

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Семёнова Наталья Викторовна

**ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДНОГО СОСТАВА КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ
ЭМБРИОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЛИСТВЕННИЦЫ
СИБИРСКОЙ *LARIX SIBIRICA* LEDEB.**

1.5.21 – физиология и биохимия растений

**диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Дударева Любовь Виссарионовна**

Иркутск – 2022

Содержание

Содержание	2
Список сокращений	4
Введение.....	8
Глава 1. Обзор литературы.....	15
1. Липиды. Общие сведения	15
2. Значение и роль липидов в процессах роста и развития	17
2.1. Нейтральные липиды.....	19
2.1.1. Жирные кислоты	20
2.1.2. Глицериды.....	25
2.1.3. Стерины.....	28
2.2. Полярные липиды	33
2.2.1. Фосфолипиды	35
2.2.2. Гликолипиды	40
3. Культивирование растительной ткани	44
3.1. Особенности культивирования хвойных растений	46
3.1.1. Характеристика хвойных видов	46
3.1.2. Характеристика лиственницы сибирской.....	52
3.3. Пути решения проблем культивирования хвойных. Соматический эмбриогенез.....	54
4. Выводы из обзора литературы.....	60
Глава 2. Материалы и методы исследований.....	62
2.1. Характеристика объектов исследования	62
2.2. Методы количественного анализа.....	65
2.2.1. Экстракция липидов.....	65

2.2.2. Колоночная хроматография	66
2.2.3. Изучение жирнокислотного состава тканей клеточной культуры <i>L. sibirica</i>	66
2.2.4. Изучение и идентификация липидов тканей <i>in vitro</i> при помощи тонкослойной хроматографии	68
2.2.4.1. Изучение состава нейтральных липидов тканей клеточной культуры <i>L. sibirica</i>	69
2.2.4.2. Изучение состава стерина тканей клеточной культуры <i>L. sibirica</i>	69
2.2.4.3. Изучение состава фосфолипидов тканей клеточной культуры <i>L. sibirica</i>	71
2.2.4.4. Изучение состава гликолипидов тканей клеточной культуры <i>L. sibirica</i>	73
2.3. Статистический анализ.....	74
Глава 3. Результаты и обсуждение	76
3.1. Содержание суммарных липидов и основных липидных групп в эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линиях <i>L. sibirica</i>	77
3.2. Жирнокислотный состав суммарных липидов	81
3.2.1. Жирнокислотный состав НЛ, ГЛ и ФЛ.....	92
3.4. Нейтральные липиды.....	101
3.4.1. Стерины.....	109
3.5. Полярные липиды	123
3.5.1. Фосфолипиды	123
3.5.2. Гликолипиды	133
Заключение	136
Выводы	141
Список литературы	142

Список сокращений

1,2-ДГ – 1,2-диглицериды

1,3-ДГ – 1,3-диглицериды

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота

ААФТ – аминоалкогольаминофосфотрансфераза

АПБ – ацил-переносающий белок

БАВ – биологически активные вещества

БАП - бензиламинопурин

БЛ – брассинолид

БР – брассиностероиды

Г-3-Ф – глицерол-3-фосфат

ГЛ – гликолипиды

ГФАТ – Г-3-Ф-ацилтрансфераза

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрией

ДГ – диглицериды

ДГДГ – дигалактозилдиглицерид

ДГМГ – дигалактозилмоноглицерид

ДФГ – дифосфатидилглицерин

ЖК – жирные кислоты

ЖКОДЦ – жирные кислоты с очень длинной цепью

ЖКОДЦ-КоА – ацил-КоА-синтетаза жирных кислот с очень длинной цепью

ЖКОДЦ-ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты с очень длинной цепью

ИДС – индекс двойных связей

ИМК – индолил-3-масляная кислота

ИУК – 3-индолилуксусная кислота

КЛС – кардиолин-синтаза

ЛФК – лизофосфатидная кислота

ЛФКАТ – ЛФК-ацилтрансфераза

МГ – моноглицериды

МГДГ – моногалактозилдиглицерид
МГМГ – моногалактозилмоноглицерид
МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот
НЛ – нейтральные липиды
НЛн – неидентифицированные нейтральные липиды
НУК – 1-нафталинуксусная кислота
ПННЖК – полиненасыщенные жирные кислоты
ПФИ – полифосфатидилинозиты
ПФИК – ПФИ-киназа
СЖК – свободные жирные кислоты
СХДГ – сульфохиновозилдиглицерид
СЭ – соматический эмбриогенез
ТГ – триглицериды
ТСХ – тонкослойная хроматография
ФГ – фосфатидилглицерины
ФГФ – фосфатидилглицеринфосфат
ФГФ-синтаза
ФГФФ – ФГФ-фосфатаза
ФИ – фосфатидилинозиты
ФИЗФ – фосфатидилинозит-3-фосфат
ФИ(3,5)Ф – фосфатидилинозит-3,5-дифосфат
ФИ4Ф – фосфатидилинозит-4-фосфат
ФИ(4,5)Ф – фосфатидилинозит-4,5-дифосфат
ФИ5Ф – фосфатидилинозит-5-фосфат
ФИС – ФИ-синтаза
ФИК – ФИ-киназа
ФК – фосфатидная кислота
ФКФ – ФК-фосфатаза
ФЛ – фосфолипиды

ФЛн – неидентифицированный фосфолипид
ФС – фосфатидилсерины
ФСД – ФС-декарбоксилаза
ФСС – ФС-синтаза
ФХ – фосфатидилхолины
ФЭ – фосфатидилэтанолamines
ЦДС – ЦДФ-ДГ-синтаза
ЦДФ-ДГ – цитидиндифосфат-диглицерид
ЭС – эфиры стеринов
ЭСМ – эмбрионально-суспензорная масса
ЭР – эндоплазматический ретикулум
АСРВ – ацил-СоА-связывающий белок
CDP-Cho – цитидиндифосфат холин
CDP-Etn – цитидиндифосфат этаноламин
DGAT от англ. diacylglycerol acylltransferase – диацилглицерол-ацилтрансфераза
DGD – ДГДГ-синтаза
FAS – синтаза жирных кислот
MGD – МГДГ-синтаза
ODR – олеоил-десатуразное отношение
PDH – пируватдегидрогеназа
PDAT от англ. phospholipid:diacylglycerol acylltransferase –
фосфолипид:диацилглицерол-ацилтрансфераза
SDR – стеароил-десатуразное отношение
SGD2 – СХДГ-синтаза
SMT – стеролметилтрансферазы
SSR1 от англ. Sterol Side-chain Reductase – редуктаза боковой цепи
ΣГЛ – сумма гликолипидов
Σ_{МНЖК} – сумма мононенасыщенных жирных кислот
Σ_{НЖК} – сумма насыщенных жирных кислот

Σ НЛ – сумма нейтральных липидов

Σ _{ПНЖК} – сумма полиненасыщенных жирных кислот

Σ ПЛ – сумма полярных липидов

Σ ФЛ – сумма фосфолипидов

Введение

Актуальность проблемы. Липиды представляют собой широко распространенную группу соединений, которые не только являются в количественном отношении основным энергетическим резервом клеток, но и выполняют множество ключевых биологических функций (Harwood et al., 1980; Васьковский, 1997; Чиркова, 1997; Fahy et al., 2011). Известно, что многие типы липидов, в том числе жирные кислоты (ЖК), играют важную роль в росте и развитии растений как *in vivo*, так и *in vitro* (Cunha and Ferreira, 1997; Brownfield et al., 2007; Kumar et al., 2015; Mei et al., 2015; Barbaglia and Hoffmann-Benning, 2016; Cheng et al., 2016). Так, полярные липиды и входящие в их состав жирные кислоты (ЖК) являются основными структурными липидами, участвующими в формировании мембран, клеточных стенок и регуляции роста клеток. Эти и другие типы липидов, играют важную роль в росте и развитии растений как *in vivo*, так и *in vitro*. Они выполняют функции сигнальных молекул либо их предшественников, участвуя тем самым в сигнальных сетях растений, в том числе в тех, которые задействованы в процессах клеточной дифференциации (Dobrzyn and Ntambi, 2005; Thole, 2008; Munnik and Nelsen, 2011; Zhou, 2013). Другой важный класс липидов – триглицериды (ТГ). Они являются запасными липидами, которые легко могут быть вовлечены в катаболизм для получения необходимой клетке энергии, а также служат источником ацильных цепей для биосинтеза мембран и транспорта липидов, имеющих важное значение для нормального роста и развития растений в культуре и в природных условиях (Fan, 2013; Xu, 2018; Shimada 2018). Фосфолипиды (ФЛ), в особенности фосфатидилэтаноламины (ФЭ), фосфатидилхолины (ФХ) и фосфатидилинозиты (ФИ), также являются важными компонентами клеточных мембран, принимают активное участие в процессах роста и развития растительного организма, в частности, в формировании клеточной полярности и дифференциации клеток (Gibellini and Smith, 2010; Munnik and Nelsen, 2011; Zhou et al., 2013; Rodriguez-Villalon et al., 2015). Свободные стеринны, как

неотъемлемый компонент мембранного липидного бислоя, играют значимую роль в регуляции текучести мембраны и ее проницаемости (Kreis and Muller-Uri, 2010). Помимо этого, стерины активно участвуют в процессах пролиферации и дифференциации растительных тканей (Diener et al., 2000; Jang et al., 2000; Carland et al., 2002; Qian et al., 2013). Что касается ЖК, для них показано, например, что жирные кислоты с очень длинной цепью (ЖКОДЦ) существенным образом влияют на направление роста и степень растяжения клеток растений в ходе морфогенеза (Zheng et al., 2005; Bach et al., 2011; Yamauchi et al., 2015; Жуков, 2018; Mabuchi et al., 2018). Кроме того, они предотвращают чрезмерную пролиферацию клеток, способствуя тем самым правильному развитию растений (Nobusawa et al., 2013).

Поэтому сведения о составе и содержании липидных компонентов и об изменениях этих параметров в ходе культивирования растительных тканей являются важным источником информации для понимания процессов, происходящих в тканях, обеспечивающих дедифференциацию клеток, инициацию каллусогенеза, соматический эмбриогенез и органогенез.

Из-за сложностей естественного воспроизводства лесных ресурсов разработка биотехнологических методов возобновления лесов становится все более актуальным направлением. В настоящее время возрос интерес к одному из перспективных методов в лесной биотехнологии - микрклональному размножению в культуре *in vitro* (Calney and Pullman, 2007; Пак и др., 2016). Для сохранения редких генотипов с уникальными признаками в качестве наиболее перспективного подхода может рассматриваться их клональное размножение путем соматического эмбриогенеза и органогенеза (Calney and Pullman, 2007; Третьякова, 2013; Пак и др., 2016). Однако биотехнология получения соматических зародышей остается трудновыполнимой задачей для большинства видов хвойных (Третьякова и Барсукова, 2012; Третьякова и др., 2012). Эти трудности вызваны недостатком сведений об условиях и механизмах индукции соматического эмбриогенеза у голосеменных растений (Третьякова,

2013). Известно, что генетически детерминированный эмбриогенный потенциал реализуется через клеточную компетентность (Третьякова и др., 2012; Тимофеева и Румянцева, 2012). Состояние такой компетентности может быть охарактеризовано особенностями биохимического состава клеток растений, включая изменчивость качественного и количественного состава липидов и входящих в их состав ЖК.

Несмотря на важность информации о составе и содержании липидов в культивируемых растительных тканях для понимания происходящих в них процессов, в том числе о влиянии этих соединений на условия инициации и успешный ход эмбриогенеза, в отношении хвойных видов такие сведения все еще немногочисленны. Особенности липидного обмена в культуре тканей лиственницы сибирской, определяемые различиями в способности этих тканей к эмбриогенезу, вообще не изучались.

Поэтому детальное изучение особенностей состава и содержания липидных компонентов в эмбриогенной культуре клеток у представителя хвойных – лиственницы сибирской является актуальной задачей как с фундаментальной, так и с практической точек зрения.

Цель исследования.

Цель работы – выявление особенностей состава и содержания липидных компонентов каллусной ткани эмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) на ранней стадии культивирования.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести сравнительный анализ ЖК-состава суммарных липидов в тканях эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий *L. sibirica* на ранней стадии культивирования и распределения жирных кислот в составе отдельных липидных классов.

2. С помощью качественного и количественного анализа компонентного состава нейтральных, фосфо- и гликолипидов определить

различия в их составе и содержании в тканях эмбрионных и неэмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской.

3. Провести сравнительный анализ качественного и количественного состава свободных стероидов и их эфиров у эмбрионных и неэмбрионных клеточных линий.

Положения, выносимые на защиту

1. Особенностью липидного профиля у эмбрионных клеточных линий *L. sibirica* на ранней стадии культивирования является значительно более высокое содержание нейтральных липидов (триглицеридов), мононенасыщенных жирных кислот, а также фосфолипидов: сигнальных и регуляторных (фосфатидной кислоты, фосфатидилинозитов) и основных компонентов мембран – фосфатидилхолинов, чем у неэмбрионных линий.

2. Среди свободных стероидов кампестерин является основным компонентом, участвующим в процессах эмбриогенеза у клеточных линий *L. sibirica* на ранней стадии культивирования.

3. Высокое абсолютное и относительное содержание мононенасыщенной олеиновой кислоты может служить маркером компетентности клеточных линий к инициации соматического эмбриогенеза на ранних стадиях культивирования *L. sibirica*.

Научная новизна. Впервые изучен липидный состав эмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской *L. sibirica*, включая ЖК суммарных липидов и ЖК отдельных фракций липидов: нейтральных (НЛ), глико- (ГЛ), фосфолипидов (ФЛ); компонентный профиль НЛ, ФЛ и ГЛ, а также состав стероидов и их эфиров. Впервые показано, что ЖК-состав клеточных линий *L. sibirica* способных и неспособных к эмбриогенезу существенно различается: для эмбрионных клеточных линий характерно высокое относительное и абсолютное содержание олеиновой кислоты – до 56,5% от суммы кислот. Установлено, что содержание отдельных липидных групп также было значительно выше у эмбрионных линий (например, в 7 раз для

фосфатидилхолинов (ФХ)). Полученные данные позволили выдвинуть предположение, что такие липидные компоненты, как ФЛ, НЛ и стерины принимают активное участие в процессах дифференциации в клеточных линиях *L. sibirica*. На основании показанных в экспериментах существенных различий липидного состава у эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской предложено использование полученных сведений для отбора перспективных в отношении эмбриогенеза линий на ранних стадиях культивирования.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты имеют важное фундаментальное значение для понимания особенностей липидного состава каллусных тканей эмбриогенных клеточных линий хвойных растений и выявления вклада отдельных липидов в успех культивирования, а именно в инициацию и поддержание эмбриогенеза. Материалы данной работы могут быть использованы при написании учебно-методических пособий для студентов биологических факультетов.

Высокое содержание мононенасыщенных ЖК, в первую очередь, олеиновой, а также особенности состава свободных стеринов и их эфиров у эмбриогенных клеточных линий *L. sibirica* могут служить ранним маркером способности культуры к эмбриогенезу. При скрининге клеточных линий для клонального размножения хвойных в культуре *in vitro* маркером компетентности клеток к инициации соматического эмбриогенеза на ранних стадиях культивирования хвойных растений могут быть соотношения: стерины/эфиры стеринов, ФХ/ФЭ, МГДГ/ДГДГ.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на 4-м Международном совещании «Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири» (Барнаул, 24-29 августа, 2015 год); IV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы» (Улан-Удэ, 23–27 июня, 2016 г.); Всероссийской школе-конференции с международным участием «Байкальская школа-

конференция по химии» (Иркутск, 15–19 мая, 2017 г.); VII Всероссийской конференции с международным участием «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 24–28 апреля 2017 г.); Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященной 100-летию Иркутского государственного университета «Социально-экологические проблемы байкальского региона и сопредельных территорий» (Иркутск, 23 апреля, 2018 г.); II Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки» (Иркутск, 22–24 мая 2018 г.); Годичном собрании ОФР-2018, научной конференции «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, 10-15 июля, 2018 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ, из них 4 статьи в рецензируемых журналах из Перечня ВАК РФ (входящие в базы Web of Science и Scopus).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 292 наименования, в том числе 229 на иностранном языке. Работа изложена на 174 страницах машинописного текста, содержит 21 рисунок и 10 таблиц.

Работа выполнена в лаборатории физико-химических методов исследования Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН, г. Иркутск).

Личный вклад автора. Диссертация написана автором самостоятельно. Автор лично принимал участие на всех этапах подготовки диссертационной работы: планирования и проведения экспериментов, статистической обработки

данных, обобщения и интерпретации полученных данных, а также в написании статей, опубликованных по результатам работы, апробациях на конференциях.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю работы к.б.н. Л.В. Дударевой за поддержку, всестороннюю помощь при планировании лабораторных экспериментов, обработке и анализе первичных экспериментальных результатов и ценные замечания при написании рукописи. Автор выражает благодарность д.б.н. проф. Ю.М. Константинову за важные замечания при написании рукописи. Автор выражает благодарность к.б.н. В.Н. Шмакову за предоставление материала для исследования и ценные советы. Автор благодарит ведущего инженера В.В. Гурину и к.б.н. И.С. Капустину за методическую помощь в проведении экспериментов. Автор выражает признательность д.б.н. доц. О.И. Грабельных, д.б.н. Н.В. Озолиной, к.б.н. Е.Г. Рудиковской за внимательное отношение к работе и полезные замечания.

Автор выражает искреннюю благодарность всем сотрудникам лаборатории физико-химических методов исследований СИФИБР СО РАН за помощь в работе и доброжелательное отношение.

Автор сердечно благодарен своей семье за всестороннюю поддержку при написании рукописи.

Глава 1. Обзор литературы

1. Липиды. Общие сведения

Липидами называют химически разнообразную группу соединений, для которых общим свойством является нерастворимость в воде (Нельсон и Кокс, 2011). С этим разнообразием исторически связаны затруднения с общим непротиворечивым определением понятия «липиды». В.Е. Васьковский, например, дал такое определение: «липиды – это жирные кислоты и их производные» (Васьковский, 1997). Согласно этому определению, например, свободные стерины не могут быть отнесены к липидам. К настоящему времени группой исследователей (Fahy et al., 2011) была разработана система классификации липидов («LIPID MAPS»), основанная на концепции двух фундаментальных «строительных блоков»: кетоацильных и изопреновых групп. В соответствии с этой концепцией липидами называют «гидрофобные или амфипатические небольшие молекулы, которые могут формироваться полностью или частично в результате конденсации кетоацилтиоэфиров на основе карбаниона и/или конденсации изопреновых единиц на основе карбокатиона». Согласно этой классификации липиды поделены на восемь категорий: жирные ацилы, глицеролипиды, глицерофосфолипиды, сфинголипиды, сахаролипиды и поликетиды (полученные в результате конденсации кетоацильных субъединиц); стероловые липиды и пренольные липиды (полученные в результате конденсации изопреновых субъединиц) (Fahy et al., 2011). Некоторые авторы, по-прежнему, используют в своих работах несколько отличающуюся классификацию, выделяя нейтральные и полярные липиды (Розенцвет и др., 2000; Новицкий и др., 2011 и др.), что основано на классификации, приведенной в работе Мориса Кейтса (Kates, 1986). К нейтральным липидам были отнесены такие соединения как глицериды, свободные жирные кислоты (СЖК), свободные стерины и их эфиры, воска, углеводороды и др. Полярные липиды включают в себя группы фосфолипидов

(фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины и др.) и гликолипиды (моноголактозилдиглицериды, дигалактозилдиглицериды и др.).

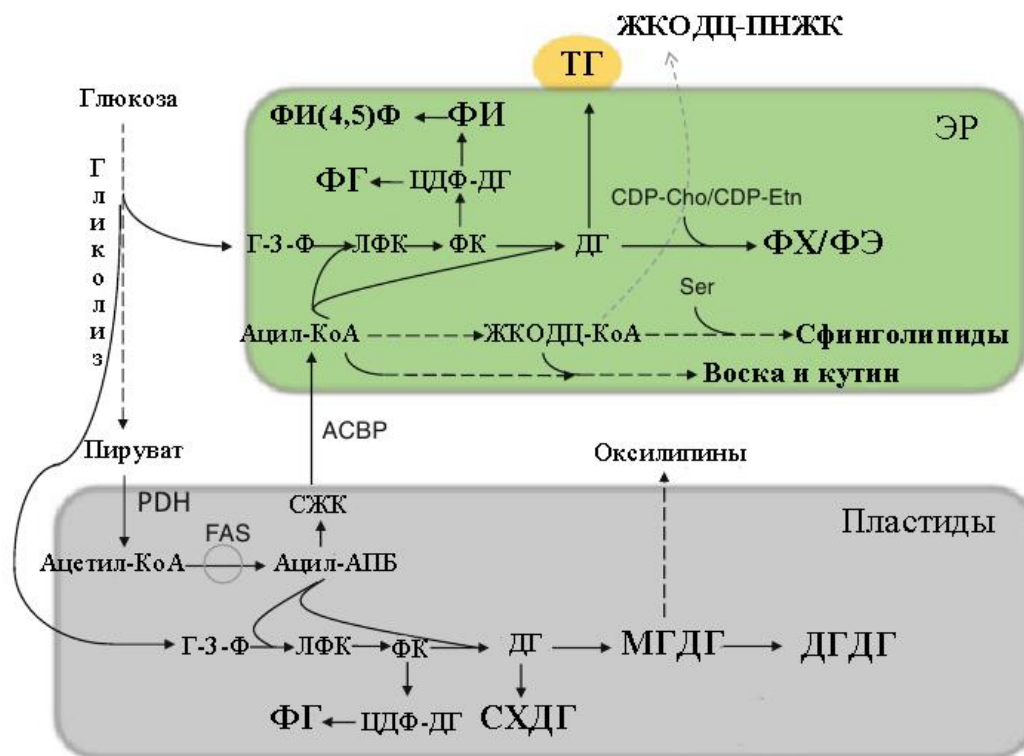


Рис. 1. Упрощенная схема биосинтеза липидов (Li-Beisson, 2016).

Примечания. ТГ – триглицериды; ФИ – фосфатидинозиты; ФИ(4,5)Ф – фосфатидинозит-3,5-бифосфат; ФГ – фосфатидилглицерины; ЦДФ-ДГ – цитидиндифосфат-диглицерид; Г-3-Ф – глицерол-3-фосфат; ЛФК – лизофосфатидная кислота; ФК – фосфатидная кислота; ДГ – диглицериды; ФХ – фосфатидилхолин; ФЭ – фосфатидилэтаноламин; ЖКОДЦ-КоА – ацил-КоА-синтетаза жирных кислот с очень длинной цепью; ЖКОДЦ-ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты с очень длинной цепью; СЖК – свободные жирные кислоты; МГДГ – моноголактозилдиглицерид; ДГДГ – дигалактозилдиглицерид; СХДГ – сульфохиновозилдиглицерид; PDH – пируватдегидрогеназа; ACSBP – ацил-СоА-связывающий белок; FAS – синтаза жирных кислот; CDP-Cho/CDP-Etn – цитидиндифосфат холин/ цитидиндифосфат этаноламин.

Благодаря разнообразию химической структуры, функции липидов в растительной клетке также весьма разнообразны. Запасные липиды выступают источником энергии клетки; мембранные липиды образуют непроницаемые барьеры вокруг клеток и клеточных компартментов – клеточные стенки и

мембраны; некоторые липиды выступают в роли сигнальных молекул (Нельсон и Кокс, 2011).

Биосинтез липидов начинается с фиксации углерода за счет гликолиза (рис. 1). Результатом гликолиза являются два основных субстрата для дальнейшего биосинтеза липидов: глицерол-3-фосфат и ацетил-КоА (Li-Beisson et al., 2016). Ацетил-КоА является основным источником биосинтеза жирных кислот и стероидов (Li-Beisson et al., 2016; Dupont et al., 2012; Валитова и др., 2016). Глицерол-3-фосфат является основным субстратом для биосинтеза глицеролипидов (Li-Beisson et al., 2016).

2. Значение и роль липидов в процессах роста и развития растений

Имеющиеся в литературе сведения о функциях липидов у растений показывают, что при изучении морфогенеза и эмбриогенеза у растений влияние липидных компонентов на процессы роста и развития *in vivo* и *in vitro* может представлять большой интерес.

Установлено, что липиды играют важную роль в процессах роста и развития растений *in vivo*. Например, ФИ и их производные влияют на установление клеточной полярности и формирование клеточных стенок, что способствует росту растений (Tejos et al., 2014; Krishnamoorthy et al., 2014; Neilmann, 2016). Кроме того, ФИ и их фосфорилированные производные играют важную роль в передаче сигналов (посредством регуляции ионных каналов и насосов) и переносе везикул (Barbaglia and Hoffmann-Benning, 2016). Такие ЖК, как ЖКОДЦ способствуют регуляции размеров клеток, а также их делению, дифференциации (Жуков, 2018) и морфогенезу (Zheng et al., 2005; Жуков, 2018), участвуют в удлинении клеток (Zheng et al., 2005; Mabuchi et al., 2018) и цитокенезе (Bach et al., 2011). Стероиды оказывают влияние на удлинение клеток (Deng et al., 2016), их пролиферацию (Jang et al., 2000; Qian et al., 2013).

Показано, что общее содержание липидов увеличивается в течение первых недель созревания соматического зародыша (Grigova et al., 2007; Svobodova et al., 1999). Это, с точки зрения авторов, указывает на важную роль липидов в процессах эмбриогенеза. На примере каллусов *Acca sellowiana* (O. Berg.) (Pescador et al., 2011) показано, что в процессе созревания зародышей происходит увеличение содержания липидов, в особенности при переходе от торпедообразной к семядольной стадии; установлены различия в накоплении и синтезе ЖК на разных стадиях развития зародышей. Авторами этой же работы выявлены различия ЖК состава эмбриогенных и неэмбриогенных каллусов. В работах других авторов показано, что липиды принимают непосредственное участие в процессах эмбриогенеза, например ТГ (Attree et al., 1992) и стерины (Jang et al., 2000; Diener et al., 2000). При изучении процессов соматического эмбриогенеза (СЭ) у льна обнаружено, что эмбриогенные каллусы имели более низкое содержание липидов, по сравнению с неэмбриогенными (Cunha and Ferreira, 1997). По мнению авторов это объясняется созреванием соматических зародышей, поскольку в процессе дальнейшего культивирования эмбриогенных каллусов, с формированием на них побегов, содержание липидов увеличивалось (Cunha and Ferreira, 1997). Использование каллусов, как модели для изучения влияния липидов на дифференциацию и органогенез показали, что нарушение синтеза различных липидов вызывает дефекты клеточного деления, дифференциации и органогенеза (Msanne et al., 2015; Tejos et al., 2014; Qian et al., 2013). Перекисное окисление липидов, как показано в работах (Benson and Roubelakis-Angelakis, 1992; Gupta and Sahoo, 2015; Kaewubon et al., 2014) может замедлять морфогенез. При проведении гистологического анализа каллусов *Azadirachta excelsa* (Jay) Jacobs. с помощью микроскопа были выявлены клетки с отложениями липидов и крахмала и было замечено, что именно в областях с обилием липидов и крахмала позднее происходила дифференцировка (Giagnacovo et al., 2001).

Таким образом, для изучения участия липидных компонентов в процессах морфогенеза, в частности эмбриогенеза, использование культуры тканей *in vitro* является отличным инструментом. В последующих главах более подробно рассмотрены различные типы липидов в контексте их роли в процессах морфогенеза, в частности эмбриогенеза.

2.1. Нейтральные липиды

Известно, что нейтральные липиды (НЛ), в том числе ЖК, играют важную роль у растений как *in vivo*, так и *in vitro* в качестве энергетического и субстратного резерва (Feirer et al., 1989; Chapman et al., 2012; Jacomini et al., 2015). НЛ, в частности, триглицериды (ТГ), эфиры стеринов (ЭС) и воска, не имеют, по определению, заряженных групп и поэтому не могут интегрироваться в бислойные мембраны в значительных количествах. Поэтому ТГ и ЭС обычно служат депо для хранения стеринов, ЖК и диглицеридов (ДГ). Наиболее доступными запасными источниками энергии являются глицериды, обеспечивающие обменные процессы в растительных организмах. Количество ТГ и их ЖК-состав играют важную роль в жизнедеятельности растительного организма в целом (Chapman et al., 2012; Cunha and Fernandes-Ferreira, 2003). В то же время, физиологическая роль глицеридов не ограничивается функцией резерва энергии. Запасы этих веществ могут служить источником структурных элементов глицерина, ЖК, являющихся исходными продуктами при биосинтезе различных соединений (Manoharan et al., 1999; Graham, 2008; Алаудинова и Миронов, 2009; Suzuki et al., 2011; Fan et al., 2014).

Воска у некоторых растений и у бактерий используются в качестве энергетического ресурса, у большинства растений воска обеспечивают гидрофобное покрытие тканей для минимизации обезвоживания поверхностей. ЖК, находящиеся в составе НЛ, могут быть использованы для производства энергии путем β -окисления или служить субстратами для реакций ацилирования, например, для синтеза ФЛ. Состав липидов и ЖК как основных структурных компонентов растительных мембран так же изменяется в

зависимости от физиологического состояния клеток и тканей (Лось, 2001; Okazaki and Saito, 2014). Степень этого варьирования определяется генотипом и зависит от факторов среды (Лось, 2001). ДГ служат субстратом для синтеза ФЭ и ФХ по пути Кеннеди (Gibellini and Smith, 2010), а также действуют как вторичные мессенджеры трансдукции сигнала при связывании с протеинкиназами (Athenstaedt and Daum, 2006; Almena and Merida, 2011). Изучение качественного состава НЛ, в связи с их участием в клеточном росте и развитии *in vitro* представляет большой интерес, в том числе и потому, что они играют важную роль в процессах развития и последующего прорастания эмбрионов (Graham, 2008; Cheng et al., 2016).

2.1.1. Жирные кислоты

Жирные кислоты – это высшие карбоновые кислоты. Они различаются по степени, характеру и длине разветвления углеродной цепи, а также по числу двойных связей и других функциональных групп, входящих в их состав (Kates, 1986).

По длине углеродной цепи ЖК подразделяют на три типа (Dolch and Marechal, 2015):

- 1) Среднецепочечные ЖК, с числом углеродных атомов ≤ 14 ;
- 2) Длинноцепочечные ЖК, с числом углеродных атомов 16-18;
- 3) ЖК с очень длинной цепью (ЖКОДЦ) или сверхдлинноцепочечные,

в которых число атомов углерода выше или равно 20.

По степени насыщенности ЖК подразделяются на три типа (Kates, 1986; Васьяковский, 1997):

- 1) Насыщенные ЖК (пальмитиновая C16:0 и др.);
- 2) Моноеновые ЖК (олеиновая C18:1 и др.);
- 3) Полиеновые ЖК (линолевая C18:2 и др.).

Жирные кислоты у растений, как и у всех других организмов, являются основными структурными компонентами мембранных фосфолипидов (ФЛ) и гликолипидов (ГЛ), а также входят в состав запасных липидов, в особенности

ТГ (Kates, 1986; Cheng et al., 2016). Кроме мембранных липидов ЖК используются в качестве строительных блоков также для восков и сфинголипидов. Жирными кислотами этерифицируется глицерол-3-фосфат в положениях sn-1 и sn-2, образуя ФК, а ФК и ДГ являются предшественниками мембранных (ФЛ и ГЛ) и запасных глицеролипидов (ТГ) (Dolch and Marechal, 2015).

ЖК играют важную роль в процессах роста и развития растений, выполняя среди прочего, сигнальные функции. Например, реакцией растений на старение, низкие температуры и фосфатное голодание является перестройка липидов, в первую очередь, входящих в их состав ЖК, для защиты растения от стрессового воздействия (Нохсоров и др., 2015; Li et al., 2016; Кривова и др., 2021). Таким образом, метаболизм ЖК имеет значение на протяжении всего жизненного цикла растений, в том числе при адаптации к абиотическим и биотическим стрессорам (Li et al., 2016).

У растений *de novo* синтез ЖК происходит в пластидах, где удлиняются ацильные цепи, прикрепленные к ацил-переносящему белку (АПБ), которые затем становятся доступными для сборки липидов в основном в форме С16:0 и С18:1-АПБ. Фракция длинноцепочечных жирных кислот частично интегрируется в липиды внутри пластид («прокариотический» путь), но большинство ЖК экспортируется в ЭР для дальнейшего удлинения, редактирования ацила и липидной сборки («эукариотический» путь) (Ohlrogge and Browse, 1995; Harwood, 1996; Thelen and Ohlrogge, 2002; Li-Beisson et al., 2013; Li et al., 2016; Lim et al., 2017). Образование ЖК – многоступенчатый процесс реакций конденсации и восстановления (рис. 2). Началом синтеза ЖК служит реакция (рис. 2, номер 1) карбоксилирования ацетил-КоА с образованием малонил-КоА посредством ацетил-КоА-карбоксилазы. Ацетил-КоА также выступает в качестве праймера для начальной реакции конденсации (рис. 2, номер 3). Далее образуется малонил-АПБ из малонил-КоА (рис. 2, номер 2), малонил-АПБ в свою очередь является донором углерода для всех

последующих реакций удлинения (рис. 2, номер 3). После каждой конденсации продукт 3-кетоацил-АПБ восстанавливается с помощью 3-кетоацил-АПБ-редуктазы (рис. 2, номер 4), дегидратируется с помощью 3-гидроксиацил-АПБ-дегидразы (рис. 2, номер 5) и снова восстанавливается с помощью и еноил-АПБ-редуктазы (рис. 2, номер 6) (Ohlrogge and Browse, 1995). Полученный в результате 16:0-АСР гидролизуется тиоэстеразой с высвобождением пальмитиновой кислоты (Li-Beisson et al., 2013).

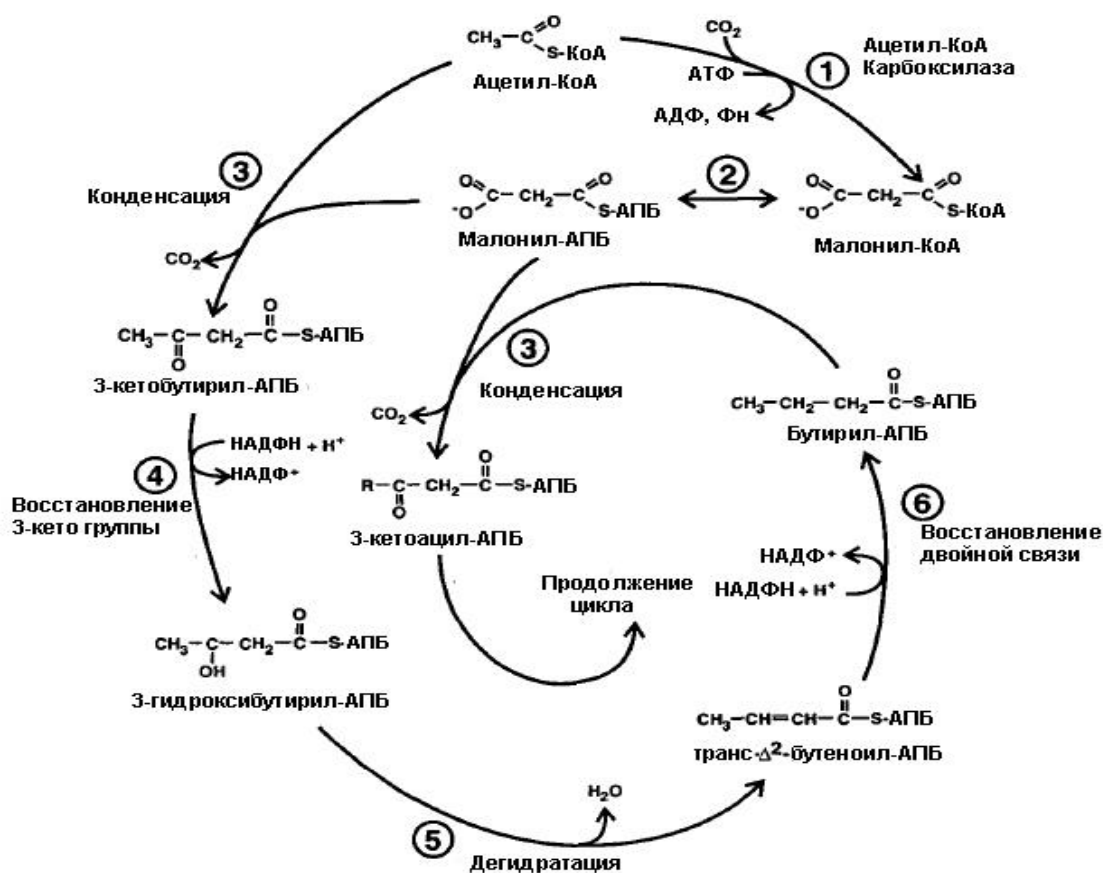


Рис. 2. Биосинтез ЖК (Ohlrogge and Browse, 1995)

Далее ЖК подвергаются десатурации, для получения ненасыщенных кислот, и элонгации, для формирования ЖК с более длинной цепью. Кроме того, ЖК могут быть модифицированы и эпоксигеназами, ацетиленазами, гидроксилазами и оксидазами (рис. 3). В результате синтезируются различные ЖК, такие как ненасыщенные моноеновые, полиеновые, ЖКОДЦ и гидрокси-ЖК, которые участвуют в росте растений, а также необычные ЖК, которые по

своей структуре отличаются от остальных и имеют специфические функции в защите растений (Lim et al., 2017).

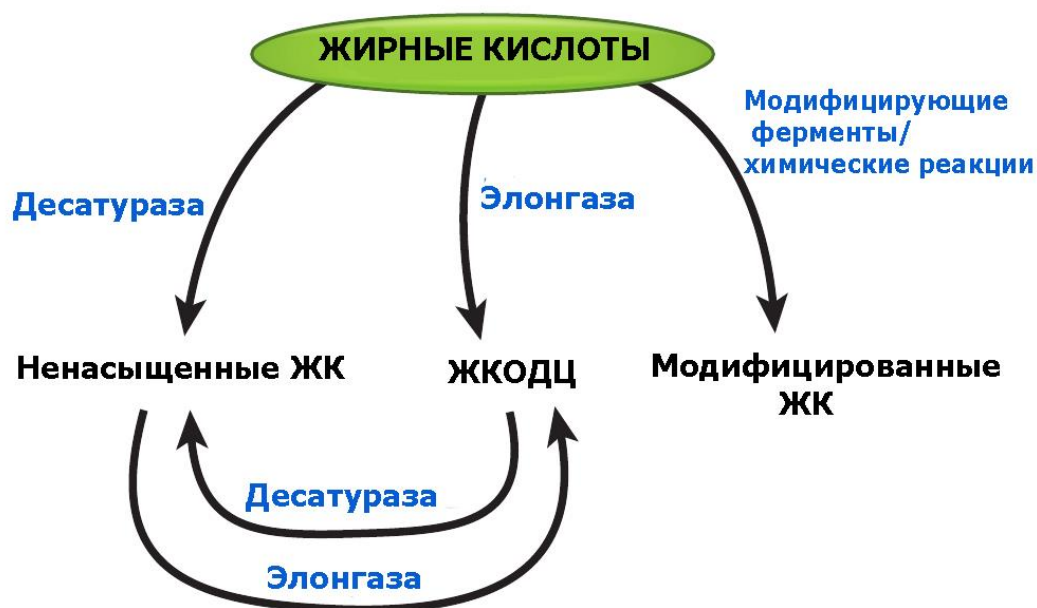


Рис. 3. Пути модификации ЖК (Lim et al., 2017)

В настоящее время появилось много исследований, показывающих участие ЖКОДЦ в процессах роста и развития растений. Например, ФЛ и сфинголипиды вместе с входящими в их состав ЖКОДЦ участвуют в создании структуры мембран и их динамике, способствуя регуляции размеров клеток, а также их делению и дифференциации. Кроме того, ЖКОДЦ служат сигнальными молекулами в составе ФЛ и сфинголипидов (Жуков, 2018). Синтез ЖКОДЦ играет важную роль в направлении и степени растяжения клеток растений в ходе морфогенеза (Zheng et al., 2005; Жуков, 2018). Мутанты *cer10 Arabidopsis thaliana* с нарушением работы гена, кодирующим транс-2,3-эноил-КоА-редуктазу, необходимую для синтеза ЖКОДЦ, при эмбриогенезе имели серьезные морфологические дефекты и уменьшенный размер надземных органов. Детальное исследование клеток эпидермального покрытия в развивающихся листьях показало, что клетки *cer10* были примерно в три раза меньше, по сравнению с диким типом, что коррелировало с трехкратным уменьшением размера листьев (Zheng et al., 2005). Клеточный анализ этого

мутанта *cer10* показал, что в основе морфологических дефектов лежит нарушение эндоцитозного мембранного переноса и растяжения клеток, кроме того, повреждение этого гена, кодирующего транс-2,3-эноил-КоА-редуктазу, оказывает серьезное воздействие на рост и морфогенез побега (Zheng et al., 2005; Bach and Faure, 2010; Жуков, 2018). При исследовании развития корней *A. thaliana* показано, что ЖКОДЦ на поверхности клеток участвует в удлинении или регуляции клеток корня (Mabuchi et al., 2018). В работе (Yamauchi et al., 2015) показано, что обработка корней риса насыщенной ЖК (C18:0) или насыщенных ЖКОДЦ (C20:0, C22:0, C24:0 или C26:0) вызывала образование аэренхимы (воздухоносной ткани), при этом эффекты кислот C24:0 и C26:0 были самыми сильными. На примере *A. thaliana* было показано, что ЖКОДЦ принимают участие в цитокенезе (Bach et al., 2011). Кроме того, установлено, что синтез ЖКОДЦ в эпидермисе *A. thaliana* необходим для ограничения биосинтеза цитокининов в сосудистой сети и предотвращения чрезмерной пролиферации клеток, что способствует правильному развитию (Nobusawa et al., 2013). Для *A. thaliana* показано также, что ЖКОДЦ непосредственно участвуют в распределении ауксина во время бокового развития корня (Roudier et al., 2010).

