

ORIGINAL ARTICLE

**Water and carbohydrate content at leaves of plants used in
medicine during vegetation**

Zhivetev M.A., Graskova I.A., Pomortsev A.V., Voinikov V.K.

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy
of Sciences, Irkutsk, Russia*

Phone: (395-2)42-50-09, Fax: (395-2)51-07-54

E-mail: nik.19@mail.ru

Received August 15, 2011

Increase of carbohydrate content with cryoprotective function to the end of vegetation period was shown. The accumulation of carbohydrates in plants on Lake Baikal shores region was greater than it in Irkutsk region.

*Key words: carbohydrate, content of water, Achillea asiatica Serg., Taraxacum officinale
Wigg., Plantago major L., Veronica chamaedrys L., Alchemilla subcrenata Buser*

ORIGINAL ARTICLE

Содержание воды и сахаров в листьях лекарственных растений в течение вегетации

Живетьев М.А., Граскова И.А., Поморцев А.В., Войников В.К.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия

Phone: (395-2)42-50-09, Fax: (395-2)51-07-54

E-mail: nik.19@mail.ru

Поступила в редакцию 15 Августа 2011 г.

Увеличение содержания сахаров, выполняющих криопротекторную функцию, наблюдали к концу периода вегетации. На побережье озера Байкал накопление сахаров происходило интенсивнее, чем в Иркутске.

Key words: сахара, содержание воды, Achillea asiatica Serg., Taraxacum officinale Wigg., Plantago major L., Veronica chamaedrys L., Alchemilla subcrenata Buser

У травянистых растений, таких как зимующие злаки, морозостойкость в значительной мере базируется на водоудерживающей способности клеток, которая достигается разными путями, в том числе и осмотическими силами растворов в результате накопления больших количеств сахаров и других растворимых нетоксичных веществ (Трунова, 1982). Водоудерживающая роль сахаров при низкотемпературном воздействии на озимую пшеницу была показана в опытах, в которых массовая доля сахаров удваивалась (с 25 до 50% сухой массы) за счет поглощения из наружного раствора, что при температуре -10 °C приводило

к уменьшению количества льда по сравнению с контролем на 6-7 % (Туманов и др., 1969). Антифризные свойства сахаров, благодаря которым замерзание их растворов происходит при более низких температурах, чем 0 °C, также очень важны для морозостойкости растений. Кроме осморегуляторных функций, сахара выполняют криопротекторную, способствуя сохранению нативной конформации белков при низкой водной активности и снижая концентрацию токсичных веществ на коллигативной основе при замерзании растений (Трунова, 2007).

Существенна роль сахаров в стабилизации клеточных мембран за счет взаимодействия с полярными группами фосфолипидов и образования дополнительных гидрофобных связей, а также тем, что сахара служат основными субстратами для синтеза стрессовых белков и липидов при низкотемпературной адаптации и постстрессовой репарации (Трунова, 2007).

Предполагается роль сахаров в передаче низкотемпературного сигнала (Чиркова, 2002; Tuteja, Sorogy, 2008), а также в качестве низкомолекулярных антиоксидантов (Аверьянов, Лапикова, 1989; Deryabin et al., 2004).

Сахара влияют на экспрессию многих генов, участвующих в фотосинтезе, гликолизе, азотном метаболизме и метаболизме сахарозы, и регулирующих клеточный цикл; также изучаются рецепторы сахаров и соответствующие пути сигнальной трансдукции (Rolland et al., 2006). Например, известно, что во многих сигнальных системах гексокиназа 1 (Hxk1) активирует эволюционно-консервативный глюкозный сенсор, благодаря которому запускается гормональный сигнал, вызывающий генную экспрессию и рост растения в ответ на действие внешней среды (Cho et al., 2006). В то же время, недостаточно изучен молекулярный механизм, через который Hxk1 контролирует экспрессию генов, кодирующих белки, вовлеченные в процесс фотосинтеза (Tuteja, Sorogy, 2008). На растениях арабидопсиса показано, что они могут иметь два глюкозных пути передачи сигнала: гексокиназо-зависимый и гексокиназо-независимый (Rolland et al., 2006).

