дерновая намытая супесчаная на песчано-супесчаном делювии	7,54	6,2

бугристо-западинный (площадка 2) и дюнно-бугристый (площадка 4) участки, склон отрога (площадка 5) и подножье склона (площадка 6). Одинаковые по рельефу площадки различались по типу леса (площадка 1- сосняк разнотравный, площадка 3 – сосняк с дубом). В качестве эдатописких характеристик были выбраны: механический тип почвы, pH и содержание фосфора. Выбранные нами экспериментальные площадки отличаются как по ландшафтно-экологическим условиям, так и по биогеографическому расположению: Приволжская возвышенность (площадки 1-4) и лесостепное Низменное Заволжье (площадка 5,6). Кроме того, выбранные

места отбора проб отличаются по степени антропогенного влияния, поскольку площадки 1-4 находятся на урбанизированной территории, а 5, 6 - на охраняемой заповедной территории.

Орляк одинаково хорошо произрастает на урбанизированной и заповедной территориях, на разнообразных типах почвы, что согласуется с литературными данными [20].

На выбранных площадках в момент их закладки (в июне) был проведен анализ почвы на кислотность и содержание фосфатная. Из данных таблицы видно, что pH почвы варьирует от 7,53 до 7,79, то есть почвы в указанных местах отбора являются нейт-

ральными или слабо щелочными. Содержание фосфата в почве, измеренного по количеству минерального фосфора ( $P_2O_5$ ), меняется от 2,4 мг до 21,8 мг на 100г почвы в зависимости от места отбора. Поскольку известно, что образование липидов является температурозависимым процессом, а сам орляк теплолюбив, низкие температуры воздуха, особенно позднелесенние и ранне-осенние заморозки действуют на него губительно, то наряду с другими характеристиками, принимались во внимание изменения среднесуточной температуры воздуха (рис. 1). Температурный максимум в период проведения данной работы приходится на июль, а среднесуточные температуры июня и сентября в те дни, когда происходил отбор проб, были одинаковыми.

Первые образцы листьев собраны в июне, когда у растений уже были сформированы листовые пластинки. Содержание ОЛ у всех исследуемых образцов папоротника в это время было максимальным (26 -34 мг на 1г сырого веса). В процессе развития листьев количество ОЛ снижалось: на площадках 1, 3 на 18-20%, а на остальных площадках на 33-39%. Наибольший начальный уровень ОЛ отмечен в образцах орляка, произрастающего на дерново-карбонатной супесчаной почве (площадка 5), расположенной в заповедной зоне и дерново-подзолистой рыхлопесчаной почве (площадка 1), расположенной в городской зоне. Данное обстоятельство свидетельствует о том, что накопление общих липидов, не связано с географическим положением и гранулометрическим составом почвы. Количество минерального фосфора и калия также не влияло на уровень общих липидов, поскольку максимальное содержание фосфора на площадках 4, 5 (19,9 и 21,8 мг) в

начале эксперимента не привело к резкому отличию ОЛ в образцах, собранных с площадок с меньшим содержанием фосфора. Не отмечено какой-либо зависимости между количеством ОЛ и среднесуточной температурой, так как температурный максимум приходится на июль, а максимум содержания ОЛ – на июнь.

Как уже упоминалось, условия обитания способны влиять на состав мембранных липидов. При недостатке или отсутствии фосфора липидный метаболизм, по крайней мере, у некоторых организмов, способен рестраиваться таким образом, что в составе мембранных липидов увеличивается содержание бесфосфорных липидов [21]. Лимитирование фосфора является физиологически стрессовой ситуацией, многократно встречаемой у свободноживущих организмов. При недостатке фосфора растения медленно развиваются, у них недоразвиты вегетативные органы: корни, листья, стебли, листья [22]. Поскольку в нашем случае каких-либо отклонений от нормы в образцах листьев, взятых для анализа, отмечено не было, то количество фосфата в почве, по-видимому, было достаточным для нормального развития орляка на всех выбранных площадках. В этих экологических условиях количество ФЛ менялось от 35 до 190 мг на 1 г липидов, что составляет 3,5-19,0% от ОЛ (рис.2, линия В). Уровень ФЛ в июне был наименьшим во всех исследованных образцах и увеличивался к июлю. Далее, в августе в листьях папоротника, собранных на площадках 2-4, уровень ФЛ несколько снижался, увеличиваясь к сентябрю. На площадках 1, 5 наблюдалось дальнейшее увеличение количества ФЛ в августе – сентябре. И только на площадке 6 количество ФЛ снижалось в сентябре. Таким образом, максимум в накоплении ФЛ в образцах, собранных с разных площадок, приходится на разные промежутки времени, что во-видимому, связано с неравномерностью развития листьев, связанных с разными экологическими условиями. В целом можно сказать, что количество мембранных ФЛ увеличивалось в образцах, собранных со всех площадок, кроме площадки 6. Однако общее коли-