В отношении ЖК состава клеток при культивировании растительной ткани *in vitro*, исследование их метаболизма при соматическом эмбриогенезе каллусов хлопка показало, что экспрессия генов, связанных с биосинтезом жирных кислот, включая *FabD*, *FabH*, *accC* и *FatB*, была заметно выше в эмбриогенных каллусах по сравнению с неэмбриогенными. Авторы показали, что ЖК накапливались во время развития эмбриогенных каллусов, аналогично тому, как это происходит при инициализации проростания семян растений (Cheng et al., 2016). В работе (Mei et al., 2015) отмечено, что для активно растущей суспензионной культуры клеток *A. thaliana* характерны более высокие значения содержания C18:1 кислоты для основных ФЛ (ФХ и ФЭ) по сравнению с медленно растущей, в которой накапливались C18:2 и C18:3

кислоты. Для эмбриогенных линий *Picea abies* (L.) Karst показано высокое относительное содержание линолевой кислоты (порядка 40% от суммы кислот) и олеиновой кислоты 18:1 (порядка 30% от суммы кислот) (Hudec et al., 2016). Авторами работы (Макаренко и др., 2014) проведен сравнительный анализ ЖК-состава суммарных липидов каллусов двух видов лиственницы – *L. sibirica* и *L. gmelinii* и установлена высокая степень ненасыщенности ЖК, а также наличие кислот Δ-5серии, характерных для хвойных растений. В работе (Finkelstein and Somerville, 1989) показано, что при развитии эмбриона *Brassica napus* идет повышенное накопление жирных кислот, в том числе длинноцепочечных.

Анализ имеющейся к настоящему времени литературы показывает, что ЖК играют важную роль в процессах роста и развития растений *in vivo* и *in vitro*. Сведения об их составе и содержании может дать полезную информацию об особенностях липидного обмена в культуре ткани, в том числе на ранней стадии эмбриогенеза.

2.1.2. Глицериды

Глицериды в растительных организмах присутствуют в форме моно- (МГ), ди- (ДГ) и триглицеридов (ТГ). МГ в растениях содержатся в небольших количествах (Prabha et al., 1988; Destailats et al., 2010; Алаудинова и др., 2010). Содержание ДГ в растительных клетках также низкое, но его присутствие необходимо для процессов развития и реакции клеток и тканей растения на воздействие окружающей среды (Dong et al., 2012). Показано, что ДГ могут накапливаться в апикальном домене плазматической мембраны и, вероятно, могут действовать как сигнальная молекула в регуляции роста кончика пыльцевой трубки табака (Helling et al., 2006). Известно также, что 1,3-ДГ накапливаются в клетке, выполняя запасующую функцию, в то время как 1,2-ДГ действуют как вторичные мессенджеры в клеточных процессах, являясь промежуточными звеньями в биосинтезе и катаболизме ТГ, в биосинтезе некоторых ФЛ – ФХ, ФЭ, ФС (Gibellini and Smith, 2010; Moessinger et al., 2014). Кроме того, показано, что ДГ способствуют формированию боковых корней

риса (Yuan et al., 2019). Метаболизм ДГ в растениях представляет особый интерес, поскольку в растениях не выявлены какие-либо ДГ-чувствительные белки, хотя в них присутствует большое разнообразие изоформ диацилглицеролкиназ. Предполагается, что основная роль этого семейства ферментов в растениях заключается в метаболизме ДГ в ФК. Известно, что ФК, синтезируемая с помощью диацилглицеролкиназ - или фосфолипаза D – зависимых механизмов, имеет решающее значение в реакции растений на многие сигналы окружающей среды (Almena and Merida, 2011).

ТГ являются основными липидными компонентами в семенах масличных культур. Предполагается, что биосинтез ТГ в семенах происходит в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), и ТГ накапливаются в масляных тельцах, образующихся в результате отрыва от внешней мембраны ЭР (Shimada et al., 2018). В наземных растениях ТГ, хранящиеся в масляных тельцах, служат источником энергии для прорастания и раннего роста проростков. ТГ служат также источником ацильных цепей для биосинтеза мембран и транспорта липидов (Fan et al., 2013; Xu et al., 2018; Shimada et al., 2018). Однако ТГ могут содержаться и в других частях растений, например, в листьях (Fan et al., 2013; Kim et al., 2015; Tjellstrom et al., 2015).

Для *A. thaliana* показано, что *sn2*-МГ образуется при помощи ферментов глицерол-3-фосфат ацилтрансфераз (GPAT от англ. glycerol-3-phosphate acyltransferases) GPAT4 и GPAT6, при этом α,ω -дикарбоновая и ω -гидроксиацил-КоА используются в качестве доноров ацила (Yang et al. 2010; Petrie et al. 2012). Субстратом как для ДГ, так и для цитидиндифосфата-ДГ (ЦДФ-ДГ) является ФК (рис. 1) (Li-Beisson et al., 2016).

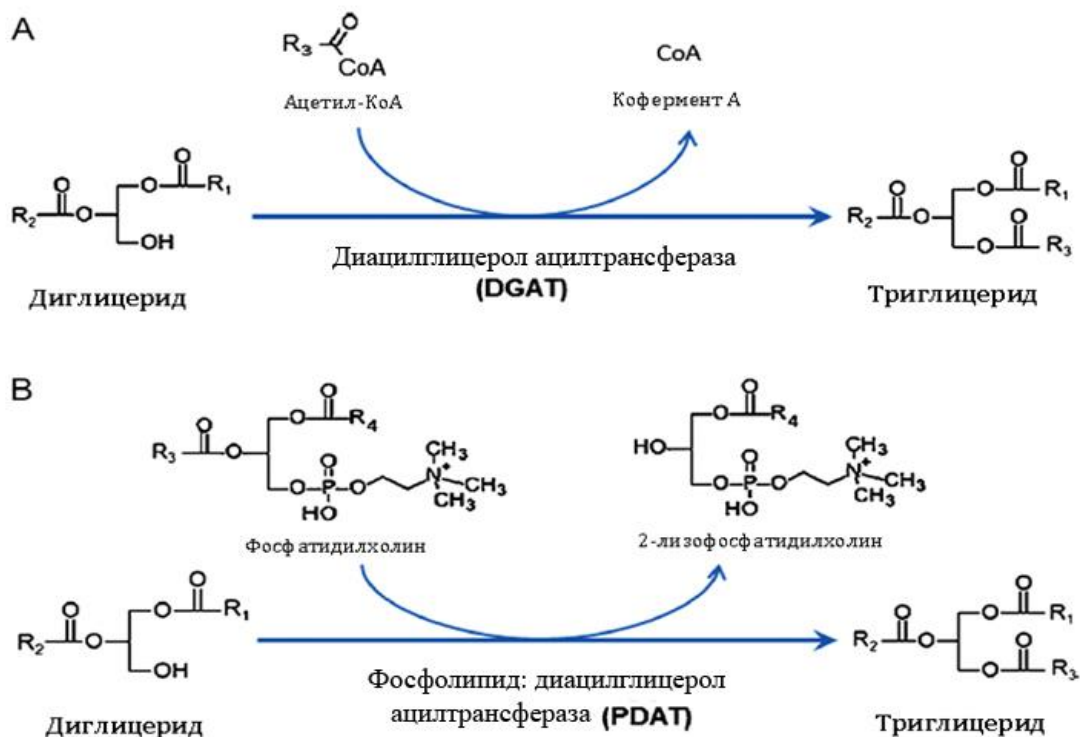


Рис. 4. Реакции биосинтеза ТГ (Chen and Smith, 2012).

ТГ могут быть синтезированы ферментами пути Кеннеди посредством последовательного ацилирования глицеринового остова с помощью специфических ацилтрансфераз, переносящих ацильные цепи из ацил-КоА (Vanas et al., 2013). У растений ТГ синтезируется ацилированием ДГ посредством диацилглицерол-ацилтрансферазы (DGAT от англ. *diacylglycerol acyltransferase*) (рис. 4, А) или фосфолипид:диацилглицерол-ацилтрансферазы (PDAT от англ. *phospholipid:diacylglycerol acyltransferase*) (рис. 4, В) с использованием ацил-КоА (для DGAT) или фосфолипида (ФХ) (для PDAT) в качестве донора ацильной группы (Routaboul et al., 1999; Chen and Smith, 2012; Tjellstrom et al., 2015; Woodfield et al., 2018). Было показано, что PDAT играет основную роль в синтезе ТГ во время фаз активного роста и деления клеток зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* (Yoon et al., 2012). Авторы работы (Fan et al., 2013) показали, что PDAT1 играет важную роль в синтезе ТГ в листьях *A. thaliana*. Сверхэкспрессия PDAT1, увеличивала содержание ТГ в листьях, тогда как нарушение PDAT1 значительно снижало уровни ТГ, причем

наиболее выраженное снижение происходило в быстрорастущих листьях в отличие от стареющих. Авторы предположили, что такие результаты указывают на эволюционно детерминированное сохранение функций PDAT, связанных с быстрым ростом клеток и пролиферацией мембран у растений.

В отношении растений *in vitro* отмечено, что для каллусов характерны высокие значения содержания ТГ и их накопление в процессе культивирования тканей. Например, ТГ составляет 32% от общих липидов каллусов полученных из листьев *Elaeis guineensis* Jacq cv. Tenera (Zou et al., 2019), а для каллусов масляничной пальмы (*E. guineensis* Jacq.) содержание ТГ составляет 15% от общих липидов и 11% для каллусов плодов оливы (*Olea europaea* L.) (Ramli et al., 2002). Содержание ДГ для каллусов этих видов составляет 7,5% и 9,8%, соответственно (Ramli et al., 2002). Для эмбриогенных каллусов *Picea glauca* отмечено увеличение содержания ТГ в 7 раз в процессе культивирования (Attree et al., 1992). Авторы работы (Attree et al., 1992) утверждают, что накопление ТГ играет существенную роль для развития каллусной культуры. В работе (Brownfield et al., 2007), посвященной изучению липидного состава эмбриогенных каллусов *Pinus taeda*, также сообщается об увеличении содержания ТГ примерно в 10 раз в процессе культивирования в течение 13 недель каллусной культуры клеток.

Таким образом, глицериды, в особенности ТГ, играют особую роль в жизнедеятельности растений, являясь богатым источником углерода при их развитии (Manoharan et al., 1999).

2.1.3. Стерины

Свободные стерины являются неотъемлемыми компонентами мембранного липидного бислоя, где они играют важную роль в регуляции текучести мембраны и ее проницаемости (Kreis and Muller-Uri, 2010).

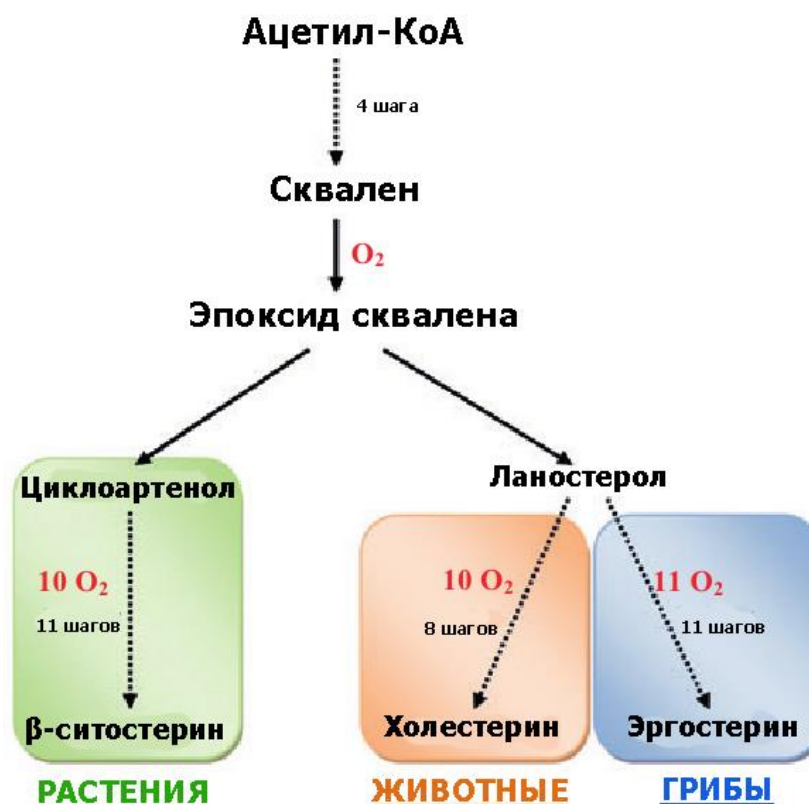


Рис. 5. Упрощенная схема биосинтеза стерина (Dupont et al, 2012).

Биосинтез стерина у растений представляет собой сложный многоступенчатый процесс (рис. 5), который можно условно разделить на два этапа – образование сквалена и циклизация сквалена до циклоартенола (Dupont et al, 2012; Валитова и др. 2016), из которого далее образуются другие растительные стерины.

Молекула стерина представляет собой свободную 3β -гидроксильную группу, плоский тетрациклический скелет и алифатическую боковую цепь с 8-10 атомами углерода. Стерины включаются в мембраны с помощью 3β -ОН группы, обращенной к полярной части мембраны и боковой цепи, простирающейся в гидрофобную часть, взаимодействуя тем самым с жирными кислотами фосфолипидов и белками. Они модулируют физическое состояние бислоев, ограничивая движение жирных ацильных цепей (эффект упорядочения), которые при физиологических температурах находятся в жидкокристаллической фазе. β -ситостерин и кампестерин являются наиболее

эффективными стеринами для ограничения подвижности фосфолипидных жирных ацильных цепей. Стигмастерин же с его транс-ориентированной двойной связью у C22 в боковой цепи оказывает обратный эффект на упорядоченность мембранного бислоя. Кроме того, β -ситостерин и кампестерин снижают проницаемость мембран, в отличие от стигмастерина (Hartmann, 1998; Валитова и др., 2016; Niu et al., 2019). Показано, что стеринны в составе рафтов участвуют во внутриклеточных сигнальных путях (Miras-Moreno et al., 2016).

При исследовании влияния стериннов на удлинение клеток в волокне хлопка *Gossypium hirsutum* L., в работе (Deng et al., 2016) показано, что β -ситостерин был доминирующим стеринном в волокнах и его содержание в 5-7 раз превышало содержание кампестерина. Кроме того, во время процесса развития волокон содержание β -ситостерина быстро увеличивалось после цветения. Также в волокнах хлопка был обнаружен и стигмастерин, но в очень низких концентрациях. Таким образом, было показано, что β -ситостерин является важным участником процесса элонгации хлопковых волокон, а нарушение биосинтеза стериннов подавляет удлинение волокна как *in vitro*, так и *in vivo*, что, по мнению авторов, свидетельствует о важной роли β -ситостерина в элонгации клеток. При нарушении синтеза изопреноидов, предшественников в синтезе стериннов, происходит изменение стеринного профиля, включая истощение объемных мембранных стериннов, в том числе снижение содержания β -ситостерина, кампестерина и стигмастерина. Поскольку мутанты с нарушением синтеза изопреноидов дефектны по развитию (наблюдался хлороз и изменение хлоропластов), авторы делают вывод о том, что уровни растительных стериннов должны строго контролироваться и любые изменения в составе стериннов быстро обнаруживаются клетками растений и воспринимаются ими как стрессовый сигнал (Manzano et al., 2016).

Для мутанта по гену FACKEL (FK) *A. thaliana fk-J3158* с кластерами мелких клеток и устьиц в эпидермисе листьев, также отмечено снижение содержания β -ситостерина и кампестерина по сравнению с диким типом.

Авторы полагают, что путь биосинтеза стероидов в этом мутанте блокирован, что позволило им предположить, необходимость стероидов для пролиферации клеток (Qian et al., 2013). Подобные результаты получены для другого мутанта по гену FACKEL – *fk-J79*. Было нарушено нормальное деление клеток и характер расширения в апикально-базальной и латеральной осях во время эмбриогенеза, что вызывало аномальную морфологию семядолей, гипокотилия, корешка (Jang et al., 2000). Биохимический анализ показал, что мутация *fk-J79* приводит к недостаточной активности С-14 стеролредуктазы и, как следствие, измененному составу стероидов. Авторы заключили, что измененный состав и содержание стероидов у мутантов *A. thaliana* указывает на их роль в регуляции и передаче сигналов при делении клеток в эмбриональном и пост-эмбриональном развитии (Jang et al., 2000). Также показано, что снижение содержания β-ситостерина и увеличение содержания холестерина влияют на эмбриогенез (Diener et al., 2000). Зародыши семян мутантов *A. thaliana* с нарушением работы стеролметилтрансферазы (SMT1) были дефектными – имели более короткие черешки и более мелкие округлые листья, что делало их розетки более компактными, стебли были короче, чем у дикого типа, их стручки отставали в росте. Такие мутанты испытывали трудности в ходе эмбриогенеза при формировании грубых структур, например, выступы на стадии сердца или стадии торпеды, дающие начало семядолям (Diener et al., 2000). Подобные результаты получены и для других мутантов с нарушением работы стеролметилтрансферазы для растений *A. thaliana*, которые имели замедленный рост и размеры по сравнению с диким типом как на стадии проростка, так и на стадии розетки. Кроме того, у них обнаружены дефекты удлинения на клеточном уровне (сосудистые клетки) и/или на уровне органов (стебель). Для таких мутантов было отмечено снижение содержания β-ситостерина в 2,3-3 раза и повышение примерно в 2 раза содержания холестерина, по сравнению с диким типом (Carland et al., 2002).

Таким образом, показано, что доминирующий в растениях β -ситостерин и другие стеринны играют ключевую роль в клеточной дифференциации и пролиферации. С другой стороны, β -ситостерин и кампестерин являются предшественниками биосинтеза брассиностероидов (БР), стимулирующих рост стероидных гормонов, которые широко распространены в растительном мире (Kreis and Muller-Uri, 2010; Bajguz et al., 2020). Они регулируют множество физиологических реакций, необходимых как для вегетативного, так и для репродуктивного развития (Clouse, 2011). Эти гормоны принимают участие в удлинении клетки и играют важную роль в клеточном делении и дифференциации (Clouse, 2011; Tian et al., 2018). БР также участвуют в росте растений и их реакции на стресс (Nolan et al., 2017). Например, листья мутантов *cpd A. thaliana* с дефектом содержания БР, по сравнению с диким типом, показали уменьшение длины и сложности рисунка жилкования. Авторы сделали вывод, что БР играют важную роль в росте листьев посредством регуляции клеточного растяжения, пролиферации и дифференциации, влияя, таким образом, на конечный размер листа (Zhiponova et al., 2013).

Влияние на процессы роста и развития оказывает и экзогенное внесение БР. Например, каллусы, полученные из молодых листьев *Populus euphratica* Oliv. выращивали на средах с добавлением и без добавления брассинолида (БЛ). Показано, что через 50 дней 11–59% каллусов, растущих на среде с БЛ, регенерировали случайные почки/побеги, в то время, как ни один из каллусов на среде без БЛ не давал случайных почек/побегов. Через 70 дней 20–73% каллусов в среде с БЛ давали случайные почки/побеги, и только 16% каллусов на среде без БЛ дифференцировались в случайные почки/побеги. Авторами отмечено, что скорость регенерации повышалась с увеличением концентрации БЛ в диапазоне от 10^{-4} до 10^{-2} мг/л (Cai et al., 2015). БЛ может способствовать формированию эмбриональной ткани у хвойных. Например, каллусы, полученные из семян ели обыкновенной (*P. taeda* L.) выращивали на среде с добавлением БЛ и без него. Было показано, что рост каллуса на среде,

содержащей 0,1 мМ БЛ, был примерно на 10% активнее, чем на среде без БЛ. Однако добавление 1,0 мМ брассинолида было избыточно, так как рост в этом варианте опыта не отличался от контроля (Pullman et al., 2003). Авторы полагают, что использование БЛ открывает широкие перспективы для оптимизации технологии соматического эмбриогенеза у хвойных растений (Pullman et al., 2003).

При изучении развития семян *Pisum sativum* на нескольких стадиях, охватывающих эмбриогенез, авторы работы (Schrick et al., 2011) определили самые высокие концентрации стероидов на стадии молодых семян. Другими словами, было показано, что стероиды необходимы для активно делящихся клеток при эмбриональном развитии (Schrick et al., 2011). Авторами работы (Cunha and Ferreira, 1997) показано, что содержание стероидов в каллусной культуре льна было различным в зависимости от степени дифференциации клеток. В неморфогенных каллусах содержание стероидов было 1,32 мг/г сухого веса, в морфогенных каллусах – 1,48 мг/г сухого веса и в эмбриогенных каллусах – 1,45 мг/г сухого веса. У соматических зародышей содержание стероидов было самым высоким и составляло 2,13 мг/г сухого веса.

Таким образом, неоднократно подтверждено, что стероиды играют заметную роль в процессе роста и развития растений и в культуре, и в природных условиях. Следовательно, сравнительное изучение их состава и содержания у растительных тканей с разной эмбриогенностью представляет бесспорный интерес для выявления механизмов эмбриогенеза у растений.

2.2. Полярные липиды

Как уже сказано ранее, основным субстратом для полярных липидов (ФЛ и ГЛ) является глицерол-3-фосфат (рис. 6), из которого образуется ФК, под действием ЛФК-ацилтрансферазы. Далее под действием ЦДС (цитидиндифосфат-ДГ синтазы) и ФКФ (ФК-фосфатазы) образуются ЦДФ-ДГ и ДГ, соответственно (Li-Beisson et al., 2016; Nakamura, 2017). ДГ и ЦДФ-ДГ, в

свою очередь, являются субстратами для ФЛ и ГЛ (рис. 6). С другой стороны известно, что некоторые ДГ-киназы продуцируют ФК (Dubots et al., 2012).

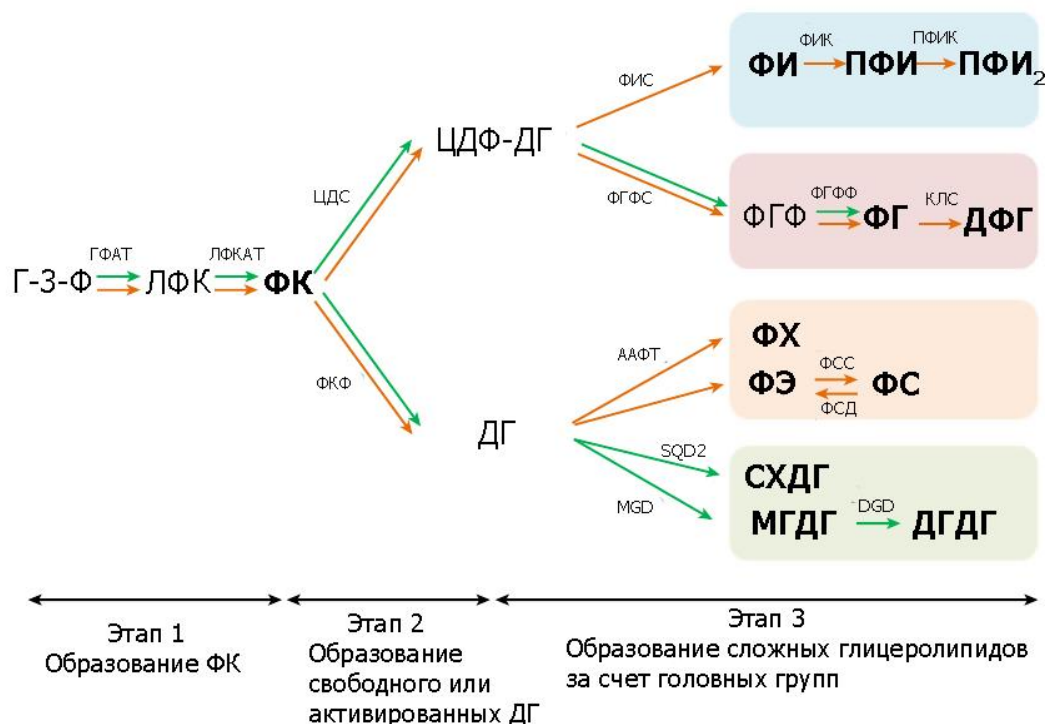


Рис. 6. Упрощенная схема биосинтеза полярных липидов (Nakamura, 2017).

Примечания. Г-3-Ф – глицерол-3-фосфат; ЛФК – лизофосфатидная кислота; ФК – фосфатидная кислота; ЦДФ-ДГ – цитидиндифосфат-диглицерид; ДГ – диглицериды; ФИ – фосфатидилинозиты; ПФИ – полифосфатидилинозиты; ПФИ – полифосфатидилинозитбифосфаты; ФГФ – фосфатидилглицеринфосфат; ФГ – фосфатидилглицерины; ДФГ – дифосфатидилглицерин (кардиолипин); ФХ – фосфатидилхолин; ФЭ – фосфатидилэтаноламин; ФС – фосфатидиосерин; МГДГ – моногалактозилдиглицерид; ДГДГ – дигалактозилдиглицерид; СХДГ – сульфохиновозилдиглицерид; ГФАТ – Г-3-Ф-ацилтрансфераза; ЛФКАТ – ЛФК-ацилтрансфераза; ЦДС – ЦДФ-ДГ-синтаза; ФКФ – ФК-фосфатаза; ФИС – ФИ-синтаза; ФГФС – ФГФ-синтаза; ФИК – ФИ-киназа; ПФИК – ПФИ-киназа; ФГФФ – ФГФ-фосфатаза; КЛС – кардиолин-синтаза; ФСС – ФС-синтаза; ФСД – ФС-декарбоксилаза; ААФТ – аминокгольаминофосфотрансфераза; MGD – МГДГ-синтаза; SGD2 – СХДГ-синтаза; DGD – ДГДГ-синтаза.

2.2.1. Фосфолипиды

Фосфолипиды (ФЛ) являются важными составляющими всех клеточных мембран, определяя их строение и функциональность. Основным механизмом формирования мембраны является образование двух фосфолипидных слоев. Двухслойные мембраны обеспечивают устойчивую форму клетки и клеточных органелл, сохранение физико-химических свойств клетки, помогая тем самым поддерживать ее внутреннюю среду в состоянии необходимом для нормального функционирования. Даже незначительные изменения в составе мембранных ФЛ могут привести к резким изменениям в структуре мембран, вызывая серьезные нарушения в функциях и жизнеспособности клеток (Чиркова, 1997). В тоже время следует подчеркнуть, что ФЛ являются не только структурными компонентами клеточных мембран, но и важными сигнальными молекулами, которые регулируют, наряду с другими соединениями рост и развитие растений, а также клеточный ответ на изменения окружающей среды (Чиркова, 1997; Джамеев, 2014; Nakamura, 2017).

ФХ и ФЭ являются двумя наиболее распространенными видами фосфолипидов в эукариотических клетках. ФХ является основным источником ДГ, ФК, лизофосфатидной кислоты и арахидоновой кислоты, которые могут далее метаболизироваться в другие сигнальные молекулы (Gibellini and Smith, 2010). Достаточно высокая концентрация ФХ позволяет клеткам контролировать избирательную проницаемость мембран для ионов и воды (Pukacki, 2004). ФЭ играет основную роль в мембранной архитектуре: он имеет общую коническую форму с небольшой полярной головной группой относительно поперечного сечения гидрофобных хвостов. По этой причине он способен образовывать обращенные неламеллярные структуры, такие как, например, гексагональная. Эта способность ФЭ возрастает с увеличением длины ацильной цепи и степени ненасыщенности жирных кислот, что необходимо для формирования промежуточных структур в процессах слияния и деления мембран (Gibellini and Smith, 2010). ФЭ, по-видимому, особенно

важен для разборки актиновой частицы на конечной стадии цитокинеза в определенных клетках, поэтому дефицитные по ФЭ клетки не способны завершить деление (Gibellini and Smith, 2010). Таким образом, ФЭ и ФХ являются особенно важными для роста и развития растительного организма компонентами мембран. Другой тип ФЛ – ФИ, играют важную роль в разнообразных клеточных процессах у растений. Например, в работе посвященной вегетативному развитию *A. thaliana* был изучен фосфолипидный состав двойного мутанта по генам *cds1cds2*, участвующим в синтезе ФЛ и дикого типа *A. thaliana* (Zhou et al., 2013). Было показано, что содержание ФИ меньше в 2 раза (6% от суммы ФЛ) по сравнению с диким типом, а содержание ФК больше в 6 раз для мутанта (6% от суммы ФЛ). Поскольку двойной мутант не давал настоящие листья и погибал через 2-3 недели, не формировал каллусы, авторы пришли к выводу, что из-за измененного глицеролипидного состава двойного мутанта по сравнению с таковым у сеянцев дикого типа, снижение содержания ФИ и увеличение ФК вызывали дефекты клеточного деления и удлинения (Zhou et al., 2013). Кроме того, из ФИ могут образовываться полифосфоинозиты (ПФИ), которые известны разнообразием функций, в том числе, сигнальных (Munnik and Nelsen, 2011). ПФИ играют важную роль при установлении клеточной полярности и в процессах дифференциации клеток (Munnik and Nelsen, 2011; Thole et al., 2008; Rodriguez-Villalon et al., 2015).

ПФИ образуются путем фосфорилирования головной группы мембранного фосфолипида, фосфатидилинозитола (ФИ). Головная группа ФИ состоит из D-мио-инозита, который представляет собой циклический полиол, связанный через фосфодиэфирную связь в положении C1 с глицериновым скелетом липида. Гидроксильные группы в положениях 3, 4 и 5 головной группы липидов доступны для фосфорилирования. Существуют заметные различия в составе видов на основе ПФИ, обнаруженных в растениях и животных. В растениях были обнаружены только пять из семи видов ФИ, известных из других эукариотических систем, а именно ФИ монофосфаты:

ФИЗФ, ФИ4Ф и ФИ5Ф, и ФИ бисфосфаты: ФИ(3,5)Ф и ФИ(4,5)Ф (Munnik and Nelsen, 2011; Krishnamoorthy et al., 2014; Heilmann, 2016). Фосфорилированные инозитольные кольца могут выступать либо в качестве предшественников для растворимых внутриклеточных мессенджеров, либо в качестве сайтов связывания для цитозольных или мембранно-интегральных белков, которые обладают специфическими доменами распознавания липидов (Krishnamoorthy et al., 2014).

Предполагается, что ПФИ участвуют в управлении центральным механизмом мембранного транспорта и сортировки белка в растениях (Krishnamoorthy et al., 2014). Эти процессы влияют на развитие эмбрионов, сосудов и, в конечном итоге, на рост растений (Heilmann, 2016). Например, у мутантов с нарушением работы ФИ4Ф-5-киназы (*PIP5K1* и *PIP5K2*) и, как следствие, недостатком ФИ(4,5)Ф наблюдали аномальное деление клеток уже в двухклеточном эмбрионе. При дальнейшем эмбриогенезе дефекты стали более выраженными, что привело к появлению эмбрионов с серьезными дефектами и плохо определенной границей апикально-базального отдела (Tejos et al., 2014). Кроме того, показано, что *PIP5K1* и *PIP5K2* важны для асимметричного распределения ауксина, а также для формирования эмбриональных апикально-базальных структур, органогенеза надземных и корневых органов, жилкования листьев и активности и роста корневой меристемы, процессов, которые зависят от асимметричного распределения ауксина и обычно вовлекают скоординированные события поляризации клетки (Tejos et al., 2014). Кроме того, ФИЗ-киназы фосфорилируют ФИ для производства ФИЗФ, которые участвуют в пролиферации клеток и организации цитоскелета (Meijer and Munnik, 2003).

ФК, самый простой мембранный фосфолипид, является липидным медиатором, участвующим в различных клеточных процессах, таких как сигнальная трансдукция, мембранный транспорт и перестройка цитоскелета. Клеточная ФК генерируется в основном двумя путями: диглицерид-киназа

фосфорилирует диглицериды или фосфолипаза D гидролизует структурные фосфолипиды. У растений ФК служит вторичным мессенджером и реагирует в ответ на действие различных биотических и абиотических стрессоров, включая патогенную инфекцию, засуху, засоление, ранение, холод, гибель клеток (Meijer and Munnik, 2003; Xue et al., 2009; Ruelland et al., 2015; Poot-Poot and Hernandez-Sotomayor, 2011; Testerink and Munnik, 2005; Park et al., 2004). Однако увеличение содержания ФК может негативно сказываться на росте и развитии растительных организмов. Как уже говорилось ранее, в работе посвященной вегетативному развитию *A. thaliana* показано, что содержание ФК больше в 6 раз для мутанта (6% от суммы ФЛ). Авторы (Zhou et al., 2013) связывают резкое увеличение уровня ФК у нежизнеспособных мутантов с дефектами клеточного деления. Кроме того, авторы работы (Wu et al., 2014) пришли к выводу, что с накоплением ФК происходит снижение содержания БР, поскольку протеин фосфатаза PP2A дефосфорилирует фермент сигналинга brassinosterоидов BZR1 и активирует сигнал БР в цитоплазме; когда уровень ФК повышается после стимуляции неизвестных сигналов (влияние окружающей среды или гормоны), субъединица PP2AA1 связывается и рекрутируется на мембрану посредством ФК, и пониженная цитоплазматическая активность PP2A снижает активность BZR1 и сигнал БР.

Не только ФХ, ФЭ и ФИ играют важную роль в процессах роста и развития растений, большой вклад в эти процессы вносят и другие ФЛ, напримерДФГ, который выполняет в дыхательном аппарате митохондрий растений важную роль. Митохондриальная способность продуцировать НАДН снижается при дефицитеДФГ, дефицит этого ФЛ снижает дыхательную функцию митохондрий растений (Petereit et al., 2017).

Что касается культивирования растительных тканей, то для некоторых покрытосеменных растений в литературе имеются сведения о влиянии ФЛ на процессы роста и развития в культуре *in vitro*. Например, показано, что добавление холина в среду культивирования, с целью быстрого размножения

культур риса, вызывает характерные изменения в составе липидов. При использовании этой добавки содержание ФХ увеличивается в 1,3 раза, а ФИ в 1,6 раз (Sathishkumar and Monoharan, 1996). Похожие результаты получены и для соматических зародышей *Cajanus cajan*. Так, установлено, что добавление хлорида холина, как предшественника ФХ, в питательную среду при выращивании культуры одиночных клеток приводило к созреванию большего количества соматических зародышей *C. cajan*, кроме того, культура демонстрировала ускоренный рост клеток (Kumar et al., 2015). Показано также, что увеличение скорости поглощения ФХ и мио-инозитола при добавлении их в среду культивирования каллусов *Brassica napus* является проявлением их специфической роли в регуляции мембраносвязанных ферментов (Zur et al., 2002b; Drobak, 1992). Для тканей *in vitro* показано, что процесс дифференциации каллусов *Datura innoxia* был связан с увеличением содержания мембранных липидов примерно в 1,3-1,6 раз. Кроме того, установлено, что при дифференцировании тканей происходит увеличение содержания ФИ примерно в 2 раза (Manoharan et al., 1987). В работе (Filek et al., 1993) изучен поверхностный потенциал мембран каллусов озимой пшеницы и выявлено, что электрофизиологическая гетерогенность клеток в каллусе может служить ранним индикатором процесса дифференциации в культурах *in vitro*. Кроме того, авторами показана корреляция между поверхностным потенциалом и содержанием ФИ, что по их мнению, указывает на участие этого липида в модификации электрических свойств клеточных мембран, в том числе при дифференциации (Filek et al., 1993).

Содержание ФЛ для каллусов разных видов носит видоспецифичный характер. Показано, что для недифференцированных каллусов айвы бенгальской (*Aegle marmelos*) содержание ФЛ составило – 14,5-16,0 мг/г сух. веса (Bhardwaj et al., 1995), для недифференцированных каллусов дурмана индийского (*D. innoxia*) – 15,0 мг/г сух. веса (Manoharan et al., 1990). Для культуры клеток *Daucus carota* L. отмечено, что в состав ФЛ соматических

зародышей входили в основном ФХ, ФЭ и ФИ. Общее содержание ФЛ варьировало от примерно 5 до 11 мг/г сух. веса (Liu et al., 1994). Каллусы плодов оливы (*Olea europaea* L., Picual) содержали 41,2% ФЛ от суммы общих липидов (Rutter et al., 1998), такое же содержание ФЛ (41,2%) было отмечено и для морфогенных каллусов *Triticum aestivum* L. (Дударева и др., 2016). Однако, показано, что для плазматической мембраны каллусов *Spartina patens* содержание ФЛ было в 2 раза ниже ГЛ (Wu et al., 2005).

Исходя из вышесказанного, очевидно что, изучение профиля ФЛ в эмбриогенных тканях может дать полезную информацию об участии ФЛ в процессах эмбриогенеза клеточных линий лиственницы сибирской.

2.2.2. Гликолипиды

У высших растений гликолипиды (ГЛ), включая МГДГ и ДГДГ, наряду с ФЛ, являются наиболее распространенными мембранными липидами.

ФЛ присутствуют в различных клеточных мембранах, в то время как ГЛ преимущественно локализуются в мембранах хлоропластов. Известно, например, что мембраны пластид состоят из ГЛ, включая моногалактозилдиглицерид (МГДГ), дигалактозилдиглицерид (ДГДГ) и сульфохиновозилдиглицерид (СХДГ), а также фосфатидилглицерин (ФГ). В соответствии с их молекулярной структурой глицеролипиды можно разделить на липиды, образующие бислои цилиндрической формы (например, ФХ, ФК, ФИ, ФГ, ФС, ДГДГ) и не бислойные, образующие конусообразную форму (например, ФЭ, МГДГ). Как правило, бислойные липиды обеспечивают стабильность мембран, тогда как небислойные липиды важны для опосредования протеолипидных взаимодействий и увеличения морфологической пластичности липидных бислоев (Guo et al., 2019). Показано, что МГДГ как не бислойобразующий липид важен для формирования проламеллярных тел, в то время как ДГДГ – бислойобразующий липид способствует развитию пластинчатых протилакоидов (Fujii et al., 2019a). Снижение синтеза МГДГ негативно влияет на удлинение протилакоид (Fujii et

al., 2019a). Однако, ГЛ, в частности ДГДГ, также могут быть структурными компонентами плазматических мембран, особенно когда растения лишены фосфора (Cao et al., 2016). Например, во время отсутствия фосфатов количества ДГДГ и СХДГ увеличиваются в пластидах растений, и ДГДГ экспортируется в внепластидные мембраны для замены ФЛ (Kalisch et al., 2016). Другими авторами показано, что эндосперм зерна пшеницы более богат ГЛ, чем ФЛ. ГЛ содержится в 3 раза больше, чем ФЛ (14 и 5% от суммарных липидов соответственно), за счет высокого содержания МГДГ И ДГДГ (Khan and Shewry, 2009; Geng et al., 2015). Таким образом, ГЛ, по-видимому, могут содержаться во многих растительных мембранах.