Недавно продемонстрировано, что Hxk1-ядерный комплекс контролирует экспрессию специфических генов фотосинтеза, а в

глюкозном метаболизме существуют два партнера (VHAB1 и RPT5B) (Chen, 2007), которые участвуют в передаче сигнала посредством контроля генной экспрессии в ядрах. В растениях сахарный сигналинг может также пересекаться с другими сигнальными путями (Tuteja, Sorogy, 2008).

Исследуя молекулярные механизмы сахарного ответа, Li et al. (2007) использовали мутантов *Arabidopsis thaliana* по гену *hsr8* (high sugar response8), которые проявляли рост и генную экспрессию в ответ на сахара. Растущие на свету *hsr8*-растения показали увеличение антоцианинов и уменьшение содержания хлорофилла в ответ на глюкозу, в то время как растущие в темноте растения-*hsr8* демонстрировали высокочувствительную к глюкозе элонгацию гипокотыля и развитие. Также выявлен путь, когда сигнал в клеточной стенке через плеотропный регуляторный локус 1 (PRL1) изменяет генную экспрессию и сахарозависимый метаболизм, рост и развитие (Li et al., 2007).

Уровень активности фермента сахарозосинтазы (SUS) различается в разных органах и растениях. Qiu и соавторы (2007) считают, что световой и метаболический сигналы регулируют SUS-протеиновую дегградацию в листьях кукурузы (*Zea mays*) во время деэтиоляции.

Недавно показано (Кемра et al., 2007), что MsK4, подобная гликоген-синтазной киназе-3 в *Medicago sativa* связывает стрессовый сигналинг с углеводным метаболизмом. MsK4 может быть локализованной в пластидах протеинкиназой, ассоциированной с крахмальными зёрнами. Растения с высокой экспрессией MsK4 проявляют большую толерантность к солевому стрессу и обладают высокой аккумуляцией углеводов. Это указывает на то, что MsK4

является регулятором, который изменяет метаболизм углеводов под действием абиотического стресса (Ваена et al., 2007). Кроме того, показано, что протеинкиназы KIN 10 и KIN 11 являются центральной точкой в развитии стресса, а сахара и ответные сигналы регулируют метаболизм, энергетический баланс и рост под действием стрессора (Ваена et al., 2007).

Массовая доля растворимых форм сахаров в значительной мере определяется активностью ферментов углеводного обмена, в том числе инвертазы, катализирующей гидролиз сахарозы с образованием глюкозы и фруктозы (Roberts, 1975; Колупаев, Трунова, 1992). Изменения активности инвертаз при низкотемпературных воздействиях обнаружены у многих растений и объясняются взаимным переходом ее растворимой и связанных форм, а также синтезом фермента *de novo* (Дерябин и др., 2003; Deryabin et al., 2005). Причем повышение активности инвертазы в условиях низкотемпературного стресса характерно только для неповрежденных растений, что дает основание полагать, что увеличение активности инвертазы не является отражением деструктивных процессов, а скорее соответствует роли защитно-адапционной реакции. Об этом свидетельствует также тот факт, что увеличение активности инвертазы в ответ на низкотемпературное воздействие характеризуется большей скоростью проявления (Колупаев, Трунова, 1994).

Для изучения роли инвертаз в устойчивости растений к гипотермии был привлечен трансгенез. Введение гена дрожжевой инвертазы апопластной локализации в растения картофеля увеличило суммарную активность кислых инвертаз в 2-3 раза, а щелочных – в 1,3 раза по

сравнению с контролем, что привело к повышению массовой доли не только гексоз, но и самой сахарозы. Последнее объясняют (Трунова, 2007) тем, что активная инвертаза апопласта, гидролизуя сахарозу, препятствует транспорту углеводов, поскольку образующиеся гексозы не могут поступать во флоэму и в связи с этим обратно проникают в клетки мезофилла, где рефосфолируются гексокиназой и фруктокиназой и включаются в метаболический путь синтеза сахарозы. Таким образом, экспрессия генов апопластной инвертазы в листьях картофеля привела к накоплению большого количества сахаров и повышению устойчивости растений к низкотемпературному воздействию, что было показано различными методами (Deryabin et al., 2005).

