



УДК 577.125

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БЕТАИНОВОГО ЛИПИДА *O*-(1,2-ДИАЦИЛГЛИЦЕРО)-*N,N,N*-ТРИМЕТИЛГОМОСЕРИНА В ТКАНЯХ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ *LYCOPODIOPHYTA*

© 2004 г. О. А. Розенцвет

Институт экологии Волжского бассейна РАН, 445003, Тольятти, ул. Комзина, 10

Поступила в редакцию 10.11.2003 г. Принята к печати 07.04.2004 г.

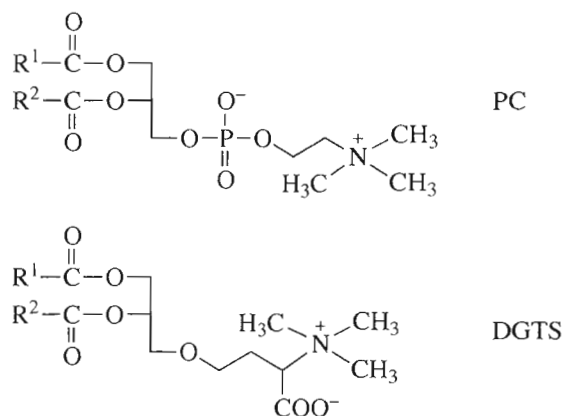
Определено содержание бетаинового липида *O*-(1,2-диацилглицеро)-*N,N,N*-триметилгомосерина (DGTS) в 10 образцах растений отдела *Lycopodiophyta*, собранных в различных местах обитания. Для анализа использованы однородные ткани растений (вегетативные побеги, колоски) и смешанные ткани (побеги с колосками). Особое внимание уделено сравнению DGTS-синтезирующей способности у разных видов плауновидных растений, разных типов тканей, слагающих орган растения одного и того же вида, а также сравнению соотношения уровня DGTS с содержанием глицеролипидов других классов.

**Ключевые слова:** бетаиновый липид DGTS; гликолипиды; глицеролипиды; плауновидные растения; фосфолипиды.

### ВВЕДЕНИЕ

Полярные липиды – главные компоненты матрицы всех биологических мембран. Самыми распространенными являются диацильные производные глицерина, полярная головка которых в положении *sn*-3 может содержать углеводный фрагмент – как в главном для растений классе липидов – гликолипидах, или фосфатный – как в глицерофосфолипидах, общем классе липидов растений и животных. Бетаиновые липиды представляют третий класс глицеролипидов, в котором полярной головкой служит четвертичный аминоспирт, связанный простой эфирной связью с диацилглицериновым фрагментом [1]. Химическая структура бетаинового липида *O*-(1,2-диацилглицеро)-*N,N,N*-триметилгомосерина близка структуре наиболее распространенного глицерофосфолипида фосфатидилхолина (PC).

DGTS впервые был обнаружен в одноклеточной морской водоросли *Ochromonas danica* (Chrysophyceae) [2]. Дальнейшее исследование показало, что бетаиновые липиды количественно значимы и широко распространены в растениях и морских водорослях [3–11]. Кроме того, они обычны в грибах, включая съедобные грибы и человеческие патогены [12–14], а также встречаются в простейших [15]. Бетаиновые липиды синтезируются высшими сосудистыми растениями, такими, как папоротники и мхи [9, 12]. Однако все попытки обнаружить DGTS в представителях самой многочисленной группы высших растений –



семенных, пока не увенчались успехом [1, 10, 12]. Сравнительно недавно DGTS был обнаружен в клетках фотосинтезирующей бактерии *Rhodobacter sphaeroides* [16] и в бактерии *Sinorhizobium meliloti* [17]. Это означает, что способность к синтезу бетаиновых липидов не является вновь приобретенной в процессе эволюции чертой эукариотных организмов, а уже была развита в фотосинтезирующих бактериях.

Наши собственные исследования на примере папоротников *Dryopteris filixmas* и *Matteuccia struthiopteris* показывают, что бетаиновый липид DGTS в процессе роста может исчезать на определенном этапе, а затем синтезироваться снова [18, 19]. В связи с этим, мы считаем, что еще предстоит выяснить, действительно ли все или большинство семенных растений в процессе эволюции утратили присущую их предкам способность к син-

Автор для переписки (тел.: (8482) 48-92-09; эл. почта: rozen@infopac.ru).