В растительных клетках МГДГ синтезируется из ДГ и УДФ-галактозы МГДГ синтазой. Далее часть МГДГ дополнительно галактозилируется с помощью УДФ-галактозы ДГДГ синтазой с образованием ДГДГ (Fujii et al., 2019b). ДГ, используемые для биосинтеза ГЛ, могут быть получены двумя различными путями. ДГ синтезируются полностью внутри пластид по пластидному пути, либо сначала в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) синтезируются фосфолипиды, и затем из них образуются ДГ – путь ЭР (Fujii et al., 2019b).

Для каллусов содержание ГЛ, вероятно, видоспецифично и, кроме того, зависит от выбора материала для экспланта. Например, в долгоживущей культуре каллусной ткани, полученной из гипокотилей *Cereus peruvianus* Mill., содержание ГЛ составляло 22,4% от суммы полярных липидов и содержание ФЛ 77,6% от суммы полярных липидов (Jacomini et al., 2015). Показано, что плазмалемма каллусов, полученных из незрелых зародышей яровой пшеницы сорта Равета, содержит больше фракции ГЛ. Содержание МГДГ 30% от суммы полярных липидов, ДГДГ 25% от суммы полярных липидов, ФЛ 45% от суммы полярных липидов (Gzyl-Malcher et al., 2017). В тоже время в каллусах пшеницы сорта Скала (*T. aestivum* L.), где в качестве экспланта использовали зрелые зародыши, содержание ГЛ составляло 13% от суммы полярных липидов

и содержание ФЛ 87% от суммы полярных липидов (Дударева и др., 2014; Дударева и др., 2016). В каллусной культуре *Artemisia absinthium* содержание ГЛ было порядка 50% от суммы общих липидов (Radwan et al., 1975). В каллусных культурах клеток меристемы *A. thaliana* мембранными липидами являлись в основном ФЛ (от 80 до 90%) с небольшим количеством ГЛ (от 10 до 20%) (Mei et al., 2015).

Таким образом, ГЛ, являются важными компонентами мембран, в том числе пластидных. Авторы (Filek et al., 2005) заключают, что каждая мембрана в клетке состоит из характерного набора типов липидов. Уникальный состав ЖК позволяет предположить, что структура/состав липидов является важным фактором для обеспечения особенностей в функционировании мембран. Например, мембраны с большим содержанием ГЛ и стерина имеют низкую проницаемость мембран для ионов тяжелых металлов (Wagatsuma, 2017).

В работе (Filek et al., 2005) показано, что содержание ГЛ в пластидах неэмбриогенных каллусов озимой пшеницы, полученных из незрелых соцветий сорта Камила составляло 62,3% от суммарных липидов, а для эмбриогенных каллусов 44,5% от суммарных липидов. Различия в составе и содержании ГЛ для каллусов разной эмбриогенности показывают, что ГЛ, по-видимому, играют существенную роль в процессах дифференцирования.

Действительно, в работе (Manoharan et al., 1987) показано, что процесс дифференциации каллусов, полученных из листьев *D. innoxia*, связан с увеличением содержания мембранных липидов, в частности с увеличением содержания ГЛ с 24 до 31% от суммарных липидов. В тоже время качественный состав ГЛ не изменялся, содержание ГЛ увеличивалось в основном за счет увеличения содержания МГДГ. Подобные результаты получены и для каллусов, инициированных из ствола айвы бенгальской *A. marmelos*, в которых процесс дифференциации также сопровождался повышением уровня ГЛ с 9,1 до 17,1% от суммы полярных липидов (Bhardwaj et al., 1995). В работе (Thomas and Stobart, 1970) показано, что в процессе

регенерации каллусов *Kalanchoe crenata* уровень ГЛ вырос примерно в 5 раз, с последующим накоплением МГДГ. В процессе регенерации каллусов, полученных из этиолированных эмбрионов семян *Brassica napus* L. сорта Drakkar, также происходило накопление липидов: их общее содержание увеличивалось более чем в 10 раз (Williams et al., 1991). При этом содержание ТГ увеличивалось на 14,1%, содержание ГЛ на 1,3%. В процессе дифференциации каллусов из гипокотилия семян ярового масличного рапса (*Brassica napus* L. var. *Oleifera*, сорт Спок) происходило увеличение содержания МГДГ, тогда как уровень ДГДГ оставался относительно постоянным, что привело к увеличению соотношения МГДГ/ДГДГ (Zur et al., 2002a).

Накопленная информация об изменениях в составе и содержании ГЛ показывает, что изучение гликолипидного состава клеточных линий разной эмбриогенности также может дать полезную информацию для понимания процессов, происходящих во время эмбриогенеза у хвойных видов.

Таким образом, к настоящему времени достоверно установлено, что многие типы липидов играют важную роль в процессах роста и развития растительных тканей. Авторами многочисленных работ (Diener et al., 2000; Zheng et al., 2005; Bach et al., 2011; Munnik and Nelsen, 2011; Qian et al., 2013; Zhou et al., 2013 и др.) была рассмотрена связь процессов липидного обмена и дифференциации и пролиферации растительных тканей именно в культуре *in vitro* различных видов растений, ввиду удобства ее использования в качестве модельной системы. Однако, такие исследования для культуры хвойных растений не многочисленны (Attree et al., 1992; Pullman et al., 2003; Brownfield et al., 2007; Макаренко и др., 2014; Hudec et al., 2016), а для лиственницы сибирской такие исследования не проводились вообще. Использование культуры тканей в подобных исследованиях представляет большой интерес ввиду ее особенных свойств, которые будут рассмотрены далее.

3. Культивирование растительной ткани

Одним из характерных свойств растительных клеток является их тотипотентность (Батыгина, 1987; Komamine et al., 1992; Feher, 2019). Под тотипотентностью подразумевается способность клеток растений к дифференцированию в любые типы клеток организма вплоть до развития в полноценный новый организм при реализации наследственной программы онтогенетического развития при определенных условиях выращивания (Тимофеева и Румянцева, 2012; Feher, 2019). Эта способность растительных клеток лежит в основе микрклонального размножения, как одного из направлений культивирования растительных тканей *in vitro*.

Культивирование растительных клеток подразумевает под собой выращивание изолированных клеток, тканей, органов в асептических условиях (Steward et al., 1958; Дитченко, 2007; Тимофеева и Румянцева, 2012). Среди основных типов культивируемых клеток выделяют: каллусную, суспензионную культуру, культуру протопластов, а также могут быть культивированы изолированные органы и зародыши (Бутенко, 1999).

Успех инициации растительной культуры *in vitro* зависит от исходного материала (вида растения, органа из которого ее получают), среды культивирования, освещения, температуры и других факторов. Поэтому для введения в культуру *in vitro* необходим подбор оптимальных условий культивирования для конкретного вида растения и органа или ткани.

Наиболее простыми объектами для введения в культуру *in vitro* являются двудольные травянистые растения, более сложными являются однодольные и зерновые культуры (Бутенко, 1999; Дитченко, 2007). Древесные растения в целом и хвойные, в частности, являются трудными объектами для введения в культуру, о чем подробнее будет сказано ниже.

В качестве экспланта при культивировании растительных тканей могут быть использованы различные части и органы растений: корни, побеги, сосудистые клетки, молодые соцветия, колеоптили, зародыши, незрелые

пыльники, семяпочки и т.п. (Sugiyama, 2015; Wonga, 2017; Круглова и др., 2019 и др.). Для разных видов растений подбирается оптимальный тип ткани для получения клеточной культуры поскольку выбор типа растительной ткани имеет важное значение. Например, ювенильные ткани имеют преимущество при введении в культуру по сравнению с тканями взрослых растений в связи с более длительным сохранением их морфогенетического потенциала в процессе культивирования (Дитченко, 2007; Фоменко и Малюш, 2010). Также предпочтительнее использовать в качестве эксплантов ткани несемennого происхождения, например листья, так как уровень пloidности у таких клеток более стабилен, что снижает вероятность самоклональной изменчивости полученной культуры *in vitro* (Лебедев и др., 2012).

При помещении экспланта на питательную среду *in vitro* клетки специализированной ткани теряют присущую им структуру и функцию и возвращаются к состоянию делящейся клетки, т.е. дедифференцируются (Vining et al., 2013). Такой процесс включает крупномасштабную реорганизацию хроматина (Grafí, 2004; Vining et al., 2013). Ауксин и цитокинин побуждают клетки вновь запускать клеточный цикл, пролиферировать и формировать каллусы (Бутенко, 1999; Grafí et al., 2011).

Ауксины играют важную роль в инициации деления клеток и в процессе их роста (Gaspar et al., 1996; Phillips and Garda, 2019). Стимуляция деления клеток при культивировании достигается влиянием цитокининов (Gaspar et al., 1996; Rademacher, 2015). Совместное действие ауксинов и цитокининов регулирует деление клеток, причем каждый из этих фитогормонов влияет на разные фазы клеточного цикла. Цитокинины контролируют процессы, приводящие к митозу и цитокинезу; ауксины влияют на репликацию ДНК (Gaspar et al., 1996). Абсцизовая кислота, которая в интактных растениях выступает как ингибитор роста, а также замедляет удлинение клеток, при культивировании тканей *in vitro* при правильно подобранных концентрациях

оказывает положительный эффект на рост каллуса и органогенез (Gaspar et al., 1996).

3.1. Особенности культивирования хвойных растений

3.1.1. Характеристика хвойных видов

Голосеменные растения в современной флоре представлены четырьмя классами: саговниковые, гинкговые, гнетовые и хвойные. Класс хвойных является наиболее распространенным и самым многочисленным на земном шаре среди современных голосеменных растений, в отличие от остальных трех классов (Громадин, 2010; Farjon, 2018). Хвойные существуют не менее 300 миллионов лет и занимают все обитаемые континенты. Класс хвойных насчитывает около 615 видов, 68 родов и 7 различных семейств (Pinaceae, Podocarpaceae, Araucariaceae, Taxaceae, Cupressaceae, Sciadopityaceae, Cephalotaxaceae) (Farjon, 2018; Седельникова, 2017).

В связи с большим ареалом распространения хвойных, условия их произрастания весьма разнообразны, однако можно отметить некоторые общие закономерности. Например, большинство представителей рода *Pinus* не требовательны к почве, а также засухоустойчивы и светолюбивы. Есть холодоустойчивые представители рода *Pinus* (*Pinus sibirica*) и теплолюбивые (*Pinus nigra*). Представители рода *Larix* устойчивы к неблагоприятным климатическим воздействиям и светолюбивы. К почве эти виды малотребовательны, однако есть некоторые особенности. Например, *Larix decidua* не растет на заболоченных почвах, а *Larix leptolepis* предпочитает черноземные почвы. Самые теневыносливые виды хвойных – это представители родов *Picea* и *Abies*. Эти деревья требовательны к высокой влажности воздуха и почвы. Однако при достаточном увлажнении представители рода *Picea* могут расти на бедных подзолистых почвах, в то время как представители род *Abies* предпочитают плодородные. Все эти виды отличаются холодостойкостью (Громадин, 2010).

У голосеменных растений семена с семязачатками не заключены в плодолистик, как это характерно для покрытосеменных растений. Период между опылением и созреванием семян у голосеменных растений длительный, для них характерен медленный темп роста. Представители рода *Ginkgo* и все хвойные виды опыляются ветром, тогда как некоторые современные саговники и гнетофиты могут опыляться насекомыми (Christenhusz et al., 2011).

В России древесные растения занимают 90% площади покрытой лесами и 70% из них это хвойные породы (Алексеев и Связева, 2009). При этом лиственные леса составляют около 40%, занимая, таким образом, первое место в лесном фонде России и по проценту занимаемой площади, и по запасу древесины (31%), значительно превосходя другие древесные породы. Лиственница сибирская (*L. sibirica* Ledeb.), лиственница Каяндера (*L. cajanderi* Mayr) и лиственница Гмелина (даурская) (*L. gmelinii* (Rupr.) Rupr.) являются наиболее распространёнными видами этого рода на территории России. На Дальнем Востоке встречаются лиственницы камчатская (*L. kamtschatica* (Rupr.) Carr.) и ольгинская (*L. olgensis* A. Henry), занимающие небольшие ареалы (Рысин, 2012; Милютин, 2003).

Кедровые леса составляют 5,5% от всей занимаемой лесами площади: кедр сибирский (*Pinus sibirica* Du Tour) – свыше 35 млн. гектар, кедр корейский (*Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.) – свыше 3,5 млн. гектар (Рысин, 2012). **Сосновые леса** составляют 16,1% от занимаемой лесом площади (Алексеев и Связева, 2009), причем основным лесообразователем в сосновых лесах на территории России является сосна обыкновенная (*P. sylvestris* L.) (Рысин, 2012). **Еловые леса** составляют 10,4% (Алексеев и Связева, 2009): на территории России произрастают следующие виды: ель европейская (*Picea abies* (L.) Karst), ель аянская (*P. ajanensis* (Lindl. et Gord.) Fisch. ex Carr.), ель Глена (*P. glehnii* (Fr.Schmidt) Mast.), ель корейская (*P. koraiensis* Nakai) и ель сибирская (*P. obovata* Ledeb.) (Рысин, 2012). **Пихтовые леса** составляют – 2,0% от площади лесов (Алексеев и Связева, 2009): в основном это пихта сибирская (*Abies*

sibirica Ledeb.), которая имеет ареал, охватывающий значительную часть таежной зоны (Рысин и др., 2012).

Леса на территории Предбайкалья и Забайкалья занимают около 60% площади. В Иркутской области леса занимают 75% территории (Рысин, 2010), причем на долю **лиственничных лесов** приходится 30%. Сосновые леса занимают 26% от территории покрытой лесом, ели – 5,5%, кедр – 12%, пихты – 2,7% (Рысин и Савельева, 2008).

3.2.2. Культивирование хвойных растений

Как было сказано ранее, у двудольных и однодольных травянистых растений каллусогенез инициируется достаточно легко. Наиболее трудными объектами для культивирования в целом и каллусогенеза, в частности, являются древесные растения, особенно голосеменные (Бутенко, 1999). На это влияет, кроме всего прочего, длительный жизненный цикл, так как по мере старения тканей способность к каллусогенезу уменьшается (Бутенко, 1999). Трудности при культивировании хвойных возникают не только при выборе подходящего экспланта. При получении каллусов могут возникать проблемы с пролиферацией тканей *in vitro*, с растяжением клеток, с возникновением некрозов. А в дальнейшем с низкой частотой формирования растений-регенерантов и низкой эффективностью их укоренения (Sarmast, 2016).

В качестве эксплантов для введения хвойных растений в культуру могут выступать пазушные почки органов стеблевого происхождения, особенно взятые в весенний период, поскольку начинается активная пролиферация меристем после периода покоя (Аёшина и Величко, 2008; Плынская и др., 2008; Третьякова и др., 2014; Красноперова и Бухарина, 2019; Wang and Yao, 2017). Получение каллусов из зрелой хвои представляет собой трудновыполнимую задачу, ввиду глубокой специализации клеток хвои из-за проблем, связанных с дедифференцированием. Авторами работы (Третьякова и др., 2014) показано, что при использовании зрелой хвои в качестве экспланта при культивировании *Abies sibirica* Ledeb. каллусы не образовывались, а через некоторое время

экспланты некротизировались и погибали. Имеет значение также генотип исходного дерева, например, при культивировании *Pinus sibirica* Du Tour, из 16 эксплантов, взятых от плюсовых деревьев кедра сибирского (16 деревьев) один из эксплантов образовывал эмбриогенную массу в 2-3 раза большую, чем остальные экспланты (Третьякова и Барсукова, 2010).

Одной из пионерских работ по введению хвойных пород в культуру стали исследования А.Е. Harvey и J.L. Grasham (Harvey and Grasham, 1969). Авторами были подобраны условия для культивирования некоторых хвойных видов, в качестве экспланта выступали стебли молодых ветвей. Каллусы были получены для: *Abies grandis*, *Larix occidentalis*, *Picea abies*, *P. engelmannii*, *P. pungens*, *Pinus albicaulis*, *P. contorta*, *P. flexilis*, *P. nigra*, *P. ponderosa*, *Pseudotsuga menziesii*, *Thuja plicata*. В работе был описан эксперимент с культивированием полученных каллусов на протяжении 120 дней и авторы надеялись на поддержание культур за счет субкультивирования. Однако, в каллусах *L. occidentalis* после 90 дней культивирования начал развиваться некроз. Авторами J. Reinert и Ph. White (Reinert and White, 1956) были получены каллусы из ветвей *Picea glauca*, которые также подвергались почернению и некрозу через 6-7 недель культивирования. Некроз и прекращение роста каллусов хвойных авторы связали с наличием активной полифенолоксидазной системы, поскольку добавление в среду тирозина или ингибитора полифенолоксидазы – диэтилкарбамата способствовало росту каллусов без некротизации. Древесные, и особенно хвойные, растения содержат большое количество вторичных метаболитов (фенолы, терпены и т.д.), которые в изолированных тканях могут активироваться. Например, окисленные фенолы обычно ингибируют деление и рост клеток, что может привести к гибели первичного экспланта (Широков и Крюков, 2012; Ozyigit, 2008) Вторичные метаболиты могут косвенно влиять на запуск органогенеза, регулируя внутриклеточный гормональный баланс. Для каллусов *P. abies* показано, что

рост каллусов и образование корней замедлялось в связи с накоплением вторичных метаболитов (Simola and Huhtinen, 1986).

Одним из видов культивирования хвойных пород является каулогенез. Каулогенез подразумевает образование придаточных побегов при культивировании *in vitro* или развитие побега *de novo* из каллуса (Cuesta et al., 2009; Alvarez et al., 2020). Кроме того, каулогенез может выступать и в качестве модели для исследований органогенеза. Например, авторами (Alvarez et al., 2020) была изучена экспрессия генов, которые предположительно могут участвовать в адвентивном каулогенезе семядолей *Pinus pinea*. Авторы предположили, что семейство генов *WOX* и *KNOX* (*PpWUS*, *PpWOX5*, *PpKN2*, *PpKN3* и *PipiRR1*) играют ключевую роль в каулогенном процессе (Alvarez et al., 2020). Известно, что гены семейства *WOX* выполняют специализированные функции в ключевых процессах развития растений за счет стимулирования активности деления клеток или предотвращения преждевременной дифференциации клеток, например, при формировании эмбрионального паттерна и формировании органов (van der Graaff et al., 2009). Что касается *KNOX*, то работа генов этого семейства необходима для правильного формирования паттерна инициации органа (Hake et al., 2004).

Нередко для микроразмножения хвойных в качестве экспланта используют кончики побегов пазушных ветвей длиной 3-4 см, например для *Picea abies* (L.) (Zarei et al., 2020; Zarei et al., 2017), а также побеги с удалением кончиков, с образованием «мини-пней», как описано в работе (Wang and Yao, 2017) для *Pinus massoniana* Lamb. Такие экспланты помещают на среду культивирования для получения растений-регенерантов и в дальнейшем подбирают условия для укоренения в почву. Авторами работы (Wang and Yao, 2017) была показана зависимость успеха культивирования от времени сбора материала для эксплантов. Было установлено для *P. massoniana*, что самым низким процентом выживаемости эксплантов обладают узловые сегменты мини-пней собранных в сентябре (3,5%), кроме того, у них не образовывались

побеги. Для эксплантов, собранных в декабре, процент выживаемости и образования побегов заметно увеличивался до 45,8 и 35,6%, соответственно. Наилучшими показателями обладали экспланты, собранные в марте, – их выживаемость составила 64,5%, а процент образования побегов 52,3%. Таким образом, была продемонстрирована зависимость успеха индукции каллусогенеза от сезона сбора материала для культивирования, другими словами от периода онтогенеза растения, взятого в качестве источника для культивирования.

Важным этапом при культивировании хвойных, с целью получения растений-регенерантов, является процесс образования корней и дальнейшее укоренение полученных растений в почву. Адаптация к почвенным условиям для пробирочных растений хвойных пород является сложной задачей. Для достижения максимального укоренения растений-регенерантов создаются специальные условия, сходные с их развитием в условиях *in vitro* (Аёшина и Величко, 2008).

Для эксплантов хвойных пород эффективность формирования побегов в зависимости от среды культивирования может колебаться от 60 до 100% (Khater and Benbouza, 2019). Укоренение полученных регенерантов остается непростой задачей. Например, эффективность укоренения побегов *Juniperus thurifera* L. достигала 38,8% (Khater and Benbouza, 2019), в то время как для *Juniperus sibirica* процент укоренения побегов составил 17,5% (Аёшина и Величко, 2008). Для *Picea abies* (L.) H. Karst 37,5% побегов укоренялись (Zarei et al., 2020). Для стимуляции ризогенеза зачастую используют регуляторы роста: 3-индолилуксусную кислоту (ИУК) (Аёшина и Величко, 2008), ИУК и индолил-3-масляную кислоту (ИМК) (Zarei et al., 2020), ИМК и 1-нафталинуксусную кислоту (НУК) (Khater and Benbouza, 2019), НУК (Wang and Yao, 2017).

При введении хвойных растений в культуру на начальном этапе могут возникать проблемы, связанные с микробным и грибным заражением

эксплантов чаще, чем для других растений. Поэтому стерилизация исходного материала имеет особенно важное значение при введении хвойных в культуру *in vitro* (Long et al., 2010; Широков и Крюков, 2012; Третьякова и Барсукова, 2012; Третьякова и др., 2014; Красноперова и Власевский, 2017; Zarei et al., 2020; Shmakov and Konstantinov, 2020; Gao et al., 2021).

3.1.2. Характеристика лиственницы сибирской

Важнейшими составляющими бореальных лесов северного полушария являются многочисленные виды рода *Larix* Mill. Его представители довольно широко распространены и являются лесообразующей породой не только в России, но и в странах Европы, Китае, Корее, Монголии, Японии, Северной Америке. Поэтому лиственницы имеют большое биосферное и ресурсное значение и изучение их генетического разнообразия, внутри и межвидовой дифференциации, является одной из важных задач популяционной биологии (Орешкова и др., 2013).

В России лиственница самая распространенная лесообразующая порода, максимальное ее распространение отмечается в континентальных горных районах Южной Сибири (Милютин, 2003; Милютин, 2016), а также в Восточной Сибири, где ее насаждения занимают всю юго-западную часть Прибайкалья и юг Бурятии (Барченков и др., 2012). Кроме того, в соответствии с современной систематикой, в Сибири произрастают (в направлении с востока на запад) еще 3 вида лиственницы: лиственница Каяндера *L. cajanderi* Mayr, лиственница Гмелина, или даурская *L. gmelinii* (Rupr.) Rupr., лиственница Сукачева *L. sukaczewii* Dylis (Милютин, 2016).

По сравнению с лиственницами Гмелина и Сукачева, лиственница сибирская занимает промежуточное положение по отношению к температурным условиям произрастания. Так лиственница Гмелина более устойчива к низким температурам, и граница распространения между этими двумя видами совпадает с юго-западной границей вечной мерзлоты. Однако, лиственница сибирская занимает ареал с более низкими температурами нежели

лиственница Сукачева (Милютин, 2003). Показано, что *L. sibirica* имеет самую высокую морфологическую изменчивость среди восточных популяций, в связи с ее высокой экологической пластичностью и слабой репродуктивной изоляцией (Барченков и др., 2012). В связи с широким ареалом распространения, лиственница сибирская формирует большое количество различных типов смешанных лесов, в зависимости от произрастания в них различных кустарников и других растений, например, в горных районах Южной Сибири лиственничных лесов выделяют 172 типа (Милютин, 2003).

Лиственница является высокопродуктивным и малотребовательным к условиям произрастания видом и поэтому представляет большой интерес для лесного хозяйства (Громадин, 2010; Шайхразиев и Глушко, 2017; Улитин и Бессчетнов, 2020). Древесина лиственницы пользуется большим спросом в промышленности и строительстве, поскольку со временем ее прочность возрастает, благодаря особому составу смолы. Древесина лиственницы отличается большей твердостью, по этому признаку она на 50% превосходит древесину сосны обыкновенной, кроме того, отличительным свойством ее древесины является естественная устойчивость к гниению (Громадин, 2010; Володькина и Володькин, 2010). Древесина лиственницы используется для гидротехнических сооружений, для изготовления переводных и мостовых брусьев, рудничных стоек и других построек. Кора является ценным дубильным сырьем за счет содержания в ней таннидов (Громадин, 2010).

Однако, в связи с растущим антропогенным воздействием, ареал лиственницы заметно сокращается, в том числе из-за пожаров – как природных, так и антропогенных (Ведрова и др., 2018).

Еще одной важной причиной сокращения лиственничных лесов является низкое качество семян лиственницы. Например, всхожесть семян *L. sibirica* (Нижний Новгород) составляет 7%, и лишь 40% ее семян полнозернистые (Логунов, 2018). В работе (Барченков и др., 2007) отмечено, что всхожесть семян лиственницы сибирской составила 7-73%, а полнозернистость ее семян –

8-73% (ниже, чем для других видов лиственницы в Красноярском крае). Авторами работы (Пименов и др., 2016) отмечено, что для болотного экотипа лиственницы сибирской (Томская область) всхожесть семян составила 49%, по сравнению с суходольными (Республика Хакасия) 32%. Поражение болезнями также влияет на численность лиственничных деревьев. В большей степени, по сравнению с другими видами лиственницы, насекомыми вредителями повреждается лиственница сибирская (32%). В меньшей степени (около 25%) повреждаются семена лиственницы европейской, кроме того, она образует меньшее количество пустых семян (55%) и, в целом, отличается семенами более высокого качества, от *L. gmelinii*, у которой эти показатели составляют 29 и 64% соответственно (Логунов, 2018). Важнейшим вредителем видов лиственницы на юге Сибири и в северо-восточной Монголии является лиственничная почковая галлица (*Dasineura rozhkovi* Mam. et Nik. (Diptera, Cecidomyiidae)), которой поражены более 60% деревьев (Баранчиков, 2006).

Таким образом, *L. sibirica* является уязвимым для вредителей и антропогенных воздействий видом, с затрудненным размножением в естественных условиях. Поэтому необходимость возобновления лиственничных лесов является одной из первостепенных задач, как с экологической, так и с практической точки зрения. Наиболее перспективными в этом плане разработок являются программы с использованием современных биотехнологий микрклонального размножения и введение лиственницы сибирской в культуру *in vitro* (Третьякова и др., 2012).

3.3. Пути решения проблем культивирования хвойных.

Соматический эмбриогенез

Как уже упоминалось, классические программы генетического размножения для древесных видов имеют важные ограничения из-за их большой продолжительности жизни, трудностей сохранения семян и т.п. (Testillano et al., 2018). В настоящее время наиболее востребованный и перспективный метод культивирования и альтернативного размножения, а

также криоконсервации элитных генотипов растений является соматический эмбриогенез (СЭ), при котором дифференцированные (соматические) клетки переключаются в эмбриогенное состояние (Третьякова и др., 2012; Rupps et al., 2015; Testillano et al., 2018). В особенности этот метод предпочтителен для хвойных видов, поскольку он позволяет получать каллусы и клеточные линии разных видов избегая при этом множества проблем. Для этих видов наилучшим исходным материалом являются зиготические и соматические зародыши, ввиду глубокой специализации хвои, корней и других взрослых тканей, обусловленное среди прочего, вероятно, эволюционными различиями покрыто- и голосеменных растений. Поэтому представляется важным получить информацию о регуляции и специфических характеристиках СЭ у хвойных пород (Rupps et al., 2015).

СЭ представляет собой процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) в культуре клеток и тканей (Тимофеева и Румянцева, 2012). Известно, что индукция СЭ *in vitro* может быть инициирована в том числе клеточным стрессом, связанным с переносом клеток из окружающей их ткани на среду культивирования и/или с изменением баланса эндогенных гормонов. Такие клетки вынуждены адаптироваться к новой среде, что в итоге приводит к метаболическому и генетическому перепрограммированию (Fehér, 2015). Стресс и ауксин играют центральную роль при СЭ в большинстве эмбриогенных систем (Третьякова и Барсукова, 2010; Fehér, 2015). Следует отметить, что одним из важных моментов при инициации СЭ является генотип исходного растения, например, при исследовании склонности *Pinus sylvestris* к СЭ показано, что женский генотип деревьев более склонен к инициации СЭ, чем мужской (Klimaszewska et al., 2016).

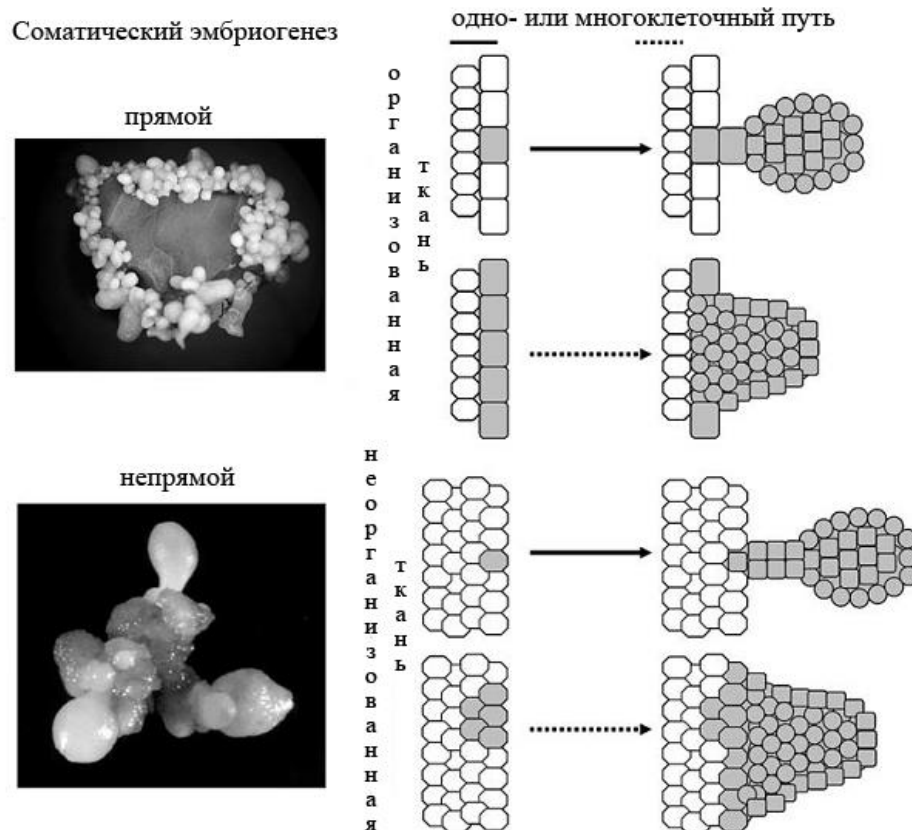


Рис. 7. Схематическое изображение соматического эмбриогенеза (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Сверху показан прямой СЭ (одноклеточный и многоклеточный пути), снизу показан непрямой СЭ (одноклеточный и многоклеточный пути). Фотографии из авторской лаборатории соответствуют прямому СЭ в *Coffea canephora* (вверху) и непрямому СЭ в *Coffea arabica* (внизу).

Образование соматических зародышей может идти двумя путями (рис. 7). Образование зародышей непосредственно из клеток экспланта, минуя этап каллусообразования называется прямым СЭ. В таком случае формирование зародышеподобных структур происходит из клеток экспланта, которые эмбриогенно детерминированы. Клетка делится, образуя при этом базальную и проэмбриональную клетки, давая начало, таким образом, небольшому суспензору и эмбриоиду, соответственно. Другой путь, когда формирование каллуса является необходимым этапом, называется непрямым СЭ. В этом случае клеточная программа развития направлена сначала на дифференциацию

инициальных эмбрионных клеток, а затем формирование из них специализированных клеток и тканей эмбриона (Митрофанова, 2009; Тимофеева и Румянцева, 2012). Кроме того, может происходить и вторичный эмбриогенез, образование добавочных эмбриоидов на поверхности сформировавшихся соматических зародышей (Митрофанова 2009; Тимофеева и Румянцева, 2012). Соматические зародыши могут развиваться одноклеточным и многоклеточным путем (рис. 7). Многоклеточное и одноклеточное происхождение эмбриоидов может быть как в прямом, так и в непрямом СЭ (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Что касается соматического зародыша или эмбриоида, то он представляет собой независимую двухполюсную структуру (возникающую из глобулярного проэмбрио), не соединенную сосудами с тканью, из которой происходит. В перспективе такие зародыши могут развиваться и прорасти в регенеранты, проходя через стадии, соответствующие тем, что встречаются при развитии зиготы (Тимофеева и Румянцева, 2012). Например, на основе суспензионной культуры моркови *Daucus carota* L. были продемонстрированы стадии развития соматических эмбрионов (Komamine et al., 1992; Dodeman et al., 1997), на рисунке (рис. 8) схематично показаны этапы развития СЭ и этапы при развитии зиготы (Dodeman et al., 1997). Соматические зародыши проходят такие же морфологические стадии, как и зиготический аналог (Yang and Zhang, 2010; Dodeman et al., 1997; Komamine et al., 1992; Quiroz-Figueroa et al., 2006). При развитии соматических зародышей *Nelumbo nucifera* Gaertn также выделяют стадии: проэмбрио, глобулярную, сердцевидную, торпедообразную и семядольную (Arunyanart and Chaitrayagun, 2005). Для хвойных деревьев выделяют следующие стадии: проэмбрио, глобулярную, семядольную (Santos et al., 2002; Stasolla et al., 2002; Третьякова и Барсукова, 2012; Guan et al., 2016). Клетки-суспензоры начинают дифференцироваться, увеличиваться в размерах, приобретая в итоге глобулярную форму. Затем происходит формирование выступа – образование апикальной меристемы, при дальнейшем развитии из

периферической зоны верхушки побега вырастает кольцо семядолей, что определяет семядольную стадию развития зародыша, например, как показано на рис. 9 (Stasolla et al., 2002; Третьякова и Барсукова, 2012).

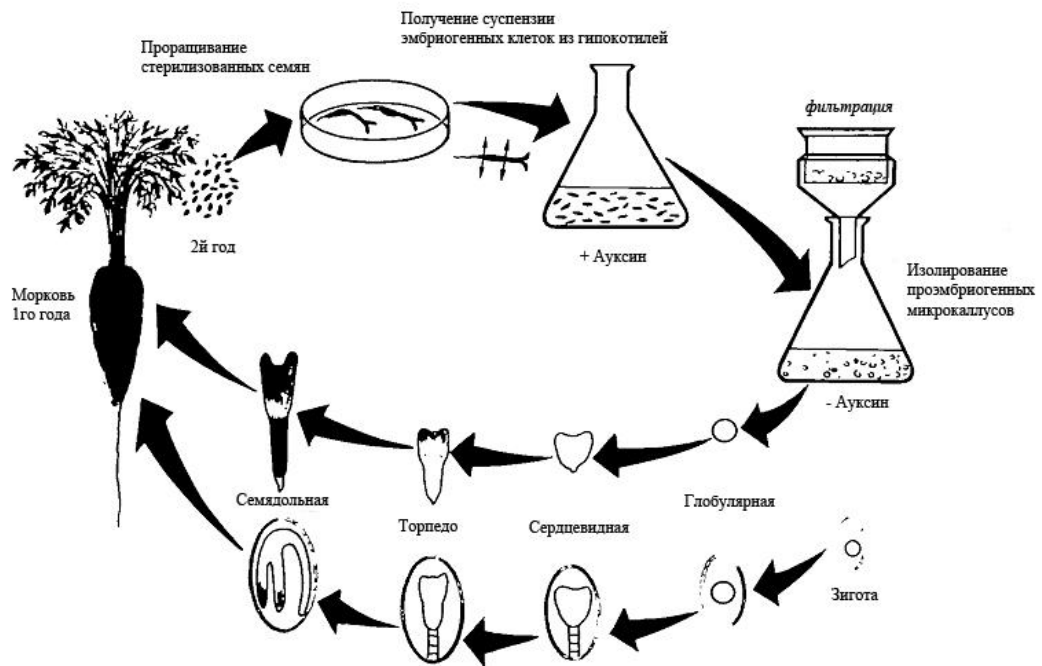


Рис. 8. Зиготический и соматический эмбриогенез на примере *Daucus carota* L. (Dodeman et al., 1997)

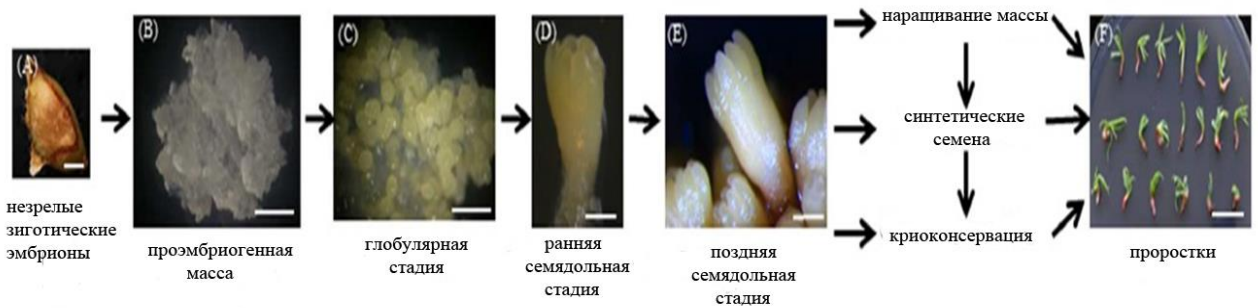


Рис. 9 Схематическое изображение соматического эмбриогенеза у лиственницы (*Larix* spp.) (Guan et al., 2016).

Примечания. (A, B) проэмбрионные массы, инициированные из незрелых зиготических эмбрионов. (C – E) Микроскопический фенотип соматических эмбрионов на разных стадиях развития. (F) Росток лиственницы. Бар равен: (A – C) - 1 мм, (D, E) - 0,2 мм, (F) - 1 см.

Таким образом, регенерация клеток посредством СЭ у растений является многоступенчатым процессом. Для хвойных видов он включает несколько стадий: инициацию (индукцию), пролиферацию, созревание соматических зародышей, прорастание соматических зародышей, получение регенерантов и акклиматизацию соматических сеянцев (Третьякова и Пак, 2018; Третьякова и Шуваев, 2015; Третьякова и Барсукова, 2012; Lelu-Walter and Paques, 2009). Пролиферирующую эмбриогенную культуру хвойных принято называть эмбрионально-суспензорной массой (ЭСМ) и она выглядит как полупрозрачная масса незрелых соматических (глобулярных) зародышей (Третьякова и Пак, 2018).

Механизм СЭ очень напоминает зиготический эмбриогенез, поэтому является наиболее предпочтительным методом микрклонального размножения, в особенности для хвойных растений (Bonga, 2017). Преимуществом соматического эмбриогенеза (СЭ), по сравнению с органоогенезом, является то, что растения-регенеранты, полученный путем СЭ уже полностью сформированы, тогда как растения-регенеранты, полученные путем органоогенеза необходимо стимулировать корнеобразование *de novo*, что является весьма сложным и не всегда успешным процессом (Бутенко, 1999; Yang et al., 2020). СЭ используют для размножения хвойных видов, клонального тестирования, генетической трансформации с целью улучшения древесных пород (Bonga, 2017; Guan et al., 2016). Также СЭ имеет ценность для фундаментальных исследований процессов морфогенеза, проэмбриональных клеток, зародышеподобных структур (Бутенко, 1999). Наиболее важным и значимым моментом для изучения процессов морфогенеза и эмбриогенеза, в том числе СЭ, является изучение его ранних этапов, когда часть клеток переключаются на путь развития в соматические зародыши. При этом важно выявление механизмов, которые заставляют дедифференцированные клетки *in vitro* переключаться на путь эмбриогенеза (Бутенко, 1999) и биохимические изменения, которые сопровождают/определяют эмбриогенез.

4. Выводы из обзора литературы

Известно, что при созревании соматических зародышей происходит накопление липидов, а нарушение синтеза липидов вызывает дефекты клеточного деления, нарушения дифференциации и органогенеза. Однако, несмотря на имеющуюся информацию об участии липидов в процессах морфогенеза у растений, до сих пор не было уделено достаточного внимания составу и содержанию липидов в каллусной культуре хвойных деревьев, особенно различиям этих параметров у эмбриогенных и неэмбриогенных тканей, в частности, в культуре тканей лиственницы сибирской.

Каллусы являются отличными модельными системами для различных исследований. Однако, необходимость тщательного подбора условий, в том числе выбор среды культивирования, подготовка эксплантов, в отдельных случаях, делают инициацию каллусогенеза и дальнейшее развитие тканей труднодостижимой. В особенности это касается хвойных растений. Причины этого следующие:

1) Процесс каллусообразования из взрослой хвои затруднен её глубокой специализацией в процессе эволюции (Бутенко, 1999; Третьякова и др., 2014).

