

УДК 630\*181.324

**Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов**

Сибирский государственный технологический университет

Алаудинова Елена Владимировна родилась в 1955 г., окончила в 1978 г. Сибирский технологический институт, кандидат химических наук, доцент кафедры химической технологии древесины и биотехнологии Сибирского государственного технологического университета. Имеет около 100 печатных работ в области химии древесины, биохимии и физиологии растений.  
E-mail: alaudinovaev@yandex.ru



Миронов Петр Викторович родился в 1950 г., окончил в 1973 г. Красноярский государственный университет, доктор химических наук, профессор кафедры химической технологии древесины и биотехнологии Сибирского государственного технологического университета. Имеет около 200 печатных работ в области химии древесины, биохимии и физиологии растений.  
E-mail: mpv@sibsty.kts.ru



## **СОСНА ОБЫКНОВЕННАЯ: ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ ЖИВЫХ ТКАНЕЙ ПОЧЕК**

Исследована сезонная изменчивость состава жирных кислот типа  $C_{18}$  диглицеридной части молекул гликолипидов сосны обыкновенной. Выявлены закономерности биосинтеза олеиновой, линолевой и линоленовой кислот посредством оценки изменения сезонной активности жирнокислотных  $\omega 9$ -,  $\omega 6$ - и  $\omega 3$ -десатураз.

*Ключевые слова:* сосна обыкновенная, гликолипиды, жирные кислоты, жирнокислотные  $\omega 9$ -,  $\omega 6$ - и  $\omega 3$ -десатуразы.

Более 80 % лесного фонда Красноярского края представлено хвойными древесными видами, являющимися основой бореальных лесов. Среди хвойных по богатству видов и занимаемой ими территории выделяется семейство *Pinaceae*. Основной объект лесозаготовок – сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.). Экономическое значение сосны определяется, главным образом, широким использованием ее древесины. В свою очередь, продуктивность ксилогенеза во многом обуславливается деятельностью фотосинтетического аппарата, обеспечивающего образование первичных продуктов фотосинтеза, преобразующихся впоследствии в высокомолекулярные компоненты древесины.

В Центральной Сибири морфо- и органогенез фотосинтетического аппарата хвойных начинается с закладки почек более чем за 10 месяцев до их распускания. Период экстремально низких зимних температур может быть достаточно продолжительным (например, зимой 2009/10 гг. морозы 30...40 °С держались с конца декабря до начала марта, в отдельные дни температура опускалась еще ниже). Вместе с тем, изучению разнообразных аспектов метаболизма живых тканей (зачаточных тканей хвои и побегов), сохраняющих жизнеспособность в таких условиях, до сих пор не уделяется должного внимания.

Известно, что, адаптируясь к сезонному снижению температуры окружающей среды, растения выработали механизмы, позволяющие регулировать жидкое фазовое

состояние мембран живых клеток через изменение жирнокислотного состава мембранных липидов. С уверенностью можно сказать, что изменчивость данного признака зависит не только от факторов окружающей среды, но и определяется генотипом. Ввиду большого видового разнообразия растений, специфичности каждой растительной ткани, сведений по данному вопросу до сих пор недостаточно, а по меристемам почек морозоустойчивых хвойных видов их практически нет. При этом необходимо отметить, что способность живых растительных тканей переносить низкие зимние температуры напрямую зависит от структуры липидных компонентов клеточных мембран.

Ранее [1], исследуя фракционный состав липидов меристем почек и его сезонные изменения у основных лесообразующих хвойных пород Красноярского края, мы обратили внимание на то, что у сосны в зимний период содержание гликолипидов было практически в четыре раза выше, чем у лиственницы сибирской и ели сибирской, а значит, у сосны эта липидная форма, наравне с фосфолипидами, имеет существенное значение в структурной организации мембран. Данный факт явился еще одним стимулом для дальнейшего изучения гликолипидов сосны.