Растения сталкиваются не только с неблагоприятным действием критических температур, но и с проблемой поддержания водного баланса организма при нерегулярном выпадении осадков. При недостаточном водоснабжении преимущества получают растения с эффективной регуляцией транспирации, сопряженностью газо- и водообмена, эффективной осмотической регуляцией, обеспеченностью элементами питания (Кошкин, 2010). Поэтому устойчивость растений к засухе напрямую взаимосвязана с накоплением сахаров, выполняющих водоудерживающую и ассимилирующую функции. Сахара включаются в рост растений и метаболизм как структурные компоненты и источники энергии (Tutejia, Sorogy, 2008). Такие сахара как сахароза имеют двойную функцию – как транспортируемые углеводы и как сигнальные молекулы, регулирующие экспрессию генов и развитие растений (Baier et al., 2004). Так же концентрации и пул сахаров в

ряде случаев служат сигналами для экспрессии различных генов углеводного метаболизма, в частности кодирующих инвертазу и сахарозсинтазу (Кошкин, 2010). Такая экспрессия тканеспецифична и в одних органах растений эти гены активируются, а в других – ингибируются высокими концентрациями сахаров (Кошкин, 2010). Существенна регуляция углеводного и энергетического обмена через продукцию, утилизацию, мобилизацию и локализацию продуктов фотосинтеза в различных тканях растения и на разных стадиях развития (Tutejia, Sorogy, 2008).

Во многих работах показано, что накопление сахаров происходит при разных видах стрессов, и следовательно можно рассматривать накопление углеводов как неспецифическую составляющую стрессового ответа, в том числе на засуху и низкую температуру (Ваена et al., 2007; Tutejia, Sorogy, 2008). Изучение кинетики пероксидазных реакций в присутствии разных концентраций сахаров показало, что среды с высоким их содержанием понижают активность пероксидазы и ее термостабильность (Рогожин и др., 2004).

Поэтому целью наших исследований стало изучение содержания растворимых сахаров в листьях пяти видов растений в течение периода вегетации в условиях Иркутска и на побережье озера Байкал.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования развития приспособительной адаптации дикорастущих лекарственных растений к осеннему понижению температур были выбраны пять видов травянистых растений. Три из них – тысячелистник азиатский *Achillea asiatica* Serg., одуванчик лекарственный *Taraxacum officinale* Wigg., и подорожник большой *Plantago major* L.

– широко распространены в Прибайкалье и в России. Они занимают обширный ареал на Евразийском континенте и поэтому произрастают в разных экологических условиях. Априори можно предвидеть у этих растений выраженный адаптационный потенциал и широкую норму реакции в ответ на те или иные стрессовые воздействия. Все три вида широко представлены как во флоре города Иркутск, так и на побережьях озера Байкал. Это позволяет провести сравнение адаптации этих растений при произрастании в двух климатически различающихся точках ареала – на юго-восточном побережье Байкала, который оказывает мощное смягчающее воздействие на атмосферные условия прилегающих территорий, и в Иркутске, где господствует резкоконтинентальный климат. Отбор растений производили соответственно на левом берегу реки Выдриная в 700 м от уреза озера Байкал на территории стационара СИФИБРа (в дальнейшем для краткости – «р. Выдриная») и в Иркутске на территории дендрариума СИФИБРа. Отбирались растения видов *Achillea asiatica* Serg., *Taraxacum officinale* Wigg., *Plantago major* L. на обеих экспериментальных площадках, а также два вида растений, относительно массово представленные на стационаре на берегу реки Выдриная и непосредственно на берегу Байкала в устье реки, но не встречающиеся в Иркутске: вероника дубравная (*Veronica chamaedrys* L.) и манжетка городковатая (*Alchemilla subcrenata* Buser). Последние хорошо растут в районе устья реки Выдриная, иногда формируя сплошной покров.

