

## ЛИПИДЫ ЛИСТЬЕВ *PLANTAGO MEDIA* (L.)

© 2011 Т.М. Гребенкина, В.Н. Нестеров, О.А. Розенцвет, Е.С. Богданова

Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти, г. Тольятти

Поступила 29.04.2011

Исследован состав мембранных липидов, содержание хлорофиллов и каротиноидов в листьях растения *Plantago media*, собранного на территории национального парка «Самарская Лука». Установлена динамика исследуемых биохимических показателей в зависимости от времени суток.

**Ключевые слова:** *Plantago media*, пигменты, липиды, жирные кислоты.

Растения из семейства *Plantaginaceae* привлекают внимание исследователей, благодаря широкому ареалу их распространения [2], неприхотливости и полезным свойствам [22, 24]. Лекарственные средства, изготовленные из растений этого семейства, оказывают противомикробное, противовоспалительное, противоязвенное, спазмолитическое, отхаркивающее и кровоостанавливающее действие. Наиболее изученным из данного семейства является *Plantago major* (подорожник большой) [11, 12, 23, 24]. Однако не менее важными лечебными свойствами обладают растения *Plantago media* (подорожник средний), поскольку содержат в своем составе горькие и дубильные вещества, витамины С, К и U, флавоноиды, полисахариды, жирные кислоты (ЖК), липиды и др. [14]. Данный вид имеет широкое географическое распространение: ареал охватывает Европу, Сибирь, Переднюю и Среднюю Азию. Растение адаптировано к различным условиям среды обитания: произрастает как на высокогорных лугах, так и в разреженных лесах, около дорог [2, 18].

Важную роль в жизнедеятельности растений и их адаптации к условиям обитания играют биологические мембраны [4]. Липидам мембран и составу их ЖК отводится ведущая роль в регулировании текучести мембран - как одного из механизмов биохимической адаптации растений к условиям окружающей среды [5]. В литературе имеются обширные сведения о качественных и количественных изменениях липидного комплекса растительных клеток при неблагоприятных воздействиях температуры, засухи, засоления, аноксии [1, 13, 17]. Меньше известно о динамике или стабильности липидного состава растений в течение одного светового дня.

Цель работы состояла в исследовании характеристик липидного обмена, состава хлорофиллов и каротиноидов у дикорастущего растения *P. media* в зависимости от времени суток. Эти сведения могут быть полезными как для понимания динамики внутриклеточных процессов, так и для определения оптимального времени заготовки лекарственного сырья.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Объект исследования.** *Plantago media* (L.) - многолетнее травянистое растение рода *Pimpinella*, семейства *Plantaginaceae*, порядка *Lamiales*, высотой от 10 до 50 см. Цветет с конца мая по конец августа. Лекарственным сырьем являются листья, семена, корни [14]. Растительный материал собирали на территории национального парка «Самарская Лука» вблизи г. Жигулевска Самарской области. Растения подорожника произрастали на слабо заросшем ровном хорошо освещенном участке. Сбор растений осуществляли 26 и 27 июня 2010 года в 7, 14 и 21 ч при температуре воздуха 16, 32 и 23 °С соответственно. Листья отбирали по одному со средней части розетки 10-12 типичных растений, находящихся в фазе цветения.

**Анализ пигментов.** Высечки из средней части листьев фиксировали кипящим ацетоном. Содержание фотосинтетических пигментов определяли в 3-4-кратной биологической повторности спектрофотометрически на приборе «Spectol» (Германия) в ацетоновой вытяжке при длинах волн – 662 и 644 нм (хлорофиллы) и 470 нм (каротиноиды). Расчет концентрации хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов произвели по методу Lichtenthaler [21].

**Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ).** Интенсивность ПОЛ в листьях растений оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) после реакции с тиобарбитуровой кислотой [8]. Определение МДА проводили в трехкратной биологической повторности спектрофотометрически на приборе «Spectol» (Германия) при длине волны 532 нм.