2) Ткани хвойных деревьев подвержены грибковым и бактериальным заражениям (Баранчиков, 2006; Третьякова и Барсукова, 2012; Широков и Крюков, 2012; Третьякова и др., 2014).

3) Возникновение некрозов в культуре (Reinert and White, 1956; Ozyigit, 2008; Широков и Крюков, 2012; Третьякова и др., 2014; Sarmast, 2016).

4) Низкая эффективность укоренения растений-регенерантов (Бутенко, 1999; Аёшина и Величко, 2008; Khater and Benbouza, 2019; Zarei et al., 2020; Yang et al., 2020).

Оптимальным методом, позволяющим культивировать хвойные виды, является соматический эмбриогенез (Rupps et al., 2015; Testillano et al., 2018; Третьякова и Пак, 2018). Такой метод позволяет получить не только клеточные культуры, но и растения-регенеранты, которые необходимы при

лесовосстановлении хвойных пород, которые плохо размножаются из-за низкого качества семян, а также из-за их подверженности некоторым заболеваниям (почковая галлица для *L. sibirica*).

Учитывая полифункциональность липидных компонентов, их доказанное участие в регуляции процессов роста и развития, в накоплении ресурсов для этих процессов, логично предположить, что сравнительный анализ состава и содержания липидов у эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий *L. sibirica* может дать важную информацию об участии этих соединений в процессах роста и развития клеточной культуры тканей этого вида.

В связи с этим комплексное изучение состава и содержания липидных компонентов в эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линиях лиственницы сибирской, особенно на ранних этапах культивирования, представляется перспективным направлением исследований. Можно предположить, что кроме безусловного фундаментального интереса, информация о различиях в количественном и качественном составе липидных компонентов для эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий, в частности, в культуре лиственницы сибирской, может помочь в оценке компетентности соматических зародышей для завершения последующих этапов развития.

Глава 2. Материалы и методы исследований

2.1. Характеристика объектов исследования

В качестве растительного материала использовали эмбриогенные и неэмбриогенные клеточные линии лиственницы сибирской *L. sibirica* Ledeb., полученные в лаборатории лесной селекции и генетики Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (г. Красноярск) группой сотрудников под руководством И.Н. Третьяковой (Третьякова и др., 2012; Третьякова, 2013).

Использованный для получения клеточных линий вид Лиственница сибирская. Вид относится к отделу *Pinophyta*, класс – *Pinopsida*, порядок – *Pinales*, семейство – *Pinaceae*, род – *Larix*. Лиственница сибирская произрастает в пределах лесной зоны, занимая обширные территории в России, от 58° в.д. на западе и до оз. Байкала на востоке (119° в.д.), от тундры на севере (70° с.ш.) до Алтая и Саян на юге (46° с.ш.); в горах поднимается до верхней границы леса (Алтай 2200-2400 м). Хорошо переносит значительные колебания температуры и засуху. Очень светолюбива, к почвам нетребовательна (Громадин, 2010). Начало вегетации приходится на конец второй декады апреля, при преодолении температурного порога в +5 °С, пыление стробил в начале мая, когда оптимальная температура воздуха составляет от +10 до 15 °С (Карбасникова и др., 2020). Семена в Сибири созревают в сентябре и выпадают в течение 15-35 дней. Семенные годы через 2-3 года; в северных районах реже, чем в южных (Громадин, 2010).

Клеточные линии. В качестве эксплантов для индукции соматического эмбриогенеза использовали изолированные зиготические зародыши на стадии инициации семядолей из семян 35–40-летних деревьев лиственницы сибирской, произрастающих на территории дендрария Института леса СО РАН (г. Красноярск). Семена очищали от покровных чешуй, поверхностно стерилизовали 5% спиртовым раствором йода в течение 3 минут. После 3-кратной промывки в стерильной дистиллированной воде, мегагаметофиты обрабатывали 10%-м раствором перекиси водорода в течение 5–10 минут.

Зародыши извлекали из мегагаметофитов в стерильных условиях, помещали на увлажненную фильтровальную бумагу в чашках Петри и затем переносили на питательную среду (Третьякова и Барсукова, 2012).

Для индукции каллуса использовали питательную среду АИ – модифицированную среду MSGm с увеличенным содержанием некоторых микроэлементов по сравнению с исходной прописью MSG и изменным составом макроэлементов (Третьякова, 2013). Макроэлементы среды: KNO_3 , $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgSO_4 \cdot H_2O$, KH_2PO_4 ; микроэлементы среды: KI , H_3BO_3 , $MnSO_4 \cdot H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $CuSO_4 \cdot 6H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; витамины и органические вещества: мезоинозит, тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота, глутамин, гидролизат казеин. Кроме того, в состав среды входит $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Na_2 -ЭДТА, а pH – 5,8. В качестве регуляторов роста использовали 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) (2 мг/л) и 6-бензиламинопурин (БАП) (1 мг/л). В среду добавляли агар – 7 г/л. Культивирование проводили в чашке Петри в темноте при $25^\circ C \pm 1^\circ C$ (Третьякова и Барсукова, 2012).

Для пролиферации клеточных линий и образования эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) применяли базовую среду АИ, содержащую 2,4-Д (2 мг/л), 6-БАП (0,5 мг/л) и сахарозу (20 г/л). Культуры инкубировали в темноте при температуре $25^\circ C \pm 1^\circ C$ (Третьякова и Барсукова, 2012; Пак и др., 2016).

Были получены клеточные линии двух типов: эмбриогенные – кремового цвета, рыхлые, со сформированными незрелыми соматическими зародышами (рис. 10); неэмбриогенные – кремового цвета, плотные, глобулярные, у которых незрелые соматические зародыши не формировались (рис. 11). Для полученных эмбриогенных клеточных линий число зародышей составляло от 2 (Кл2, Кл6) до 11 (Кл10) тыс. шт/г сырой массы ЭСМ (Третьякова и Барсукова 2012, Пак и др., 2016). Средний вес клеточной линии составил 1,4 г. Оводненность тканей – 95-97%.

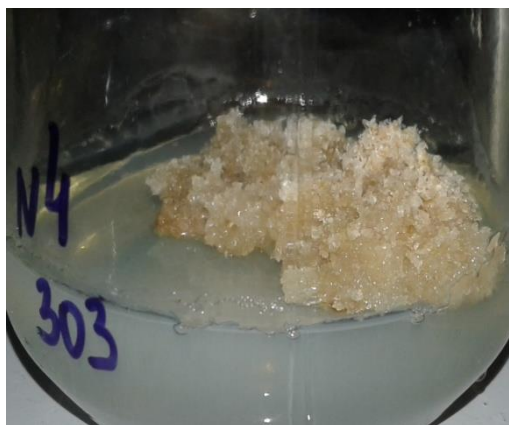


Рис. 10 Эмбриогенная клеточная линия *L. sibirica* (фото автора)



Рис. 11 Неэмбриогенная клеточная линия *L. sibirica* (фото к.б.н. Шмакова В.Н., лаборатория генетической инженерии растений СИФИБР СО РАН)

Клеточные линии *L. sibirica* поддерживались с.н.с. В.Н. Шмаковым на питательной среде АИ (Третьякова, 2013) в лаборатории генетической инженерии растений СИФИБР СО РАН (рук. лаборатории д.б.н. Ю.М. Константинов). В качестве регуляторов роста использовали 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2 мг/л) и 6-бензиламинопурин (0,5 мг/л). Пересадку на свежую питательную среду проводили каждые 28 дней. Материал для исследования брали на 28-ые сутки.

Для изучения состава и содержания жирнокислотного состава суммарных липидов в клеточных линиях лиственницы сибирской использовали эмбриогенные долгоживущие клеточные линии *L. sibirica* – Кл2, Кл6, Кл4, Кл10, Кл5 на стадии пролиферации эмбрионально-суспензорной массы (Кл2 получена в 2009 г., Кл4 – в 2009 г., Кл5 – в 2009 г., Кл6 – в 2011 г., Кл10 – в

2012 г. (Третьякова и др., 2015)) и неэмбриогенные клеточные линии КлЛ, Кл23, у которых незрелые соматические зародыши не формировались (Третьякова и Барсукова, 2012). Для изучения состава и содержания жирнокислотного состава разных фракций липидов (НЛ, ФЛ, ГЛ), а также профиля НЛ (в том числе стеринового), ФЛ и ГЛ в клеточных линиях листовенницы сибирской использовали эмбриогенные – Кл2, Кл6, Кл4, Кл10 долгоживущие клеточные линии *L. sibirica* на стадии пролиферации эмбрионально-суспензорной массы и неэмбриогенные клеточные линии Кл31, Кл23 такого же возраста.

Эмбриогенные клеточные линии *L. sibirica* с сформированными незрелыми соматическими зародышами (Кл4, Кл2, Кл6, Кл10, Кл5), в дальнейшем могут формировать растения-регенеранты, при этом линия Кл4 была наиболее успешной в этом отношении (Пак и др., 2016; Третьякова и Барсукова, 2012).

2.2. Методы количественного анализа

2.2.1. Экстракция липидов

Для экстракции липидов навеску образца (0,5 г) фиксировали в жидком азоте и растирали до получения гомогенной массы (Folch et al., 1957). Затем добавляли 10 мл смеси хлороформ:метанол (2:1 v/v) с добавлением ионола в качестве антиоксиданта из расчета 0,00125 г на 100 мл смеси хлороформ:метанол, тщательно перемешивали и оставляли на 30 мин до полной диффузии липидов в растворитель. Количественно переносили раствор в делительную воронку через фильтр, трижды промывая ступку и фильтр смесью растворителей. Для лучшего расслаивания добавляли воду. Для анализа суммарных липидов отделяли нижнюю хлороформную фракцию. Хлороформ из липидного экстракта удаляли под вакуумом с помощью роторного испарителя RVO-64 (Чехия). Для контроля экстрагируемости липидов (в %) использовали нонадекановую кислоту (C19:0), добавляя ее известное количество на этапе гомогенизации. Количественно переносили липиды в

стеклянные вials, концентрирование экстракта проводили в токе азота. Абсолютное содержание суммарных липидов определяли взвешиванием с помощью электронных весов GR-120 (A&D Company Ltd., Япония), образец высушивали до постоянного веса.

Выделенные липиды растворяли в элюенте хлороформ-метанол (2:1), с концентрацией – 100 мг липидов в 1 мл элюента.

2.2.2. Колоночная хроматография

Подготовка колонки. При расчете количества необходимого силикагеля для данной колонки и количества растворителей учитывались соотношения: а) вес силикагеля:вес липидов = 75:1, б) высота колонки с силикагелем:площадь ее сечения = 5:1. Стеклообразную хроматографическую колонку ($d=0,7$ см) упаковывали однородной суспензией 0,6 г силикагеля (Silicagel L 100/160, Чехия) в 3-5 мл хлороформа, после чего дважды промывали колонку 4 мл хлороформа (Kates, 1986; Vonfils et al., 2007).

Нанесение образца и элюирование. Соблюдая стандартные процедуры нанесения образца липидов на колонку (Kates, 1986, Vonfils et al., 2007), пипеткой вводили образец 100 мг липидного экстракта, растворенного в 1 мл хлороформа. Далее последовательно элюировали при скорости 3 мл/мин хлороформом (20 мл) – нейтральные липиды (НЛ), ацетоном (80 мл) – гликолипиды (ГЛ), метанолом (20 мл) – фосфолипиды (ФЛ) (Kates, 1986).

Абсолютное содержание фракций липидов (НЛ, ГЛ, ФЛ) определяли взвешиванием с помощью электронных весов GR-120 (A&D Company Ltd., Япония), образец высушивали до постоянного веса. Затем каждую фракцию подвергали метилированию для анализа жирнокислотного состава.

2.2.3. Изучение жирнокислотного состава тканей клеточной культуры *L. sibirica*

Метилирование ЖК. Метилловые эфиры ЖК (МЭЖК) из экстракта получали по методу (Christie, 1993). Хлороформный экстракт суммарных липидов, а также отдельные фракции липидов метилировали для получения

метиловых эфиров жирных кислот в 1% растворе серной кислоты в метаноле. Дополнительную очистку МЭЖК проводили методом ТСХ на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-В (Россия) в камере с бензолом в качестве подвижной фазы ($R_f = 0,71-0,73$). Для визуализации зоны МЭЖК пластинки обрабатывали 10%-ным раствором H_2SO_4 в этаноле и нагревали на плите до появления пятен. Необработанную проявителем зону МЭЖК удаляли с пластинки шпателем и элюировали с силикагеля хлороформом.

ГХ-МС анализ МЭЖК. Анализ МЭЖК проводили методом газожидкостной хроматографии с использованием хромато-масс-спектрометра 5973/6890N MSD/DS Agilent Technologies (США). Детектор – квадрупольный масс-спектрометр, способ ионизации - электронный удар, энергия ионизации 70 эВ, для анализа использовали режим регистрации полного ионного тока. Для разделения использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX (30 м × 250 мкм × 0,50 мкм) со стационарной фазой полиэтиленгликоль. Газ-носитель: гелий, скорость потока газа 1 мл/мин. Температура испарителя 250°C, источника ионов 230°C, детектора 150°C, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, 280°C. Диапазон сканирования 41-450 а.е.м. Объем вводимой пробы – 1 мкл, образец вводили в режиме разделения потоков 5:1. Хроматографическое разделение смеси МЭЖК выполняли в изотермическом режиме при 200°C. Для идентификации ЖК использовали библиотеку масс-спектров NIST 08 и стандартную смесь МЭЖК (Supelco 37 Component FAME Mix, США), а также расчет времени удерживания по эквивалентной длине цепи. Относительное содержание ЖК определяли методом внутренней нормализации – в весовых процентах (% вес.) от общего их содержания в исследуемом образце, с учетом коэффициента отклика ЖК. Абсолютное содержание суммарных МЭЖК определяли взвешиванием с помощью электронных весов GR-120 (A&D Company Ltd., Япония), образец высушивали до постоянного веса.

Расчет интегральных показателей. В качестве характеристики степени ненасыщенности ЖК использовали индекс двойной связи (ИДС) (Lyons et al., 1964):

(формула 1)

$$\text{ИДС} = \frac{\sum P_j \cdot n_j}{100},$$

где P_j – содержание кислоты (% вес.) и n_j – число двойных связей в каждой кислоте.

Активность Δ^9 -, Δ^{12} - Δ^{15} -десатураз, отвечающих за введение двойных связей в углеводородные цепи ЖК, оценивали с помощью стеароил-десатуразного (SDR), олеоил-десатуразного (ODR), рассчитанных по модифицированным формулам (Cartea et al., 1998), учитывая при этом, что олеиновая кислота является предшественником в биосинтезе таксолеиновой (C18: $\Delta^5,9$) и пиноленовой (C18:3 $\Delta^5,9,12$) кислот.

(формула 2)

$$\text{SDR} = \frac{\%C18:1\Delta^9}{\%C18:0 + \%C18:1\Delta^9 + \%C18:2\omega_6 + \%C18:2\Delta^5,9},$$

(формула 3)

$$\text{ODR} = \frac{\%C18:2\omega_6 + \%C18:2\Delta^5,9 + \%C18:3\omega_3 + \%C18:3\Delta^5,9,12}{\%C18:1\Delta^9 + \%C18:2\omega_6 + \%C18:2\Delta^5,9 + \%C18:3\omega_3 + \%C18:3\Delta^5,9,12},$$

2.2.4. Изучение и идентификация липидов тканей *in vitro* при помощи тонкослойной хроматографии

Подготовка пластинок ТСХ. Для разделения липидов методом ТСХ использовали высокоэффективные хроматографические пластинки Sorbfil ПТСХ-АФ-В (Россия) с алюминиевой подложкой, неподвижная фаза – силикагель СТХ-1ВЭ, зернение 8-12 мкм, толщина слоя сорбента 80-100 мкм. Перед использованием пластинку подвергали очистке ацетоном в качестве элюента, а затем высушивали в сушильном шкафу при 120 °С в течение 30 мин.

2.2.4.1. Изучение состава нейтральных липидов тканей клеточной культуры *L. sibirica*

Состав нейтральных липидов анализировали методом одномерной тонкослойной хроматографии в системе для НЛ: гексан:диэтиловый эфир:уксусная кислота (80:20:1 v/v/v) (Malins and Mangold, 1960). Для визуализации зон отдельных типов липидов хроматограммы опрыскивали 10%-ной серной кислотой в этаноле с последующим нагреванием при 180 °С до проявления пятен.

Идентификация и количественный анализ. Идентификацию отдельных фракций НЛ проводили с использованием соответствующих стандартов (Supelco, США) и значений Rf (Retention factor, фактор удерживания вещества, который является соотношением расстояния, которое прошло вещество, к расстоянию, которое прошел элюент за единицу времени), взятых из литературных источников (Kates, 1986). Количественное определение НЛ проводили методом денситометрии (сканер Hewlett-Packard, США), при помощи программного обеспечения Scion Image (Scion Corporation, США, 2000).

Абсолютное содержание отдельных НЛ ($P_{\text{ГНЛ}}$) рассчитывали исходя из их общего веса НЛ (мг/г сух. веса) ($P_{\text{НЛ}}$) в образце и процентного содержания каждой группы НЛ ($C_{\text{ГНЛ}\% \text{отн}}$) по формуле:

(формула 4)

$$P_{\text{ГНЛ}} = \frac{P_{\text{НЛ}} \cdot C_{\text{ГНЛ}\% \text{отн}}}{100}$$

2.2.4.2. Изучение состава стерина тканей клеточной культуры *L. sibirica*

Стерины выделяли и идентифицировали с помощью метода ТСХ. Для этого фракцию суммарных липидов перерастворяли в 200 мкл хлороформа и наносили тонкой полосой на пластинку Sorbfil ПТСХ-АФ-В (Россия), операцию повторяли дважды. Пластинку помещали в камеру заполненную элюентом для

НЛ: гексан:диэтиловый эфир:уксусная кислота (80:20:1 v/v/v) (Malins and Mangold, 1960). После того как элюент доходил до края пластины, ее вынимали из камеры и просушивали. Для идентификации стеринов и их эфиров край пластины обрабатывали 10% раствором серной кислоты в этаноле и нагревали на плитке при 180 °С. Стерины и их эфиры проявлялись на пластинке розово-голубыми пятнами. Были рассчитаны значения Rf для стеринов (Rf=0,19) и их эфиров (Rf=0,94), которые совпадали со значениями рассчитанными Rf для стандартов (холестерин, стигмастерин, кампестерин и β-ситостерин), а также с табличными значениями (Kates, 1986). Далее с необработанной пластины шпателем снимали сорбент с зон стеринов и эфиров стеринов и переносили в центрифужные пробирки (10 мл), добавляли 1,5 мл хлороформа. Стерины экстрагировали с помощью ультразвуковой ванны (Bandelin Sonorex, Германия) в течение 15 мин и далее центрифугировали 5 мин при 3000 об./мин. Экстракт переносили в стеклянные виалы. Хлороформ из виал удаляли под током азота, чтобы избежать окисления. Для полноты выделения стеринов и их эфиров, к сорбенту, оставшемуся в пробирке, добавляли 1,5 мл этилацетата и повторяли экстракцию дважды. К полученным стеринам и их эфирам добавляли эргостерол (20 мкг) (Sigma, США) – стерин, не встречающийся в наших объектах, в качестве внутреннего стандарта. Для получения летучих производных, необходимых для анализа методом ГХ-МС, стерины и эфиры стеринов, подвергали модификации – силилированию путем обработки N,O-бис-(триметилсилил)трифторацетамидом с триметилхлорсиланом (200 мкл) (Fluka, США).

ГХ-МС анализ. Анализ полученных триметилсилильных производных стеринов проводили методом газожидкостной хроматографии с использованием хромато-масс-спектрометра 7890A/7000 GC/MS Triple Quad Agilent Technologies (США). Детектор – трехквadrupольный масс-спектрометр (в режиме квадруполь), способ ионизации - электронный удар, энергия ионизации 70 эВ, для анализа использовали режим регистрации полного

ионного тока (SCAN). Для хроматографического разделения использовали капиллярную колонку HP-5MS (30 м × 250 мкм × 0,25 мкм) со стационарной фазой метилполисилаксан (неподвижная фаза). Газ-носитель (подвижная фаза): гелий, скорость потока газа 1 мл/мин. Температура испарителя 250 °С, источника ионов 230 °С, детектора 150 °С, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, 280 °С. Диапазон сканирования 50-600 а.е.м. Объем вводимой пробы – 1 мкл, делитель потока 5:1.

Идентификация и количественный анализ. Идентификацию свободных стерина и их эфиров проводили с использованием стандартов целевых компонентов сравнением времени удерживания. В качестве стандартов использовали холестерин, стигмастерин, кампестерин (Sigma, США) и бетаситостерин (European pharmacopoeia reference standard, Франция). При необходимости использовали библиотеки масс-спектров NIST08, Wiley7. Количественный анализ целевых компонентов проводили методом внешней калибровки с учетом отклика внутреннего стандарта по формуле:

(формула 5)

$$C_{\text{СТЕРИНА}} = \frac{C_{\text{СТ}} \cdot S_{\text{СТЕРИНА}}}{a \cdot S_{\text{СТ}} + b \cdot S_{\text{СТЕРИНА}}},$$

где $C_{\text{СТЕРИНА}}$ – концентрация искомого стерина, $C_{\text{СТ}}$ – концентрация стандарта, $S_{\text{СТЕРИНА}}$ – площадь искомого стерина, $S_{\text{СТ}}$ – площадь стандарта, а и b – поправочные коэффициенты.

2.2.4.3. Изучение состава фосфолипидов тканей клеточной культуры

L. sibirica

ФЛ количественно определяли с помощью аналитической тонкослойной хроматографии по неорганическому фосфору методом Васьковского (Vaskovsky et al., 1975). Для этого на ТСХ пластинку наносили экстракт липидов. Для разделения липидов использовали двумерную систему: первое направление - хлороформ:метанол:28%NH₄OH:бензол (65:30:10:5 v/v/v/v), второе направление - хлороформ:метанол:ацетон:уксусная кислота:вода:бензол

(70:30:5:4:1:10 v/v/v/v/v/v). После разделения смеси липидов, ФЛ обнаруживали обработкой 10% серной кислотой в этаноле с последующим нагреванием пластинки при 180 °С до проявления пятен. Силикагель из зон, содержащих разделенные ФЛ, переносили микрошпателем в жаростойкие пробирки, добавляли в каждую 0,05 мл 72% хлорной кислоты. Для холостых проб брали силикагель, взятый с чистого участка нижней части хроматограммы, с площади, равной средней величине хроматографической зоны. Сжигание проводили на песчаной бане при 180-200 °С в течении 20 мин. После охлаждения в пробирки вносили по 0,45 мл рабочего реагента (см. ниже). Далее смесь в пробирке подвергали перемешиванию с помощью ультразвуковой ванны (Bandelin Sonorex, Германия). Пробирки помещали на кипящую водяную баню на 15 мин, охлаждали, силикагель удаляли центрифугированием (10 минут 700 g) и измеряли величину оптической плотности при 815 нм (спектрофотометр УФ-ВИД – Specord S100, Analitic Jena, Германия). Количество фосфора в ФЛ определяли по калибровочной кривой, используя для ее построения аликвотные части стандартного раствора фосфата (Na_2HPO_4), содержащего от 0,1 до 0,5 мкг фосфора также путем измерения величины оптической плотности. Для перерасчета использовали коэффициенты, которые представляют собой отношение молекулярной массы каждого ФЛ к атомной массе фосфора. В данном исследовании использовали пересчет фосфора в ФЛ путем умножения на средний коэффициент 25 (Новицкий и др., 2011).

Идентификация ФЛ. Для обнаружения и идентификации ФЛ в растительном материале использовали специфические реагенты: для фосфорсодержащих компонентов молибденовый синий (Vaskovsky et al., 1975), для аминокислотсодержащих липидов – 0,2% -ый раствор нингидрина в ацетоне (Kates, 1986), пластинки проявляли над водяным паром кипящей водяной бани. Кроме того, были использованы стандарты ФЭ, ФГ, ФХ (Sigma, USA) и ФС, ФИ, ФК (Serva, Germany).

Рабочий реагент. К 5,5 мл исходного молибдатного реагента добавляли 26 мл 1N серной кислоты и доводили объём до 100 мл дистиллированной водой (реагент использовали в течение недели) (Vaskovsky and Latyshev, 1975).

Исходный молибдатный реагент. К 10 г молибдата натрия добавляли к 60 мл 4N HCl, гидрозин солянокислый 0,4 г добавляли к 14 мл 4N HCl, два реактива объединяли и нагревали 20 мин на кипящей водяной бане, добавляли к холодному раствору 14 мл концентрированной серной кислоты и доводили объём до 100 мл дистиллированной водой (реактив хранился в посуде из темного стекла при комнатной температуре несколько месяцев) (Vaskovsky and Latyshev, 1975).

2.2.4.4. Изучение состава гликолипидов тканей клеточной культуры

L. sibirica

Гликолипиды количественно определяли с помощью аналитической тонкослойной хроматографии по методу Дюбуа (по галактозе) (Dubois et al., 1956), в модификации Роугахана и Батта (Roughan and Batt, 1968). Для этого на ТСХ пластинку наносили экстракт суммарных липидов. Для разделения липидов использовали одномерную систему ацетон – бензол – вода (91:30:8 v/v/v) (Нестеров и др., 2009; Богданова и др., 2020). После разделения смеси липидов, гликолипиды проявляли в парах йода. Идентификацию пятен проводили с помощью стандартов МГДГ и ДГДГ (Sigma, США). Силикагель из зон, содержащих разделенные МГДГ и ДГДГ, переносили микрошпателем в центрифужные пробирки. Для холостых проб брали силикагель, взятый с чистого участка нижней части хроматограммы, с площади, равной средней величине хроматографической зоны. В пробирку добавляли 1 мл 2% раствора фенола, немедленно приливали 4 мл концентрированной серной кислоты и интенсивно встряхивали. Через 15 минут силикагель осаждали центрифугированием (5 мин при 2000 об./мин). Измеряли величину оптической плотности при 480 нм (спектрофотометр УФ-ВИД – Specord S100, Analytic Jena, Германия). Количество галактозы в гликолипидах определяли по

калибровочной кривой, используя для ее построения аликвотные части стандартного раствора галактозы (РеаХим, Россия), содержащего от 2 до 50 мкг галактозы путем измерения величины оптической плотности. Для перерасчета использовали коэффициенты, которые представляли собой отношение молекулярной массы МГДГ и ДГДГ к молекулярной массе галактозы.

2.3. Статистический анализ

В таблицах представлены средние данные шести независимых экспериментов и их стандартные отклонения для каждой анализируемой клеточной линии как эмбриогенной, так и неэмбриогенной. Каждую эмбриогенную и неэмбриогенную линию считали биологической повторностью. Анализ достоверности различий изучаемых параметров проводили между каждой эмбриогенной и неэмбриогенной линиями. Кроме того, отдельно оценивали средние значения, их стандартные отклонения и достоверность различий между двумя типами (группами) клеточных линий: эмбриогенными и неэмбриогенными. При сравнении этих двух групп клеточных линий, полученные данные представляли в виде средней арифметической или медианы (Me), а разброс значений – в виде стандартного отклонения или интерквартильной широты [25%; 75% процентиль]. С помощью критерия Шапиро-Уилка проверяли нормальность распределения. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. При нормальном распределении для доказательства наличия значимых различий между средними использовали парный двухвыборочный t-тест. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием пакета статистического анализа в среде Microsoft Office Excel 2010 и SigmaPlot 12.5.

Для отличающихся от нормального распределения данных наличие значимых различий рядами данных доказывали с помощью теста Манна-Уитни.

Для подтверждения значимости обнаруженных различий в ЖК-составе у изученных клеточных линий лиственницы был проведен кластерный анализ

данных, использованием пакета статистического анализа в среде Microsoft Office Excel 2010 и программы STATISTICA V-10.0 (StatSoft Inc., США). Использовали иерархический подход на основе методов дальнего и ближнего соседа, эвклидовы расстояния; вероятностный подход на основе расчета K-средних и корреляционный анализ. Для оценки достоверности коэффициента корреляции использовали t-критерий.

Глава 3. Результаты и обсуждение

Как уже говорилось выше, биотехнология получения соматических зародышей остается трудной задачей для большинства видов хвойных, в том числе произрастающих на территории России (Третьякова и Барсукова, 2012; Третьякова и др., 2012). Эти трудности вызваны недостатком сведений об условиях и механизмах индукции соматического эмбриогенеза у голосеменных растений. Известно, что генетически детерминированный эмбриогенный потенциал реализуется через клеточную компетентность (Тимофеева и Румянцева, 2012). Состояние такой компетентности может быть охарактеризовано особенностями биохимического состава клеток растений, включая изменчивость качественного и количественного состава клеточных липидов и входящих в их состав жирных кислот (ЖК) при изменениях внешних (окружающая среда) и внутренних (процессы роста и развития) факторов.

В работах (Svobodova et al., 1999; Grigova et al., 2007) показано увеличение содержания суммарных липидов и изменение содержания ЖК в процессе созревания соматических эмбрионов ели обыкновенной, что, с точки зрения авторов, указывает на важную роль липидов, в том числе ЖК, в эмбриональном развитии. Авторы пришли к выводу, что количество и состав суммарных липидов каллусов, необходимых для эмбрионального развития, могут помочь оценить компетентность соматических зародышей для завершения последующих этапов развития. Известно также, что нарушение синтеза различных липидов вызывает дефекты клеточного деления, нарушения дифференциации и органогенеза (Diener et al., 2000; Nobusawa et al., 2013; Tejos et al., 2014 и др.).

Абсолютное количество липидов и их качественный и количественный анализ, в том числе ЖК-состав суммарных липидов клеточных линий лиственницы сибирской у эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий может дать важную информацию об особенностях липидного обмена в этих типах тканей.

3.1. Содержание суммарных липидов и основных липидных групп в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях *L. sibirica*

Увеличение содержания липидов в ходе эмбриогенеза и созревания зародышей показано в работах (Svobodova et al., 1999; Grigova et al., 2007; Pescador et al., 2012). В процессе созревания зародышей, также установлены различия в накоплении и синтезе жирных кислот на разных стадиях развития зародышей на примере каллусов *Acca sellowiana* (O. Berg.) (Pescador et al., 2012). В ходе эмбриогенеза имеет значение содержание отдельных липидных классов (НЛ, ГЛ, ФЛ) и их составляющих, таких как стерины (Deng et al., 2016), ФИ (Meijer and Munnik, 2003), ТГ (Attree et al., 1992) и других. Различия в липидном профиле эмбрионных и неэмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской могут говорить о том, что в клеточных линиях с разным эмбрионным потенциалом (с разной способностью клеточной культуры образовывать соматические эмбриониды) протекают разные процессы.

Результаты сравнительного анализа содержания суммарных липидов, а также отдельных групп липидов (НЛ, ГЛ, ФЛ) в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской приведены в таблице 1. Как видно из представленных данных, абсолютный вес липидной фракции у отдельных клеточных линий существенно различался: от 35,8 мг/г сухого веса для Кл23 до 55,2 мг/г сухого веса для Кл6, что составляло 3,6% и 5,5% сухого веса, соответственно. При этом абсолютное содержание суммарных липидов в эмбрионных линиях было достоверно выше, чем в неэмбрионных. Полученные в отношении эмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской результаты согласуются с литературными данными по содержанию липидов в эмбрионных тканях других видов (Grigova et al., 2007; Pescador et al., 2012), хотя следует отметить, что содержание липидов в этих тканях характеризуется высокой вариативностью. Так, авторами (Grigova et al., 2007) показано, что содержание суммарных липидов в пролиферирующей эмбрионально-суспензорной массе *Picea abies* доходило до 24% сухого веса.

Содержание суммарных отдельных групп липидов в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской

Липиды		Клеточные линии							
		Кл4(э)	Кл6(э)	Кл2(э)	Кл10(э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)	ΣЭ Кл	ΣНЭ Кл
НЛ	мг/г с.в.	17,9 ± 3,3 ^{а,б}	20,0 ± 4,9 ^{а,б}	24,5 ± 4,8 ^{а,б}	18,0 ± 2,6 ^{а,б}	12,7 ± 0,6 ^а	13,1 ± 0,5 ^б	19,85 [16,0;23,7]*	12,9 [12,5;13,4]
	% от Σлипидов	41,1	36,2	48,9	39,6	35,5	33,7	-	-
ГЛ	мг/г с.в.	19,2 ± ±4,5 ^в	25,7 ± 4,3 ^в	19,9 ± ±4,4 ^в	19,2 ± 3,6 ^в	17,4 ± 3,9 ^в	20,5 ± 0,4 ^в	20,7 [16,5;24,2]**	19,0±3,0**
	% от Σлипидов	44,3	46,6	39,9	42,2	48,6	52,7	-	-
	% от ΣПЛ	74,8	73	78,3	69,8	75,3	79,8	-	-
ФЛ	мг/г с.в.	6,5 ± 1,1 ^в	9,5 ± 2,2 ^в	5,5 ± 1,9 ^в	8,3 ± 2,4 ^в	5,7 ± 1,6 ^в	5,2 ± 0,2 ^в	7,4 [5,6;9,2]	5,5±1,1
	% от Σлипидов	14,9	17,2	11	18,2	15,9	13,4	-	-
	% от ΣПЛ	25,2	27	21,7	30,2	24,7	20,2	-	-
Сумма липидов		43,6 ± 3,3 ^{а,б}	55,2 ± 4,5 ^{а,б}	49,9 ± 2,1 ^{а,б}	45,5 ± 4,2 ^{а,б}	35,8 ± 2,7 ^а	38,9 ± 0,6 ^б	48,6 ± 5,4*	37,4± 2,2

Примечания. НЛ – нейтральные липиды, ГЛ – гликолипиды, ФЛ – фосфолипиды, ПЛ – полярные липиды, э – эмбрионные линии, нэ – неэмбрионные линии, с.в. – сухой вес клеточной линии. n=6, в таблице приведены средние значения и их стандартные отклонения, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{а,б,в} – различия между Кл23 и всеми эмбрионными линиями (^а), различия между Кл31 и всеми эмбрионными линиями (^б), различия между ГЛ и ФЛ у всех клеточных линий (^в) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Для данных по суммарному содержанию отдельных групп липидов у линий, различающихся по способности к эмбриогенезу ΣЭ Кл и ΣНЭ Кл представлены средние значения и их стандартные отклонения (в случае нормального распределения) или Me с планками погрешностей 25% и 75% процентилями, *,** - наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия и U-критерия Манна–Уитни. Различия между средними значениями для двух типов линий считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Для эмбриональной массы, полученной из зиготических зародышей *Asca sellowiana* содержание липидов на семядольной стадии развития зародышей составило 16-20% сухого веса (Pescador et al., 2012). Однако, на стадии пролиферации эмбрионально-суспензорной массы (стадии, на которой проводилось изучение клеточных линий *L. sibirica*), авторами (Pescador et al., 2012) показано, что содержание липидов составило 1-3% сухого веса. По-видимому, такое довольно высокое абсолютное содержание липидов характерно для каллусной культуры древесных растений.

При изучении абсолютного содержания НЛ, как и для суммарных липидов, было обнаружено достоверно высокое содержание НЛ для эмбриогенных клеточных линий по сравнению с неэмбриогенными: 17,9–24,5 мг/г сухого веса для эмбриогенных линий и 12,7–13,1 мг/г сухого веса для неэмбриогенных линий. Такое же соотношение было отмечено (Reidiboym-Talleux and Grenier-De March, 1999) для каллусов *Prunus avium*, для которых у трех эмбриогенных линий каллусов показано более высокое содержание НЛ, по сравнению с неэмбриогенными линиями.

Абсолютное содержание ФЛ составляло – 5,5-9,5 мг/г сухого веса для эмбриогенных и 5,2-5,7 мг/г сухого веса для неэмбриогенных клеточных линий, соответственно. При этом наиболее высоким содержанием ФЛ среди эмбриогенных клеточных линий отличалась линия Клб (9,3 мг/г сухого веса), а наименьшим линия Кл2 (5,5 мг/г сухого веса). При сравнении с литературными данными можно видеть, что суммарное содержание ФЛ в клеточных линиях листовенницы сибирской заметно ниже по сравнению с содержанием этого класса липидов в каллусной культуре других видов. Так, для айвы бенгальской (*A. marmelos*), этот показатель составил – 14,5-16,0 мг/г сухого веса для неморфогенных каллусов (Bhardwaj et al., 1995), а для неморфогенных каллусов дурмана индийского (*D. innoxia*) содержание ФЛ составляло 15,1 мг/г сухого веса (Manoharan et al., 1987). Вероятно, более низкое по сравнению с каллусной

культурой *A. marmelos* и *D. innoxia* содержание ФЛ в клеточных линиях листовенницы сибирской является видоспецифическим признаком.

Что касается ГЛ, то в представленных в таблице 1 данных можно отметить, что абсолютное содержание ГЛ во всех клеточных линиях было достоверно выше, чем абсолютное содержание ФЛ. При этом наиболее высоким содержанием ГЛ среди клеточных линий отличалась линия Кл6 (25,7 мг/г сухого веса), а наименьшим линия Кл23 (17,4 мг/г сухого веса) (табл. 1). В целом содержание ГЛ в клеточных линиях листовенницы сибирской значительно выше и по сравнению с результатами, полученными для каллусной культуры *A. Marmelos*. Содержание ГЛ в каллусах *A. Marmelos* составляло – 1,6-2,7 мг/г сухого веса для неморфогенных и 3,3 мг/г сухого веса для морфогенных (Bhardwaj et al., 1995). Для каллусов *D. innoxia*, содержание ГЛ было 6,0 мг/г сухого веса для неморфогенных и 11,3 мг/г сухого веса для морфогенных калусов (Manoharan et al., 1987), что также значительно ниже значений, полученных нами. Вероятно, высокое содержание ГЛ в клеточных линиях листовенницы сибирской по сравнению с каллусной культурой *A. marmelos* и *D. innoxia* также является видоспецифическим признаком. На содержание липидов, в том числе ГЛ, по-видимому, влияет не только специфика вида растения, но и тип используемого для получения культуры растительного материала, другими словами тип экспланта. Например, в каллусах пшеницы сорта Скала (*T. aestivum* L.), где в качестве экспланта использовали зрелые зародыши, содержание ГЛ составляло 13% от суммы полярных липидов и содержание фосфолипидов 87% от суммы полярных липидов (Дударева и др., 2014; Дударева и др., 2016), а в плазмалемме каллусов, полученных из незрелых зародышей яровой пшеницы сорта Равета, содержалось больше гликолипидной фракции – 55% от суммы полярных липидов и 45% от суммы полярных липидов фракции ФЛ (Gzyl-Malcher et al., 2017). В другой работе (Filek et al., 2005) показаны и отличия для эмбриогенных и неэмбриогенных каллусов озимой пшеницы, полученных из незрелых

соцветий сорта Камила. Содержание ГЛ в пластидах неэмбриогенных каллусах составило 62,3%, а для эмбриогенных каллусов 44,5%.

Таким образом, установлено, что для эмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской характерно более высокое содержание суммарных липидов, чем для неэмбриогенных. Показано также, что у всех клеточных линий преобладают НЛ и ГЛ. Однако, для эмбриогенных линий содержание НЛ и ФЛ выше, чем для неэмбриогенных линий. Вероятно, именно эти группы липидов (НЛ и ФЛ) в большей степени участвуют в процессах роста и развития в процессе культивирования лиственницы сибирской, за счет таких соединений как: ТГ, ДГ, свободных стероидов, жирных кислот, ФИ, ФЭ, ФХ.

3.2. Жирнокислотный состав суммарных липидов

Жирные кислоты, как уже говорилось ранее, являются основными структурными компонентами мембранных липидов, а также входят в состав запасных липидов, в особенности ТГ (Cheng et al., 2016). Липиды чутко реагируют на стрессовые воздействия, изменяя свой жирнокислотный состав (Li et al., 2016). Помимо этого, все больше в последнее время уделяется внимание исследованиям об участии жирных кислот, в том числе с очень длинной цепью (ЖКОДЦ), в росте и развитии растений. Например, ФЛ и сфинголипиды вместе с входящими в их состав ЖКОДЦ участвуют в создании структуры мембран и их динамике, способствуя регуляции размеров клеток, а также их делению и дифференциации (Жуков, 2018). А в работе (Mei et al., 2015), показано накопление олеиновой кислоты в быстрорастущей суспензионной культуре *A. thaliana*. Однако, результаты изучения особенностей состава ЖК и количества суммарных липидов в ходе отдельных стадий соматического эмбриогенеза хвойных представлены в немногочисленных работах (Svobodova et al., 1999; Grigova et al., 2007; Макаренко и др., 2014). Поэтому, при изучении липидного обмена клеточных линий с разным эмбриогенным потенциалом, представлялось важным изучить их качественный и количественный ЖК состав, знание которого, может помочь оценить

компетентность соматических зародышей для завершения последующих этапов развития в ходе эмбриогенеза лиственницы сибирской.