Для исследований отбиралась средняя проба биомассы листьев растений со среднего яруса побега или из прикорневой розетки. Предпочтение отдавалось нецветущим

растениям. Отобранный растительный материал транспортировали в контейнерах с сухим льдом и хранили в холодильнике при температуре -80°C .

Для определения общего содержание водорастворимых сахаров в растительных тканях использовали антроновый метод (Кочетков и др., 1967). Навеску материала (10-50 мг) заливали 10-50 мл кипящей воды, растирали в ступке и оставляли для экстракции сахаров на 1 сутки. Затем раствор центрифугировали и надосадочную жидкость переносили в мерную посуду и доводили до заданного объема водой. К аликвоте (400 мкл) раствора сахаров добавляли двойной объем 0,2% раствор антраона («Диадем», Индия) в концентрированной серной кислоте. Смесь выдерживали 15 мин при комнатной температуре до полного развития характерной окраски. Оптическую плотность раствора промеряли на спектрофотометре Specord – S100 («Analytic Zeiss Jena», Германия) при длине волны 620 нм против контроля, в котором вместо пробы сахаров добавлялась вода. Расчет

производили по калибровочной кривой, построенной по сахарозе.

Измерения содержания сахаров в листьях растений осуществляли в трех биологических и трех аналитических повторностях. Рассчитывали среднее арифметическое, стандартное отклонение для воды и ошибку среднего для сахаров.

Содержание воды в листовых пластинках определяли стандартным методом высушивания до постоянного веса при температуре 105°C . Содержание воды выражали в долях единицы от сырой массы листа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследуемых растениях было определено содержание воды для того, чтобы проследить динамику обеспеченности тканей растений влагой в течение периода вегетации, которая зависит от внешних условий среды обитания, в том числе избыточной солнечной инсоляции летом и количества атмосферных осадков (рис 1, 2).