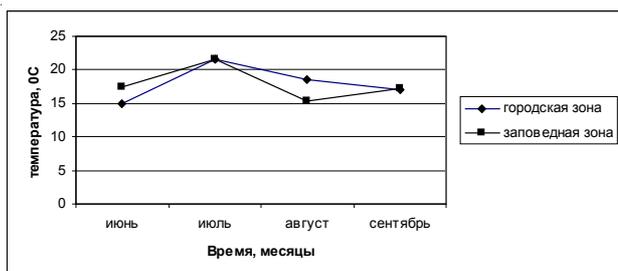


Рис. 1. Сезонные изменения среднесуточной температуры воздуха в г. Тольятти и д. Бахилова Поляна (данные ГМО)

чество ФЛ зависело от места обитания, приуроченного к разным площадкам.

Индивидуальные ФЛ исследуемых образцов орляка содержат: фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидил- (ФГ) и дифосфатидилглицерол (ДФГ), фосфатинозит (ФИ) и фосфатидную кислоту (ФИ). На рис. 2 приведена сезонная динамика относительного содержания главных фосфолипидов (ФХ, ФГ, ФИ и ФЭ).

Как видно (рис.2) соотношение этих липидов также меняется в определенных пределах в течение всего сезона. Например, содержание ФХ в июньских образцах составило 34,0 – 49,5% от суммы ФЛ в зависимости от площадки, на которой отбирались листья, а в сентябре его вклад в состав ФЛ составлял уже 18,0 - 30,0%, то есть отмечается стойкая тенденция к снижению вклада ФХ в состав ФЛ. Уровень ФГ, напротив, увеличивается от 17,1 – 25,8% от суммы ФЛ в начале лета до 26,1- 33,1% в конце лета. В поведение ФИ прослеживается следующая тенденция: при

довольно значительной вариабильности уровня этого липида в начале лета (7,3 - 16,8% от суммы ФЛ), достигается достаточно стабильный уровень в середине лета (13,1- 16,4%), который несколько снижается к августу (10,3 – 13,4%). Наиболее изменчиво содержание ФЭ, поскольку содержание его в июне в разных образцах отличается более чем в 3 раза (6,3 % -площадка 4 и 21,0% - площадка 1), а в последующие месяцы разница между содержанием этого липида на разных площадках составляет 2 и более раз. В поведении и общих и индивидуальных ФЛ просматриваются одни и те же закономерности: накопление ФЛ в процессе роста, очевидно связанное с увеличением количества образующихся мембран; снижение вклада ФХ в процессе развития листьев, вероятно связанное со старением листьев; сохранение и увеличение вклада ФГ, свидетельствующее о весьма стабильном процессе фотосинтеза даже в конце лета, поскольку данный липид принимает участие в стабилизации процесса