Содержание DGTS (мг/г липидов), соотношение DGTS и полярных липидов (ПЛ) (% от суммы ПЛ), соотношение DGTS с фосфолипидами (ФЛ) (% и ФЛ и DGTS) в образцах *Lycopodiophyta*

Номер образца	Образец	Место и время сбора образца	DGTS, мг/г липидов	DGTS, % от суммы ПЛ	DGTS, % от суммы ФЛ
I	<i>D. complanatum</i> , вегетативные побеги	Одинцовский р-н Моск. обл., июнь 1999 г.	28.2 ± 0.5	7.4 ± 0.1	14.9 ± 0.3
II	<i>D. complanatum</i> , побеги с колосками	Лоухский р-н Карелии, август 1999 г.	21.1 ± 1.0	14.4 ± 0.7	21.4 ± 1.0
III	<i>H. selago</i> , вегетативные побеги	Одинцовский р-н Моск. обл., июнь 1999 г.	10.2 ± 0.4	8.9 ± 0.3	18.3 ± 0.7
IV	<i>H. selago</i> , вегетативные побеги	Лоухский р-н Карелии, август 1999 г.	20.0 ± 0.5	16.2 ± 0.4	29.0 ± 0.7
V	<i>H. selago</i> , побеги со спорангиями	Одинцовский р-н Моск. обл., июнь 1999 г.	26.7 ± 1.3	7.9 ± 0.4	18.4 ± 0.9
VI	<i>L. annotinum</i> , вегетативные побеги	Одинцовский р-н Моск. обл., июнь 1999 г.	6.4 ± 0.2	3.9 ± 0.1	9.0 ± 0.3
VII	То же	Белорецкий р-н Башкирии, сентябрь 2000 г.	49.6 ± 0.4	15.1 ± 1.2	33.1 ± 1.6
VIII	<i>L. annotinum</i> , колоски	То же	26.4 ± 1.1	22.1 ± 0.9	38.5 ± 1.6
IX	<i>Selaginella selaginoides</i> , вегетативные побеги	Лоухский р-н Карелии, август 1999 г.	43.8 ± 3.0	13.1 ± 0.9	23.5 ± 1.1
X	<i>S. selaginoides</i> , побеги с колосками	То же	18.0 ± 0.8	13.5 ± 0.6	20.4 ± 0.9

тезу DGTS или же этот липид все же образуется у некоторых семенных растений в количестве, достаточном для того, чтобы его можно было обнаружить современными методами, но не во всех органах и не на всех этапах жизненного цикла растения. В конечном счете, необходимо выяснить, какова физиологическая роль DGTS и его роль в эволюции растений.

Целью данной работы стало изучение количественного содержания бетаинового липида DGTS у некоторых видов растений отдела плауновидных (*Lycopodiophyta*).

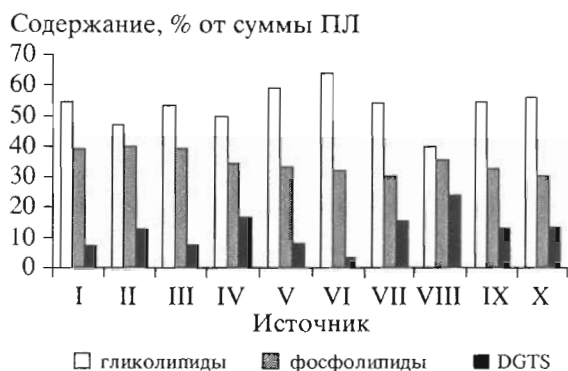
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среди высших растений плауновидные принадлежат к числу самых древних [20]. Филогенетически их относят к группе сосудистых растений, занимающих промежуточное положение между *Spermatophyta* (семенные) и *Bryophyta* (несосудистые) [21]. Мы подвергли анализу 10 образцов, которые представляют собой три вида плаунов и один вид селягинелл (таблица). В указанных видах для анализа были отобраны однородные ткани (вегетативные побеги, колоски) или смешанные ткани (побеги с колосками или побеги со спорангиями). Для того чтобы исключить фактор случайности, связанный с ростом растений в усло-

виях одного места обитания, их собирали в разных географических районах.