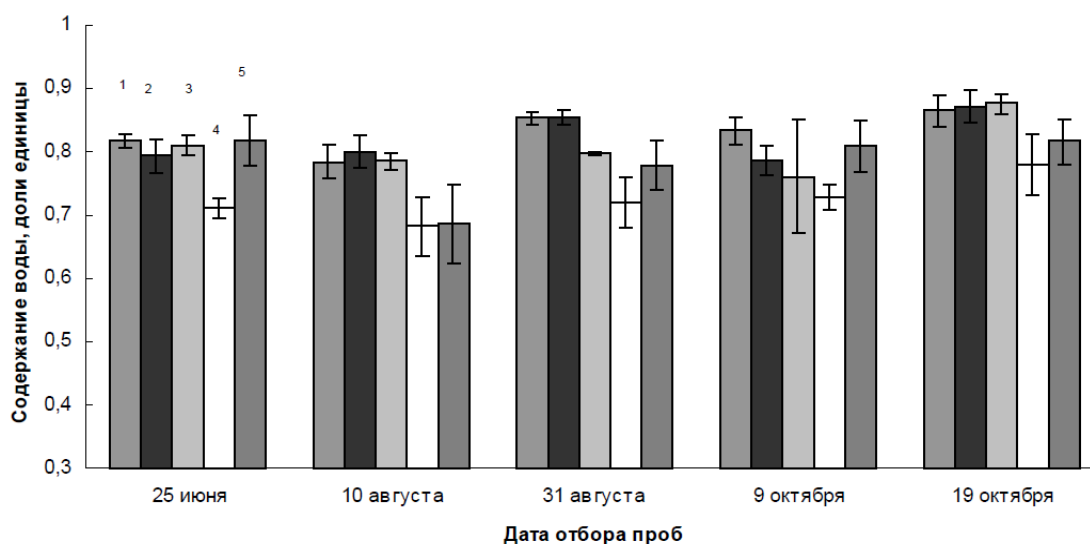


Рисунок 1. Содержание воды в листьях растений, р. Выдриная

1 – одуванчик, 2 – подорожник, 3 – тысячелистник, 4 – манжетка, 5 – вероника

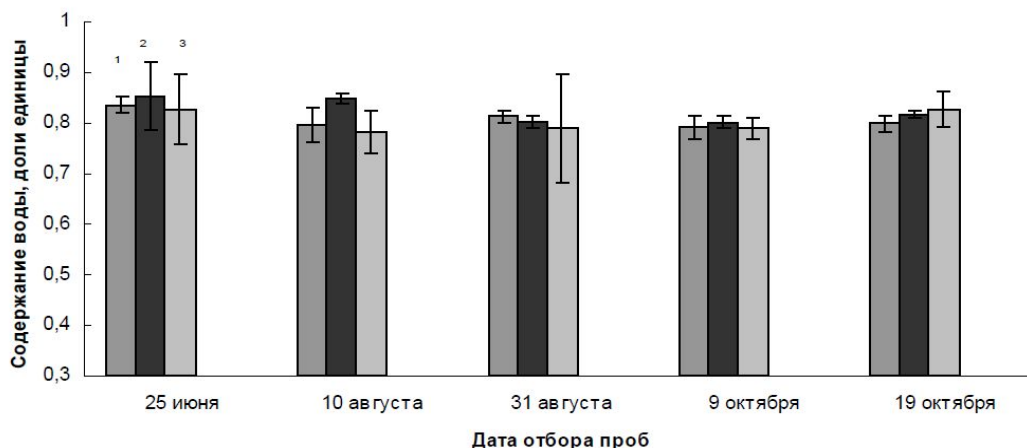


Рисунок 2. Содержание воды в листьях растений, произрастающих в Иркутске

1 – одуванчик, 2 – подорожник, 3 – тысячелистник

В начале августа большинство изученных растений на р. Выдриная были мало обеспечены водой, а в октябре содержание воды в листьях было, наоборот, очень высоким (рис. 1).

В Иркутске в октябре листья растений

содержали меньше воды, как в сравнении с летним периодом в Иркутске, так и с октябрём на р. Выдриная (рис. 2).

Были получены данные по концентрации растворимых сахаров (таблицы 1 и 2).

Таблица 1. Содержание растворимых сахаров в листьях одуванчика, тысячелистника, подорожника

Место отбора проб	Дата отбора проб	Содержание сахаров, % сырой массы		
		Одуванчик	Подорожник	Тысячелистник
Выдриная	24 июня	0,94±0,095	1,34±0,137	0,76±0,015
	06 августа	1,50±0,038	0,92±0,070	0,78±0,061
	30 августа	1,08±0,041	1,20±0,120	1,48±0,119
	08 октября	4,33±0,070	3,70±0,310	4,71±0,220
	16 октября	5,72±0,212	3,57±0,534	4,81±0,224
Иркутск	25 июня	1,83±0,017	0,76±0,085	0,28±0,005
	10 августа	1,24±0,140	0,52±0,014	0,84±0,061
	31 августа	0,67±0,050	0,53±0,019	2,17±0,058
	9 октября	2,76±0,287	4,04±0,177	2,53±0,118
	19 октября	2,74±0,126	2,92±0,341	4,37±0,225

Показано, что с понижением температур воздуха к концу периода вегетации у всех исследуемых растений происходит накопление сахаров в листьях.

Учитывая количество воды в исследуемых тканях и количество растворимых сахаров, приходящееся на этот объем, можно вычислить концентрацию растворимых углеводов в

цитоплазматическом растворе или клеточном соке. Кроме того, чем больше воды в клетке, тем больше требуется сахаров, препятствующих воде кристаллизоваться при понижении температуры окружающей среды. Поэтому отношение содержания сахаров (в мг/г сырой массы) к содержанию воды (в мл/г сырой массы) может быть показательным (рисунки 3, 4, 5).