Настоящая работа является продолжением изучения метаболизма меристем почек основных лесообразующих хвойных пород Центральной Сибири и посвящена исследованию сезонной изменчивости состава жирных кислот типа  $C_{18}$  диглицеридной части молекул гликолипидов сосны обыкновенной и выявлению закономерностей их биосинтеза посредством оценки изменения сезонной активности жирнокислотных  $\omega 9$ -,  $\omega 6$ - и  $\omega 3$ -десатураз. Жирнокислотный состав изучали в различных фенологических фазах развития почек, соответствующих состоянию глубокого покоя осенью, вынужденного покоя и низкотемпературной устойчивости в зимний период, а также при переходе к активной вегетации весной.

Объект исследования – зачаточные (меристематические) ткани хвои и побега сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). Побеги последнего года (по 10 шт. с 10 деревьев) отбирали на территории Мининского лесничества (пригородная зона г. Красноярск) с различных мест кроны деревьев II–III классов возраста. После удаления почечных чешуй меристематические ткани вегетативных почек срезали по границе с ксилемой побега. Полученные образцы фиксировали смесью хлороформ – изопропиловый спирт в соотношении 1:2 по объему [9, 12] с добавлением 1 %-го ионола. Гомогенизацию зачаточных тканей и экстракцию липидов проводили при температуре 0...2 °С, используя охлажденную лабораторную посуду и реактивы. Общую фракцию липидов очищали от нелипидных примесей гель-фильтрацией через колонку с сефадексом G-25. Очищенный липидный экстракт упаривали на ротационном вакуумном испарителе (РВИ) при температуре 36...38 °С и разделяли на индивидуальные фракции с помощью препаративной колоночной хроматографии [3]. В качестве адсорбента использовали силикагель Bio-Sil A 100-200 mesh. Колонку с нанесенным липидным экстрактом последовательно промывали хлороформом, ацетоном, изопропанолом. Скорость элюирования составляла около 3 мл/мин. При этом последовательно вымывались вещества нейтрального характера, гликолипиды и фосфолипиды. Выход липидных фракций контролировали методом ТСХ, массу определяли гравиметрически. Ацетоновый экстракт, содержащий гликолипиды, упаривали на РВИ при температуре 36...38 °С.

Жирные кислоты анализировали в виде их метиловых эфиров, полученных переэтерификацией фракции гликолипидов метанолом [10]. Для этого упаренный ацетоновый экстракт растворяли в 3 мл 1 %-го метанольного раствора NaOH и

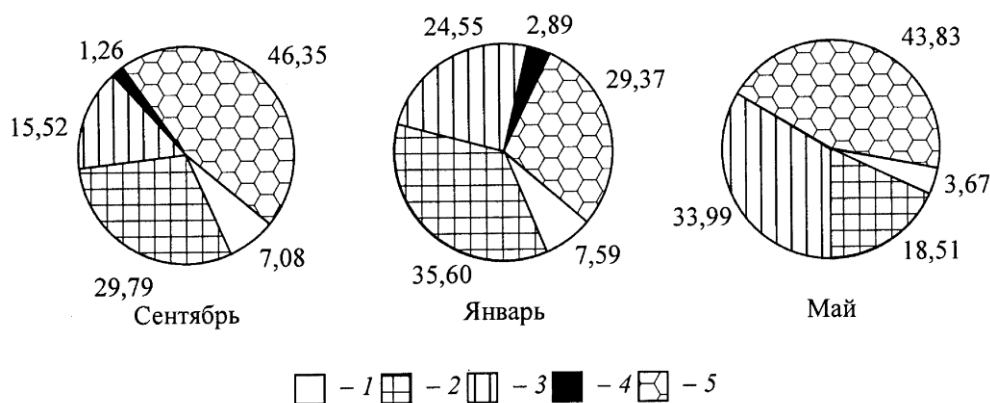


Рис. 1. Содержание жирных кислот в составе гликолипидов, %: 1 – моноеновые; 2 – диеновые; 3 – триеновые; 4 – тетраеновые; 5 – насыщенные