**Экстракция и анализ липидов.** Липиды выделяли по методу Блайя и Дэйра [19]. Количественное содержание суммарных липидов (СЛ) определяли взвешиванием аликвот экстрактов, высушенных в вакууме до постоянного веса. Идентификацию и количественное определение фосфолипидов (ФЛ), гликолипидов (ГЛ) и нейтральных липидов (НЛ) проводили по методам, описанным ранее [6, 10].

**Анализ жирных кислот (ЖК).** Для анализа ЖК использовали их метиловые эфиры, которые получали путем кипячения в 5% -ом растворе HCl в метаноле [6]. Полученные эфиры очищали препаративной ТСХ и анализировали на газо-жидкостном хроматографе «Хроматэк Кристалл 5000.1» (Рос-

Гребенкина Татьяна Михайловна, асп.; Нестеров Виктор Николаевич, к.б.н., м.н.с.; Розенцвет Ольга Анатольевна, д.б.н., в.н.с.; Богданова Елена Сергеевна, асп., e-mail: matane4ka@yandex.ru

сия) с использованием капиллярной колонки, длиной 105 м и диаметром 0,25 мм “RESTEK” (США). Температура колонки - 180 С, испарителя и детектора - 260 С. Скорость тока газа-носителя (гелий) - 20 мл/мин.

**Статистика.** Результаты экспериментов обрабатывали с помощью пакета офисных программ Microsoft Excel 2003. Значения в таблицах и рисунках представляют средние арифметические из 3-х биологических и 3-х аналитических повторностей и их стандартные ошибки.

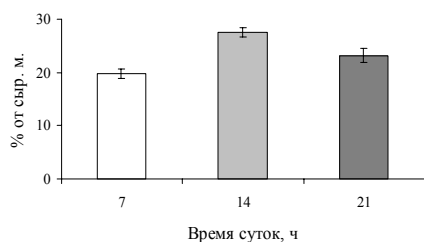
### РЕЗУЛЬТАТЫ

Растения подорожника собирали в утреннее, дневное и вечернее время, когда температура воздуха составляла 16, 32 и 23°С соответственно. Суммарное содержание пигментов было максимальным в утренние часы (1,8 мг/г сыр. массы), затем оно уменьшалось в течение светового дня, и достигало минимума в 21 ч (табл. 1). При этом снижалась концентрация как хлорофилла *a* (на 25%), так и хлорофилла *b* (на 33%). Однако соотношение зеленых пигментов показало, что в полуденное время концентрация хлорофилла *b* снижалась в большей степени, чем хлорофилла *a*. Содержание каротиноидов оставалось постоянным в течение дня, но их соотношение с зелеными пигментами менялось от 3,5 до 2,5.

**Таблица 1.** Состав и содержание пигментов в листьях *P. media*

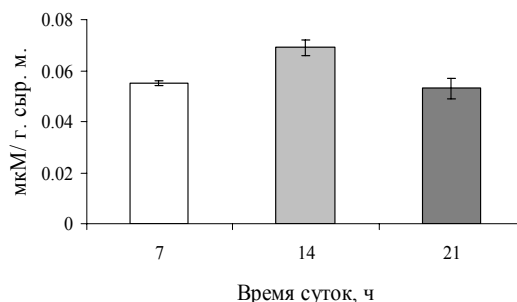
Пигменты	Концентрация, мг/г сырой массы		
	7.00 ч	14.00 ч	21.00 ч
Хлорофилл а	0,8±0,3	0,7±0,1	0,6±0,1
Хлорофилл b	0,6±0,2	0,4±0,1	0,4±0,1
Каротиноиды	0,4±0,2	0,4±0,0	0,4±0,1
Сумма пигментов	1,8	1,5	1,4
Хлорофилл а / хлорофилл b	1,3	1,8	1,5
Хлорофиллы/каротиноиды	3,5	2,8	2,5

Следует также отметить, что в течение суток менялся водный режим растений. Так, содержание сухой массы в утреннее и вечернее время составило 20-23%, а в полуденное время - 27% (рис. 1).