Таблица 2. Содержание растворимых сахаров в листьях манжетки и вероники

Место отбора проб	Дата отбора проб	Содержание сахаров, % сырой массы	
		Манжетка	Вероника
Выдриная	24 июня	3,04±0,101	0,79±0,029
	06 августа	1,36±0,073	0,97±0,046
	30 августа	1,59±0,024	0,95±0,033
	08 октября	5,22±0,226	2,80±0,145
	16 октября	5,53±0,118	3,95±0,329

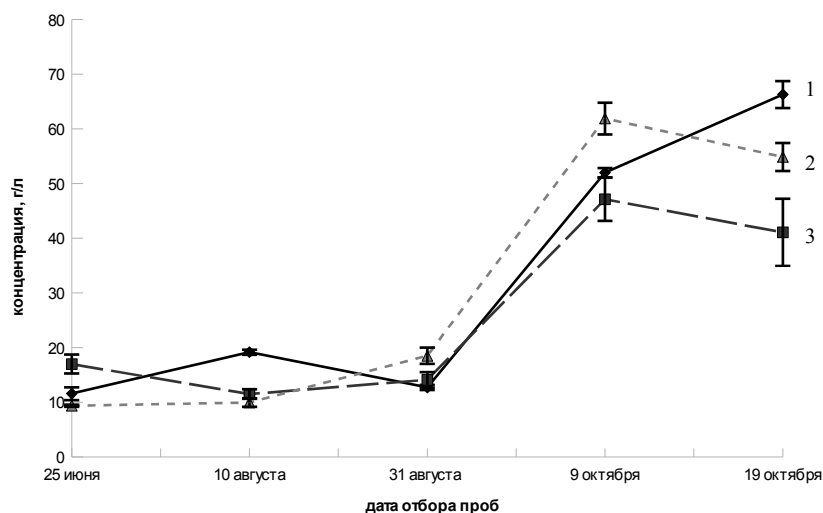


Рисунок 3. Отношение содержания сахаров к содержанию воды (г/л) в тканях одуванчика, подорожника и тысячелистника, р. Выдриная
1 – одуванчик, 2 – тысячелистник, 3 – подорожник

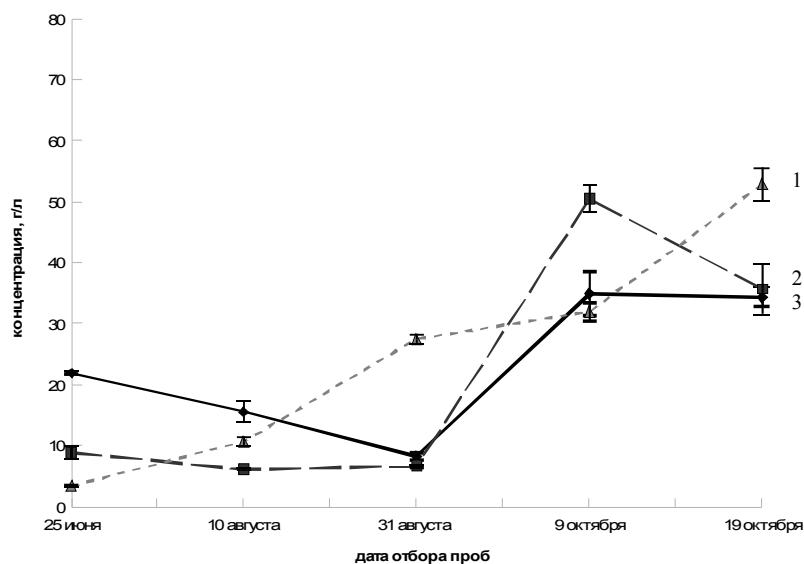


Рисунок 4. Отношение содержания сахаров к содержанию воды (г/л) в тканях одуванчика, подорожника и тысячелистника, Иркутск 2009
1 – тысячелистник, 2 – подорожник, 3 – одуванчик