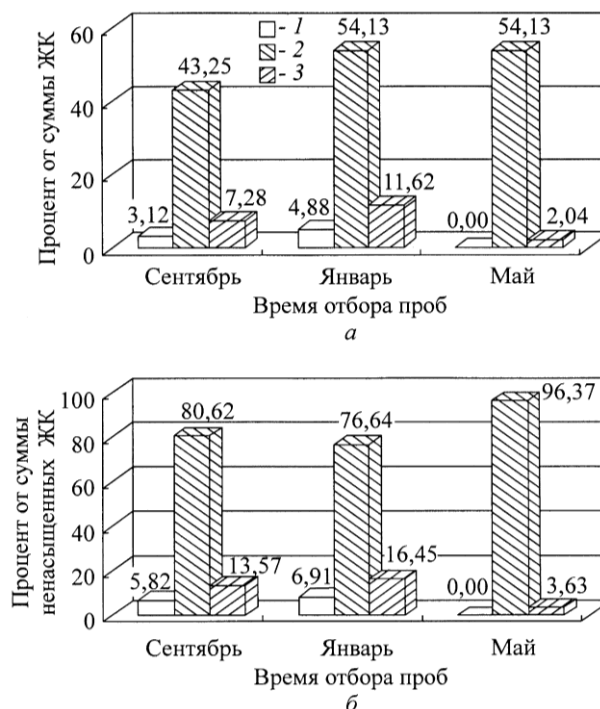
нагревали на водяной бане при 55 °С в течение 30 мин. Смесь охлаждали, подкисляли 5 %-м метанольным раствором HCl и вновь инкубировали при 55 °С. После охлаждения добавляли дистиллированную воду (1/2 объема смеси) и трижды экстрагировали метиловые эфиры жирных кислот гексаном. Гексановый экстракт также концентрировали на РВИ при температуре 36...38 °С, а затем очищали метиловые эфиры жирных кислот методом ТСХ, используя стеклянные пластинки с силикагелем марки КСК (размер частиц 100...200 меш.) Воскресенского химкомбината. В качестве проявителя применяли бензол. Метиловые эфиры жирных кислот анализировали на газожидкостном хроматографе Agilent Technologies фирмы «Хьюлетт-Паккард» (США) с масс-селективным детектором, работающим в режиме электронного удара, и регистрацией разделенных компонентов по полному ионному току. Использовали кварцевую капиллярную колонку HP-5МС (длина 30 м, диаметр 0,25 мм, толщина слоя пленки фазы 0,33 мкм); начальная температура термостата колонок +150 °С в изотермическом режиме 3 мин, затем температура термостата колонок увеличивалась со скоростью 20 °С/мин; конечная температура термостата колонок – 280 °С; газ-носитель – гелий.

Жирные кислоты идентифицировали по масс-спектрам (библиотека масс-спектров NIST 02.L) и индексам удерживания. Приведены результаты средних арифметических значений трех биологических и трех аналитических повторностей. Различия достоверны при 95 %-м уровне значимости. Активности ацил-липидных ω9-, ω6- и ω3-десатураз рассчитывали на основании содержания компонентов типа C<sub>18</sub> [14].

Изучение состава жирных кислот гликолипидов показало, что в их структуре постоянно присутствовали ненасыщенные компоненты – моноеновые, диеновые, триеновые и тетраеновые, составляющие биосинтетические семейства жирных кислот с нормальной структурой и *cis*-конфигурацией двойных связей (рис. 1).

В зимующих почках содержание диеновых жирных кислот было наибольшим и значительно (на 10 % от их суммы) превышало содержание триеновых; в набухших почках, наоборот, максимально увеличивалось содержание триеновых и снижалось – диеновых. В целом в зимний период общая доля ненасыщенных компонентов возрастала, весной – уменьшалась. Анализ содержания ненасыщенных жирных кислот, различающихся по числу углеродных атомов, показал, что вклад этих компонентов в структурную организацию гликолипидов в различные сезоны года неодинаков (рис. 2).

Рис. 2. Содержание основных групп ненасыщенных жирных кислот в гликолипидах: *a* – от суммы жирных кислот; *б* – от суммы ненасыщенных; 1, 2, 3 – сумма C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub> и C<sub>20</sub> ненасыщенных



Вместе с тем в общем составе постоянно преобладали ненасыщенные кислоты с 18 атомами углерода. Зимой их число возрастало до максимума и оставалось на этом уровне до распускания молодой хвои. Несмотря на то, что эти же кислоты доминировали и в составе ненасыщенных кислот, до максимума (96 %) их доля возрастала только весной.