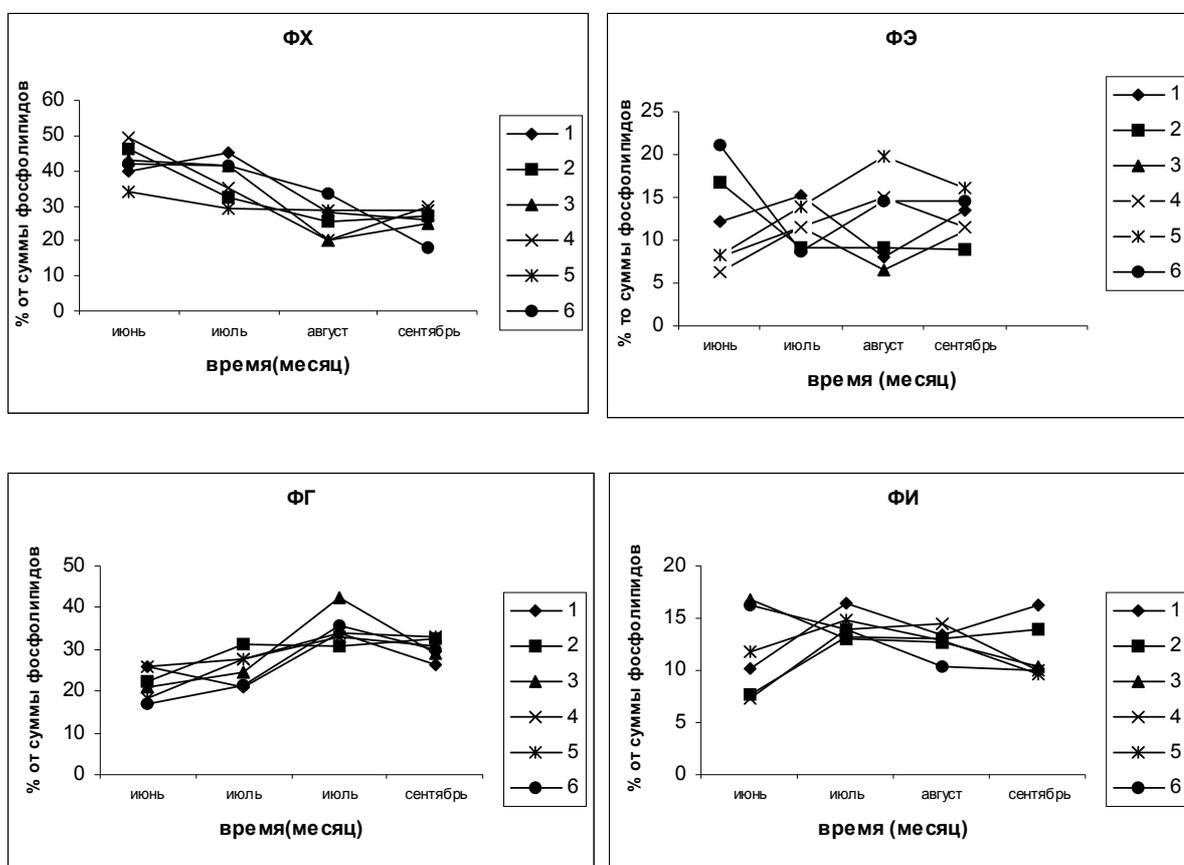


Рис. 2. Сезонные изменения индивидуальных фосфолипидов в листьях папоротника орляка: ФХ – фосфатидилхолин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ФГ – фосфатидилглицерол, ФИ – фосфатидилинозит; 1-6 – номера экспериментальных площадок

фотосинтеза и т.д.

Бетаиновый липид ДГТС является тем самым нефосфорным мембранным липидом, содержание которого, судя по литературным данным, может увеличиваться в стрессовой ситуации при ограничении фосфата в среде обитания. В условиях нашей работы содержание ДГТС в листьях практически всех образцов было максимальным в июне и составляло 25 – 45 мг на 1 г липидов. В последующий период времени с июля по сентябрь уровень этого липида в мембранах листьев орляка, собранного на площадках 3, 5 и 7 снижался, на площадке 2 практически не менялся, а на площадках 1 и 6 сначала снижался, а затем повышался снова. На площадке 6 уровень ДГТС к сентябрю повышался, достигая июньского уровня (рис 2, линия С). Аналогичная ситуация уже была описана нами ранее и подтвердилась для образцов данного вида папоротника, собранных только с площадки 6 в заповедной зоне [10,11]. Что касается других экспериментальных площадок, то начальный уровень ДГТС в листьях орляка, обитающего в городской зоне, был ниже, чем в заповеднике и его снижение к июлю было менее интенсивным. Если принять во внимание факт, установленный нами ранее, что самый высокий уровень содержания ДГТС обнаружен у наиболее молодых листьев (стадия “улитки”), то можно предположить, что листья на данной площадке сформировались раньше, чем на других площадках, и тогда наиболее значимое снижение уровня ДГТС могло произойти в более ранний период времени. Во всяком случае, поведение этого липида неоднозначно для образцов одного и того же вида папоротника и одинакового типа растительной ткани и явно связано с условиями обитания.

Следует отметить, что наблюдается обратная зависимость между содержанием ДГТС и среднесуточной температурой воздуха. Максимальный уровень ДГТС обнаружен при наименьших показаниях среднесуточной температуры. Можно лишь предположить, что максимальная летняя температура ограничивает синтез ДГТС, однако прямых доказательств для такого рода утверждения в условиях данной работы не обнару-

жено, поскольку невозможно отделить влияние температуры на интенсивность и направленность метаболических процессов от других факторов среды обитания.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что исследуемые мембранные глицеролипиды в листьях орляка, произрастающего в разных условиях в пределах одного географического района, претерпевают количественные изменения в процессе роста. Поведение ФЛ имеет одинаковый характер изменчивости независимо от условий обитания. Количество ФЛ на разных площадках было разным. Что касается бетаинового липида ДГТС, то и количественный уровень и его поведение на протяжении всего вегетативного сезона менялись по-разному на каждой из выбранных площадок. Строгой корреляции между поведением исследуемых липидов и выбранными нами характеристиками площадок, установить не удалось. Какие именно условия оказывают решающее влияние на липидный метаболизм и состояние мембран, по-видимому, еще предстоит выяснить в будущем.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Северин Е.С., Алейникова Т.Л., Осипов Е.В.* Биохимия. М.: Медицина. 2000.
2. *Чиркова Т.В.* Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям // Соросовский образовательный журнал. 1997
3. *Sitte P.* Functional organization of biomembranes. In: *Lipids and polymers in higher plants*. Ed. M. Tevini and H.K. Lichtenhaler. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1977.
4. *Mazliak P.* Glyco- and Phospholipids of membranes in higher plants. In: *Lipids and polymers in higher plants*. Ed. M. Tevini and H.K. Lichtenhaler. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1977.
5. *Dembitsky V. M.* Betaine ether -linked glycerolipids: chemistry and biology // *Prog. Lipid Res.* 1996. V. 35.
6. *Ohlrogge J. and Browse J.* Lipid Biosynthesis // *The Plant Cell.* 1995. V.7.
7. *Хотимченко С.В.* Липиды морских водо-