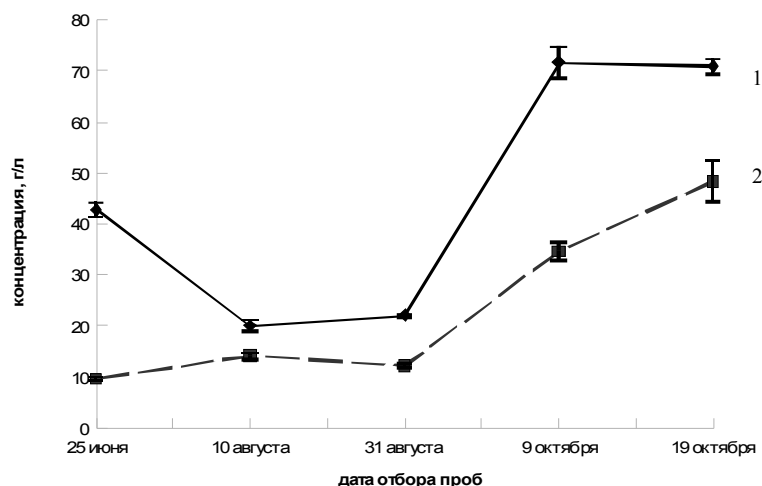


Рисунок 5. Отношение содержания сахаров к содержанию воды (г/л) в тканях манжетки и вероники, р. Выдриная, 1 – манжетка, 2 – вероника

Мы использовали этот показатель для лучшего понимания роли сахаров как осмопротекторов и антифризных молекул в тканях исследуемых растений. Чем выше это соотношение, тем при более низких температурах должна замерзать вода в клеточном соке растений и тем выше осмотические свойства листьев.

Показано, что с наступлением осенних холодов происходит накопление водорастворимых углеводов в тканях растений. На р. Выдриная этот процесс идет интенсивней. Относительное уменьшение содержания растворимых сахаров к концу октября может быть связано с ослаблением фотосинтеза и процессами деструкции, особенно у подорожника, а у растений побережья Байкала – с наступлением осеннего пика вегетации. Иногда весной и ранним летом отмечается высокое содержание растворимых углеводов, особенно ярко это выражено у манжетки. Такая особенность может быть связана как с защитой от весенне-летних заморозков, так и с тем, что весной синтез углеводов может превышать

скорость их усвоения растением. Учитывая, что манжетка обладает очень развитыми целлюлозными оболочками, ей требуется больше углеводов в период активного роста.

В то же время, манжетка за лето успевает пройти два цикла развития (Зорина, 2009). Возможно, перед вторым циклом активной вегетации манжетка накапливает углеводы, необходимые для отрастания новых листьев взамен отмирающим старым. Тогда первый пик содержания сахаров у манжетки связан с естественными фазами онтогенеза растения. Второй пик, наблюдаемый в октябре, значительно больше летнего, что может объясняться усилением накопления сахаров в связи с необходимостью адаптироваться к гипотермии.

ВЫВОДЫ

Таким образом, для всех пяти видов растений показан высокий потенциал развития холодоустойчивости при наступлении осенней гипотермии, базирующийся на накоплении сахаров в листьях растений. На р. Выдриная накопление сахаров в октябре происходило

интенсивнее, чем в г. Иркутск у тех же биологических видов, что может свидетельствовать о более выраженном развитии адаптации на побережье оз. Байкал по сравнению с Иркутском.