Анализируя сезонную динамику содержания индивидуальных соединений ненасыщенных жирных кислот типа C<sub>18</sub>, нужно отметить, что уровень олеиновой кислоты в осенне-зимний период был стабилен – около 6 % от суммы жирных кислот, а весной в набухших почках снижался в 1,6 раза. Динамика содержания линоленовой кислоты оказалась противоположной: с сентября по май (в ходе органогенеза почек) ее количество в составе гликолипидов возрастало от 12 до 34 %.

Содержание линолевой кислоты в различные сезоны года изменялось от 16 до 30 %, возрастая до максимума зимой в состоянии низкотемпературной устойчивости меристем и снижаясь весной в набухших почках. По нашим данным, гликолипидам сосны в различные сезоны года присуще более высокое по сравнению с другими породами содержание линолевой кислоты (например, у лиственницы сибирской оно изменялось в пределах 6...22 %).

На рис. 3 наглядно продемонстрировано сезонное изменение соотношения олеиновая : линолевая : линоленовая кислоты в составе гликолипидов.

Совершенно очевидно, что эта группа ненасыщенных жирных кислот играет определяющую роль не только в структурной организации гликолипидов, но и в функциональном состоянии клеточных мембран в целом.

Известно, что повышение вязкости мембран при снижении температуры сопровождается индукцией экспрессии десатуразных генов, повышающих в клетке уровень ферментов – десатураз [5]. На сегодняшний день наиболее детально изучена экспрессия генов десатураз у цианобактерий [8, 13]. В адаптации высших растений к изменяющимся условиям окружающей среды десатуразы также играют важную роль, поскольку устойчивость растений к низкотемпературному воздействию коррелирует с наличием полиненасыщенных жирных кислот в структуре мембранных липидов [2, 6].

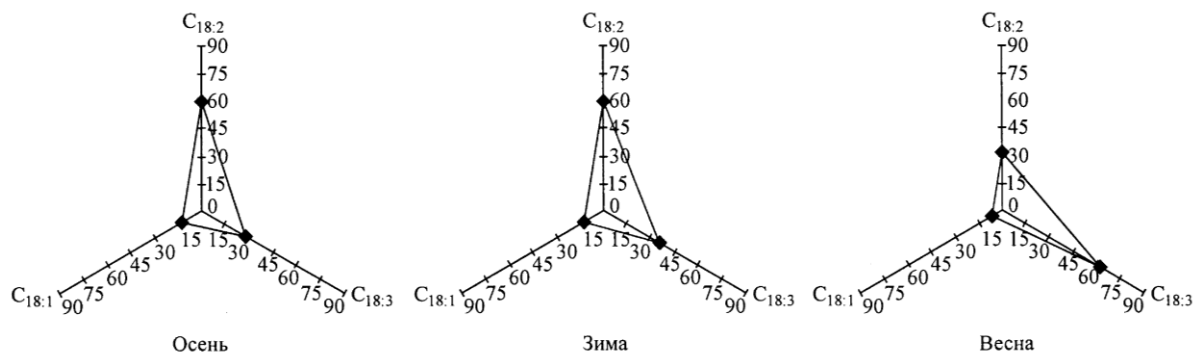


Рис. 3. Соотношение олеиновой ( $C_{18:1}$ ), линолевой ( $C_{18:2}$ ) и линоленовой ( $C_{18:3}$ ) кислот в гликолипидах, % от их суммы

Роль жирнокислотных десатураз заключается в регуляции текучести липидного бислоя мембран посредством ускорения синтеза полиненасыщенных жирных кислот в мембранных липидах. Рассматривая текучесть мембран в качестве основного параметра, обеспечивающего их нормальное функционирование при низких зимних температурах, необходимо оценивать активность жирнокислотных десатураз. На сегодняшний день существует практика ее косвенной оценки на основании состава жирных кислот мембранных липидов [7, 11, 14].