**Рис. 1.** Содержание сухого вещества в листьях *P. media* в зависимости от времени суток

Исходя из данных по содержанию МДА (рис. 2), установлено, что уровень ПОЛ увеличивался в полуденное время на 20% по сравнению с утренним и вечерним временем.



**Рис. 2.** Содержание МДА в листьях *P. media* в зависимости от времени суток

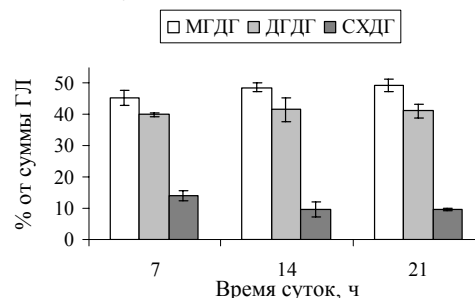
Содержание СЛ в расчете на 1 г сырой массы варьировало от 15,5 до 11,7 мг/г (табл. 2). Причем в утреннее и дневное время их количество больше, чем в вечернее. Большую часть СЛ (более 90%) составили полярные ГЛ и ФЛ, остальная часть пришлась на НЛ (6,0-8,6%). Количество ГЛ и ФЛ в утреннее и дневное время больше, чем в вечернее, а НЛ - постоянно в течение всего светового дня.

**Таблица 2.** Содержание липидов в листьях *P. media* в зависимости от времени суток

Липиды	Концентрация, мг/г сырой массы.		
	7 ч	14 ч	21 ч
ГЛ	10,0±0,1	9,7±1,7	7,2±0,9
ФЛ	4,3±0,8	4,5±1,2	3,5±0,9
НЛ	1,2±0,1	0,9±0,1	1,0±0,2
СЛ	15,5±2,3	15,1±2,2	11,7±1,6

*Примечание.* ГЛ - гликолипиды, ФЛ - фосфолипиды, НЛ - нейтральные липиды, СЛ - суммарные липиды

Как показали наши результаты, состав ГЛ мало изменялся в течение дня (рис.3). Так, процентное содержание моногалактозилдиацилглицерина (МГДГ) увеличивалось не более чем на 3% в течение дня. Относительный вклад дигалактозилдиацилглицерина (ДГДГ) не менялся, а сульфохинозилдиацилглицерина (СХДГ) – снижался пропорционально увеличению МГДГ.



**Рис. 3.** Состав и содержание ГЛ в листьях *P. media* в зависимости от времени суток

Главными ФЛ подорожника являются ФХ, ФЭ, ФГ и ФИ (рис. 4). Наиболее значимые изменения содержания ФЛ связаны со снижением относительного содержания ФХ, особенно в полуденное время, и соответственное этому снижению - увеличение вклада ФГ. В отношении других ФЛ следует отметить небольшое увеличение содержания ФК в вечернее время.

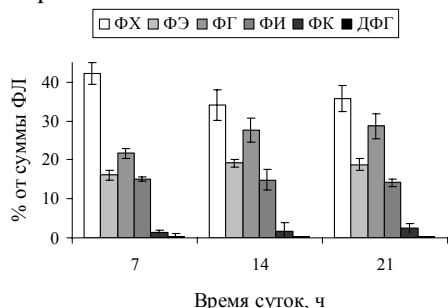


Рис. 4. Состав и содержание фосфолипидов в листьях *P. media* в зависимости от времени суток

Известно, что для адаптации растительных организмов к условиям обитания важен состав ЖК. Этот компонент мембранных липидов является наиболее обновляемым. В составе ЖК листьев подорожника обнаружено около 18 кислот (данные не приведены). Однако главными кислотами являются 16:0, 18:0, 18:2, 18:3. Данные рис. 5 показывают, что состав главных ЖК оставался постоянным в течение всего светового дня.