Скрининг полярных липидов выполнен с помощью высокоразрешающей двумерной хроматографии в тонком слое (ТСХ). Для анализа использовали сумму общих липидов, экстрагированных хлороформ-метанольной системой. Идентификацию полярных липидов проводили с применением специфических окрашивающих реагентов: фосфолипиды обнаруживали с помощью молибденового синего, гликолипиды – антроновым реагентом. Для обнаружения бетаинового липида DGTS наиболее удобна цветная реакция с реактивом Драгендорфа, специфическим для триметиламониевой группы. Поведение этого липида на хроматографической пластинке, а также спектральные характеристики, подтверждающие его строение, приведены нами ранее [22, 23]. Оценку количества DGTS проводили по содержанию его в составе общих липидов, соотношению с полярными липидами и соотношению с фосфолипидами (таблица).

Данные этой таблицы показывают, что DGTS обнаружен во всех исследованных образцах. Его содержание в составе общих липидов изменяется в зависимости от вида растения от 6.4 до 49.5 мг на 1 г липидов. В липидах образцов I и II (вегетативные побеги и побеги с колосками в плауне *Diplazium complanatum*), собранных в разных обла-



Соотношение глико-, фосфолипидов и DGTS (процент от суммы ПЛ) в образцах I–X *Lycopodiophyta* (см. табл.).

тях, количество этого липида достаточно близко, 28.2 и 21.1 мг на 1 г липидов соответственно. Однако растения одного вида, собранные в разных местах обитания, могут содержать и разное количество DGTS в составе общих липидов. Так, в вегетативных побегах *Huperzia selago* (образцы III и IV) содержание DGTS различается почти в 2 раза. Поскольку растения были собраны в разных районах не одновременно (образец III – в начале лета, а IV – в конце лета), то столь разный количественный уровень, вероятно, связан с различием физиологических стадий. Анализ образцов VII и VIII, представляющих собой вегетативные побеги и колоски от этих же побегов у *Lycopodium annotinum*, собранных одновременно, также показал разные количества DGTS в 1 г липидов. Как видно, содержание DGTS в составе общих липидов изменяется в очень широких пределах в зависимости от вида растения, ткани, из которой состоит тот или иной орган растения, а также времени сбора.

При сравнении содержания DGTS и других полярных глицеролипидов (см. таблицу и рисунок) можно отметить следующее. Содержание гликолипидов в составе полярных липидов наибольшее во всех исследованных образцах, далее следуют фосфолипиды, а затем – DGTS. Разница между самым высоким уровнем гликолипидов (64.0% – *L. annotinum*) и самым низким (45.2% – *L. annotinum*) составляет 29%. В фосфолипидах разница между самым высоким (38.0% – *H. selago*) и самым низким уровнем (28.0% – *L. annotinum*) составляет 26%. Уровень же DGTS в исследованных растениях варьирует от 3.9 до 22.1% от суммы полярных липидов, то есть количество синтезируемого DGTS в разных видах растений отличается почти в 6 раз, в пределах одного вида у *H. selago* – почти в 2 раза, а у *L. annotinum* – в 3.8 раза (таблица). Это подтверждает, что количественная изменчивость данного липида намного выше, чем других глицеролипидов.

Обращает на себя внимание тот факт, что уровень DGTS, выраженный в мг/г липидов не совпадает с его относительным вкладом в состав полярных липидов. Так, количество DGTS в общих липидах в образцах I и II различается лишь на 25%, тогда как процентное содержание в сумме полярных липидов отличается в 2 раза. То же можно сказать и о других образцах. Это несоответствие связано с тем, что общие липиды объединяют группу полярных липидов и нейтральных, которые экстрагируются одновременно по используемой нами методике. Уровень нейтральных липидов может меняться в очень широких пределах в зависимости от условий обитания, от фазы роста растений и т.д. [24], что, по-видимому, и является причиной отмеченного несоответствия.

Неоднократно подчеркивалось [1, 12, 25], что DGTS – эволюционно более древний липид, выполняя в клетках низших растений такую же роль, как фосфатидилхолин в высших растениях. В работе [3] отмечается, что отсутствие DGTS в семенных растениях и его распространение в большинстве видов зеленых водорослей и сосудистых растений указывает на то, что эта группа растений имеет большее родство с зелеными водорослями, чем с семенными растениями. В соответствии с современной классификацией [26], плауновидные растения входят в эту группу сосудистых папоротниковидных растений. Как следует из наших результатов, вклад DGTS в исследуемых образцах составляет от 9.0 до 38.5% от суммы фосфолипидов (таблица), фосфолипиды остаются преимущественными, но оба эти липида присутствуют одновременно, не заменяя друг друга.