ЛИТЕРАТУРА

- Аверьянов А.А., Лапикова В.П. (1989). Взаимодействие сахаров с гидроксильным радикалом в связи с фунгитоксичностью выделений листьев *Биохимия*. **54(10)**, 1646–1651.
- Зорина Е.В. (2009). Фармакогностическое изучение видов рода *Alchemilla* L. Пермского края. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук. Специальность фармацевтическая химия, фармакогнозия. Пермь.
- Дерябин А.Н., Трунова Т.И., Дубинина И.М. и др. (2003). Устойчивость к гипотермии растений картофеля, трансформированных геном дрожжевой инвертазы, находящимся под контролем промотора папатина В33 *Физиология растений*. **50(4)**, 505–510.
- Колупаев Ю.Е., Трунова Т.И. (1992). Особенности метаболизма и защитные функции углеводов растений в условиях стрессов. *Физиология и биохимия культ. растений*. **6**, 523–533.
- Колупаев Ю.А., Трунова Т.И. 1994. Активность инвертазы и содержание углеводов в колеоптилях пшеницы при гипотермическом и солевом стрессах // *Физиология растений*. **41(4)**, 552–557.
- Кочетков Н.К., Бочков А.Ф., Дмитриев Б.А., Усов А.И., Чижов О.С., Шibaев В.Н. (1967) *Химия углеводов*, М.: Химия. 672 с.
- Кошкин Е.И. (2010). Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур: учебник М.: Дрофа, 638 с.
- Рогожин В.В., Верхотуров В.В., Рогожина Т.В. (2004). Пероксидаза: строение и механизм действия. Иркутск: Изд-во ИрГТУ, 200 с.
- Трунова Т.И. (2007) Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука
- Туманов И.И., Красавцев О.А., Трунова Т.И. (1969). Изучение процесса льдообразования в растениях путем измерения тепловых выделений. *Физиология растений*. **16(5)**, 907–916.
- Чиркова Т.В. (2002). Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 260 с.
- Baena G.E., Rolland F., Thevelein J.M., Sheen J. (2007). A central integrator of transcription network in plant stress and energy signaling. *Nature* **448**, 938–942.
- Baier M., Hemman G., Holman R., Corke F., Card R., Smith C., Rook F., Bevan M.W. (2004), Characterization of mutants in *Arabidopsis* showing increased sugar-specific gene expression, growth, and developmental responses. *Plant Physiol*, **134**, 81–91.
- Chen J.G. (2007). Sweet sensor, surprising partners. *Sci. STKE V*. **2007**; 7.
- Cho Y.H., Yoo S.D., Sheen J. (2006). Regulatory functions of nuclear hexokinase 1 complex in glucose signaling. // *Cell* **127**, 579–589.
- Deryabin A.N., Dubinina I.M., Burakhanova E.A. et al. (2004). Cold tolerance of potato plants transformed with yeast invertase gene // *Asta agron*. **57(1-2)**, 31–39.
- Deryabin A.N., Dubinina I.M., Burakhanova E.A. et al. (2005). Influence of yeast derived

- invertase gene expression in potato plants on membrane lipid peroxidation at low temperature. *J. Thermal Biol.* **30**, 73-77.
- Kempa S., Rozhon W., Samaj J., Erban A., Baluska F., Becker T., Haselmayer J., Schleiff E., Kopka J., Hirt H., Jonak C. (2007). A plastid-localized glycogen synthase kinase 3 modulates stress tolerance and carbohydrate metabolism. *Plant J.* **49**, 1076-1090.
- Li Y., Smith C., Corce F., Zheng L., Merali Z., Ryden P., Derbyshire P., Waldron K., Bevan M.W. (2007). Signaling from an Altered Cell Wall to the Nucleus Mediates Sugar-Responsive Growth and Development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**. 2500-2515.
- Qiu Q.S., Hardin S.C., Mace J., Brutnell T.P., Huber S.C. (2007). Light and metabolic signals control the selective degradation of sucrose synthase in maize leaves during deetiolation. *Plant Physiol* **144**, 468-478.
- Roberts D.W.A. (1975). The invertase complement of cold-hardy and cold-sensitive wheat leaves. *Canad. J. Bot.* **53(13)**. 1333-1338.
- Rolland F., Baena G.E., Sheen J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **57**, 675-709.
- Tuteja N., Sopory S.K. (2008). Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant Signaling & Behavior*. **3(8)**. 525-536.
- Trunova T.I. (1982). Mechanism of winter wheat hardening at low temperature. In: Plant cold hardiness and freezing stress, V. 2., Li P., Sakai A. (ed.) N.Y.: Acad.press. N.Y., 41-55.