Таблица 2

ЖК-состав (% от суммы кислот) суммарных липидов эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской *L. sibirica*

ЖК	Клеточные линии						
	Эмбриогенные линии					Неэмбриогенные линии	
	Кл4	Клб	Кл2	Кл10	Кл5	Кл23	КлЛ
С16:0	13,1±0,5	9,1±0,7	9,9±1,0	18,1±0,6	16,0±0,7	20,9±1,3	21,7±0,6
изо С17:0	3,2±0,1	1,2±0,1	1,8±0,2	1,7±0,1	2,6±0,2	3,1±0,8	4,8±0,3
С18:0	5,0±0,2	2,0±0,3	2,2±0,2	3,8±0,1	2,2±0,2	3,2±0,3	2,6±0,2
С18:1Δ9	36,5±0,5 ^{а,б}	56,5±0,9 ^{а,б}	55,2±1,8 ^{а,б}	32,5±0,9 ^{а,б}	32,1±0,7 ^{а,б}	12,0±1,5 ^б	14,8±0,3 ^а
С18:2Δ5,9	7,2±0,2 ^{а,б}	7,1±0,2 ^{а,б}	6,6±0,1 ^{а,б}	4,6±0,2 ^{а,б}	3,8±0,2 ^{а,б}	1,7±0,2 ^б	1,6±0,2 ^а
С18:2Δ9,12	16,3±0,5 ^{а,б}	10,5±1,3 ^{а,б}	10,8±1,5 ^{а,б}	25,1±1,0 ^{а,б}	23,1±0,9 ^{а,б}	40,1±3,2 ^б	34,2±0,8 ^а
С18:3Δ5,9,12	2,9±0,1 ^{а,б}	0,4±0,2 ^{а,б}	0,4±0,1 ^{а,б}	2,7±0,3 ^{а,б}	2,1±0,2 ^{а,б}	6,7±1,0 ^б	6,1±0,1 ^а
С18:3Δ9,12,15	3,4±0,1	2,7±0,3	4,7±0,3	4,5±0,1	4,9±0,3	6,2±0,5	3,9±0,1
С20:0	2,5±0,3	1,1±0,1	1,6±0,1	0,6±0,1	0,9±0,1	0,6±0,1	1,0±0,1
С20:1Δ11	0,9±0,1	0,5±0,1	1,1±0,1	н/о	2,5±0,1	н/о	0,3±0,1
С20:2Δ9,12	0,8±0,1	1,2±0,2	1,1±0,2	0,9±0,1	3,6±0,2	0,4±0,1	1,0±0,1
С20:3Δ5,11,14	3,0±0,1	1,7±0,2	0,2±0,1	1,6±0,2	2,4±0,1	1,6±0,2	2,2±0,2
С22:0	3,7±0,6	2,6±0,1	1,6±0,1	2,2±0,2	2,0±0,1	1,4±0,2	1,4±0,2
ЖК < 1%	1,5±0,1	3,4±0,2	2,8±0,2	1,7±0,1	1,8±0,1	2,1±0,2	4,4±0,3
Σ _{НЖК}	28,7±0,6 ^{а,б}	18,2±0,9 ^{а,б}	18,7±1,1 ^{а,б}	27,9±0,9 ^{а,б}	24,9±0,6 ^{а,б}	30,3±1,4 ^б	33,4±0,8 ^а
Σ _{МНЖК}	37,7±0,8 ^{а,б}	57,7±1,1 ^{а,б}	57,5±2,6 ^{а,б}	32,7±1,1 ^{а,б}	35,2±0,8 ^{а,б}	13,0±1,7 ^б	16,4±0,9 ^а
Σ _{ПНЖК}	33,6±0,4	24,1±0,6	23,8±1,9	39,4±0,9	39,9±0,5	56,7±3,4	50,2±0,9
ИДС	0,8±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1	1,2±0,1	1,2±0,1	1,4±0,1	1,3±0,1
Вес МЭЖК (мг/г, сухого веса)	34,4±3,3	54,7±5,1	41,1±0,5	56,9±3,9	63,6±1,4	27,4±3,1	32,1±1,7

Примечания. Знак «н/о» – кислота не обнаружена. «ЖК < 1%» – суммарное количество ЖК с содержанием менее 1%. Σ_{НЖК} – сумма насыщенных ЖК. Σ_{МНЖК} – сумма мононенасыщенных ЖК. Σ_{ПНЖК} – сумма полиненасыщенных ЖК. ИДС – индекс ненасыщенности, рассчитанный по формуле (1). n=6, в таблице приведены средние значения и их стандартные отклонения, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{а,б} – различия между КлЛ и всеми эмбриогенными линиями (^а), различия между Кл23 и всеми эмбриогенными линиями (^б) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

ЖК-состав суммарных липидов каллусов в культуре *in vitro* лиственницы сибирской приведен в таблице 2. В составе липидов эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий главными насыщенными кислотами были пальмитиновая (16:0), стеариновая (18:0), арахидовая (C20:0) и бегеновая (22:0). В количестве менее 1% от суммы ЖК были идентифицированы минорные насыщенные ЖК с длиной углеродной цепи C14–C17 и их изомеры.

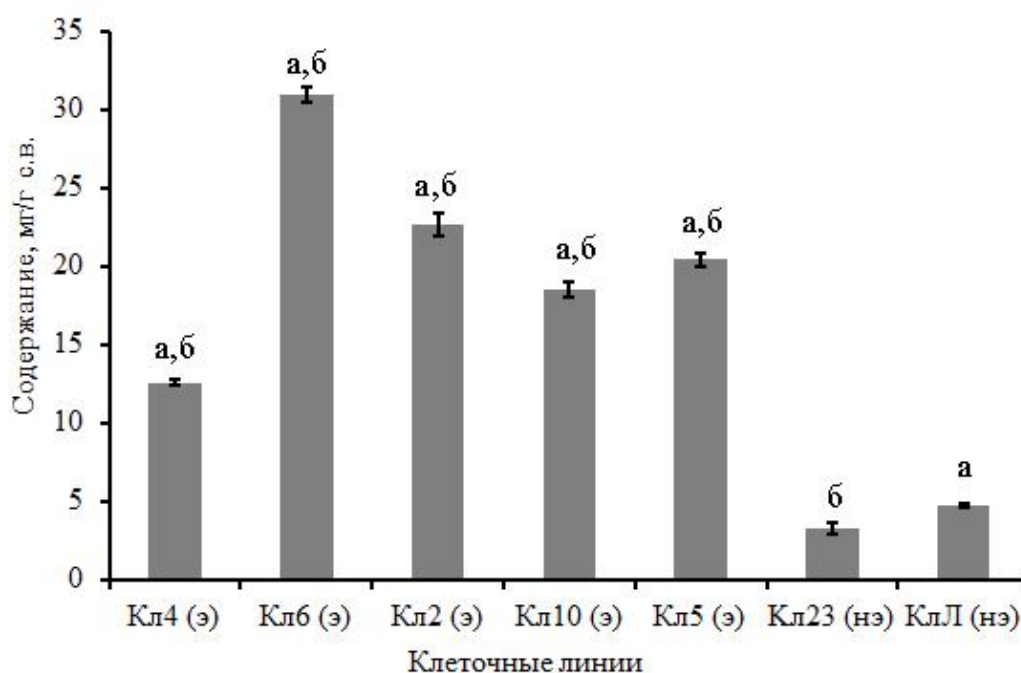


Рис. 12. Содержание олеиновой кислоты в суммарных липидах эмбриогенных (э) и неэмбриогенных (нэ) клеточных линий лиственницы сибирской.

Примечания. n=6, данные представлены средними значениями и их стандартными отклонениями, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{а,б} – различия между КлЛ и всеми эмбриогенными линиями (^а), различия между Кл23 и всеми эмбриогенными линиями (^б) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. С помощью U-критерия Манна-Уитни проведено сравнение значимости различий средних значений суммарного содержания олеиновой кислоты между двумя типами линий, различающихся по способности к эмбриогенезу, различия были статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

В составе главных ненасыщенных ЖК идентифицированы олеиновая (C18:1 Δ 9), линолевая (C18:2 Δ 9,12) и линоленовая (C18:3 Δ 9,12,15). Кроме того, были обнаружены необычные метилен-прерванные ЖК Δ 5-серии:

таксолеиновая (C18:2 Δ 5,9), пиноленовая (C18:3 Δ 5,9,12), конифероносовая (C18:4 Δ 5,9,12,15) и скиадоносовая (C20:3 Δ 5,11,14), характерные для хвойных и некоторых других таксонов (Wolff et al., 1998).

Между эмбриогенными и неэмбриогенными линиями выявлены существенные различия по ЖК-составу суммарных липидов. Так, при анализе относительного содержания насыщенных ЖК установлено, что у линий Кл2 и Кл6 содержание этих кислот было самым низким (18,7 и 18,2% соответственно). У других клеточных линий этот показатель был заметно выше – например, до 33,4% у КлЛ. Наиболее значительные отличия обнаружены в относительном и абсолютном содержании мононенасыщенных кислот, в первую очередь олеиновой. В составе ненасыщенных ЖК липидов неэмбриогенных клеточных линий относительное содержание олеиновой кислоты было 12,0–14,8%. В составе липидов эмбриогенных линий Кл2 и Кл6 с содержанием незрелых соматических зародышей до 210 шт./100 мг ЭМ относительное содержание олеиновой кислоты составляло 55,2 и 56,5%, соответственно, тогда как для каллусов Кл4, Кл5, с более высоким содержанием незрелых соматических зародышей (370 шт./100 мг ЭМ), а также для клеточной линии Кл10 уровень олеиновой кислоты был 32,1–36,5%. Данные о количестве зародышей в клеточных линиях представлены в работах (Третьякова и Барсукова, 2012; Макаренко и др., 2014). Максимальное абсолютное содержание олеиновой кислоты также наблюдали в липидах эмбриогенных линий Кл2 и Кл6 (рис. 12) – 22,7 и 30,9 мг/г сухого веса соответственно. Значительно меньшее (в 4–8 раз) содержание олеиновой кислоты было обнаружено в липидах неэмбриогенных линий КлЛ и Кл23. Эмбриогенные линии с большим количеством невызревающих зародышей – Кл4, Кл5 и Кл10 – занимали по этому показателю промежуточное положение (12,6, 20,6 и 18,5 мг/г сухого веса соответственно). Высокое содержание олеиновой кислоты в эмбриогенных клеточных линиях сопровождалось высокой активностью Δ 9-десатуразы (SDR). Ее вычисленные значения (по

формулам 2 и 3) для всех изученных линий представлены на рис. 13. Самую высокую активность Δ^9 -десатуразы наблюдали для линий Кл2 и Кл6, которые потенциально способны образовывать полноценные регенеранты.

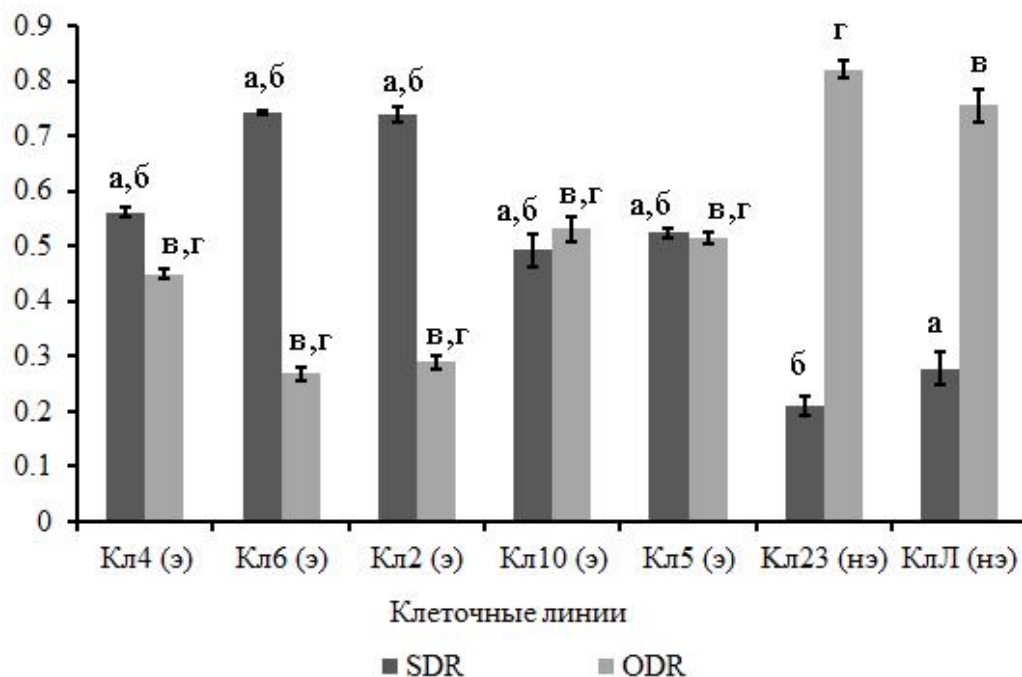


Рис. 13. Вычисленная активность Δ^9 -десатуразы (SRD) и Δ^{12} -десатуразы (ODR) в каллусной ткани клеточных линий лиственницы сибирской. SDR – стеароил-десатуразное отношение, ODR – олеоил-десатуразное отношение. Клеточные линии (Кл) – эмбриогенные (э), неэмбриогенные – (нэ).

Примечания. n=6, данные представлены средними значениями и их стандартными отклонениями, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{а,б,в,г} – различия между КлЛ и всеми эмбриогенными линиями (^а), различия между Кл23 и всеми эмбриогенными линиями (^б), различия между КлЛ и всеми эмбриогенными линиями (^в), различия между Кл23 и всеми эмбриогенными линиями (^г) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. С помощью U-критерия Манна-Уитни проведено сравнение значимости различий средних значений SDR и ODR между двумя типами линий, различающихся по способности к эмбриогенезу, различия были статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

В составе полиненасыщенных ЖК (ПННЖК) липидов неэмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской отмечали высокое относительное содержание C18:2 Δ 9,12-кислоты (40,1% для линии Кл23, 34,2% для линии КлЛ), тогда как в составе липидов эмбриогенных линий (Кл2 и Кл6) ее уровень был в 4 раза ниже и составлял 10,5–10,8% от суммы ЖК (табл. 2). Для клеточных линий Кл4, Кл5 и Кл10 содержание линолевой кислоты было ниже примерно в 1.5 раза относительно неэмбриогенных линий и составляло 16,3; 23,1 и 25,1% соответственно.

Низкое содержание C18:2 Δ 9,12-кислоты в эмбриогенных линиях, по-видимому, было обусловлено различием между двумя группами клеточных линий в активности ацил-липидной Δ 12-десатуразы (ODR), вычисленное значение которой было значительно выше для тканей неэмбриогенных линий (рис. 13), что подтверждается корреляционным анализом ($r = -0,915$; оцениваемые параметры: абсолютное содержание олеиновой кислоты и олеил-десатуразное отношение). Что касается кислот Δ 5-серии, то в липидах эмбриогенных линий (Кл2 и Кл6) помимо высокого содержания олеиновой кислоты (до 55–56%) наблюдали также довольно высокий уровень мононенасыщенной таксолеиновой кислоты (до 6,6–7,1%), в то время как в неэмбриогенных каллусах для последней он составлял лишь 1,6–1,7%. Содержание пиноленовой кислоты в липидах клеточных линий Кл2 и Кл6 составляло 0,4% от суммы ЖК, тогда как в липидах неэмбриогенных линий оно было заметно выше и достигало 6,1–6,7%. Также отмечено, что относительное содержание конифероновой кислоты было достоверно выше в неэмбриогенных клеточных линиях и составляло 0,7–0,8% (Кл23 и КлЛ) по сравнению с эмбриогенными линиями, где содержание этой кислоты варьировало от 0,2 (Кл6) до 0,5% (Кл10). Относительное содержание скиадоновой кислоты в липидах клеточных линий составляло от 0,4 до 3,6%. При этом различий между двумя типами линий по этому признаку не выявлено. Индекс ненасыщенности (ИДС) у линий с разным потенциалом эмбриогенности достоверно не

различался. Вероятно, различия, обусловленные высоким содержанием мононенасыщенных кислот в липидах эмбрионных клеточных линий, сглаживались за счет высокого уровня ПНЖК в липидах неэмбрионных линий, в основном, линолевой кислоты (C18:2 Δ 9,12).

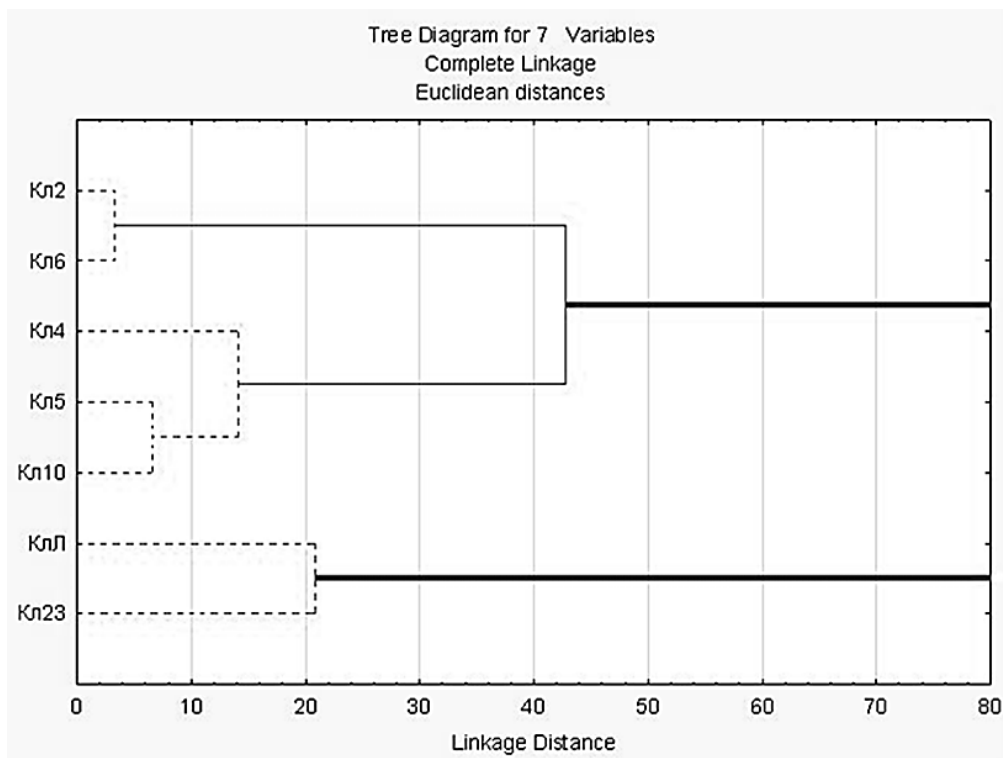


Рис. 14. Дендрограмма кластерного анализа данных по ЖК-составу суммарных липидов эмбрионных клеточных линий (Кл2, Кл6, Кл4, Кл5, Кл10) и неэмбрионных (КлЛ, Кл23) клеточных линий лиственницы сибирской (дендрограмма построена с помощью программы STATISTICA V-10.0)

Для подтверждения обнаруженных различий в ЖК-составе у изученных клеточных линий лиственницы был проведен кластерный анализ данных, представленных в табл. 2 (рис. 14). Установлено, что по исследованным показателям неэмбрионные клеточные линии КлЛ и Кл23 сходны и образуют гомогенный кластер. Анализ данных ЖК-состава липидов показал, что эмбрионные клеточные линии образовывали отдельный кластер, который включал два субкластера – первый сформировали линии Кл2, Кл6, второй – линии Кл4, Кл5 и Кл10. Как уже говорилось, линии, сформировавшие данные субкластеры, различались по продуктивности незрелых соматических

зародышей (у линий второго субкластера она была выше). Проверка устойчивости кластеризации, основанная на сравнении результатов, полученных при использовании столь непохожих алгоритмов, как методы “ближайшего соседа” и “дальнего соседа”, показала, что классификация адекватна действительности. Анализ выделенных с помощью процедуры расчета К-средних кластеров показал, что основными параметрами, определяющими межкластерные различия являются следующие: содержание C18:3 Δ 5,9,12 с уровнем значимости $p < 0,01$, и содержание C18:1 Δ 9; C18:2 Δ 5,9, а также $\Sigma_{\text{МНЖК}}$ и $\Sigma_{\text{ПНЖК}}$ с уровнем значимости $p < 0,05$ (рис. 14).

Известно, что стеароил-КоА-десатураза (Δ 9-десатураза) играет центральную роль в липидном метаболизме (Лось, 2014). Она индуцирует образование первой цис-двойной связи между 9 и 10 углеродным атомом в пальмитиновой и стеариновой кислотах, которые преобразуются в пальмитолеиновую (C16:1 Δ 9) и олеиновую кислоты (C18:1 Δ 9) соответственно. Эти ЖК являются наиболее распространенными мононенасыщенными ЖК фосфолипидов и триглицеридов. Помимо того, что эти ЖК являются компонентами липидов, они служат также посредниками в передаче сигналов, в том числе в процессах клеточной дифференциации (Dobrzyn and Ntambi, 2005). Относительно высокое содержание олеиновой кислоты было отмечено для морфогенных каллусов пшеницы *T. aestivum* L., у которых оно составляло 17,9% от суммы кислот, в то время как для неморфогенных каллусов эта величина была почти в 3 раза меньше – 7,1 от суммы кислот, в связи с этим авторы заключили, что олеиновая кислота может участвовать в процессах дифференциации (Дударева и др., 2016). В связи с этим обнаруженное нами более высокое содержание олеиновой кислоты в липидах клеточных линий с формирующимися эмбриогенными зонами представляется вполне закономерным, что возможно отражает важную метаболическую и/или регуляторную роль при соматическом эмбриогенезе в процессе образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) в культуре клеток и тканей. Следует

особо отметить, что обнаруженное нами наиболее высокое содержание олеиновой кислоты (более 30%) было характерно для эмбрионных линий (Кл4, Кл6, Кл2 и Кл10), в которых, как было показано ранее (Третьякова и Барсукова, 2012; Третьякова, 2013; Пак и др., 2016), соматические зародыши вызревают и дают регенеранты. В особенности это касается Кл4, для которой отмечено наиболее интенсивное формирование регенерантов (Пак и др., 2016).

Примером использования относительного содержания олеиновой кислоты для диагностики состояния культивируемой ткани может служить работа (Grigova et al., 2007), где авторы использовали соотношение содержания олеиновой и линолевой кислот как диагностический маркер, характеризующий степень созревания соматических зародышей в каллусах ели обыкновенной. В наших экспериментах это соотношение для эмбрионных линий листовенницы было особенно высоким у линий Кл2 и Кл6 и составляло 5,1–5,4. Для липидов эмбрионных линий Кл4, Кл5 и Кл10 это соотношение составляло 1,3–1,4, для липидов неэмбрионных линий (Кл23 и КлЛ) – 0,2.

Интересно отметить, что для клеточных линий листовенницы сибирской суммарное содержание ЖКОДЦ отличалось для групп с разным потенциалом эмбрионности. Так, содержание этих кислот было достоверно выше для эмбрионных клеточных линий (Кл4, Кл6, Кл10, Кл5), по сравнению с неэмбрионными (Кл23 и КлЛ) (табл. 2, рис. 15) (однако, эмбрионная линия Кл2 отличалась наиболее низким содержанием ЖКОДЦ среди эмбрионных клеточных линий (2,3 мг/г сухого веса) и достоверных различий с неэмбрионной линией КлЛ не имела). В работе (Trinh et al., 2019) показано, что высокие содержания ЖКОДЦ оказывают положительное влияние на формирование каллуса у *A. thaliana* и его пролиферацию. Известно, что ЖКОДЦ, входящие в состав ФЛ и сфинголипидов являются компонентами структуры мембран и участвуют в регуляции размеров клеток, а также в их делении и дифференциации (Жуков, 2018). Известно, что синтез ЖКОДЦ играет важную роль в направлении и степени растяжения клеток растений в

ходе морфогенеза (Zheng et al., 2005, Жуков, 2018). Авторами упомянутой ранее работы (Дударева и др., 2016) также отмечено, что для морфогенных каллусов содержание ЖКОДЦ достоверно выше (6,8% от суммы кислот), в отличие от неморфогенных (4,4% от суммы кислот), что авторы также связывают с процессами формирования зон вторичной дифференциации в морфогенных каллусах.

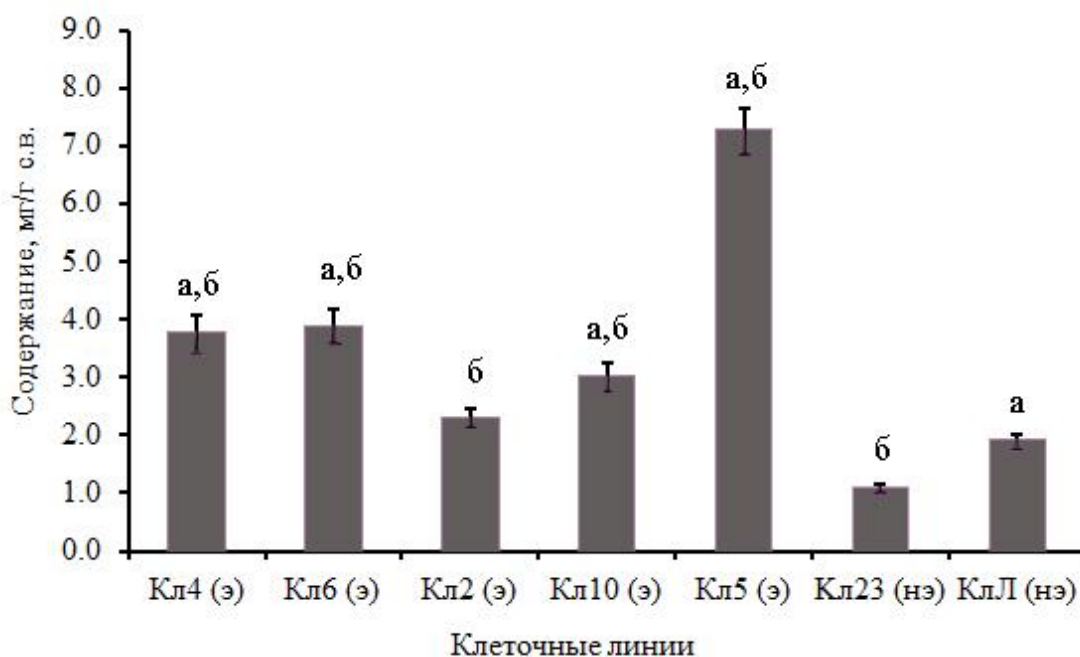


Рис. 15. Содержание ЖКОДЦ в суммарных липидах эмбриогенных (э) и неэмбриогенных (нэ) клеточных линиях лиственницы сибирской

Примечания. n=6, данные представлены средними значениями и их стандартными отклонениями, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{а,б} – различия между КлЛ и эмбриогенными линиями Кл4, Кл6, Кл10, Кл5 (^а), различия между Кл23 и эмбриогенными линиями Кл4, Кл6, Кл10, Кл5 (^б) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. С помощью U-критерия Манна-Уитни проведено сравнение значимости различий средних значений содержания ЖКОДЦ между двумя типами линий, различающихся по способности к эмбриогенезу, различия были статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Изучение ЖК-состава липидов эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий культуры *in vitro* лиственницы сибирской показало, что состав ЖК липидов клеточных линий внутри этих двух групп не имел заметных различий. В то же время между группами клеточных линий с разным

эмбриогенным потенциалом наблюдали существенную разницу по составу ЖК, особенно по содержанию олеиновой и линолевой кислот. Как уже говорилось выше, в неэмбриогенных линиях содержалось 12–15 и 34–40% олеиновой и линолевой кислот соответственно; в эмбриогенных 32–56 и 10–25% соответственно. Изменение относительного содержания ненасыщенных ЖК, в первую очередь мононенасыщенных, в липидах клеточных линий при соматическом эмбриогенезе в культуре листовенницы сибирской, вероятно, связано с процессами изменений активности ферментов – стеароил-АПБ-Δ9- и ацил-липидной-Δ12-десатураз. Показано, например, что мутация в гене *ssi2/fab2* *A. thaliana*, кодирующая стеароил-АПБ десатуразу приводит к снижению уровня олеиновой кислоты, что в свою очередь вызывает спонтанную гибель клеток у мутантов, накопление салициловой кислоты и нарушение передачи сигналов, регулируемых жасмоновой кислотой (Nandi et al., 2003). В тоже время, в аналогичной работе показано, что добавление эндогенной олеиновой кислоты предотвращает гибель клеток и восстанавливает мутант *ssi2* до фенотипа дикого типа (Kachroo et al., 2003). Также, известно, что олеиновая кислота активирует PLDδ, в процессе защиты растений от стрессовых воздействий, в частности окислительного стресса, посредством выработки ФК для снижения запрограммированной гибели клеток (Zhang et al., 2003).

Возможно, что различие в жирнокислотном составе между двумя типами линий, а именно более высокие содержания ЖКОДЦ и высокое содержание олеиновой кислоты для эмбриогенных клеточных линий, может указывать на их участие в процессах эмбриогенеза. Поскольку, как отмечено выше, олеиновая кислота положительно влияет на жизнеспособность клеток и участвует в сигналинге при стрессе (Nandi et al., 2003; Kachroo et al., 2003; Zhang et al., 2003), также известно, что олеиновая кислота накапливается при эмбриогенезе, как это показано для *Carya cathayensis* Sarg. (Huang et al., 2016). В практическом отношении высокое (32–56% от суммы ЖК) содержание

олеиновой кислоты в липидах клеточных линий может служить маркером эмбрионного потенциала при отборе перспективных клеточных линий лиственницы сибирской на стадии раннего эмбриогенеза.

3.2.1. Жирнокислотный состав НЛ, ГЛ и ФЛ

Для понимания особенностей липидного обмена в тканях *in vitro* представлялось важным определить содержание в них отдельных классов липидов и их жирнокислотный состав, в первую очередь в отношении мононенасыщенных кислот, которые, по всей вероятности, могут являться маркерами эмбрионности клеточных линий лиственницы сибирской. Одной из задач было выявление преимущественной локализации олеиновой кислоты в разных группах липидов при соматическом эмбриогенезе. Нами был определен жирнокислотный состав трех таких групп: нейтральных, глико- и фосфолипидов.

Результаты анализа ЖК-состава нейтральных, глико- и фосфолипидов представлены в табл. 3, табл. 4 и табл. 5, соответственно. Наибольшим разнообразием кислот отличались нейтральные липиды и гликолипиды (по 25 кислот в каждой фракции), в фосфолипидах было обнаружено 24 кислоты. Минорными кислотами во всех фракциях с содержанием менее 1% для всех клеточных линий были насыщенные ЖК с длиной углеродной цепи от 12 до 18 атомов углерода и их изомеры, а также ненасыщенные ЖК – пальмитолеиновая (16:1 (n-9)) и цис-вакценовая (18:1(n-7)), а также ЖКОДЦ 20:3(7,11,14). В отличие от нейтральных липидов и фосфолипидов, во фракции гликолипидов 20:2(n-6) кислота была обнаружена только для Кл31 в количестве 0,1 %. Для фосфолипидов минорными кислотами были 20:0 и 20:1(n-11). При сравнении ЖК-состава между группами липидов следует отметить наличие 22:1(n-11) кислоты только в эмбрионной Кл6 во фракции гликолипидов. Еще одной особенностью ЖК состава трех групп липидов является наличие тетраеновой ненасыщенной конифероновой кислоты (18:4Δ5,9,12,15) только в нейтральных липидах, и ее отсутствие в глико- и фосфолипидах.

ЖК-состав (% от суммы кислот) НЛ эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской *L. sibirica*

ЖК	Клеточные линии					
	Эмбриогенные линии				Неэмбриогенные линии	
	Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл2(э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)
C16:0	14,0±2,1	7,9±0,2	11,8±0,1	16,0±1,4	22,9±0,5	26,8±0,5
изо C17:0	2,8±0,2	0,4±0,0	1,5±0,1	1,5±0,1	4,1±0,2	2,0±0,1
C18:0	6,5±0,8	2,4±0,2	2,8±0,1	5,0±0,2	5,1±0,1	4,1±0,5
C18:1Δ9	43,4±8,1 ^{а,б}	60,1±3,6 ^{а,б}	61,4±6,3 ^{а,б}	37,7±3,4 ^{а,б}	16,2±1,4 ^а	20,6±0,5 ^б
C18:2Δ5,9	6,9±0,2 ^{а,б}	8,3±0,9 ^{а,б}	3,4±0,6 ^{а,б}	4,3±0,1 ^{а,б}	1,8±0,1 ^а	1,0±0,1 ^б
C18:2Δ9,12	8,9±0,9	8,5±0,8	3,4±0,1	11,4±0,7	31,8±0,5	14,7±0,5
C18:3Δ5,9,12	н/о	0,5±0,1 ^{а,б}	0,5±0,1 ^{а,б}	0,9±0,1 ^{а,б}	3,4±0,1 ^а	4,6±0,1 ^б
C18:3Δ9,12,15	1,8±0,4	2,1±0,1	н/о	2,5±0,1	4,7±0,1	2,9±0,1
C18:4Δ5,9,12,15	1,7±0,2	0,5±0,0	2,6±0,1	1,9±0,1	3,2±0,1	5,4±0,1
C20:0	2,7±0,2	1,2±0,1	2,5±0,1	1,0±0,1	1,2±0,1	2,2±0,1
C20:1Δ11	1,6±0,1	0,6±0,0	1,6±0,1	н/о	н/о	0,7±0,1
C20:2Δ9,12	2,2±0,4	1,3±0,1	4,3±0,1	0,9±0,1	1,0±0,1	0,5±0,0
C20:3Δ5,11,14	н/о	1,8±0,1	н/о	н/о	н/о	н/о
C22:0	3,3±0,2	1,8±0,2	2,5±0,1	3,5±0,2	2,1±0,2	7,5±0,5
ЖК < 1%	4,2±0,4	2,6±0,3	1,8±0,1	13,5±0,7	2,5±0,2	6,9±0,5
Σ ЖКОДЦ	9,8±0,9	6,9±0,6	10,8±1,2	5,4±0,5	5,3±0,2	11,2±1,5
ИДС	0,9±0,1	1,1±0,1	1,0±0,1	0,9±0,0	1,3±0,1	1,0±0,0
Σ нЖК	32,1±2,3	15,8±1,3	21,2±0,7	36,9±2,2	35,3±0,2	47,8±0,5
Σ мнЖК	46,4±9,8	60,9±3,9	64,5±7,2	41,2±5,0	17,8±0,2	22,9±1,5
Σ пнЖК	21,5±2,5	23,3±0,4	14,2±1,4	21,9±1,1	46,9±2,8	29,4±3,1

Примечания. Знак «н/о» – кислота не обнаружена. «ЖК < 1%» – суммарное количество ЖК с содержанием менее 1%. Σ_{нЖК} – сумма насыщенных ЖК. Σ_{мнЖК} – сумма мононенасыщенных ЖК. Σ_{пнЖК} – сумма полиненасыщенных ЖК. ИДС – индекс ненасыщенности, рассчитанный по формуле (1). n=6, в таблице приведены средние значения и их стандартные отклонения, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{а,б} – различия между Кл23 и всеми эмбриогенными линиями (^а), различия между Кл31 и всеми эмбриогенными линиями (^б) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

ЖК-состав (% от суммы кислот) ГЛ эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской *L. sibirica*

ЖК	Клеточные линии					
	Эмбриогенные линии				Неэмбриогенные линии	
	Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл2(э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)
С16:0	12,5±1,2	9,3±0,9	9,7±1,0	19,4±1,8	18,7±2,4	18,9±1,2
изо С17:0	3,1±0,4	0,4±0,0	1,7±0,0	1,9±0,2	2,3±0,2	1,8±0,0
С18:0	4,0±0,4	1,8±0,2	2,6±0,3	4,9±0,5	3,6±0,3	2,4±0,2
С18:1Δ9	34,5±3,1 ^{а,б}	50,7±3,5 ^{а,б}	55,0±5,4 ^{а,б}	32,7±3,3 ^{а,б}	10,4±1,1 ^а	19,7±0,8 ^б
С18:2Δ5,9	6,4±0,5 ^{а,б}	6,4±0,8 ^{а,б}	6,0±0,6 ^{а,б}	3,1±0,7 ^{а,б}	1,1±0,1 ^а	1,6±0,1 ^б
С18:2Δ9,12	16,3±1,5	11,7±1,6	9,5±0,9	19,0±1,1	36,3±2,7	23,1±0,4
С18:3Δ5,9,12	3,0±0,3 ^{а,б}	0,4±0,1 ^{а,б}	0,5±0,1 ^{а,б}	2,3±0,1 ^{а,б}	8,0±0,2 ^а	4,3±0,6 ^б
С18:3Δ9,12,15	5,3±0,9	3,9±0,3	7,2±0,7	8,2±0,5	11,9±1,5	10,6±1,2
С18:4Δ5,9,12,15	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
С20:0	3,6±0,2	1,3±0,1	1,8±0,1	0,8±0,1	0,6±0,1	1,6±0,1
С20:1Δ11	1,0±0,1	0,4±0,1	1,2±0,1	н/о	н/о	0,3±0,1
С20:2Δ9,12	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	0,1±0,0
С20:3Δ5,11,14	4,0±0,1	1,4±0,2	н/о	1,3±0,1	2,1±0,1	1,0±0,1
С22:0	5,5±0,3	4,8±0,5	2,0±0,2	2,7±0,3	2,3±0,3	3,8±0,3
ЖК < 1%	0,8±0,2	7,5±0,4	2,7±0,2	3,6±0,5	2,6±0,3	10,9±0,2
Σ ЖКОДЦ	14,0±0,9 ^{б,г}	10,2±0,9 ^{б,г}	5,3±0,5	5,3±0,6	5,9±0,5 ^б	6,9±0,4 ^г
ИДС	1,2±0,1	1,1±0,0	1,1±0,1	1,2±0,1	1,5±0,2	1,2±0,1
Σ нЖК	28,6±2,8	22,7±1,3	18,5±1,9	31,1±4,2	28,1±2,7	38,2±0,8
Σ мнЖК	36,3±4,2	53,3±3,8	58,0±6,6	34,5±4,2	11,6±1,3	21,1±1,2
Σ пнЖК	35,1±3,8	24,0±2,8	23,6±2,6	34,4±1,8	60,3±4,2	40,7±0,4

Примечания. Знак «н/о» – кислота не обнаружена. «ЖК < 1%» – суммарное количество ЖК с содержанием менее 1%. Σ_{нЖК} – сумма насыщенных ЖК. Σ_{мнЖК} – сумма мононенасыщенных ЖК. Σ_{пнЖК} – сумма полиненасыщенных ЖК. ИДС – индекс ненасыщенности, рассчитанный по формуле (1). n=6, в таблице приведены средние значения и их стандартные отклонения, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{а,б,в,г} – различия между Кл23 и всеми эмбриогенными линиями (^а), различия между Кл31 и всеми эмбриогенными линиями (^б), различия между Кл23 и эмбриогенными линиями Кл4 и Кл6 (^в), различия между Кл31 и эмбриогенными линиями Кл4 и Кл6 (^г) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

ЖК-состав (% от суммы кислот) ФЛ эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской *L. sibirica*

ЖК	Клеточные линии					
	Эмбриогенные линии				Неэмбриогенные линии	
	Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл2(э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)
C16:0	13,0±1,4	11,4±1,4	9,5±1,3	15,7±1,2	21,5±2,3	18,3±0,9
изо C17:0	3,6±0,3	0,5±0,1	2,0±0,1	1,7±0,3	3,2±0,3	2,8±0,3
C18:0	3,6±0,3	1,5±0,1	1,6±0,1	2,4±0,1	2,1±0,2	1,3±0,1
C18:1Δ9	34,8±4,1 ^{а,б}	58,6±3,9 ^{а,б}	53,4±5,7 ^{а,б}	31,5±3,6 ^{а,б}	11,0±1,1 ^а	19,2±1,6 ^б
C18:2Δ5,9	7,9±0,7 ^{а,б}	5,6±0,8 ^{а,б}	8,1±0,9 ^{а,б}	5,5±0,6 ^{а,б}	2,0±0,2 ^а	3,1±0,1 ^б
C18:2Δ9,12	20,9±2,5	12,9±1,4	14,3±1,1	30,6±1,8	46,5±4,6	35,7±0,6
C18:3Δ5,9,12	4,6±0,4 ^{а,б}	0,2±0,0 ^{а,б}	0,3±0,0 ^{а,б}	3,7±0,1 ^{а,б}	7,1±0,8 ^а	7,8±0,6 ^б
C18:3Δ9,12,15	1,6±0,1	1,9±0,1	3,6±0,4	3,4±0,2	2,8±0,3	4,7±0,3
C18:4Δ5,9,12,15	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
C20:0	0,8±0,1	0,5±0,0	1,1±0,1	0,2±0,0	0,3±0,0	0,7±0,0
C20:1Δ11	0,3±0,0	0,4±0,0	0,9±0,1	н/о	н/о	0,4±0,1
C20:2Δ9,12	0,9±0,1	3,2±0,0	0,8±0,0	1,4±0,1	0,4±0,0	0,2±0,0
C20:3Δ5,11,14	3,5±0,3	2,1±0,1	0,5±0,1	2,8±0,3	2,0±0,3	0,9±0,1
C22:0	1,1±0,1	0,5±0,0	0,9±0,0	1,0±0,1	0,5±0,0	2,2±0,2
ЖК < 1%	3,3±0,3	0,8±0,1	3,1±0,4	0,2±0,0	0,8±0,1	2,8±0,3
Σ ЖКОДЦ	6,6±0,4 ^{а,б}	7,2±0,5 ^{а,б}	5,1±0,2 ^{а,б}	6,1±0,5 ^{а,б}	3,5±0,4 ^а	4,6±0,3 ^б
ИДС	1,2±0,0	1,2±0,0	1,2±0,1	1,6±0,1	1,5±0,1	1,4±0,1
Σ нЖК	24,5±2,2	14,4±0,8	17,2±1,8	20,9±1,2	27,5±2,8	27,0±0,4
Σ мнЖК	36,1±3,1	59,3±5,1	54,4±5,3	31,5±3,3	11,6±1,2	20,4±1,9
Σ пнЖК	39,4±3,9	26,3±2,8	28,4±2,5	47,6±4,2	61,1±4,8	52,6±0,9

Примечания. Знак «н/о» – кислота не обнаружена. «ЖК < 1%» – суммарное количество ЖК с содержанием менее 1%. Σ_{нЖК} – сумма насыщенных ЖК. Σ_{мнЖК} – сумма мононенасыщенных ЖК. Σ_{пнЖК} – сумма полиненасыщенных ЖК. ИДС – индекс ненасыщенности, рассчитанный по формуле (1). n=6, в таблице приведены средние значения и их стандартные отклонения, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{а,б} – различия между Кл23 и всеми эмбриогенными линиями (^а), различия между Кл31 и всеми эмбриогенными линиями (^б) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Показано также, что во всех трех фракциях липидов у эмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской, в отличие от неэмбриогенных, обнаружены такие кислоты как: 18:0-и и 20:2(n-9), а также кислота 22:1(n-11) для гликолипидов. Во фракции фосфолипидов 12:0 кислота была обнаружена только в неэмбриогенных линиях.