Наши результаты подтверждают литературные данные о том, что растения отдела *Lycopodiophyta* способны синтезировать бетаиновый липид DGTS [1, 3, 12]. Наличие DGTS и преобладающий уровень PC являются очевидными признаками данного таксона. Однако, в отличие от литературных данных, мы смогли оценить количественный вклад DGTS в состав полярных липидов, а также показать уровень его изменчивости в зависимости от вида растения, физиологической стадии, вида ткани, слагающей разные органы растения одного вида. В целом, его количественная изменчивость намного выше, чем других полярных глицеролипидов. Результаты работы могут оказаться полезными как для понимания роли DGTS в построении мембраны, так и при установлении филогенетического родства растений.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследованы плауны *D. complanatum* (L.) J. Holub, *H. selago* (L.) Bernh. ex Schrank & Mart., *L. annotinum* L., класса *Lycopodiopsida*, порядка

Lycopodiales, семейства Lycopodiaceae; и селягинелла *Selaginella selaginoides* (L.) P. Beauv. ex Schrank & Mart, класса Isoëtopsida, порядка Selaginellales, семейства Selaginellaceae. Образцы *H. selago* и *L. annotinum* были собраны в Одинцовском районе Московской обл. в июне 1999 г., *L. annotinum* – в Белорецком районе Башкирии в сентябре 2000 г., *L. complanatum*, *H. selago* и *S. selaginoides* – в Лоухском районе Карелии в августе 1999 г.

Собранные образцы заливали смесью хлороформ–метанол (1 : 1), плотно закупоривали и транспортировали к месту проведения анализов. В лабораторных условиях пробы измельчали с помощью высокоскоростного гомогенизатора и далее экстрагировали липиды по методу Блайя и Дайера [27]. Разделение фосфолипидов и DGTS проводили с использованием ТСХ на микропластинках (6 × 6 см или 10 × 10 см) с закрепленным слоем силиказоля (Naarsalu, Эстония). Использовали системы растворителей: хлороформ–метанол–бензол–аммиак (130 : 60 : 20 : 12) – первое направление и хлороформ–метанол–бензол–ацетон–уксусная кислота (140 : 60 : 20 : 10 : 8) – второе направление. Идентификацию липидов проводили по известным методикам с помощью специфических окрашивающих реагентов. Пятна фосфолипидов обнаруживали молибденовым синим [28], холинсодержащие липиды (PC и DGTS) – свежеприготовленным реактивом Драгендорфа [29].

Содержание неорганического фосфора определяли методом Васьяковского [28], а количество фосфолипидов рассчитывали, умножая содержание фосфора на коэффициент 25 [30].

Содержание галактозы определяли с помощью антронового реагента [31]. Зная весовое количество фосфолипидов и молярное соотношение неорганического фосфора и галактозы, рассчитывали содержание гликолипидов.