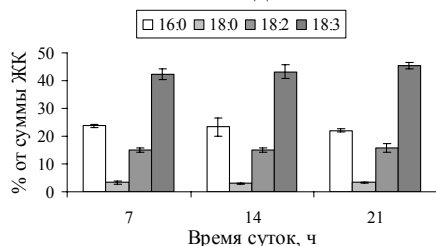


Рис. 5. Состав и содержание ЖК липидов в листьях *P. media* в зависимости от времени суток

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что количество пигментов, липидов и их соотношение являются показателями нормального развития растений и протекания фотосинтетических реакций [3, 4, 9]. По результатам наших исследований, концентрация зеленых пигментов зависела от времени суток - в послеполуденное и вечернее время отмечены меньшие концентрации зеленых пигментов по сравнению с утренним временем. Известно, что одним из условий, влияющих на образование хлорофиллов, является достаточное для растения содержание влаги [7]. В полуденное время температура воздуха была вдвое выше, чем в утреннее время. Это вызывало изменение водного баланса и как следствие - снижение концентрации пигментов. Тогда же происходило наибольшее накопление МАД - конечного продукта ПОЛ. Вероятно, высокая температура и высокая интенсивность света в это время суток приводила к увели-

чению образования активных форм кислорода в клетках, которые окисляют органические молекулы с образованием продуктов ПОЛ [3, 16]. Вероятно, уменьшение вклада ГЛ, связано с их частичным разрушением в результате ПОЛ в дневное и вечернее время. В то же самое время известно, что в условиях интенсивного освещения формируется большое число более мелких фотосинтетических единиц, что характерно для высокоактивных систем, увеличивается отношение хлорофиллов *a/b*, возрастает общая продуктивность фотосинтеза [9]. Обычно растения хорошо адаптированы к световому режиму места обитания. Адаптация фотосинтетического аппарата связана в том числе с изменением состава ГЛ. Достаточно постоянный состав ГЛ и небольшое накопление МГДГ к 14 ч свидетельствуют об эффективной адаптации подорожника к условиям освещенности. Полагают, что МГДГ необходим для превращения виолоксантина в зеаксантин, способного принимать и рассеивать энергию с перевозбужденных антенных комплексов фотосистем [13, 20].

В отношении ФЛ показано, что наибольшие изменения связаны с уменьшением относительного вклада ФХ. Этот липид является субстратом для фосфолипазы D, действие которой направлено так же и на ФЭ [15]. Уменьшение концентрации ФХ и накопление ФК свидетельствует в пользу активации этого процесса. Увеличение концентрации ФГ в послеполуденное время может быть связано с необходимостью стабилизации комплексов фотосистем [9].

В отличие от состава полярных липидов, состав и содержание ЖК оставалось неизменным в течение всего светового дня.

Таким образом, в листьях растения *P. media* на хорошо освещенном склоне в течение всего светового дня выявлены изменения в содержании влаги, концентрации пигментов и полярных липидов. Прослежена зависимость: накопление ГЛ и зеленых пигментов отмечено в утренние часы; в послеобеденное время, при уменьшении содержания влаги в листьях растения, уменьшается концентрация хлорофиллов, возрастает уровень ПОЛ, увеличивается концентрация МГДГ и ФК; содержание же ЖК практически неизменно в течение всего светового дня. Полученные результаты свидетельствуют о динамичности биохимических характеристик, что может быть важным для выявления оптимального времени сбора лекарственного сырья.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алаудинова Е.В., Поваляева В.А., Миронов П.В. Липиды меристем лесобразующих хвойных пород Центральной Сибири в условиях низкотемпературной адаптации. 3. Особенности обмена нейтральных липидов меристем почек *Larix Sibirica* Ledeb., *Picea obovata* L. и *Pinus silvestris* L. // Химия растительного сырья. 2010. № 1. С. 67-74.