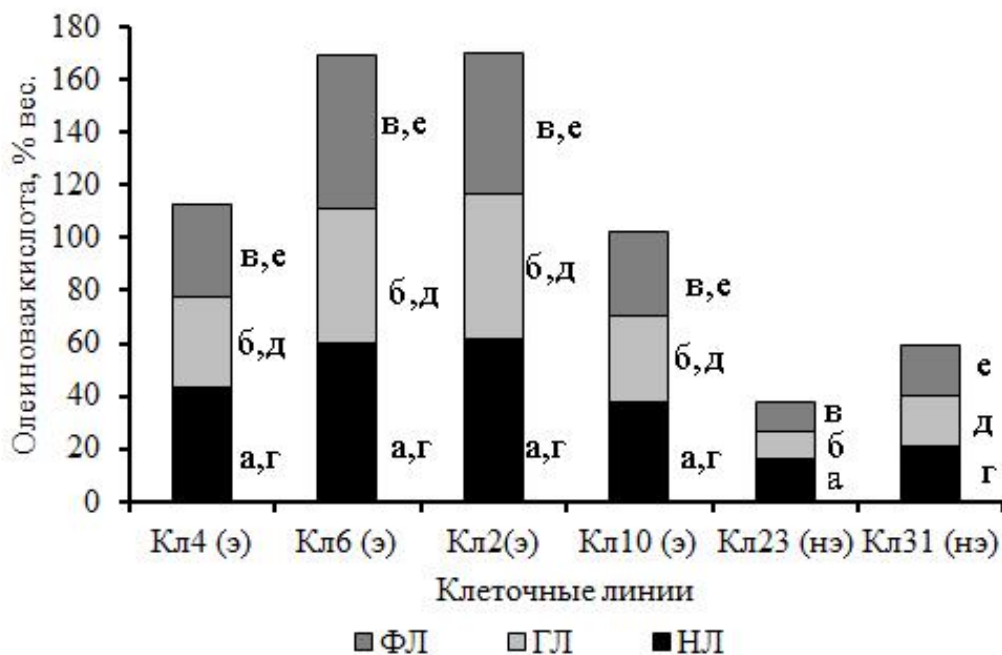


Рис. 16. Содержание олеиновой кислоты в эмбриогенных (э) и неэмбриогенных (нэ) клеточных линиях лиственницы сибирской в разных фракциях липидов

Примечания. n=6, данные представлены средними значениями и их стандартными отклонениями, наличие значимых различий рассчитано с помощью t-критерия, ^{а,б,в,г,д,е} – различия между НЛ Кл23 и всеми эмбриогенными линиями (^а), различия между НЛ Кл31 и всеми эмбриогенными линиями (^г) различия между ГЛ Кл23 и всеми эмбриогенными линиями (^б), различия между ГЛ Кл31 и всеми эмбриогенными линиями (^д) различия между ФЛ Кл23 и всеми эмбриогенными линиями (^в), различия между ФЛ Кл31 и всеми эмбриогенными линиями (^е) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. С помощью U-критерия Манна-Уитни проведено сравнение значимости различий средних значений суммарного содержания олеиновой кислоты в каждой фракции липидов между двумя типами линий, различающихся по способности к эмбриогенезу, различия были статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Особый интерес вызывает содержание мононенасыщенной олеиновой кислоты, для которой показана связь ее высокого содержания с потенциалом эмбриогенности в клеточных линиях лиственницы сибирской. При анализе содержания олеиновой кислоты в отдельных липидных фракциях показано, что количество олеиновой кислоты было достоверно выше у эмбриогенных клеточных линий во всех фракциях липидов (31,5-61,4%), по сравнению с неэмбриогенными (10,4-20,6) (табл. 3, 4, 5). Кроме того, распределение данной кислоты среди фракций внутри каждой линии носило практически равномерный характер (рис. 16). Однако, не смотря на это, можно отметить, что большая часть олеиновой кислоты содержится в полярных липидах.

Полученные результаты согласуются с литературными данными, в которых наблюдается накопление олеиновой кислоты в процессе культивирования растительных тканей и их морфогенеза. Так, авторами работы (Sahakyun et al., 2010) показано, что для каллусов *Ajuga genevensis* и *Ajuga chia* отмечено высокое содержание олеиновой и линолевой кислот для нейтральных липидов, кроме того, было показано, что в процессе культивирования идет накопление этих кислот. В работе (Reidiboym-Talleux and Grenier-De March, 1999) показано, что, ЖК-состав липидных классов *P. avium* различался между эмбриогенными и неэмбриогенными каллусами. В эмбриогенных тканях НЛ оказались менее насыщенным, чем в неэмбриогенных каллусах, и содержали больше С18:1 и С18:2, в то время как фосфолипиды неэмбриогенных каллусов *P. avium* характеризовались высокой долей С18:1 и низкой долей С18:2. Авторами другой работы (Tsai and Kinsella, 1981) также показано высокое содержание олеиновой и линолевой кислот в НЛ, в частности в ТГ, 24,4% и 23,4% от суммы кислот. Также, при изучении влияния 24-эпибрассинолида на состав жирных кислот было показано, что при добавлении этого соединения в среду культивирования каллусов масличного рапса, происходило увеличение содержания С18:1 кислоты в ДГДГ (Janeczko et al., 2009).

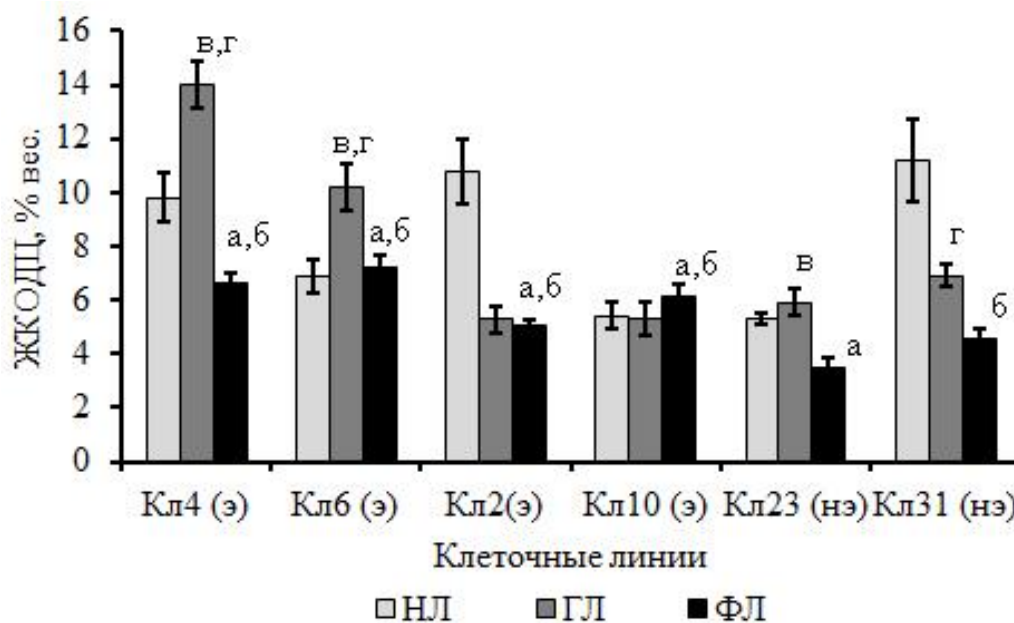


Рис. 17. Содержание суммарных ЖКОДЦ в эмбрионных (э) и неэмбрионных (нэ) клеточных линиях лиственницы сибирской в разных фракциях липидов.

Примечания. $n=6$, данные представлены средними значениями и их стандартными отклонениями, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{a,б} – различия между Кл23 и всеми эмбрионными линиями (^a), различия между Кл31 и всеми эмбрионными линиями (^б), различия между Кл23 и эмбрионными линиями Кл4 и Кл6 (^б), различия между Кл31 и эмбрионными линиями Кл4 и Кл6 (^г) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. С помощью t-критерия проведено сравнение значимости различий средних значений суммарного содержания ЖКОДЦ в разных фракциях липидов между двумя типами линий, различающихся по способности к эмбриогенезу, различия были статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Кроме того, как уже сказано ранее, известно, что олеиновая кислота накапливается при эмбриогенезе, как это показано для *Carya cathayensis* Sarg. (Huang et al., 2016), а также участвует в сигналинге при защите от патогенов (Kachroo et al., 2008). Также олеиновая кислота накапливается в семенах *Prunus sibirica* L. (Deng et al., 2019) и *Camellia oleifera* (Wu et al., 2019) и др. В целом, обнаруженное нами более высокое содержание олеиновой кислоты во всех липидных классах клеточных линий лиственницы сибирской (рис. 16) с формирующимися эмбрионными зонами представляется вполне

закономерным. Возможно, эта кислота выполняет важную метаболическую и/или регуляторную роль при соматическом эмбриогенезе в процессе образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) в культуре клеток и тканей. Например, в работе (Алаудинова и Миронов, 2009) показано, что в процессе активного морфогенеза (набухания почек весной) у ели сибирской и сосны обыкновенной происходило резкое увеличение олеиновой кислоты во фракции фосфолипидов, однако для лиственницы сибирской отмечено увеличение содержания уровней ЖКОДЦ. Действительно, в случае лиственницы сибирской, проведенными экспериментами отмечено, что для эмбриогенных линий можно наблюдать, что содержание ЖКОДЦ в фосфолипидах достоверно выше, чем для неэмбриогенных (рис. 17). Кроме того, можно отметить и достоверные различия для содержания ЖКОДЦ в гликолипидах, так для эмбриогенных линий Кл4 и Кл6 отмечены высокие уровни ЖКОДЦ. Как было сказано ранее, именно Кл4 и Кл6 являются самыми высокопродуктивными, способными формировать жизнеспособные регенеранты (Пак и др., 2016).

Распределение $\Delta 5$ -кислот по липидным фракциям показано на рис. 18. Было установлено, что суммарное содержание этих кислот выше для фракции ФЛ у эмбриогенных линий Кл4, Кл2 и Кл10, причем в Кл4 содержание $\Delta 5$ -кислот самое высокое. Для Кл6 самое высокое содержание $\Delta 5$ -кислот во фракции НЛ. Что касается неэмбриогенных линий, то для Кл23 установлено высокое содержание $\Delta 5$ -кислот для ГЛ и ФЛ, а для линии Кл31 – НЛ и ФЛ. Показано, что доля $\Delta 5$ -кислот в полярных липидах во всех фракциях и для всех клеточных линий лиственницы сибирской выше, чем доля $\Delta 5$ -кислот в НЛ.

Кроме того, установлено, что для эмбриогенных клеточных линий всех липидных фракций содержание таксолеиновой кислоты достоверно выше (НЛ: 3,4-8,3%, ГЛ: 3,1-6,4%, ФЛ: 5,5-8,1%), чем у неэмбриогенных (НЛ: 1,0-1,8%, ГЛ: 1,1-1,6%, ФЛ: 2,0-3,1%) (табл. 3, 4, 5). Для неэмбриогенных клеточных линий всех липидных фракций показано, что в них достоверно выше

содержание пиноленовой кислоты (НЛ: 3,4-4,6%, ГЛ: 4,3-8,0%, ФЛ: 7,1-7,8%), по сравнению с эмбриогенными (НЛ: 0,5-0,9%, ГЛ: 0,4-3,0%, ФЛ: 0,2-4,6%) (табл. 3, 4, 5).

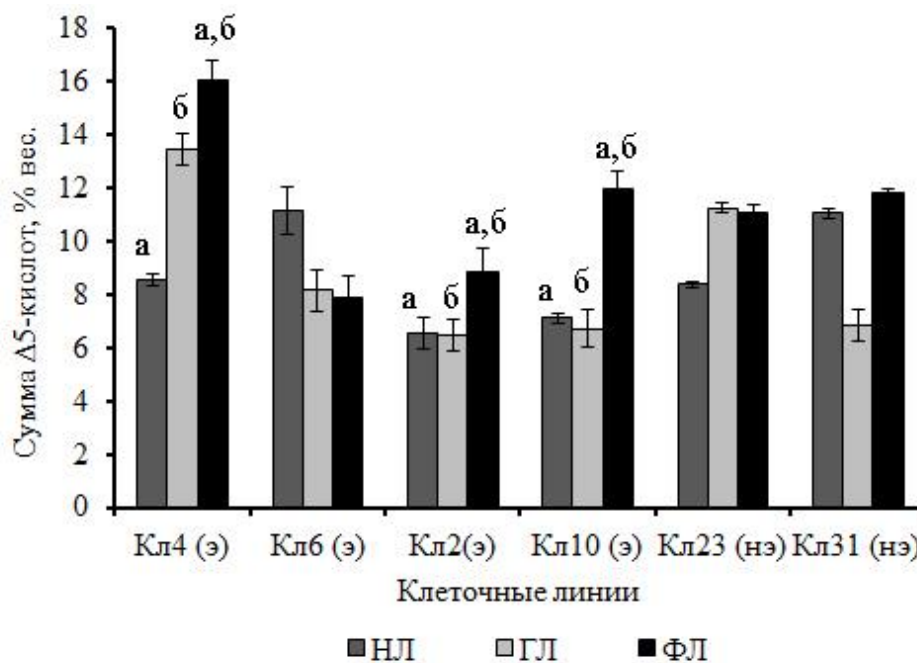


Рис. 18. Содержание суммарных Δ5-кислот в эмбриогенных (э) и неэмбриогенных (нэ) клеточных линиях лиственницы сибирской в разных фракциях липидов

Примечания. n=6, данные представлены средними значениями и их стандартными отклонениями, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{a,б} – различия между ФЛ и НЛ (^a), различия между ФЛ и ГЛ (^б) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

В литературе мало информации о содержании Δ5-кислот в каллусах хвойных растений, например, такие кислоты были обнаружены для *Pinus sibirica* и *Pinus sylvestris* (Makarenko et al., 2010), а также для каллусов *L. gmelinii* (Makarenko et al., 2005). Также авторами работы (Makarenko et al., 2005) был проведен анализ ЖК-состава нейтральных и полярных липидов неморфогенных каллусов *L. gmelinii*, в результате которого было отмечено, что НЛ отличаются большим относительным содержанием Δ5-кислот.

Таким образом, можно предположить, что жирные кислоты в составе различных липидов, в частности большее относительное содержание в эмбрионных клеточных линиях олеиновой кислоты, как компонента НЛ, ФЛ, ГЛ; ЖКОДЦ – компонента ФЛ и ГЛ, так олеиновой кислоты – компонента НЛ, ГЛ и ФЛ, играют важную роль в процессах эмбриогенеза.

3.4. Нейтральные липиды

НЛ в культуре *in vitro* листовницы сибирской занимают от 33,7 (Кл31) до 48,9% (Кл2) от суммарного содержания липидов, и выявление компонентов НЛ представляло важную часть в изучении липидного обмена *L. sibirica*. Как уже говорилось ранее, нейтральные липиды (НЛ) и жирные кислоты играют важную роль в росте и развитии растений как *in vivo*, так и *in vitro* в качестве энергетического и субстратного резерва (Feiger et al., 1989; Chapman et al., 2012; Jacomini et al., 2015). Такие соединения как ТГ и ЭС обычно служат депо для хранения жирных кислот и стероидов, соответственно. В тоже время количество ТГ и их жирнокислотный состав играют важную роль в жизнедеятельности растительного организма в целом (Chapman et al., 2012; Cunha and Fernandes-Ferreira, 2003). Такие соединения как ДГ служат субстратом для синтеза фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина по пути Кеннеди (Gibellini and Smith, 2010). Еще один важный компонент в профиле НЛ это стероиды, которые участвуют в процессах пролиферации и дифференциации клеток растений (Qian et al., 2013; Diener et al., 2000; Carland et al., 2002).

Среди НЛ клеточных линий с разным эмбрионным потенциалом идентифицированы следующие типы липидов: моноглицериды (МГ), 1,2-диглицериды (1,2-ДГ), 1,3-диглицериды (1,3-ДГ), триглицериды (ТГ), стероиды и их эфиры, свободные жирные кислоты (СЖК), метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) и воска (табл. 6).

Состав нейтральных липидов эмбриогенных (э) и неэмбриогенных (нэ) клеточных линий *L. sibirica*

НЛ	Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл2 (э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)	ΣЭ Кл	ΣНЭ Кл
	мг/г сухого веса							
МГ	0,6±0,1	0,9±0,1	0,8±0,1	0,6±0,1	0,8±0,0	0,8±0,1	-	-
1,2-ДГ	1,5±0,2 ^а _б	1,5±0,2 ^а _б	2,7±0,1 ^а _б	1,3±0,2 ^а _б	0,7±0,1 ^а	0,7±0,0 ^б	1,5 [1,3;2,4]*	0,7 [0,7;0,7]
Стерины	2,7±0,1	3,2±0,2	3,9±0,2	2,6±0,1	2,1±0,0	2,3±0,4	-	-
1,3-ДГ	0,9±0,1	1,2±0,0	1,2±0,1	1,0±0,1	0,6±0,0	0,7±0,2	-	-
СЖК	3,4±0,3 ^а _б	4,3±0,6 ^а _б	5,8±0,3 ^а _б	3,6±0,4 ^а _б	1,6±0,1 ^а	1,7±0,5 ^б	4,3±1,0*	1,7±0,3
ТГ	2,5±0,3 ^а _б	2,5±0,4 ^а _б	3,6±0,1 ^а _б	2,5±0,3 ^а _б	1,0±0,0 ^а	1,0±0,2 ^б	2,7 [2,3;3,4]*	1,0 [1,0;1,1]
МЭЖК	0,8±0,2	1,4±0,2	1,5±0,1	0,9±0,2	1,1±0,1	1,0±0,1	-	-
Воска	2,8±0,7	3,0±0,1	3,2±0,1	2,3±0,4	3,0±0,2	2,7±0,2	-	-
Эфиры стерин	1,3±0,2	0,9±0,0	1,5±0,1	1,3±0,2	1,7±0,1	1,7±0,1	-	-
НЛн	1,2±0,2	1,0±0,1	0,3±0,0	2,0±0,2	0,2±0,0	0,6±0,0	-	-
Сумма НЛ	17,9± 3,3	20,0± 4,9	24,5± 4,8	18,0± 2,6	12,7± 0,6	13,1± 0,5	19,85 [16,0;23,7] *	12,9 [12,5;13,4]

Примечания. НЛ – нейтральные липиды, МГ – моноглицериды, ДГ – диглицериды, СЖК – свободные жирные кислоты, ТГ – триглицериды, МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот, НЛн – неидентифицированные НЛ, э – эмбриогенные линии, нэ – неэмбриогенные линии. n=6, в таблице приведены средние значения и их стандартные отклонения, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{а,б} – различия между Кл23 и всеми эмбриогенными линиями (^а), различия между Кл31 и всеми эмбриогенными линиями (^б) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Для данных по суммарному содержанию разных типов НЛ ΣЭ Кл и ΣНЭ Кл представлены средние значения и их стандартные отклонения (в случае нормального распределения) или Me с планками погрешностей 25% и 75% процентилями, * - наличие значимых различий, значимость различий средних значений между двумя типами линий с разной способностью к эмбриогенезу рассчитана с помощью t-критерия и U-критерия Манна–Уитни. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Эмбриогенные клеточные линии *L. sibirica* достоверно отличались от неэмбриогенных высоким содержанием СЖК, 1,2-ДГ, ТГ. Для неэмбриогенных клеточных линий отмечено более высокое содержание эфиров стероидов, по сравнению с эмбриогенными.

Эксперименты показали, что для эмбриогенных клеточных линий содержание СЖК было выше как минимум в 2 раза по сравнению с неэмбриогенными (табл. 6) и, в целом, было довольно высоким (в пересчете на общие липиды составило 79,3-116,2 мкг/мг для эмбриогенных клеточных линий и 43,7-44,6 мкг/мг для неэмбриогенных линий). Обычно количество СЖК в клетках высших растений невелико, они редко аккумулируются в здоровых тканях. Исключение составляют некоторые водные растения, у которых относительное содержание СЖК может варьировать от 6,8% (*Potamogeton pectinatus*) до 37,9% (*Spirodela polyrhiza*) (Розенцвет и др., 2000).

Что касается культуры растительных тканей, то в работе (Cunha and Fernandes-Ferreira, 2003), посвященной изучению СЖК каллусов льна обыкновенного, также как и в наших экспериментах, было отмечено высокое содержание СЖК – 146 мкг/мг общих липидов. Для неэмбриогенных каллусов эта величина была ниже на 10%. В работе (Prabha et al., 1988) авторами показано, что каллусы плодов яблони (*Malus sylvestris*) содержали 6,5% СЖК, что в пересчете на абсолютный вес составляло 32,6 мкг/мг общих липидов. По-видимому, заметные количества СЖК нередко встречаются в липидах клеточных культур растений. Известно, что СЖК являются промежуточными веществами в синтезе других метаболитов (Kachroo et al., 2003; Hu et al., 2009). Являясь жирорастворимыми анионами, они способны увеличивать протонную проводимость в мембранах (Severin et al., 2010). Вероятно, эти или другие функции СЖК могут быть задействованы в процессах морфогенеза в культуре растительной ткани.

Для всех клеточных линий основную долю НЛ составляли глицериды (29,6–33,9% от НЛ для эмбриогенных клеточных линий, 23,9–24,3% от НЛ для

неэмбриогенных клеточных линий), в форме моно-, ди- и триглицеридов. Для эмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской характерно высокое содержание ТГ по сравнению с неэмбриогенными (табл. 6). Эта тенденция сохраняется и для 1,2-ДГ (табл. 6). При этом содержание МГ не имело достоверных различий между клеточными линиями с разным эмбриогенным потенциалом. Известно, что глицериды, в особенности ТГ, играют особую роль в жизнедеятельности растений, поскольку относительно бедны кислородом, но богаты углеродом. Выигрыш энергии при их катаболизме существенно выше по сравнению с распадом углеводов и белков даже с учетом больших размеров этих молекул (Grigova et al., 2007). Анализ литературных данных показывает, что ТГ активно накапливаются в эмбриогенных (морфогенных) тканях. Так, при анализе липидов эмбриогенных каллусов *P. glauca* отмечено активное накопление ТГ в процессе культивирования (Attree et al., 1992). Авторы утверждают, что накопление ТГ играет существенную роль для развития каллусной культуры. В работе (Reidiboym-Talleux and Grenier-De March, 1999) показано, что содержание ТГ в эмбриогенных тканях *P. avium* было в 2,6 раза выше, чем в неэмбриогенных каллусах. Авторы связывают низкие значения ТГ у неэмбриогенных каллусов с отсутствием дифференциации. Накопление ТГ в тканях *P. avium* коррелировало с процессом соматического эмбриогенеза, что подтверждали гистологические и биохимические исследования эмбриогенных тканей *P. avium*. В эмбриогенных клетках обнаружены пластидный и эндоплазматический ретикулум, связанный с липидными телами, в то же время в клетках неэмбриогенного каллуса отсутствовали цитоплазматические липидные тела (Reidiboym-Talleux and Grenier-De March, 1999). В процессе культивирования ТГ обогащаются специфическими жирными кислотами, например, имеются сведения о наличии кислот с углеродной длиной цепи 20–22 атомов, а также о наличии таксолеиновой кислоты Δ5-серии в составе ТГ (Attree et al., 1992), характерной для хвойных и некоторых других эволюционно древних таксонов (Wolff et al., 1998). В другой работе, посвященной

эмбриогенным каллусам *P. taeda*, сообщается об увеличении содержания ТГ в процессе поддержания каллусной культуры клеток. Данные по содержанию ТГ в эмбриогенных линиях, полученные нами, хорошо согласуются с данными, полученными, например, для каллусов *P. taeda* на ранних стадиях культивирования (2,5–3,6 мг/г в нашем эксперименте, у *P. taeda* – 2,5 мг/г) (Brownfield et al., 2007). Известно, что ТГ являются запасными липидами, которые легко могут быть вовлечены в катаболизм для получения энергии, необходимой клетке для роста и развития, жирные кислоты, высвобожденные в процессах катаболизма участвуют в клеточной сигнализации и синтезе ФЛ (Athenstaedt and Daum, 2006). Что касается ДГ, то известно, что 1,3-ДГ накапливаются в клетке, выполняя запасующую функцию, в то время как 1,2-ДГ действуют как вторичные мессенджеры в клеточных процессах, являясь промежуточными звеньями в биосинтезе и катаболизме ТГ, в биосинтезе некоторых ФЛ – ФХ, ФЭ, ФС. ДГ быстро накапливаются в мембранах, где они связываются с помощью сильных гидрофобных взаимодействий с определенными белками, вызывая тем самым изменения физических свойств бислоя (Almena and Merida, 2011; Gomez-Fernandez and Corbalan-Garcia, 2007). В других работах показано участие ДГ в процессах роста. Например, высказано предположение об участии ДГ как сигнальной молекулы в регуляции роста кончика пыльцевой трубки табака (Helling et al., 2006). Показано, что ДГ способствует формированию боковых корней (Yuan et al., 2019). В работе (Алаудинова и Миронов, 2009) показано, что для меристем почек лиственницы сибирской содержание 1,2-ДГ было в 2 и более раз выше, чем содержание 1,3-ДГ в теплые месяцы (май, август). Авторы связывают это с тем что, весной идет активное накопление 1,2-ДГ в связи с их последующим участием в синтезе фосфолипидов, в то время как в холодные месяцы (октябрь–февраль) идет накопление 1,3-ДГ для сохранения необходимой клетке энергии. В работе (Pollard et al., 2015), описывающей биосинтез липидов как *in vivo*, так и *in vitro* для семян рыжика посевного (*Camelina sativa*), также показано высокое

содержание 1,2-ДГ по сравнению с 1,3-ДГ для каллусов *C. sativa* на стадии развития эмбрионов.

Таким образом, более высокое содержание ТГ, а также 1,2-ДГ, по сравнению с содержанием 1,3-ДГ, вероятно, характерно для эмбриогенных клеточных линий, из-за их более высокой потребности в этих соединениях для активных процессов роста, развития, в частности синтеза мембранных липидов. Такое распределение содержания глицеридов, по-видимому, подтверждает важную роль ТГ и ДГ в процессе эмбриогенеза.

Содержание восков для клеточных линий с разным эмбриогенным потенциалом достоверно не различалось: для неэмбриогенных линий – 3,0 и 2,7 мг/г сухого веса (Кл23 и Кл31, соответственно) и для эмбриогенных линий содержание восков составило 2,3 (Кл10), 2,8 (Кл4), 3,0 (Кл6), 3,2 (Кл2) мг/г сухого веса. Воска – сложные эфиры высших жирных кислот и высших одноатомных спиртов жирного (реже ароматического) ряда. Воска являются соединениями с ярко выраженными гидрофобными свойствами. Природные воска содержат некоторое количество СЖК и высокомолекулярных спиртов. Воска также являются запасными липидами, гидролиз которых высвобождает жирные кислоты, а также может привести к образованию длинноцепочечных спиртов (Athenstaedt and Daum, 2006). Обнаруженные в составе НЛ эфиры жирных кислот по содержанию в клеточных линиях с разным эмбриогенным потенциалом достоверно не различались. Так, для неэмбриогенных линий их содержание составило 1,0-1,1 мг/г сухого веса, в то время как для эмбриогенных линий их содержание варьировало от 0,8 до 1,5 мг/г сухого веса.

Содержание стеринов в клеточных линиях колебалось от 2,1 мг/г сухого веса (Кл23) до 3,9 мг/г сухого веса (Кл2). В наших экспериментах показано, что наряду со свободными стеринами в исследуемых клеточных линиях обнаружены заметные количества эфиров стеринов (табл. 6). Авторами работы (Sato et al., 2007) обнаружено, что в каллусной культуре лиственницы японской (*Larix kaempferi*) содержание стеринов составило от 1,0 до 2,5 мг/г сухого веса,

что, в целом, согласуется с нашими данными. Для эмбриогенных линий льна обыкновенного установлено, что содержание стерина составляло 1,45 мг/г сухого веса (Cunha and Fernandes Ferreira, 1997), а для каллусов цикория (*Cichorium intybus*) содержание стерина составило 0,42 мг/г сухого веса (Agarwal and Sarin, 2014), т.е. заметно ниже, чем для клеточных линий лиственницы. Возможно, высокое содержание стерина в клеточных линиях является видовой особенностью хвойных, в частности, лиственницы сибирской. Из данных, представленных в таблице 6, видно, что содержание свободных стерина не имело существенных различий между линиями с разным эмбриогенным потенциалом. При этом содержание эфиров стерина у эмбриогенных клеточных линий было несколько ниже, чем у неэмбриогенных. Согласно нашим и литературным данным эфиры стерина содержатся в клетках растений в гораздо меньших количествах, чем свободные стерин (Валитова и др., 2016). Предполагается, что эфиры стерина служат инертной формой хранения стерина (Athenstaedt and Daum 2006; Banas et al., 2005), из которой стерин высвобождаются под действием специфических гидролаз (Athenstaedt and Daum, 2006). Для количественной оценки конвертации стерина из связанной формы в свободную, нами было рассчитано отношение количества стерина к количеству эфиров стерина (Taylor and Parks, 1978; Kalo and Kuuranne, 2001) для эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий (рис. 19). Из представленных результатов видно, что для неэмбриогенных линий этот показатель ниже в 1,5–3 раза по сравнению с таковым для эмбриогенных клеточных линий. Такие высокие значения отношения стерина к их эфирам, вероятно, характерны для эмбриогенных линий ввиду участия свободных стерина в различных процессах связанных с дифференциацией и пролиферацией.

Из полученных нами данных (табл. 6) видно, что, несмотря на то, что ТГ и ЭС обычно служат депо для хранения стерина, жирных кислот и ДГ, для эмбриогенных линий содержание ТГ больше, а ЭС меньше, чем для

неэмбриогенных. Вероятно, для некоторых стадий развития каллусов необходимо высокое содержание ТГ, в частности, для процессов регенерации из каллуса целого растения, как предполагают авторы (Brownfield et al., 2007).

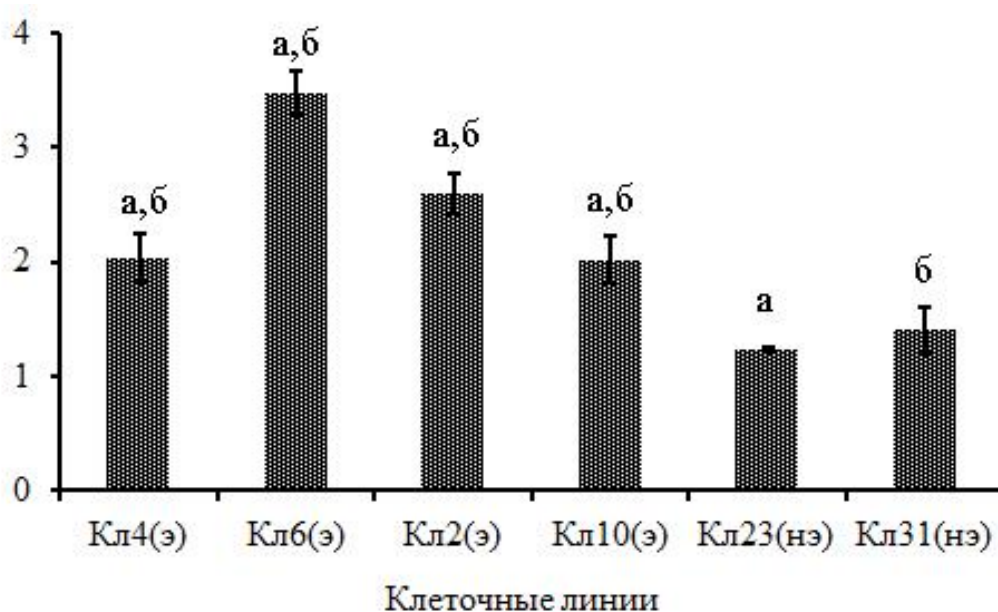


Рис. 19. Отношение стероидов к их эфирам для эмбриогенных (э) и неэмбриогенных (нэ) клеточных линий ливственницы сибирской

Примечания. $n=6$, данные представлены средними значениями и их стандартными отклонениями, ^{а,б} – различия между Кл23 и эмбриогенными линиями (^а), различия между Кл31 и эмбриогенными линиями (^б) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. С помощью U-критерия Манна-Уитни проведено сравнение значимости различий средних значений отношения стероидов к их эфирам между двумя типами линий, различающихся по способности к эмбриогенезу, различия были статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Свободные стероиды в процессе созревания соматических зародышей активно участвуют в формировании мембран и поэтому накопления их эфиров не происходит. Напротив, конвертация свободных стероидов в их эфиры является результатом прекращения деления клеток, и именно тогда избыточные стероиды этерифицируются (Bailey and Parks, 1975). Авторами работы (Radwan et al., 1975) показано, что в процессе субкультивирования *Artemisia absinthium* содержание эфиров стероидов снижается с 6,1 до 4,3 (% от общих липидов), а соотношение стероидов к их эфирам возрастает с 3,0 до 5,4, в то время как

содержание ТГ остается практически неизменным. Можно предположить, что для изучаемой стадии развития эмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской характерен большой расход свободных стерина, и, следовательно, высвобождение их из связанной формы. В этот же период происходит накопление ТГ, необходимых на более поздних стадиях культивирования.

Анализ полученных результатов показывает, что содержание и качественный состав НЛ в культуре *in vitro* лиственницы сибирской закономерно различается между клеточными линиями с разным эмбриогенным потенциалом. Более высокое содержание ТГ и 1,2-ДГ у эмбриогенных клеточных линий по сравнению с неэмбриогенными является вполне ожидаемым – ТГ являются запасными липидами, необходимыми в процессах эмбриогенеза для получения энергии, необходимой клетке для роста и развития, а также для участия жирных кислот, высвобожденных в результате катаболизма ТГ, в клеточной сигнализации. Действующие как вторичные мессенджеры в клеточных процессах 1,2-ДГ участвуют также в биосинтезе наиболее распространенных форм ФЛ (ФХ, ФЭ), являясь необходимыми для формирования мембран клеток и клеточных органелл. Обнаруженные различия в соотношении стерина и их эфиров указывают на то, что, по-видимому, в эмбриогенных клеточных линиях лиственницы на раннем этапе культивирования стерин активно вовлекается в процессы эмбриогенеза. В целом, представленные результаты свидетельствуют об активном участии НЛ, в первую очередь ТГ, 1,2-ДГ и стерина в процессах эмбриогенеза в тканях лиственницы сибирской *in vitro*. Полученные в настоящей работе результаты имеют также очевидное прикладное значение, поскольку НЛ, участвуя в клеточном росте и развитии *in vitro*, играют важную роль в процессах развития и последующего прорастания эмбрионов.

3.4.1. Стерины

Как уже говорилось ранее, обнаруженные различия в содержании свободных стерина и их эфиров (их соотношение), могут свидетельствовать об

активном участии этих соединений в процессах эмбриогенеза. Известно, что стерины являются жизненно важными участниками процессов роста и развития растений и как компоненты мембран и как прекурсоры стероидных гормонов (Diener et al., 2000; Deng et al., 2016; Валитова и др., 2016). В работах (Qian et al., 2013) и (Jang et al., 2000) было показано, что у мутанта по гену *FACKEL A. thaliana* при дефектной работе стерин С-14-редуктазы, произошло изменение состава стеринов, которое привело к нарушению нормального деления клеток. Авторы полагают, что стерины являются необходимыми участниками процессов пролиферации клеток. Авторами работы (Diener et al., 2000) показано, что снижение содержания β -ситостерина и увеличение содержания холестерина влияют на эмбриогенез. Подобные результаты получены и для других мутантов *A. thaliana* с нарушением работы стеролметилтрансферазы, которые имели замедленный рост и были меньшего размера по сравнению с диким типом, как на стадии проростка, так и на стадии розетки (Carland et al., 2002). Поэтому представлялось важным изучить компонентный состав свободных стеринов и их эфиров.

Результаты ГХ-МС анализа компонентного состава свободных стеринов в эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линиях листовенницы сибирской приведены в таблице 7 и эфиров стеринов – в таблице 8. В первую очередь, стоит отметить, что свободные стерины клеточных линий отличаются большим разнообразием компонентов и насчитывают от 11 (Кл2) до 21 (Кл4, Кл10) различных соединений, по сравнению с эфирами стеринов, которых у эмбриогенных клеточных линий обнаружено 10, а у неэмбриогенных – 16 таких компонентов.

Как известно, свободные стерины по химической структуре относятся к изопреноидам, с циклопентанопергидрофенантроном в качестве остова (Валитова и др., 2016). Методом ГХ-МС в клеточных линиях *L. sibirica* среди свободных стеринов были обнаружены соединения без двойных связей в структуре циклопентанопергидрофенантрена, а также с двойными связями в

положении $\Delta 8$, $\Delta 4$, $\Delta 12$ и две большие группы свободных стеринов с двойными связями в положении $\Delta 7$ и $\Delta 5$ (табл. 7).