DGTS определяли по методу Кабара и Чена [32]. С пластинки с разделенными и обнаруженными пятнами полярных липидов соскабливали пятна, соответствующие DGTS, в пробирки (5 × 60 мм), добавляли 1 мл 15 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, выдерживали при 185°C строго 15 мин. После охлаждения измеряли оптическое поглощение при 375 нм на спектрофотометре “Specol-11” (Чехия). Калибровочную кривую строили по известным количествам предварительно выделенного и очищенного DGTS в диапазоне 1–30 мкг. Полученные результаты, приведенные в таблице и на рисунке, представляют собой средние величины для двух–трех образцов. Каждый экстракт анализировали на соответствующий показатель (фосфор, галактозу, DGTS) на 3–4 пластинках параллельно, результаты получали как средние с отклонением не выше 5%.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность Филину В.Р. (МГУ) за сбор материала и помощь в обсуждении результатов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы Отделения биологических наук РАН “Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dembitsky V.M. // Prog. Lipid Res. 1996. V. 35. P. 1–51.
2. Brown A., Elovson J. // Biochemistry. 1974. V. 13. P. 3476–3482.
3. Sato N., Furuya M. // Phytochemistry. 1984. V. 23. P. 1625–1627.
4. Sato N., Kato K. // Plant Science. 1988. V. 55. P. 21–25.
5. Dembitsky V.M., Rozentsvet O.A. // Phytochemistry. 1989. V. 28. P. 3341–3343.
6. Khotimchenko S.V., Klochkova N.G., Vaskovsky V.E. // Biochem. System. and Ecol. 1990. V. 18. P. 93–101.
7. Jones A.I., Harwood J.L. // Phytochemistry. 1992. V. 31. P. 3397–3403.
8. Sato N. // Bot. Mag. 1992. V. 105. P. 185–197.
9. Eichenberger W. // Plant Physiol. Biochem. 1993. V. 31. P. 213–221.
10. Бычек И.А. // Биохимия. 1994. Т. 59. С. 1646–1662.
11. Kato M., Sakai M., Adachi K., Ikemoto H., Sano H. // Phytochemistry. 1996. V. 42. P. 1341–1345.
12. Kunzler K., Eichenberger W. // Phytochemistry. 1997. V. 46. P. 383–392.
13. Vaskovsky V.E., Khotimchenko S.V., Benson A.A. // Lipids. 1991. V. 26. P. 254–256.
14. Vaskovsky V.E., Khotimchenko S.V., Boolukh E.M. // Phytochemistry. 1998. V. 47. P. 755–760.
15. Furlong S.T., Learly J.A., Costello C.E. // J. Lipid Res. 1986. V. 27. P. 1182–1189.
16. Benning C., Huang Z., Gage D. // Arch. Biochem. Biophys. 1995. V. 317. P. 103–111.
17. Geiger O., Rohrs V., Weissenmayer B., Finan T., Thomas-Otes J. // Mol. Microbiol. 1999. V. 32. P. 63–73.
18. Rozentsvet O.A., Saksonov S.V., Filin V.R., Dembitsky V.M. // Physiol. Plantarum. 2001. V. 113. P. 59–63.
19. Розенцвет О.А., Филин В.Р., Саксонов С.В., Мецьяков В.В. // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 1251–1255.
20. Prye K.M., Smith A.R., Skog J.E. // Amer. Fern J. 1995. V. 85. P. 203–282.
21. Lytle T.F. // Phytochemistry. 1973. V. 12. P. 623–629.
22. Rozentsvet O.A., Saksonov S.V., Dembitsky V.M. // Phytochemistry. 2000. V. 53. P. 1–7.
23. Розенцвет О.А., Козлов В.Г., Спирихин Л.В. // Хим. природн. соед. 2002. № 2. С. 251–256.
24. Юровицкий Ю.Г., Сидоров В.С. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1993. № 1. С. 74–81.

25. Klug R., Benning C. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001. V. 98. P. 5910–5915.
26. Кронкрест А.Г., Тахтаджян А.Л., Циммерман В. // Ботан. журн. 1966. № 5. С. 629–631.
27. Bligh E.G., Dyer W.J. // Canad. J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. P. 911–919.
28. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 322 с.
29. Vaskovsky V.E., Latyshev L.A. // J. Chromatogr. 1975. V. 115. P. 246–249.
30. Christie W. Lipid Analysis. Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids. 2nd Ed. Oxford: Pergamon Press, 1982. P. 95.
31. Северин С.Е., Соловьева Г.А. Практикум по биохимии. М.: МГУ, 1989. С. 23.
32. Kabara J.J., Chen J.S. // Anal. Chemistry. 1976. № 6. P. 814–817.

## Distribution of a Betaine Lipid *O*-(1,2-Diacylglycero)-4'-(*N,N,N*-Trimethyl)homoserine in Tissues of Some Lycopodiophyta Species

O. A. Rozentsvet<sup>#</sup>

<sup>#</sup>Phone: (8482)48-9209; e-mail: rozen@infopac.ru  
Institute of Ecology of the Volga River Basin, Russian Academy of Sciences,  
ul. Komzina 10, Togliatti, 445003 Russia

The distribution of *O*-(1,2-diacylglycero)-4'-(*N,N,N*-trimethyl)homoserine (DGTS), a betaine lipid, in ten samples of plants belonging to the division Lycopodiophyta collected in various habitats was studied. Homogeneous plant tissues (vegetative shoots and spikelets) and mixed tissues (shoots with spikelets) were analyzed. Particular attention was paid to the DGTS-synthesizing ability of various club mosses and to various tissue types forming an organ in a single plant species, as well as the ratio between DGTS and other glycerolipid classes. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* betaine lipid DGTS, glycerolipids, glycolipids, lycopodium plants, phospholipids