2. Боголюбов А.С. и др. Компьютерный определитель травянистых растений средней полосы России. М.: Экосистема. 2004.
3. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. М.: Мир, 1986. 422 с.
4. Верещагин А.Г. Липиды в жизни растений. М.: Наука. 2007. 78 с.
5. Ипатова В.И. Адаптация водных растений к стрессовым абиотическим факторам среды. М.: Графикон - принт. 2005. 224 с.
6. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир. 1975. 323 с.
7. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. - М.: Высшая школа. 2005. - 736 с.
8. Лукаткин А.С., Голованова В.С. Интенсивность перекисного окисления липидов в охлажденных листьях теплолюбивых растений // Физиология растений. 1988. Т. 35. Вып. 4. С. 773-780.
9. Мокроносов А.Т. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. М. 2006. 448с.
10. Нестеров В.Н., Розенцвет О.А., Мурзаева С. В. Изменение состава липидов у пресноводного растения *Hydrilla verticillata* (L. fil.) Royle в условиях аккумуляции и элиминации ионов тяжелых металлов // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 1. С. 85-93.
11. Оленников Д.Н., Samuelsen A.B., Танхаева Л.М. Подорожник большой (*Plantago major* L.). Химический состав и применение // Химия растительного сырья. 2007. № 2. С. 37-50.
12. Олешко Г.И., Печерская Л.Г., Левинова В.Ф., Соснина С.А. Виды подорожника: содержание действующих веществ // Фармация. 2008. № 8. С. 21-24.
13. Светлова Н.Б., Ситар О.В., Бацманова Л.М., Таран Н.Ю., Мусиенко М.М. Каротиноиды и гликолипиды в адаптивном ответе растений озимой пшеницы на действие оксидного стресса // Физиология и биохимия культурных растений. 2007. Т. 39. С. 168-173.
14. Соснина С.А. Сравнительное фармакогностическое изучение, стандартизация сырья и фитопрепаратов видов рода *Plantago* L.: автореф. дис. к.фарм.наук. Пермь. 2009. 140 с.
15. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука. 2002. 294 с.
16. Тихонов А.Н. Защитные механизмы фотосинтеза // Соросовский образовательный журнал. 1999. № 11. С. 16-21.
17. Чиркова Т.В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям // Соросовский образовательный журнал. 1997. № 9. С. 12-17.
18. Шишкин Б.К. Род 1381. Подорожник - *Plantago* L. Флора СССР. В 30-ти томах / Начато при руководстве и под главной редакцией акад. В.Л. Комарова. Л.: Издательство Академии Наук СССР. 1958. Т. XXIII. 148 с.
19. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. № 37. P. 911-917.
20. Latowski D., Kruk J., Burda K. Skrzynecka-Jaskier M., Kostecka-Gugala F., Strzalka K. Kinetics of Violaxanthin De-epoxidation by Violaxanthin De-epoxidase, a Xanthophylls Cycle Enzyme, is Regulated by Membrane Fluidity in Model Lipid Bilayers // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 4656-4665.
21. Lichtenthaler H.K. Chlorophyll and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes // Methods. Enzimol. 1987. V. 148. P. 331-382.
22. Maathuis Frans J.M., Prins Hidde B.A. Patch Clamp Studies on Root Cell Vacuoles of a Salt-Tolerant and a Salt-Sensitive *Plantago* Species // Plant Physiol. 1990. № 92. P. 23-28.
23. Noor H., Juing M., Chee B.J., Kueh B.L. and Othman Zolkepli. Medicinal Properties of *Plantago major*: Hypoglycaemic and Male Fertility Studies // Pertanika J. Trop. Agric. Sci. 2000. № 1. P. 29 - 35.
24. Samuelsen Anne Berit. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review // Journal of Ethnopharmacology. 2000. № 71. P. 1-21

## LIPIDS OF *PLANTAGO MEDIA* (L.) LEAVES

© 2011 T.M. Grebenkina, V.N. Nesterov, O.A. Rozentsvet, E.S. Bogdanova

Institute of Ecology of the Volga River basin of the RAS, Togliatti

The mixture of membrane lipids has been analyzed as well as the content of chlorophylls and carotenoids of the *Plantago Media* plant which grows on the territory of Samara Bend nearby Zhigulevsk City, Samara region. The dynamics of changes of analyzed biochemical characteristics depending on time of day have been determined.

**Key words:** *Plantago media*, pigments, lipids, fatty acids.