Таблица 7

Содержание фракции свободных стеринов в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской *L. sibirica*

Названия соединений		Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл2 (э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)
Стерины							
Без двойных связей в структуре колец циклопентанопергидрофенантрена							
Прегнан-11-он, 17-гидрокси-3,20-бис [(триметилсилил)окси] -, (3 α , 5 β , 20S)	% от Σ C	0,2 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,9 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	1,1 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1
Этилизо-аллохолат	% от Σ C	0,2 \pm 0,0	0,04 \pm 0,0	-	0,1 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	2,0 \pm 0,3
Холестан-3-он, циклический 1,2-этандилаэтал, (5 β)	% от Σ C	0,04 \pm 0,0	-	-	0,02 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	-
Ланостан-3 β -ол, 11 β , 18-эпокси, ацетат	% от Σ C	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	3,0 \pm 0,1
Циклоартенол	% от Σ C	1,5 \pm 0,2	-	-	5,5 \pm 0,4	-	-
9,19-циклохолестан-3-он, 4,14-диметил-	% от Σ C	0,3 \pm 0,0	-	-	0,1 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0	-
9,19-циклоланостан-3-ол, 24-метилен-, ацетат, (3 β) -	% от Σ C	0,5 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	-	0,9 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	-
9,19-циклоланост-24-ен-3-ол, (3 β) -	% от Σ C	-	-	0,6 \pm 0,1	1,2 \pm 0,0	-	-
Различные двойные связи в структуре колец циклопентанопергидрофенантрена							
8-андростен-3-ол, 17-(2-метилаллил)-4,4,14-триметил-	% от Σ C	0,02 \pm 0,0	-	1,8 \pm 0,2	0,01 \pm 0,0	0,03 \pm 0,0	1,2 \pm 0,1
Эргоста-4,6,8(14),22-тетраен-3-он	% от Σ C	-	0,1 \pm 0,0	-	-	-	-
Барригенол	% от Σ C	0,2 \pm 0,0	-	-	0,1 \pm 0,0	-	-
$\Delta 7$-стерины							
Холеста-7-ан-3 β -ол	% от Σ C	0,03 \pm 0,0	0,02 \pm 0,0	-	0,01 \pm 0,0	-	-
Силан, [[(3 β ,22E)-эргоста-7,22-диен-3-ил]окси]триметил-	% от Σ C	0,6 \pm 0,0	0,6 \pm 0,1	3,1 \pm 0,4	0,4 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0	2,1 \pm 0,1

Продолжение таблицы 7

Названия соединений		Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл2 (э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)
Δ7-стерины							
Силан, триметил[(4α-метилэргоста-7,24(28)-диен-3β-ил)окси]	% от ΣС	0,4±0,0	-	-	0,6±0,1	1,7±0,3	-
Авенастерин	% от ΣС	0,6±0,1	0,4±0,0	-	0,4±0,0	0,3±0,0	-
Δ5-стерины							
Холест-5-ен-3-он	% от ΣС	-	-	-	-	1,4±0,1	-
Холест-5-ен-24-он, 3-[(триметилселил)окси]-, (3β)-	% от ΣС	0,3±0,1	0,3±0,0	-	0,1±0,0	0,9±0,1	-
Прегн-5-ен-20-он, 3,16-бис[(триметилселил)окси]-, (3β,16α)-	% от ΣС	2,6±0,2	-	1,5±0,1	-	1,6±0,2	0,9±0,1
γ-ситостерол	% от ΣС	0,7±0,1	0,5±0,0	-	0,5±0,0	-	-
Изофукостерин	% от ΣС	15,3±0,1	19,0±1,3	12,9±1,2	17,7±0,3	-	2,6±0,1
Холестерин	% от ΣС	0,4±0,0	0,6±0,0	0,4±0,0	0,2±0,0	0,5±0,0	0,6±0,0
	мкг/г с.в.	6,7±2,8	17,6±1,5	4,2±0,3	4,4±1,5	4,4±0,7	4,2±0,1
Кампестерин	% от ΣС	19,1±0,7	20,0±0,6	18,3±1,8	14,9±0,3	17,1±1,8	9,2±0,8
	мкг/г с.в.	166,2±7,7 _{а,б}	199,2±12,0 _{а,б}	191,8±8,1 _{а,б}	133,8±1,3 _{а,б}	104,3±2,9 _а	102,4±1,9 _б
		178,8 [141,0;197,3] *				102,9 [101,5;105,0]	
Стигмастерин	% от ΣС	3,3±0,3	1,4±0,2	1,1±0,1	14,7±1,4	3,7±0,4	2,4±0,2
	мкг/г с.в.	67,2±8,0	41,7±4,9	21,8±1,3	248,2±3,8	40,0±0,1	63,9±1,3
β-ситостерин	% от ΣС	54,3±0,9	57,0±2,0	59,1±4,9	42,9±1,1	70,7±0,2	75,6±2,0
	мкг/г с.в.	582,5±53,5 _{в,г}	544,7±32,3 _{в,г}	1370,1±49,3	410,0±7,1 _{в,г}	776,5±96,5 _в	1684,8±23,7 _г
		560,8 [440,9;1149,6] *				1267,0 [752,3;1690,8]	
ΣΔ5-стеинов	% от ΣС	95,9±1,0	98,7±0,1	93,3±1,0	91,6±0,4	95,9±0,9	91,2±1,0
ΣΔ7-стеинов	% от ΣС	1,7±0,2	1,0±0,1	3,1±0,5	1,5±0,1	2,3±0,2	2,1±0,1
Σстеинов без 2й связи в структуре колец	% от ΣС	2,6±0,2	0,3±0,0	1,8±0,0	8,0±0,6	3,3±0,1	5,9±0,4

Содержание фракции эфиров (в этой же фракции выявлен сквален)
 стеринов в эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линиях лиственницы
 сибирской *L. sibirica*

Название соединений		Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл2 (э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)
соединения не циклической природы							
Сквален	% от ΣЭС	25,8±2,8 ^а ₆	34,2±3,3 ^а ₆	12,5±0,1 ^а ₆	15,1±1,6 ^а ₆	2,3±0,3 ^а	2,9±0,0 ₆
		19,9 [12,8;30,3] *				2,8 [2,2;2,9]	
Секохолеста-5,7,10(19)-триен-1,3-диол, 25-[(триметилселил)окси]-, (3β),	% от ΣЭС	-	-	-	-	16,2±2, 3	29,6±0, 1
Эфиры стеринов							
без двойных связей в структуре колец циклопентанопергидрофенантрена							
Прегнан-11-он, 17-гидрокси-3,20-бис [(триметилсилил) окси]-, (3α, 5β, 20S) -	% от ΣЭС	2,4±0,4	1,5±0,3	6,5±0,1	2,5±0,3	2,2±0,3	6,3±0,2
Холест-22-ен-21-ол, 3,5-дегидро-6-метокси-, пивалат	% от ΣЭС	-	-	-	-	6,1±0,7	14,1±0, 0
Холан-24-овая кислота, 12- (ацетилокси) -3-оксо-, метиловый эфир, (5α, 12α) -	% от ΣЭС	-	-	-	-	2,2±0,3	9,8±0,0
Этилизо-аллохолат	% от ΣЭС	23,4±3,3	29,6±3,9	20,6±0,2	26,0±3,4	28,2±1, 1	14,2±0, 0
Холестан-3-он, циклический 1,2-этандиилаэтал, (5β) -	% от ΣЭС	1,7±0,3	2,1±0,3	5,5±0,0	1,6±0,2	1,3±0,2	2,1±0,0
7,8-эпоксиланостан-11-ол, 3-ацетокси-	% от ΣЭС	28,4±3,2	14,0±2,1	15,6±0,1	32,4±3,4	11,7±1, 4	7,4±0,0
4-норланоста-17 (20), 24-диен-11,16-диол-21-овая кислота, 3-оксо-16,21-лактон	% от ΣЭС	-	-	-	-	6,0±0,5	-
различные двойные связи в структуре колец циклопентанопергидрофенантрена							
Холеста-8,24-диен-3-ол, 4-метил-, (3β, 4α) -	% от ΣЭС	4,6±0,5	2,6±0,3	15,5±0,1	3,1±0,3	4,0±0,3	4,0±0,0

Название соединений		Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл2 (э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)
Δ5-стерины							
Холест-5-ен-3-он	% от ΣЭС	-	-	-	-	1,1±0,1	1,1±0,0
Стигмастан-3,5-диен	% от ΣЭС	-	-	-	-	8,1±0,9	1,6±0,0
Холестерин	% от ΣЭС	2,9±0,3	4,5±0,5	4,4±0,2	4,4±0,4	2,7±0,3	2,0±0,1
	мкг/Г с.в.	1,3±0,1	2,8±0,1	1,2±0,1	1,4±0,3	5,8±0,0	3,2±0,4
Кампестерин	% от ΣЭС	5,4±0,6	6,2±0,6	4,3±0,2	9,4±0,9	4,5±0,5	1,4±0,1
	мкг/Г с.в.	1,2±0,2	1,8±0,4	0,6±0,0	1,4±0,4	4,3±0,7	1,1±0,1
Стигмастерин	% от ΣЭС	3,5±0,5	2,5±0,2	6,9±0,5	3,1±0,3	1,4±0,2	2,1±0,1
	мкг/Г с.в.	1,4±0,1	1,4±0,2	1,8±0,2	1,0±0,1	3,1±0,8	3,3±0,1
β-ситостерин	% от ΣЭС	1,9±0,2	2,8±0,3	8,3±0,2	2,4±0,2	2,1±0,3	1,7±0,2
	мкг/Г с.в.	1,1±0,4	2,2±0,2	3,2±0,1	1,1±0,1	6,5±0,5	3,8±0,4
ΣΔ5-стеинов	% от ΣЭС	13,7±0,6	16,0±0,9	23,9±0,4	19,2±1,0	19,8±1,8	9,7±0,1
Σстеинов без 2й связи в структуре колец	% от ΣЭС	55,9±3,9	47,2±3,1	48,1±0,4	62,6±3,3	57,8±2,3	53,8±0,1

Примечания к таблицам 7 и 8. э – эмбриогенные клеточные линии, нэ – неэмбриогенные клеточные линии. n=6, в таблице приведены средние значения и их стандартные отклонения, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{а,б} – различия между Кл23 и всеми эмбриогенными линиями (^а), различия между Кл31 и всеми эмбриогенными линиями (^б), различия между Кл23 и эмбриогенными линиями Кл4, Кл6, Кл10 (^в), различия между Кл31 и эмбриогенными линиями Кл4, Кл6, Кл10 (^г) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Для кампестерина, β-ситостерина и сквалена рассчитаны средние значения для двух типов линий, Me с планками погрешностей 25% и 75% процентилями, * - наличие значимых различий, значимость различий средних значений содержания стеиновых компонентов и сквалена рассчитана с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Среди $\Delta 7$ -стеринов обнаружен холеста-7-ан-3 β -ол, являющийся предшественником холестерина и авенастерин – предшественник 24-этилстеринов.

Основной вклад в суммарный вес свободных стеридов вносят $\Delta 5$ -стериды (холест-5-ен-3-он; холест-5-ен-24-он,3-[(триметилсилил)окси]-,(3 β); прегн-5-ен-20-он, 3,16-бис[(триметилсилил)окси]-,(3 β ,16 α)-; γ -ситостерол; изофукостерин; холестерин; кампестерин; стигмастерин; β -ситостерин), их относительное содержание варьировало от 91.2% (Кл31) до 95.9% (Кл4, Кл23) от суммы свободных стеридов (табл. 7).

При этом, наибольший вклад в суммарный вес свободных стеридов эмбриогенных клеточных линий вносят (табл.7): β -ситостерин (42,9-59,1% от суммы свободных стеридов), кампестерин (14,9-20,0% от суммы свободных стеридов), изофукостерин (12,9-19,0%, от суммы свободных стеридов) и стигмастерин (1,1-14,7% от суммы свободных стеридов). Наибольший вклад в суммарный вес свободных стеридов неэмбриогенных линий вносят: β -ситостерин (70,7-75,6% от суммы свободных стеридов), кампестерин (9,2-17,1% от суммы свободных стеридов) и стигмастерин (2,4-3,7% от суммы свободных стеридов). Изофукостерин в неэмбриогенных линиях, в отличие от эмбриогенных, либо совсем не обнаружен (Кл23), либо обнаружен в незначительных количествах (2,6% от суммы свободных стеридов для Кл31).

Показано, что значительное влияние на мембранную проницаемость оказывает холестерин, в меньшей степени кампестерин, β -ситостерин и стигмастерин (Валитова и др., 2016). Считается, как уже говорилось выше, что стигмастерин является «стрессовым» стеридом, поскольку его содержание возрастает при ответе растений на стрессирующие воздействия различной природы (Валитова и др., 2016). В нашем исследовании не было выявлено четкой закономерности в распределении стигмастерина и холестерина между эмбриогенными и неэмбриогенными клеточными линиями лиственницы сибирской (табл. 7).

Содержание стигмастерина варьировало в широких пределах от 21,8 (Кл2) до 248,2 (Кл10) мкг/г сухого веса или от 1,1% (Кл2) до 17,9% (Кл23) от суммы свободных стеринов. У растений содержание стигмастерина обычно ниже, чем β -ситостерина. Например, у *A. thaliana* содержание стигмастерина было 4,2% от суммы свободных стеринов (Silvestro et al., 2013). В работе (Дударева и др., 2020) авторами показано, что в надземных частях хвоща пестрого *Equisetum variegatum* стигмастерин обнаружен только в образцах осенней вегетации (4,3 мкг/г сухого веса) при относительно низкой температуре. Имеющиеся в научной литературе данные показывают, что для каллусов, полученных от разных видов растений, содержание этого стерина может существенно различаться. Например, для суспензионной культуры табака (*Nicotiana tabacum* L.) содержание стигмастерина было 7,1% (Chiu et al., 1980), а для каллусов *Euphorbia tirucalli* содержание стигмастерина колебалось от 5,9% до 34,3% от суммы свободных стеринов (Uchida et al., 2010). В наших экспериментах различий в содержании этого стерина, связанных с эмбриогенностью выявлено не было. Значительно более высокое, чем во всех других изучаемых линиях, содержание т.н. «стрессового» стигмастерина в эмбриогенной клеточной линии Кл10 может быть связано с тем, что эта линия отличалась от других изучаемых эмбриогенных линий в отношении эмбриогенной продуктивности. Так, при длительном культивировании она характеризовалась более низким процентным количеством нормальных соматических зародышей и более низким процентом их прорастания (Третьякова и др., 2015), хотя в молодых клеточных линиях (в возрасте 1 год) именно эта линия формировала самое высокое число зародышей.

Абсолютное содержание холестерина было значительно ниже, чем стигмастерина и варьировало от 4,2 (Кл31) до 17,6 (Кл6) мкг/г сухого веса или от 0,2% (Кл10) до 0,6% (Кл31) от суммы свободных стеринов. Известно, что у растений содержание холестерина, как правило, достаточно низкое. Так, показано, что у *A. thaliana* содержание холестерина составляло 3,8% от суммы

свободных стероидов (Silvestro et al., 2013), а в надземных частях хвоща пестрого *E. variegatum* содержание холестерина снижалось к осенней вегетации с 1,2 до 0,6% от суммы свободных стероидов (с 4,9 до 2,7 мкг/г сухого веса) по сравнению с летней (Дударева и др., 2020). В растительных тканях *in vitro* холестерин может вообще отсутствовать. Так, например, он не был обнаружен в тканях в каллусной культуре *E. tirucalli* (Uchida et al., 2010) и *L. usitatissimum* (Cunha and Fernandes Ferreira, 1997), содержался в малых количествах в суспензионной культуре *N. tabacum* – 1,2% (Chiu et al., 1980). При анализе результатов нашей работы не было обнаружено различий в содержании холестерина у клеточных линий лиственницы сибирской с разной эмбриогенностью.

Доминирующим стероидом во всех клеточных линиях был β -ситостерин – его содержание варьировало от 410,0 (Кл10) до 1684,8 (Кл31) мкг/г сухого веса образца (табл.7). Следует отметить, что содержание этого стерина было достоверно выше (табл. 7) для неэмбриогенных клеточных линий Кл23, Кл31, по сравнению с эмбриогенными Кл4, Кл6, Кл10. Впрочем было и исключение: для эмбриогенной линии Кл2 содержание β -ситостерина было более высоким, чем в остальных эмбриогенных линиях (1370,1 мкг/г сухого веса) и было сравнимо с таковым у неэмбриогенных линий. В растениях *in vivo* β -ситостерин является преобладающим стероидом, однако, его содержание может отличаться в тканях отдельных органов. Например, в цветках и плодах *Olea europaea* L. cv Píscual содержание этого стерина составляло 97% и 92% от суммы свободных стероидов, соответственно (Ines et al., 2019), для *Nicotiana tabacum* L. var. xanthi содержание β -ситостерина в корнях составило 31% и 18% в листьях – от суммы свободных стероидов (Schaeffer et al., 2000). Для *T. aestivum* L. cv. Kazanskaya Jubilejnaya также отмечено более высокое содержание этого стерина в корнях – 60,5%, чем в листьях – 55,6% от суммы свободных стероидов (Valitova et al., 2019). Что касается культуры растений *in vitro*, то, например, в суспензионной культуре сельдерея (*Apium graveolens*) отмечено более низкое содержание этого

стерина – 28,3% от суммы свободных стеринов, а доминирующим стерином был стигмастерин (44,2%) (Dyas et al., 1991). В работе (Sato et al., 2007) показано, что в каллусной культуре лиственницы японской (*L. kaempferi*) содержание β -ситостерина достигало 98% от суммы свободных стеринов. Известно, что содержание стеринов в каллусах зависит от исходного материала для получения культуры. Например, для каллусов *Crataeva tapia* L., полученных из листьев, при культивировании на различных средах содержание β -ситостерина колебалось от 360 до 1230 мкг/г сухого веса, а для каллусов, полученных из тканей стебля, оно было более высоким и составляло – 420-3410 мкг/г сухого веса (Sharma et al., 2016). Показано также, что для эмбриогенных и неэмбриогенных каллусов льна (*Linum usitatissimum*) абсолютное содержание β -ситостерина было около 800 и 700 мкг/г сухого веса (53,3% и 50,0% от суммы свободных стеринов), соответственно (Cunha and Fernandes Ferreira, 1997). Этими же авторами установлена связь между накоплением β -ситостерина и ростом биомассы неэмбриогенных каллусов. Так, максимальное содержание этого стерина для неэмбриогенных каллусов отмечено в конце эффективной стадии их роста. Известно, что β -ситостерин является важным участником процесса элонгации клеток (Deng et al., 2016), а также участвует в процессах их пролиферации (Qian et al., 2013; Jang et al., 2000) и дифференциации (Diener et al., 2000; Carland et al., 2002). Авторами работы (Nakamoto et al., 2015) при изучении влияния β -ситостерина на рост корней *A. thaliana* показано, что при добавлении β -ситостерина в среду культивирования корней уровень содержания этого стерина в у дикого типа снижался на 20%, в то время как содержание стигмастерина возрастало на 20%. Однако, для мутантов *smt2smt3* дефектных по *SMT1* и *SMT3* (стеролметилтрансфераз), для которых характерно слабое развитие корневой системы, уровень накопления β -ситостерина в тканях повышался при добавлении его в среду культивирования. Это частично восстанавливало боковое развитие корневой системы для мутантов *smt2smt3* (Nakamoto et al., 2015). Можно предположить, что содержание β -ситостерина

необходимо для нормального развития растения и находится на определенном, характерном для каждого вида растений уровне, а его избыток не приводит к аномальному росту. В то же время его недостаток негативно влияет на рост и развитие растений. Таким образом, вероятно, что более высокие содержания β -ситостерина у неэмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской связаны с наращиванием биомассы каллуса.

В растениях предшественником β -ситостерина в биосинтезе стериннов является изофукостерин (Schaller, 2003; Sonawane et al., 2016). Его содержание может быть достаточно высоким, наряду с другими распространенными стеринами, такими как β -ситостерин, кампестерин и стигмастерин (Валитова и др., 2016). Например, для каллусов *Euphorbia tirucalli* содержание изофукостерина составляло от 20,7% до 90,3% от суммы свободных стериннов (Uchida et al., 2010). В наших исследованиях содержание изофукостерина для эмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской варьировало от 12,9% (Кл2) до 19,0% от суммы свободных стериннов (Кл6). У неэмбриогенных клеточных линий этот стерин был обнаружен только для линии Кл31, где его содержание было в 2 и более раза ниже, чем у эмбриогенных линий. Можно предположить, что в эмбриогенных клеточных линиях идет активный синтез стериннов, необходимый для роста и развития, за счет накопления изофукостерина, который далее конвертируется в β -ситостерин посредством работы SSR1 (от англ. Sterol Side-chain Reductase - редуктазы боковой цепи). В биосинтезе стериннов SSR1 участвует в образовании β -ситостерина из изофукостерина, а также в образовании кампестерина из 24-метилхлестерина (Sonawane et al., 2016; Bajguz et al., 2020). Возможно также, что у эмбриогенных клеточных линий, для которых было отмечено более низкое содержание β -ситостерина, работа SSR1 направлена на синтез кампестерина, в отличие от неэмбриогенных, для которых изофукостерин не обнаружен или обнаружен в малых количествах. Вероятно, изофукостерин

активно конвертируется в β -ситостерин, содержание которого, как отмечено ранее, в неэмбриогенных линиях выше, чем в эмбриогенных.

Что касается кампестерина, в наших экспериментах было отмечено высокое его содержание для всех клеточных линий лиственницы сибирской, причем для эмбриогенных линий оно было достоверно выше (от 133,8 (Кл10) до 199,2 (Кл6) мкг/г сухого веса), чем для неэмбриогенных, где этот показатель составлял – 102,4 (Кл31)-104,3 (Кл23) мкг/г сухого веса (табл. 7). По-видимому, в содержании этого компонента имеются существенные межвидовые различия. Так, если для неморфогенных каллусов лиственницы японской содержание кампестерина составило 2% от суммы свободных стероидов (Sato et al., 2007), то в наших экспериментах его процентное содержание было значительно выше - порядка 19% от суммы свободных стероидов для эмбриогенных линий и 9% (Кл31) и 17% (Кл23) от суммы свободных стероидов для неэмбриогенных (табл. 7). Такая существенная разница в абсолютном содержании кампестерина между линиями с разной эмбриогенностью показывает, что он, по-видимому, активно участвует в процессах эмбриогенеза. Известно, что кампестерин является субстратом для С28-брасиностероидов, в то время как β -ситостерин является предшественником С29-брасиностероидов (Vajguz et al., 2020). Эти соединения, как уже говорилось ранее, являются стимулирующими рост растений стероидными гормонами, которые широко распространены в растительном мире и участвуют в регуляции морфогенетических процессов (Kreis and Muller-Uri, 2010; Vajguz et al., 2020).

Таким образом, полученные нами данные показывают, что биосинтез стероидов у эмбриогенных и неэмбриогенных линий лиственницы сибирской имеет отличительные особенности. Содержание β -ситостерина у эмбриогенных линий остается сравнительно низким, что позволяет предположить возможность активного его расходования на биосинтез С29-брасиностероидов. В то же время у эмбриогенных клеточных линий идет активное накопление кампестерина. Возможно, синтез С28-брасиностероидов, в котором

задействован кампестерин, происходит на более поздних этапах развития клеточных линий. Как уже говорилось выше, для эфиров стеринов неэмбриогенных клеточных линий обнаружено большее их разнообразие, чем для эмбриогенных линий.

Во фракции эфиров стеринов всех клеточных линий нами были обнаружены эфиры холестерина, кампестерина, стигмастерина, β -ситостерина в сравнительно небольшом количестве (табл. 8). Наибольший вклад в суммарное содержание эфиров стеринов во всех клеточных линиях вносили соединения без двойной связи в структуре циклопентанопергидрофенантрена от 47,2% (Кл6) до 62,6% (Кл10) от суммы эфиров стеринов. Кроме того, этот тип соединений включает в себя наибольшее разнообразие эфиров – 7 соединений (табл. 8). Среди эфиров стеринов всех клеточных линий лиственницы сибирской в отличие от свободных стеринов не были обнаружены Δ^7 -стерины.

Помимо стеринов и их эфиров в процессе анализа был идентифицирован сквален – углеводород тритерпенового ряда, принадлежащий к группе каротиноидов. Сквален является промежуточным соединением в биосинтезе стеринов (Валитова и др., 2016; Vajguz et al., 2020). Содержание этого компонента в эмбриогенных линиях было в 4 и более раза более высоким, чем в неэмбриогенных. Это дает основание полагать, что в эмбриогенных клеточных линиях идет более активный синтез стеринов, чем в неэмбриогенных. У неэмбриогенных линий во фракции эфиров стеринов обнаружено соединение 9,10-Секохолеста-5,7,10(19)-триен-1,3-диол, 25-[(триметилселил)окси]-, (3 β), которое в своей структуре содержит только два циклогексановых кольца вместо четырех, характерных для стеринов и относится к классу терпеноидов (Theagwam et al., 2019). Содержание этого соединения достаточно высокое 16,2% (Кл23) и 29,6% (Кл31) от общего количества эфиров стеринов. Исходя из его структуры, можно предположить, что это соединение является предшественником или побочным продуктом при биосинтезе стеринов. В литературе есть сведения, что это соединение было обнаружено в семенах

Wrightia arborea (Nagalakshmi and Murthy, 2015), в экстракте *Adiantum capillus-veneris* (Hussein et al., 2016), в экстрактах листьев *Terminalia catappa* (Iheagwam et al., 2019) и др.

Анализ полученных результатов показывает, что содержание и качественный состав свободных стероидов и эфиров стероидов в культуре *in vitro* существенным образом различаются в клеточных линиях с разным эмбриогенным потенциалом. Эмбриогенные линии содержат больше кампестерина, а неэмбриогенные линии β -ситостерина, высокое содержание которого многие авторы связывают с накоплением биомассы (Cunha and Fernandes Ferreira, 1997), но не с эмбриогенезом. Показано также, что клеточные линии листовенницы, контрастные по способности к соматическому эмбриогенезу, демонстрируют значительные различия в соотношении содержаний двух основных растительных стероидов - β -ситостерин/кампестерин. Именно соотношение в содержании β -ситостерина и кампестерина существенно для функционального состояния клеточной мембраны, а именно для упорядочивания жирнокислотных цепей в мембранах, увеличения мембранной проницаемости для воды и ионов, а также для активности мембранно-связанных белков (Валитова и др., 2016; Zur et al., 2002b). Мы предполагаем, что подобного рода изменения мембранных свойств, обеспечиваемые составом и содержанием стероидов, могут играть важную роль в процессах дифференциации клеток при эмбриогенезе. Обнаруженное высокое содержание в составе эмбриогенных линий сквалена, который является субстратом для биосинтеза стероидов, свидетельствует в пользу предположения о более высокой активности синтетических процессов в эмбриогенных линиях. Выявленные особенности состава свободных стероидов и их эфиров эмбриогенных клеточных линий *L. sibirica* могут служить также маркером компетентности клеток каллусов к инициации соматического эмбриогенеза при скрининге клеточных линий для клонального размножения хвойных в культуре *in vitro*.

3.5. Полярные липиды

3.5.1. Фосфолипиды

Как уже сказано ранее, известно, что ФЛ являются не только структурными компонентами клеточных мембран, но и важными сигнальными молекулами, которые регулируют наряду с другими соединениями рост и развитие растений, а также клеточный ответ на изменения окружающей среды (Чиркова, 1997; Джамеев, 2014). Нарушения в функциях и жизнеспособности клеток могут быть следствием изменения в структуре мембран за счет изменения в составе мембранных ФЛ (Чиркова, 1997). Известно и о влиянии ФЛ на процессы роста и развития в культуре *in vitro*. Например, при добавлении хлорида холина в питательную среду показало ускоренный рост клеток и приводило к созреванию большего количества соматический зародышей *S. sajan* (Kumar et al., 2015). Показано, при добавлении ФХ и миоинозитола в среду культивирования каллусов *B. parvis* наблюдалось увеличение скорости их поглощения, что является проявлением их специфической роли в регуляции мембраносвязанных ферментов (Zur et al., 2002b; Drobak, 1992). Все вышесказанное указывает на важную роль ФЛ в клеточном метаболизме у растений как *in vivo*, так и *in vitro*. Очевидно, что изучение особенностей состава ФЛ в культуре растительных клеток с разным эмбриогенным потенциалом представляет значительный интерес в фундаментальном и прикладном отношении.

Суммарное содержание ФЛ было достоверно выше для эмбриогенных клеточных линий по сравнению с неэмбриогенными (табл.9). Среди ФЛ в эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линиях лиственницы сибирской были идентифицированы следующие типы: фосфатидилхолины (ФХ), фосфатидилэтаноламины (ФЭ), фосфатидилсерины (ФС), фосфатидилинозиты (ФИ), фосфатидилглицерины (ФГ), дифосфатидилглицерины (ДФГ), фосфатидная кислота (ФК) (табл. 9).

Содержание ФЛ в эмбрионных (э) и неэмбрионных (нэ) клеточных линиях лиственницы сибирской *L. sibirica*

Клеточные линии		Тип ФЛ								ΣФЛ
		ФХ	ФЭ	ФИ	ФК	ФС	ФГ	ДФГ	ФЛ _н	
Кл4 (э)	мг/г с.в.	2,92 ± 0,34 ^{а,б}	2,1 ± 0,17 ^{в,г}	0,89 ± 0,08 ^{а,б}	1,57 ± 0,16 ^б	0,42 ± 0,04	0,31 ± 0,07	0,51 ± 0,08	0,40 ± 0,04	-
	% от ΣФЛ	32,0	23,0	9,76	17,2	4,6	3,4	5,6	4,4	-
Кл6 (э)	мг/г с.в.	3,49 ± 0,29 ^{а,б}	2,59 ± 0,24 ^{в,г}	1,06 ± 0,25 ^{а,б}	1,62 ± 0,30 ^б	-	0,10 ± 0,03	0,44 ± 0,05	-	-
	% от ΣФЛ	37,5	27,9	11,4	17,4	-	1,1	4,7	-	-
Кл2 (э)	мг/г с.в.	0,43 ± 0,02 ^{а,б}	0,40 ± 0,09 ^г	0,50 ± 0,08 ^{а,б}	2,74 ± 0,19 ^б	0,47 ± 0,05	0,45 ± 0,09	0,48 ± 0,12	-	-
	% от ΣФЛ	7,9	7,3	9,1	50,1	8,6	8,2	8,8	-	-
Кл10 (э)	мг/г с.в.	2,49 ± 0,32 ^{а,б}	1,64 ± 0,23 ^{в,г}	0,55 ± 0,12 ^{а,б}	1,19 ± 0,23 ^б	0,12 ± 0,05	0,51 ± 0,09	0,43 ± 0,07	0,52 ± 0,09	-
	% от ΣФЛ	33,4	22,0	7,4	16,0	1,6	6,9	5,8	7,0	-
Кл23 (нэ)	мг/г с.в.	0,14 ± 0,00 ^а	0,18 ± 0,02 ^г	0,17 ± 0,02 ^а	1,62 ± 0,19	-	-	0,00007 ± 0,00	-	-
	% от ΣФЛ	6,6	8,5	8,1	76,8	-	-	0,003	-	-
Кл31 (нэ)	мг/г с.в.	0,32 ± 0,07 ^б	0,79 ± 0,12 ^в	0,34 ± 0,07 ^б	3,15 ± 0,21 ^б	-	0,08 ± 0,02	0,18 ± 0,03	-	-
	% от ΣФЛ	6,6	16,3	7,0	64,8	-	1,7	3,7	-	-
ΣЭ Кл	мг/г с.в	2,70 [0,88;3,25] *	1,68± 0,87 *	0,74 [0,51;0,95] *	-	-	-	-	-	7,8± 1,7 *
ΣНЭ Кл	мг/г с.в	0,20 [0,14;0,34]	0,49± 0,34	0,23 [0,17;0,36]	-	-	-	-	-	3,5± 1,5

Примечания. ФЛ – фосфолипиды, ФХ – фосфатидилхолины, ФЭ – фосфатидилэтаноламины, ФС – фосфатидилсерины, ФИ – фосфатидилинозиты, ФГ – фосфатидилглицерины, ДФГ – дифосфатидилглицерины, ФК – фосфатидная кислота, ФЛ_н – неидентифицированный ФЛ, э – эмбрионные клеточные линии, нэ – неэмбрионные клеточные линии, с.в. – сухой вес клеточной линии, ΣФЛ – сумма фосфолипидов. n=6, в таблице приведены средние значения и их стандартные отклонения, значимость различий

рассчитана с помощью t-критерия, ^{a,b} – различия между Кл23 и всеми эмбриогенными линиями (^a), различия между Кл31 и всеми эмбриогенными линиями (^b), различия между Кл31 и эмбриогенными линиями Кл4, Кл6, Кл10 (^b) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Для данных по суммарному содержанию разных типов фосфолипидов Σ Э Кл и Σ НЭ Кл представлены средние значения и их стандартные отклонения (в случае нормального распределения) или Me с планками погрешностей 25% и 75% процентилями, * - наличие значимых различий, значимость различий средних значений между двумя типами линий рассчитана с помощью t-критерия и U-критерия Манна–Уитни. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Доминирующими ФЛ для эмбриогенных клеточных линий были ФХ и ФЭ (табл. 9), для неэмбриогенных линий доминирующим ФЛ была ФК (табл. 9). Однако следует отметить, что линия Кл2 отличалась в этом отношении от других эмбриогенных линий: относительное содержание ФК в составе этой линии составило 50%.

Для эмбриогенных клеточных линий были обнаружены значительно более высокие относительные содержания ФХ и ФЭ. Так, эмбриогенные клеточные линии достоверно отличались от неэмбриогенных по высокому содержанию ФХ (0,43–3,49 мг/г сухого веса) (табл. 9). При этом Кл2 отличалась наиболее низким абсолютным содержанием ФХ (0,43 мг/г сухого веса) по сравнению с другими эмбриогенными линиями.

В тоже время в клеточных линиях *L. sibirica* относительное содержание ФХ достигало 37,5% (Кл6) для эмбриогенных линий, в то время как неэмбриогенные линии содержали значительно меньшее количество этого фосфолипида – 6,5%. В литературе имеются сведения по относительному содержанию ФХ для культуры *in vitro* некоторых видов растений.

Например, для соматических зародышей культуры *Glycine max* (Guschina et al., 2014) и морфогенных каллусов *D. innoxia* (Monoharan et al., 1987) относительное содержание ФХ составляло 38 и 33%, соответственно. Для неэмбриогенных и эмбриогенных клеточных линий черешни (*P. avium*)

установлено, что ФХ является для них основным ФЛ (Reidiboym-Talleux and Grenier-De March, 1999). Авторами отмечено, что средний уровень ФХ в эмбрионных тканях был в 9 раз выше, чем в неэмбрионных каллусах. В работе (Zur et al., 2002b), посвященной влиянию сахарозы, мио-инозитола и ФХ на процессы индукции и дифференциации каллусов *B. napus*, авторы наблюдали быстрое нарастание скорости поглощения этих соединений регенерирующей каллусной тканью после переноса на среду, стимулирующую регенерацию. Авторы делают вывод, что эти соединения, в том числе ФХ, играют важную роль на самых ранних стадиях дифференциации, и изменения в их содержании могут быть полезны в качестве возможного раннего прогностического теста на органогенную способность каллусов.

Что касается ФЭ, то можно отметить, что Кл2 также содержала меньшее, чем другие эмбрионные клеточные линии, количество ФЭ (0,40 мг/г и 1,64–2,59 мг/г сухого веса, соответственно) и чем неэмбрионная линия Кл31 (0,79 мг/г сухого веса) (табл. 9). Относительное содержание ФЭ для эмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской достигало 27,8%, что согласуется с данными для *D. innoxia*, однако, для культуры *G. tax* содержание этого ФЛ составляло 6,4%. Для эмбрионных клеточных линий *P. avium* также было показано значительно более высокое количество ФЭ (примерно в 5 раз) по сравнению с неэмбрионными.

Таким образом, ФХ и ФЭ являются двумя наиболее распространенными видами ФЛ в эукариотических клетках. ФХ – основной источник ДГ, ФК, лизофосфатидной и арахидоновой кислот, которые могут далее метаболизироваться в сигнальные молекулы (Gibellini and Smith, 2010). Достаточно высокие содержания ФХ позволяют клеткам контролировать избирательную проницаемость мембран для ионов и воды (Pukacki, 2004). ФЭ играет основную роль в мембранной архитектуре – он имеет коническую форму с небольшой относительно поперечного сечения гидрофобных хвостов полярной головной группой (Gibellini and Smith, 2010). По этой причине он

способен образовывать обращенные неламеллярные структуры, например, гексагональную.

Зачастую в работах, посвященных изучению ФЛ у растений и грибов, подверженных действию различных стрессоров, а также в условиях культуры *in vitro*, используют отношение ФХ/ФЭ как параметра, зависящего от особенностей структуры мембраны, влияющих на ее функциональность (Wu et al., 2005). Для ламеллярных мембранных структур характерно более высокое значение отношения ФХ/ФЭ, в то время как снижение этого отношения показывает образование различных гексагональных структур в мембране. Снижение отношения ФХ/ФЭ способствует процессу дегидратации, увеличению проницаемости мембран и может приводить к их повреждению и нарушению целостности, что, в свою очередь, вызывает образование каналов, через которые осуществляется пассивный транспорт воды (Wu et al., 2005).

Рассчитанное по результатам экспериментов для клеточных линий *L. sibirica* отношение ФХ/ФЭ (рис. 20) для эмбриогенных линий листовенницы было достоверно выше в 1,4–3,8 раз, чем для неэмбриогенных. В целом этот показатель для эмбриогенных клеточных линий во всех случаях был выше 1, а для неэмбриогенных – ниже 0,8. В работе (Sathishkumar and Manoharan, 1996) показано, что для каллусов риса (*Oryza sativa*) соотношение ФХ/ФЭ составляло 1,1, однако при добавлении в среду холина этот показатель увеличивался до 1,7. Авторы сделали вывод, что холин является перспективным агентом для стимуляции быстрой пролиферации культур *O. sativa*. Отношение ФХ/ФЭ для эмбриогенных линий *P. avium* было выше в 12 и более раз в отличие от неэмбриогенных линий (Reidiboym-Talleux and Grenier-De March, 1999), а для неморфогенных каллусов *D. innoxia* (Manoharan et al., 1987) составило 1,2, в то время как для его морфогенных каллусов, образующих побеги, эта величина составила около 1,5.

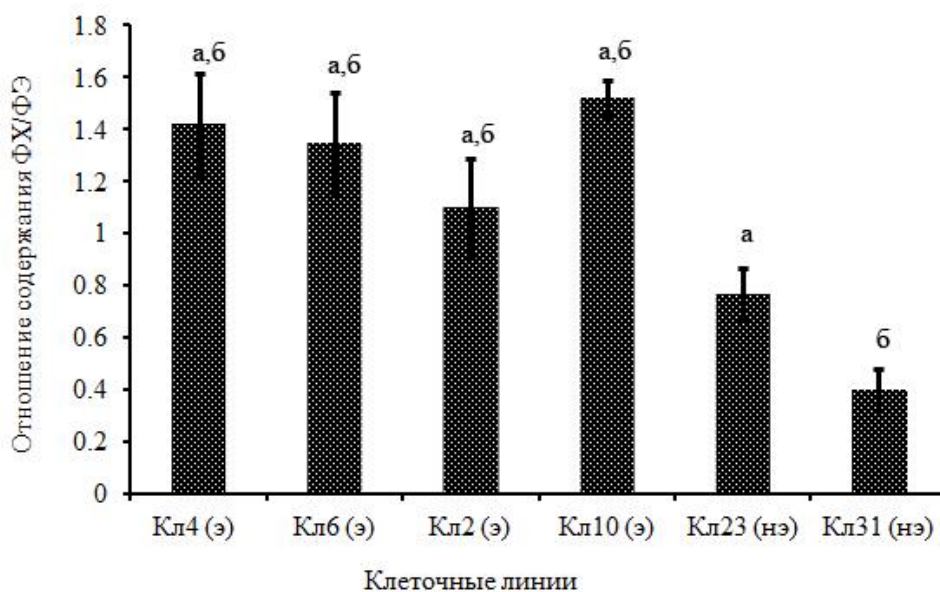


Рис. 20. Отношение содержания ФХ/ФЭ у эмбрионных и неэмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской *L. Sibirica*: э – эмбрионные клеточные линии, нэ – неэмбрионные клеточные линии. *Примечания.* n=6, данные представлены средними значениями и их стандартными отклонениями, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{а,б} – различия между Кл23 и эмбрионными линиями (^а), различия между Кл31 и эмбрионными линиями (^б) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. С помощью t-критерия проведено сравнение значимости различий средних значений отношения ФХ/ФЭ между двумя типами линий, различающихся по способности к эмбриогенезу, различия были статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

В целом, исходя из полученных данных, а также литературных источников, логично предположить, что высокое относительное содержание ФХ и ФЭ, а также высокие показатели отношения ФХ/ФЭ, по-видимому, сопровождают и, возможно, в какой-то степени определяют активные ростовые процессы у эмбрионных клеточных линий в процессе развития культуры.