Для выявления закономерностей биосинтеза важнейшей группы ненасыщенных жирных кислот гликолипидов исследовано изменение сезонной активности жирнокислотных  $\omega 9$ -,  $\omega 6$ - и  $\omega 3$ -десатураз, катализирующих введение двойных связей в углеводородные цепи олеиновой ( $C_{18:1}$ ), линолевой ( $C_{18:2}$ ) и линоленовой ( $C_{18:3}$ ) кислот. Величины стеариол- (SRD), олеил- (ORD) и линолеил- (LRD) десатуразных отношений приведены в таблице (относительная стандартная ошибка опыта не превышала 5 %).

К зиме стеариол- (SRD) десатуразное отношение повышалось до 0,63, следовательно, в состоянии низкотемпературной устойчивости для меристем сосны характерно определенное соотношение количества стеариновой и олеиновой кислот. Изменение соотношения стеариновой и олеиновой кислот в пользу стеариновой, наблюдавшееся в набухших почках, и, соответственно, снижение SRD до 0,38 в данном случае не свидетельствуют о снижении весной активности  $\omega 9$ -ацил-АПБ-десатуразы.

Кажущееся противоречие легко объяснимо. В период вегетации в почках возрастала скорость введения третьей двойной связи в линолеовую кислоту, поскольку количество последней увеличивалось до максимума.

#### Состав жирных кислот с 18 атомами углерода, % от суммы жирных кислот

Жирная кислота (десатуразное отношение)	Время отбора проб		
	Сентябрь	Декабрь	Май
Стеариновая ( $C_{18:0}$ )	5,58	3,50	5,93
Олеиновая ( $C_{18:1}$ )	5,65	5,93	3,67
Линолевая ( $C_{18:2}$ )	25,82	29,78	16,47
Линоленовая ( $C_{18:3}$ )	11,78	18,42	33,99
SRD	0,50	0,63	0,38
ORD	0,87	0,90	0,91
LRD	0,32	0,38	0,68

Одновременно на высоком уровне (0,92) оставалось и олеил- (ORD) десатуразное отношение. Но без высокой активности ацил-АПБ-десатуразы, обеспечивающей субстратом  $\omega$ 3- и  $\omega$ 6- ацил-липидные (мембранные)-десатуразы, последовательно образующие полиненасыщенные жирные кислоты с двумя и тремя связями, процессы дальнейшей десатурации жирных кислот просто невозможны. Поэтому весной снижение SRD связано, в первую очередь, с тем, что образующаяся олеиновая кислота быстро расходовалась на биосинтез высоконенасыщенных жирных кислот с 18 атомами углерода.

На протяжении всего периода исследования для сосны характерны высокие и относительно стабильные значения олеил- (ORD) десатуразных отношений (0,87...0,91), поскольку сумма линолевой и линоленовой кислот в гликолипидах в различных фенологических фазах развития почек значительно превосходила уровень содержания олеиновой кислоты.

В зимний период отмечалось некоторое увеличение ORD. Такая динамика показывает, что у сосны, как и у других высших растений [4], гены, кодирующие  $\omega$ 6-ацил-липидную-десатуразу, активируются низкими температурами. Весной в набухших почках показатель несущественно отличался от зимнего значения (разница составляла менее 5 %), т. е. активность  $\omega$ 6-ацил-липидной-десатуразы сохранялась на прежнем уровне.

Линолеил- (LRD) десатуразное отношение в осенне-зимний период у сосны было невысоким (0,32...0,38), что связано со значительно большей долей линолевой кислоты. Существенное изменение LRD происходило весной при набухании почек и формировании молодой хвои. Оно увеличивалось почти в два раза, что свидетельствует об экспрессии генов  $\omega$ 3-ацил-липидной-десатуразы, ответственной за синтез линоленовой кислоты. В результате скорость введения третьей двойной связи в линолевою кислоту возрастала – количество линоленовой кислоты увеличивалось.