- рослей-макрофитов и трав. Владивосток: Дальнаука, 2003.
8. Harwood J.L. Environmental effect on plant lipid biochemistry. In: Harwood J.L., ed. Plant lipid biosynthesis. Fundamentals and agricultural applications. Cambridge: Cambridge university Press. 1998.
  9. Dyrman P., Balbo I., Benning C. Arabidopsis galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1 // Science. 1999. V. 284.
  10. Rozentsvet O. A., Saksonov S. V., Filin V. R., Dembitsky V. M. Seasonal changes of lipid content in the leaves of some ferns // Physiol. Plantarum. 2001. V. 113.
  11. Розенцвет О.А., Филин В.Р., Саксонов С.В., Мещеряков В.В. Сезонная динамика полярных липидов в листьях папоротников *Dryopteris filix-mas*, *Matteuccia struthiopteris* // Биохимия. 2002. №9.
  12. Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств. С-П.: Мир и семья, 1995.
  13. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification // Canad. J. Biochem. Physiol. 1959. V.37.
  14. Vaskovsky V.E., Latyshev L.A. Modified Jungnickel's reagent for detecting phospholipids and other phosphorus compounds on thin-layer chromatography // J. Chromatogr. 1975. V. 115.
  15. Кеймс М. Техника липидологии М.: Мир, 1975.
  16. Kabara, J.I., Chen, J.S., (1976) Microdetermination of lipids classes after thin – layer chromatography // Analyt. Chem. V.48.
  17. Dembitsky V.M., Rozentsvet O.A. (1989) Diacylglyceryltrimethylhomoserine and phospholipids of some marine macrophytes // Phytochemistry. 1089. V. 28.
  18. Толмачев А.И. Основы учения об ареалах. Л.: Изд-во ЛГУ, 1962.
  19. Watt A.S. The ecological status of bracken // Bot. J. Linn.Soc. 1976. V. 73.
  20. Шорина Н.И., Ершова Э.А. Орляк обыкновенный. В: Биологическая флора Московской области / Под ред. В.Н. Павлова, Т.А. Работнова, В.Н. Тихомирова. М.: Изд. Моск. ун-та, 1990.
  21. Benning C., Huang Z., Gage D. Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter-Sphaeroides* grown under phosphate limitation // Arch. Biochem. Biophys 1995. V. 317.
  22. Двораковский М.С. Экология растений. М.: Изд-во Высшая школа, 1983.

#### SEASONAL CHANGEABILITY OF PHOSPHO AND BETAINE LIPIDS IN MEMBRANES OF *Pteridium aquilinum* DEPENDING ON HABITATS

© 2004 O.A. Rozentsvet<sup>1</sup>, E.S. Bogdanova<sup>1</sup>, V.G. Kozlov<sup>1</sup>, S.V. Saksonov<sup>1</sup>, E.A. Uzhametskaya<sup>1</sup>, V.P. Yunina<sup>2</sup>, M.V. Sidorenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology of the Volga River Basin of Russian Academy of Sciences, Togliatti  
<sup>2</sup>Nizhni Novgorod State University

Lipid components present in the leaf membranes of a bracken species *Pteridium aquilinum* collected from different habitats were studied. Composition of total lipids, phospholipids (PL), a betaine lipid DGTS, ratio of individual PL in the rolled-out fronds (leaf blades) of brackens collected from various experimental sites in the course of a single season was determined. The sites embraced the biota most characteristic for propagation of brackens in the Middle Volga area and having different landscape, ecological and biogeographical conditions as well as subject to different levels of anthropogenic influence. It was demonstrated that membrane glycerolipids in the leaves of brackens growing under different conditions within a single geographic area changed both qualitatively and quantitatively in the process of growth. The character of PLs' changeability was similar in different habitats. The content of a betaine lipid DGTS changed in different ways in each of the selected sites in the course of the entire vegetative season.