Таким образом, исследование индивидуального состава и содержания жирных кислот типа C<sub>18</sub> гликолипидов меристем сосны обыкновенной, анализ его сезонных изменений показали, что наиболее существенные трансформации в диглицеридной части молекул гликолипидов происходят при смене зимней фенологической фазы развития почек и связаны с переходом дерева от состояния покоя к активной вегетации:

в состоянии низкотемпературной устойчивости меристем уровень линолевой кислоты в 1,6 раза превышает уровень линоленовой, в 5 раз – олеиновой и составляет около 30 % от суммы жирных кислот. Вероятно, у сосны количество линолевой кислоты в составе гликолипидов является определяющим для формирования криозащищенной структуры мембран;

у сосны на мембранные механизмы криорезистентности меристем, регулирующие жирнокислотный состав гликолипидов, наиболее существенное влияние оказывает  $\omega$ 6-ацил-липидная десатураза, ответственная за синтез линолевой кислоты. Сравнение величин олеил- (ORD – 0,89) и линолеил- (LRD – 0,38) десатуразных отношений показывает, что в зимний период  $\omega$ 6-ацил-липидная-десатураза катализирует введение второй двойной связи в олеиновую кислоту вдвое интенсивнее, чем  $\omega$ 3-ацил-липидная-десатураза – третьей двойной связи в линолевою;

весной у сосны в меристемах почек экспрессия генов  $\omega$ 3-ацил-липидной-десатуразы, ответственной за синтез линоленовой кислоты, вызывает увеличение скорости введения третьей двойной связи в линолевою кислоту, в набухших почках LRD увеличивается практически вдвое. В результате гликолипиды, синтезирующие-

ся *de novo* при формировании фотосинтетического аппарата молодой хвои, преимущественно аккумулируют линоленовую кислоту.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алаудинова Е.В., Миронов П.В. Сравнительная характеристика липидов меристем почек *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. // Химия природных соединений. 2009. № 6. С. 666–669.
2. Ветчинникова Л.В. Карельская береза и другие редкие представители рода *Betula* L. М.: Наука, 2005. 269 с.
3. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 322 с.
4. Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот: Адаптивная экспрессия и принципы регуляции // Физиология растений. 1997. Т. 44. С. 528–540.
5. Лось Д.А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений // Вестн. РАН. 2005. Т. 75. № 4. С. 338–345.
6. Фуксман И.Л., Саукконен А.А., Степанов А.А. Динамика жирнокислотного состава липидов почек сосны обыкновенной в связи с ее ростом // Химия древесины. 1987. № 6. С. 89–93.
7. Характеристика жирнокислотного состава липидов митохондриальных мембран некоторых видов злаков, различающихся устойчивостью к низким температурам / С.П. Макаренко [и др.] // Биологические мембраны. 2003. Т. 20. № 4. С. 301–306.
8. Alteration of Low-Temperature Susceptibility of the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7002 by Genetic Manipulation of Membrane Lipid Unsaturation / T. Sakamoto [et al.] // Arch. Microbiol. 1998. Vol. 169. P. 20–28.
9. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiology. 1959. Vol. 37. P. 911–917.
10. Carreau V.P., Dubaeq J.P. Adaptation of a Macro-Scale Method to the Micro-Scale for Fatty Acid Methyl Trans-esterification of Biological Lipid Extracts // J. Chromatogr. 1978. Vol. 151. P. 384–390.
11. Comparison of sense and antisense methodologies for modifying the fatty acid composition of *Arabidopsis thaliana* oilseed / M. E. Cartea [et al.] // Plant Science. 1998. Vol. 136. P. 181–194.
12. Folch J., Lees M., Stanley G.H. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226, N 1. P. 497–509.
13. Los D.A., Murata N. Structure and Expression of Fatty Acid Desaturases // Biochim. Biophys. Acta. 1998. Vol. 1394. P. 3–15. 6
14. Yaworski, J.G., Stumpf P.K. Fat metabolism in higher plants properties of a soluble stearyl-acyl carrier protein desaturase from maturing *Carthamus tinctorius* // Arch. Biochem. Biophys. 1974. Vol. 162. P. 158–162. 7.

E.V. Alaudinova, P.V. Mironov  
Siberian State Technological University

**Scotch Pine: Membrane Lipids Metabolism of Bud Live Tissues**

The seasonal variability of C<sub>18</sub> fatty acids composition of the molecule diglyceride part of Scotch pine glycolipids is investigated. The biosynthesis regularities of oleic, linoleic and linolenic acids are revealed by assessment of seasonal activity changes of ω9-, ω6- and ω3- fatty-acid desaturases.

Keywords: Scotch pine, glycolipids, fatty acids, ω9-, ω6- and ω3-fatty-acid desaturases.