В клеточных линиях *L. sibirica* абсолютные содержания ФК для неэмбрионной Кл23 и эмбрионных клеточных линий достоверно не различались (1,19–2,74 мг/г сухого веса) (табл. 9). Достоверные различия по этому признаку с эмбрионными линиями найдены только для одной

неэмбриогенной линии Кл31. Можно предположить, что такие различия в абсолютном содержании ФК между неэмбриогенными линиями обусловлены низким общим содержанием ФЛ у Кл23. Что касается относительного содержания ФК для неэмбриогенных клеточных линий, оно было более 64% от общего содержания ФЛ (76,8% – Кл23 и 64,8% – Кл31), в то время как для эмбриогенных ее относительное содержание было заметно ниже – от 16 (Кл10) до 50% (Кл2). Эти результаты позволяют заключить, что ФК является основным типом ФЛ неэмбриогенных клеточных линий у лиственницы сибирской. ФК, самый простой мембранный ФЛ, является липидным медиатором регуляции ряда клеточных процессов, таких как сигнальная трансдукция, мембранный транспорт и перестройка цитоскелета (Xue et al., 2009). У растений ФК служит вторичным мессенджером и реагирует изменением содержания в ответ на различные биотические и абиотические стрессы, включая засуху, засоление, ранение, холод, гибель клеток (Xue et al., 2009). Для *A. thaliana* показано, что у двойного мутанта по генам биосинтеза ФЛ *cds1cds2* содержание ФК было в 6 раз больше, чем у дикого типа (Zhou et al., 2013). В связи с этим авторы пришли к выводу, что высокое содержание ФК вызывает дефекты деления и удлинения клеток. Поскольку ФК содержится в неэмбриогенных линиях в значительно больших относительных количествах по сравнению с эмбриогенными, а также с учетом литературных данных можно предположить, что высокое содержание ФК способно оказывать негативное влияние на способность культуры *in vitro* к эмбриогенезу. Кроме того, как уже упоминалось ранее, авторы работы (Wu et al., 2014) показано, что с накоплением ФК происходит снижение содержания брассиностероидов, которые являются регуляторами роста и развития растений *in vivo* и *in vitro* (Nolan et al., 2017).

Известно, что ФИ – субстрат для полифосфоинозитов (ПФИ), которые обеспечивают пролиферацию клеток и организацию в них цитоскелета, транспорт везикул к вакуоли и т.п. (Джамеев, 2014), и могут функционировать

как сигнальные липиды (Munnik and Nielsen, 2011). ПФИ играют важную роль при формировании клеточной полярности и дифференциации клеток (Munnik and Nielsen, 2011). В клеточных линиях *L. sibirica* нами установлено, что абсолютное содержание ФИ достоверно различается для эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий (табл. 9). Для эмбриогенных линий оно составляло 0,50–1,06 мг/г сухого веса (11,9–20,3 мг/г общих липидов (ОЛ), порядка 10% от суммы ФЛ), в то время как для неэмбриогенных 0,17–0,34 мг/г сухого веса (4,7–9,0 мг/г ОЛ, порядка 7% от суммы ФЛ). В литературе имеются данные о различиях между уровнями ФИ при сравнительном анализе липидного состава мембран клеток на разных стадиях дифференциации в культуре ткани, в которых также показано более высокое содержание ФИ в морфогенных тканях. Так, содержание ФИ для неморфогенных каллусов *D. innoxia* составило 9% (1,8 мг/г сухого веса) от суммы полярных липидов, а для морфогенных каллусов достигало 18% (4,7 мг/г сухого веса) от суммы полярных липидов (Monoharan et al., 1987). Для морфогенных клеточных линий озимой пшеницы было зафиксировано высокое содержание ФИ (50 мг/г ОЛ) (Filek et al., 1993). Для эмбриогенных клеточных линий *P. avium* обнаружено, что содержание ФИ выше более чем в 2 раза по сравнению с неэмбриогенными (Reidiboym-Talleux and Grenier-De March, 1999). Авторами ранее упомянутой работы (Zhou et al., 2013) отмечено не только увеличение содержания ФК для двойного мутанта по генам *cds1cds2*, участвующим в синтезе ФЛ, но и низкое содержание ФИ (6% от суммы ФЛ) по сравнению с диким типом. Авторы связывают резкое снижение уровня ФИ у нежизнеспособных мутантов с дефектами клеточного деления. В целом, в морфогенных и в частности эмбриогенных клеточных линиях наблюдается более высокое содержание ФИ по сравнению с неморфогенными и в частности неэмбриогенными, что, вероятно, связано с его способностью образовывать ПФИ.

В составе ФЛ клеточных линий листовницы сибирской в минорных количествах обнаруженыДФГ, ФГ и ФС (табл. 9). При этом ФС обнаружен

только в эмбрионных клеточных линиях Кл4 (0,42 мг/г сухого веса), Кл2 (0,47 мг/г сухого веса), Кл10 (0,12 мг/г сухого веса). Обычно ФС содержится в мембранах в незначительных количествах, однако, помимо его структурной функции, он участвует, по-видимому, и в других клеточных процессах. Например, обнаружено, что мутация гена *pss1-1*, кодирующего фосфатидилсеринсинтазу 1 у *A. thaliana*, вызывает нарушение деления клеток и их удлинения (Liu et al., 2013). Содержание ДФГ также было выше в 2 и более раза (0,43–0,51 мг/г сухого веса) у эмбрионных линий, чем у неэмбрионных. В клетках линии Кл23 нами обнаружены следовые количества этого ФЛ. Известно, что ДФГ (кардиолипин) является характерным ФЛ внутренней мембраны митохондрий (Bligny and Douce, 1980). Показано, что нехватка ДФГ в митохондриях сопровождается падением мембранного потенциала, снижением синтеза АТФ и в целом митохондриальной функции, а его отсутствие приводит к дестабилизации суперкомплексов дыхательной цепи (Рахманкулова, 2014). Нами был обнаружен ФГ в эмбрионных клеточных линиях Кл4 (0,31 мг/г сухого веса), Кл6 (0,10 мг/г сухого веса), Кл2 (0,45 мг/г сухого веса), Кл10 (0,51 мг/г сухого веса) и в неэмбрионной линии Кл31 (0,08 мг/г сухого веса). В неэмбрионной Кл23 нашими методами не было обнаружено ФГ, возможно его количество оказалось ниже предела обнаружения метода. Авторами работы (Manoharan et al., 1987) показано также, что для неморфогенных каллусов *D. innoxia* содержание ФГ было меньше (0,8 мг/г сухого веса), чем в морфогенных каллусах (1,2 мг/г сухого веса). Известно, что в растительных клетках ФГ в основном является ФЛ тилакоидных мембран, однако он может встречаться и в других клеточных мембранах (Babiychuk et al., 2003). Например, мембраны митохондрий также содержат ФГ (Bligny and Douce, 1980; Rokorna et al., 2016), кроме того, ФГ является важным источником ДФГ (Michaud et al., 2016), который, как уже было сказано выше, играет важную роль в процессах дыхания у растений и синтезе АТФ. Можно предположить, что ФС, ФГ и ДФГ, содержащиеся в эмбрионных линиях в

больших количествах, также могут принимать участие в эмбриогенезе клеточных линий лиственницы сибирской, поскольку известно, что эти ФЛ важны для нормального функционирования процессов роста и развития у растений (Liu et al., 2013; Рахманкулова, 2014; Michaud et al., 2016).

Анализ полученных результатов показывает, что содержание и качественный состав ФЛ в культуре *in vitro* закономерно различаются между клеточными линиями с разным эмбриогенным потенциалом. Эмбриогенные клеточные линии содержат больше ФХ, ФЭ, наиболее распространенных форм ФЛ, необходимых для формирования мембран клеток и клеточных органелл. Для эмбриогенных клеточных линий также характерны высокие значения отношения содержаний этих двух типов липидов (ФХ/ФЭ) показателя, свидетельствующего о функциональном состоянии клеточных мембран. Низкие его значения могут указывать на увеличение проницаемости мембран и даже на их повреждение. Соответствующее содержание ФХ и ФЭ на фоне высокого отношения ФХ/ФЭ обеспечивают наряду с другими функционально важными ФЛ активный рост эмбриогенных клеточных линий в процессе развития культуры на ранних стадиях культивирования. Полученные данные свидетельствуют в пользу представлений о том, что ФХ играет важную роль на самых ранних стадиях дифференциации. Особый интерес представляют результаты анализа содержания ФИ. Установлено, что для тканей эмбриогенных клеточных линий характерно значительно более высокое содержание этого ФЛ. Вероятно, это является критически важным для эмбриогенеза, поскольку известно, что низкие содержания ФИ вызывают дефекты клеточного деления.

В целом, полученные результаты позволяют предположить, что ФЛ, в первую очередь, ФХ, ФЭ и ФИ, играют важную роль в процессах эмбриогенеза в тканях лиственницы сибирской *in vitro* на ранних стадиях культивирования.

3.5.2. Гликолипиды

Еще одним важным компонентом мембран, помимо ФЛ, в являются ГЛ. Причем наиболее распространенными среди них являются моногалактозилдиглицерид (МГДГ), дигалактозилдиглицерид (ДГДГ) и сульфохиновозилдиглицерид (СХДГ) (Wang et al., 2018; Guo et al., 2019). Известно, что ДГДГ обеспечивает стабильность мембран, тогда как МГДГ важен для опосредования липид-белковых взаимодействий и увеличения морфологической пластичности липидных бислоев (Guo et al., 2019). Кроме того, ГЛ могут заменять ФЛ в мембранах растений при отсутствии фосфатов (Kalisch et al., 2016). В клеточных линиях лиственницы сибирской содержание ГЛ было достаточно высоким (от 39,9% (Кл2) до 52,7% (Кл31) от суммы липидов), поэтому представлялось важным этапом изучение состава ГЛ клеточных линий с разным эмбрионным потенциалом.

В составе ГЛ были обнаружены и идентифицированы: МГДГ и ДГДГ. Было установлено, что содержание МГДГ в клетках эмбрионных линий достоверно выше, чем в неэмбрионных (табл. 10) и составляло от 6,0 (Кл10) до 9,4 (Кл2) мг/г сухого веса для эмбрионных линий и от 4,6 (Кл23) до 5,1 (Кл31) мг/г сухого веса для неэмбрионных. Для ДГДГ достоверных различий не наблюдалось, содержание этого гликолипида варьировало от 2,2 (Кл10) до 5,0 (Кл31) мг/г сухого веса образца. В работах связанных с выращиванием каллусов, а также с изучением их процессов дифференциации или регенерации, было отмечено накопление МГДГ в процессе культивирования. Так, в работе (Manoharan et al., 1987) показано, что в процессе дифференциации каллусов, полученных из листьев *D. innoxia*, происходит накопление МГДГ от 2,5 до 8,1 мг/г сухого веса, содержание ДГДГ увеличивалось в 1,5 раза, от 2,1 до 3,2 мг/г сухого веса. Подобные результаты получены в работе (Bhardwaj et al., 1995) для каллусов, полученных из ствола *A. marmelos*, в которых процесс дифференциации также сопровождался накоплением МГДГ от 0,8 до 1,9 мг/г сухого веса. Показано также накопление МГДГ в процессе регенерации для

каллусов *Kalanchoe crenata* (Thomas and Stobart, 1970) и *Brassica napus* L. сорта Drakkar (Williams et al., 1991).

Таблица 10

Содержание ГЛ в эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линиях
лиственницы сибирской *L. sibirica*

Содержание ГЛ, мг/г с.в.	Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл2 (э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)	ΣЭ Кл	ΣНЭ Кл
МГДГ	6,5± 1,1 ^{а,б}	7,3± 1,4 ^{а,б}	9,4± 0,4 ^{а,б}	6,0± 0,7 ^{а,б}	4,6± 0,3 ^а	5,1± 0,1 ^б	7,0 [5,9;8,9]*	5,0 [4,5;5,1]
ДГДГ	2,3± 0,6	3,5± 0,3	3,6± 0,0	2,2± 0,3	3,3± 0,3	5,0± 0,3	-	-
МГДГ/ДГДГ	2,9± 0,8 ^{а,б}	2,1± 0,4 ^{а,б}	2,6± 0,1 ^{а,б}	2,8± 0,7 ^{а,б}	1,4± 0,1 ^а	1,0± 0,1 ^б	2,6±0,6*	1,2±0,2
ΣГЛ	8,8± 1,2	10,8± 1,5	13,0± 0,4	8,2± 1,0	7,9± 0,6	10,1± 0,3	-	-

Примечания. э – эмбриогенные линии, нэ – неэмбриогенные линии. n=6, в таблице приведены средние значения и их стандартные отклонения, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{а,б} – различия между Кл23 и всеми эмбриогенными линиями (^а), различия между Кл31 и всеми эмбриогенными линиями (^б), считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Для данных по суммарному содержанию ГЛ ΣЭ Кл и ΣНЭ Кл представлены средние значения и их стандартные отклонения (в случае нормального распределения) или Me с планками погрешностей 25% и 75% процентилями, * - наличие значимых различий, значимость различий средних значений МГДГ и отношения МГДГ/ДГДГ между двумя типами линий рассчитана с помощью t-критерия и U-критерия Манна–Уитни. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Интересно отметить соотношение МГДГ/ДГДГ, которое в основном используют для описания фазовых переходов мембран (Rast et al., 2015), однако, в случае описания процессов дифференциации каллусов, авторы также используют соотношение МГДГ/ДГДГ (Manoharan et al., 1987; Zur et al., 2002a). В наших исследованиях этот показатель достоверно отличался для эмбриогенных и неэмбриогенных линий. Так, для эмбриогенных клеточных линий это соотношение варьировало от 2,1 (Кл6) до 2,9 (Кл4), а для неэмбриогенных составляло 1,0 (Кл31) и 1,4 (Кл23), соответственно.

Многочисленными работами показано, что в процессе дифференциации каллусов происходит увеличение этого соотношения, например для четырех недельных каллусов ярового масличного рапса (*Brassica napus* L. var. *Oleifera*, сорт Спок) с 0,3 до 1,2 (Zur et al., 2002a), каллусов оливы европейской (*Olea europaea* L.) с 2 до 2,3 (Williams et al., 1993), каллусов дурмана (*D. innoxia*) с 1,2 до 2,4 (Manoharan et al., 1987). В работе (Filek et al., 2005) были выделены пластиды из эмбриогенных и неэмбриогенных каллусов, полученных из незрелых цветков озимой пшеницы сорта Камила, и показано, что пластиды неэмбриогенных каллусов были наиболее богаты МГДГ и ДГДГ (более 62% от общих липидов), по сравнению с эмбриогенными (44% от общих липидов). Соотношение МГДГ/ДГДГ составило 1,5 для неэмбриогенных каллусов и 2,7 для эмбриогенных, кроме этого в работе отмечено, что в эмбриогенных и неэмбриогенных каллусах пшеницы имеются различия в толщине мембранного бислоя. Так, для эмбриогенных каллусов толщина бислоя составила 3,8 нм, а для неэмбриогенных – 4,1 нм (Filek et al., 2005).

Следует отметить, что относительное содержание МГДГ и ДГДГ в клеточных линиях листовенницы сибирской составляет от 42,0 (Кл6) до 65,3 (Кл2) % от всей фракции ГЛ. По-видимому во фракции гликолипидов содержатся и другие гликолипиды, не обнаруженные нашими методами в силу ограниченных возможностей. Так, во фракции ГЛ, помимо распространенных МГДГ и ДГДГ, могут содержаться МГМГ (моноголактозилмоноглицерид), ДГМГ (дигалактозилмоноглицерид), СХДГ. Например, показано, что в семенах пшеницы содержатся МГМГ и ДГМГ (Khan and Shewry, 2009). В семенах *Picralima nitida* также содержатся МГМГ и ДГМГ, причем содержание МГМГ достигало 68% от суммы ГЛ (Adebowale et al., 2012).

Таким образом, можно заключить, что МГДГ, вероятно, принимает непосредственное участие в процессах эмбриогенеза, а высоким соотношением МГДГ/ДГДГ можно использовать в качестве маркера эмбриогенности для клеточных линий листовенницы сибирской.

Заключение

В наших экспериментах использовались эмбриогенные клеточные линии *L. sibirica* Ledeb. с сформированными незрелыми соматическими зародышами, которые в дальнейшем развиваются в растения-регенеранты, а также неэмбриогенные линии, для которых незрелые соматические зародыши не формировались (Третьякова и Барсукова, 2012).

В составе ненасыщенных ЖК липидов неэмбриогенных клеточных линий относительное содержание олеиновой кислоты составляло 12,0–14,8%, в то время как в составе липидов эмбриогенных линий относительное содержание этой кислоты достигало 32,1–56,5%. Помимо того, что олеиновая кислота входит в состав липидов, она служит также посредником в передаче сигналов, в том числе в процессах клеточной дифференциации (Dobrzyn and Ntambi, 2005). С другой стороны, олеиновая кислота активирует PLD δ , в результате чего повышается уровень ФК (Zhang et al., 2003). Можно предположить, что функции олеиновой кислоты для эмбриогенных и неэмбриогенных линий принципиально различные. Если в эмбриогенных линиях олеиновая кислота способствует дифференциации клеток, то в неэмбриогенных линиях ее функция, скорее всего, состоит в участии в биосинтезе ФК.

Реакция ФК на различные биотические и абиотические стрессоры проявляется в изменении ее содержания (Xue et al., 2009). Авторы работы (Zhou et al., 2013) пришли к выводу, что высокое содержание ФК вызывает дефекты деления и удлинения клеток. Кроме того, в работе (Wu et al., 2014) показано, что с накоплением ФК происходит снижение содержания brassinosterin, которые как уже говорилось ранее, являются регуляторами роста и развития растений *in vivo* и *in vitro* (Nolan et al., 2017; Kreis and Muller-Uri, 2010; Bajguz et al., 2020). По-видимому, высокое содержание ФК в неэмбриогенных клеточных линиях листовницы сибирской играет негативную роль в клеточной дифференциации. ФК синтезированная из ДГ в тканях эмбриогенных линий может расходоваться на синтез других важных для процессов эмбриогенеза

ФЛ, таких как ФХ, ФИ, ФЭ и др. (Li-Beisson et al., 2016). Наши исследования показали, что эмбриогенные клеточные линии лиственницы сибирской отличались высоким содержанием ФХ, ФИ, ФЭ, по сравнению с неэмбриогенными. Эти ФЛ, по всей видимости, играют важную роль на самых ранних стадиях дифференциации, обеспечивая пролиферацию клеток, организацию в них цитоскелета и транспорт везикул к вакуоли. Кроме того, они могут функционировать и как сигнальные липиды (Zur et al., 2002b; Munnik and Nielsen 2011; Джамеев, 2014).

Источниками ФК и ТГ являются ДГ (Gibellini and Smith, 2010; Dubots et al., 2012; Moessinger et al., 2014; Almena and Merida, 2011), ДГ в неэмбриогенных линиях может, в основном, расходоваться на образование ФК, а не на образование ТГ, поскольку в неэмбриогенных клеточных линиях лиственницы сибирской отмечено низкое содержание ТГ. В эмбриогенных линиях обратная ситуация: низкое содержание ФК и высокое содержание ТГ. ТГ, в свою очередь, могут быть источником ЖК, в том числе олеиновой кислоты, которая, как говорилось ранее, принимает активное участие в процессах клеточной дифференциации (Dobrzyn and Ntambi, 2005). ТГ могут быть источником и других ЖК. Известно также, что при культивировании растений происходит активное накопление ТГ (Attree et al., 1992; Brownfield et al., 2007), необходимых для процессов роста и развития (Fan et al., 2013; Xu et al., 2018; Shimada et al., 2018).

Важно отметить, что для клеточных линий лиственницы сибирской суммарное содержание ЖКОДЦ отличалось для групп с разным потенциалом эмбриогенности. Содержание этих кислот было достоверно выше для эмбриогенных клеточных линий (Кл4, Кл6, Кл10, Кл5), по сравнению с неэмбриогенными (Кл23 и КлЛ). ЖКОДЦ, оказывают положительное влияние на пролиферацию (Trinh et al., 2019), дифференциацию (Жуков, 2018) и растяжение клеток растений в ходе морфогенеза (Zheng et al., 2005; Жуков, 2018).

Сравнительный анализ липидного состава у эмбрионных и неэмбрионных клеточных линий *L. sibirica* показал, что липидный обмен у них существенным образом различается, что, возможно, влияет на способность клеточных линий к формированию растений-регенерантов на более поздних этапах развития клеточной культуры.

На основании результатов проведенного исследования и с учетом имеющихся в научной литературе данных нами предложена следующая схема особенностей липидного обмена в клеточных линиях лиственницы сибирской с разным эмбрионным потенциалом (рис. 21).

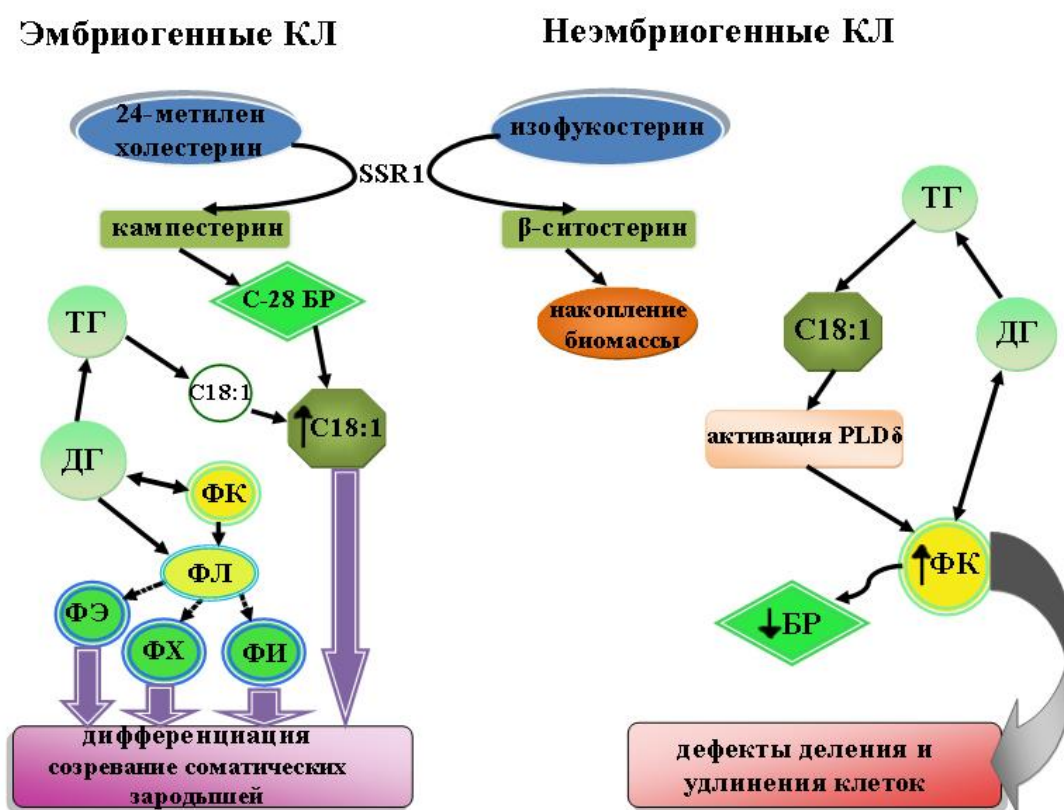


Рис. 21. Схема липидного обмена в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской *L. sibirica* Ledeb.

Примечания. КЛ – клеточные линии, SSR1 - редуктаза боковой цепи, С-28 БР – С28 brassinosteroids, ↑С18:1 – повышение содержания олеиновой кислоты, ↑ФК – повышение содержания фосфатидной кислоты, ↓БР – понижение содержания brassinosteroids, ТГ – триглицериды, ДГ – диглицериды, ФЛ – фосфолипиды, ФЭ – фосфатидилэтаноламины, ФХ – фосфатидилхолины, ФИ – фосфатидилинозиты.

В многочисленных работах (Qian et al., 2013; Jang et al., 2000; Diener et al., 2000; Carland et al., 2002 и др.) было показано, что стерины являются необходимыми участниками процессов пролиферации и дифференциации клеток, участвуя, таким образом, в эмбриогенезе. Нами обнаружено более активное накопление изофукостерина в эмбрионных линиях, по сравнению с неэмбрионными. Изофукостерин далее конвертируется в β -ситостерин посредством работы фермента SSR1. Можно предположить, что в эмбрионных клеточных линиях идет активный синтез стерина, необходимый для роста и развития, за счет накопления ими изофукостерина. В биосинтезе стерина SSR1 участвует в образовании β -ситостерина из изофукостерина, а также в образовании кампестерина из 24-метилхолестерина (Sonawane et al., 2016; Bajguz et al., 2020). Мы предполагаем, что у эмбрионных клеточных линий, для которых было отмечено более низкое содержание β -ситостерина, работа SSR1 направлена на синтез кампестерина, в отличие от неэмбрионных, для которых изофукостерин не обнаружен или обнаружен в малых количествах. Вероятно, изофукостерин активно конвертировался в процессе биосинтеза β -ситостерина, которого в неэмбрионных линиях было больше, чем в эмбрионных. Имеющиеся в литературе сведения дают основания предполагать, что более высокие содержания β -ситостерина у неэмбрионных клеточных линий листовницы сибирской связаны с процессом накопления биомассы каллуса (Cuhna and Fernandes Ferreira, 1997), в то время как для эмбрионных клеточных линий этот стерин вовлечен в более сложные процессы дифференциации и в образование C29-брасиностероидов (Nakamoto et al., 2015; Bajguz et al., 2020). Для эмбрионных линий было показано заметно более высокое содержание кампестерина, по сравнению с неэмбрионными. Этот стерин, как известно, является субстратом для C28-брасиностероидов (Bajguz et al., 2020), которые принимают активное участие в процессах роста и развития (Kreis and Muller-Uri, 2010; Bajguz et al., 2020).

В работе (Janeczko et al., 2009) было показано, что при культивировании озимого маслиничного рапса внесение в питательную среду 24-эпибрассинолида вызывало увеличение содержания олеиновой кислоты, в частности в ДГДГ. Вероятно, С28-брассинолиды могут влиять на увеличение содержания олеиновой кислоты как в ГЛ, так и в других липидах. В подтверждение этого следует отметить, что в наших экспериментах обнаружены впечатляющие различия в относительном и абсолютном содержании олеиновой кислоты между линиями с разной эмбриогенностью.

Следует отметить также, что выявленные нами особенности состава ЖК, НЛ, ФЛ, ГЛ и стеринов эмбриогенных клеточных линий *L. sibirica* могут быть полезны при скрининге клеточных линий с целью отбора материала для клонального размножения хвойных в культуре *in vitro*. Маркером компетентности клеток к инициации соматического эмбриогенеза могут служить высокие значения соотношений: стерины/эфирные стерины, ФХ/ФЭ, МГДГ/ДГДГ; а также высокое содержание олеиновой кислоты для эмбриогенных клеточных линий, по сравнению с неэмбриогенными.

Выводы

1. ЖК-состав эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий *L. sibirica* Ledeb. существенно различался. Основное различие касалось главной мононенасыщенной олеиновой кислоты, относительное и абсолютное содержание которой было достоверно выше у эмбриогенных клеточных линий по сравнению с неэмбриогенными во всех фракциях липидов (31,5-61,4% и 10,4-20,6%, соответственно).

2. Суммарное содержание ЖК с очень длинной цепью, играющих важную роль в сигнальных системах клеток растений и в эмбриогенезе, было достоверно выше у большинства эмбриогенных клеточных линий *L. sibirica* (3,0-7,3 мг/г сухого веса) по сравнению с неэмбриогенными (1,1-1,9 мг/г сухого веса).

3. Для эмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской характерно более высокое содержание суммарных липидов. Количественный и качественный состав отдельных липидных групп: НЛ, ФЛ и ГЛ в культуре *in vitro* лиственницы сибирской различался между двумя типами клеточных линий за счет более высокого содержания соединений, для которых показана регуляторная роль в отношении эмбриогенеза (ЖК, ФИ, ФК, ФХ).

4. Содержание и качественный состав свободных стеринов и эфиров стеринов в культуре *in vitro* лиственницы сибирской у эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий существенно различались. Эмбриогенные клеточные линии содержали больше кампестерина, а неэмбриогенные линии β -ситостерина.

5. По-видимому, НЛ и ФЛ в бóльшей степени, чем ГЛ задействованы в процессах роста и развития клеточных линий лиственницы сибирской на ранней стадии культивирования за счет таких соединений как ТГ, ДГ, свободных стеринов, жирных кислот (в первую очередь моноеновых), ФИ, ФЭ, ФХ.

Список литературы

1. Аёшина Е.Н. Регенерация *Juniperus sibirica* В. *in vitro* / Е.Н. Аёшина, Н.А. Величко // Хвойные бореальной зоны. – 2008. – Т. 25, №3-4. – С. 333–336.
2. Алаудинова Е.В. Особенности обмена глицеридов меристем почек *Larix sibirica* Ledeb. / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов // Хвойные бореальной зоны. – 2009. – Т. 26, №2. – С. 291–293.
3. Алаудинова Е.В. Липиды меристем лесообразующих хвойных пород центральной сибери в условиях низкотемпературной адаптации. 3. Особенности обмена нейтральных липидов меристем почек *Larix sibirica* Ledeb., *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. / Е.В. Алаудинова, В.А. Поваляева, П.В. Миронов // Химия растительного сырья. – 2010. – №1. – С. 67–74.
4. Алексеев В.А. Древесные растения лесов России. Список видов и государственный учет биоразнообразия лесных ресурсов / В.А. Алексеев, О.А. Связева. – Красноярск: СО РАН, Институт леса им. В.Н. Сукачева, 2009. – 182 с.
5. Баранчиков Ю.Н. Размер галла и уровень паразитизма личинок листовенничной почковой галлицы / Ю.Н. Баранчиков // Лестной вестник. – 2006. – №2. – С. 64–67.
6. Барченков А.П. Изменчивость семян сибирских видов листовенницы / А.П. Барченков, Л.И. Милютин, А.П. Исаев // Лесоведение. – 2007. – №2. – С. 65–69.
7. Барченков А.П. Морфологическая изменчивость генеративных органов листовенницы сибирской в Восточной Сибири и Северо-Восточной Монголии / А.П. Барченков, Л.И. Милютин, С.Жамъянсурен // Хвойные бореальной зоны. – 2012. – Т. 29, №1–2. С. 16–20.
8. Батыгина Т.Б. Хлебное зерно: атлас / Т.Б. Батыгина. – Л.: Наука, 1987. –103 с.

9. Богданова Е.С. Липиды, жирные кислоты и пигменты листьев *Dictamnus caucasicus* Fisch. ex. Grossh. (Rutaceae) / Е.С. Богданова, В.Н. Нестеров, С.А. Сенатор [и др.] // Химия растительного сырья. – 2020. – №3. – С. 233–238.
10. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
11. Валитова Ю.Н. Растительные стерины: многообразие, биосинтез, физиологические функции / Ю.Н. Валитова, А.Г. Сулкарнаева, Ф.В. Минибаева // Биохимия. – 2016. – Т. 81, №8. – С. 1050–1068.
12. Васьковский В.Е. Липиды / В.Е. Васьковский // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – Т. 3. – С. 32–37.
13. Ведрова Э.Ф. Динамика экологических функций лесов под воздействием природных и антропогенных факторов / Э.Ф. Ведрова, Л.В. Мухортова, Л.В. Кривобоков // Сборник научных трудов ГНБС. – 2018. – №147. – С. 28–31.
14. Володькина О.А. Опыт интродукции лиственницы в Пензенской области / О.А. Володькина, А.А. Володькин // Нива Поволжья. – 2010. – №4 (17). – С. 77–81.
15. Громадин А.В. Дедрология: Учебное пособие / А.В. Громадин. – М.: Изд-во РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева, 2010. – 848 с.
16. Джамеев В.Ю. Фосфолипидный сигналинг у растений / В.Ю. Джамеев // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія. – 2014. – №3 (33). – С. 80–95.
17. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений: курс лекций / Т.И. Дитченко. – Издатель БГУ, 2007. – 102 с.
18. Дударева Л.В. Влияние низкоинтенсивного излучения гелий-неонового лазера на жирнокислотный состав каллусных тканей пшеницы

(*Triticum aestivum* L.) / Л.В. Дударева, Е.Г. Рудиковская, В.Н. Шмаков // Биологические мембраны. – 2014. – Т. 31, №5. – С. 364–364.

19. Дударева Л.В. Липидный и жирнокислотный состав морфогенных и неморфогенных каллусов пшеницы *Triticum aestivum* L / Л.В. Дударева, Е.Г. Рудиковская, С.В. Ланкевич // Биологические мембраны. – 2016. – Т. 33, №2. – С. 133–139.

20. Дударева Л.В. Компонентный состав фитостеринов надземной части хвоща пестрого *Equisétum variegatum* Schleich. ex. Web., произрастающего в северо-восточной Якутии / Л.В. Дударева, Н.В. Семенова, В.В. Нохсоров // Химия растительного сырья. – 2020. – №2. – С. 133–139.

21. Жуков А.В. Жирные кислоты с очень длинной цепью в составе мембранных липидов растений / А.В. Жуков // Физиология растений. – 2018. – Т. 65, №6. – С. 418–437.

22. Карбасникова Е.Б. Особенности сезонного развития лиственницы (*Larix* Mill.) в условиях южной подзоны тайги / Е.Б. Карбасникова, Н.А. Бабич, А.А. Карбасников // Лесной вестник/Forestry bulletin. – 2020. – Т. 24, №3. – С. 53–59.

23. Красноперова В.В. Роль вегетативного размножения хвойных растений в культуре *in vitro* для нужд лесного и садово-паркового хозяйства / В.В. Красноперова, Д.Н. Власевский // Пермский аграрный вестник. – 2017, №4 (20). С. 18–22.

24. Красноперова В.В. Изучение метода культуры *in vitro* как способа вегетативного размножения хвойных древесных пород / В.В. Красноперова, И.Л. Бухарина // Российская сельскохозяйственная наука. – 2019. – №6. – С. 19–22.

25. Кривова З.В. Влияние фосфорного голодания на жирнокислотный состав штаммов рода *Vischeria* / З.В. Кривова, Е.И. Мальцев, М.С. Куликовский // Вопросы современной альгологии. – 2021. – Т. 26, №2. – С. 159–163.

26. Круглова Н.Н. Каллус *in vitro* как модельная система для изучения органогенеза растений / Н.Н. Круглова, О.А. Сельдимирова, А.Е. Зинатуллина // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2019. – №2. – С. 44–54.
27. Лебедев В.Г. Проявление соматклональной изменчивости у микроразмноженных и трансгенных растений / В.Г. Лебедев, А.Б. Азарова, К.А. Шестибратов [и др.] // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2012. – №1. – С. 153–163.
28. Логунов Д.В. Биологические особенности семян некоторых видов лиственницы (*Larix Mill.*) в озеленительных посадках города Нижнего Новгорода / Д.В. Логунов // Вестник Нижегородской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. – №4 (20). – С. 28–32.
29. Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот / Д.А. Лось. – М.: Научный мир, 2014. – 359 с.
30. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот / Д.А. Лось // Успехи биол. химии. – 2001. – Т. 41. – С. 163–198.
31. Макаренко С.П. Жирнокислотный состав липидов каллусов двух видов лиственницы (*Larix gmelinii* и *Larix sibirica*) / С.П. Макаренко, В.Н. Шмаков, Т.А. Коненкина [и др.] // Химия растительного сырья. – 2014. – №2. – С. 121–127.
32. Милютин Л.И. Биоразнообразие лиственниц России / Л.И. Милютин // Хвойные бореальной зоны. – 2003. – Т. 21, №1. – С. 1–4.
33. Милютин Л.И. Изученность лесных генетических ресурсов Сибири / Л.И. Милютин // Сибирский лесной журнал. – 2016. – №3. – С. 3–9.
34. Нельсон Д. Основы биохимии Ленинджера. В 3 т. Т.1. пер. с англ. / Д. Нельсон, М. Кокс. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 694 с.
35. Нохсоров В.В. Свободные жирные кислоты и адаптация организмов к холодному климату Якутии / В.В. Нохсоров, Л.В. Дударева, В.А. Чепалов [и др.] // Вестник БГСХА им. ВР Филиппова. – 2015. – Т. 38, №1. – С. 127–134.

36. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений / И.В. Митрофанова // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т.41, №6. – С. 496–508.
37. Нестеров В.Н. Изменение состава липидов у пресноводного растения *Hydrilla verticillata* при накоплении и удалении из тканей ионов тяжелых металлов / В.Н. Нестеров, О.А. Розенцвет, С.В. Мурзаева // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, №1. – С. 97–106.
38. Новицкий Ю.И. Влияние вращения растений редиса вокруг вертикальной оси на морфологию и липидный состав листьев / Ю.И. Новицкий, Г.В. Новицкая, Т.К. Кочешкова [и др.] // Физиология растений. – 2011. – Т. 58, №2. – С. 308–315.
39. Орешкова Н.В. Генетическое разнообразие, популяционная структура и дифференциация листовенниц сибирской, Гмелина и Каяндера по данным SSR-маркеров / Н.В. Орешкова, М.М. Белоконов, С.Жамьянсурен // Генетика. – 2013. – Т. 49, №2. – С. 204–213.
40. Пак М.Э. Эмбриогенный потенциал длительно пролиферирующих клеточных линий *Larix sibirica in vitro* / М.Э. Пак, А.С. Иваницкая, Л.М. Двойнина [и др.] // Сибирский лесной журн. – 2016. – №1. – С. 27–38.
41. Пименов А.В. Качество семян морфотипов листовенницы сибирской на юге Сибири / А.В. Пименов, Т.С. Седельникова, А.С. Аверьянов // Флора и растительность Сибири и Дальнего Востока. – 2016. – С. 298–301.
42. Плынская Ж.А. Культивирование хвойных в условиях *in vitro* / Ж.А. Плынская, Е.Н. Аёшина, Н.А. Величко // Хвойные бореальной зоны. – 2008. – Т. 25, №1–2. – С. 68–70.
43. Рахманкулова З.Ф. Дыхательные суперкомплексы растительных митохондрий: структура и возможные функции / З.Ф. Рахманкулова // Физиология растений. – 2014. – Т. 61, №6. – С. 765–777.
44. Розенцвет О.А. Эколого-биохимический подход к изучению липидов высших водных растений / О.А. Розенцвет, С.В. Саксонов, В.Г. Козлов

[и др.] // Изв. Самарского научного центра РАН. – 2000. – Т. 2, №2. – С. 358–366.

45. Рысин Л.П., Савельева Л.И. Сосновые леса России / Л.П. Рысин, Л.И. Савельева. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 289 с.

46. Рысин Л.П. Лиственничные леса России / Л.П. Рысин. – Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2010. – 343 с.

47. Рысин Л.П. Хвойные леса России / Л. П. Рысин // Изв. Самарского научного центра РАН. – 2012. – Т. 14, №1(4). – С. 1106–1109.

48. Рысин Л.П. Пихтовые леса России / Л.П. Рысин, Ю.И. Манько, С.М. Бебия. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2012. – 197 с.

49. Седельникова Т.С. Изменчивость размера генома хвойных растений в экстремальных условиях произрастания / Т.С. Седельникова // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2017. – №. 20. – С. 37–41.

50. Тимофеева О.А. Культура клеток и тканей растений / О.А. Тимофеева, Н.И. Румянцева. – Казань: изд-во КФГУ, 2012. – 91 с.

51. Третьякова А.В. Особенности получения каллусной культуры пихты сибирской *Abies sibirica* Ledeb / А.В. Третьякова, Е.А. Демина, Н.И. Рекославская [и др.] // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. – 2014. – Т. 10. – С. 11–23.

52. Третьякова И.Н. Сохранение генофонда хвойных видов Сибири при помощи соматического эмбриогенеза *in vitro* – современного метода биотехнологии / И. Н. Третьякова, А. В. Барсукова // Хвойные бореальной зоны. – 2010. – Т. 27, №1–2. С. 203–206.

53. Третьякова И.Н. Перспективы микроклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез / И.Н. Третьякова, Е.В. Ворошилова, В.Н. Шуваев [и др.] // Хвойные бореальной зоны. – 2012. – Т. 30, №1–2. – С. 180–186.

54. Третьякова И.Н. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы / И.Н. Третьякова, А.В. Барсукова // Онтогенез. – 2012. – Т. 43, №6. С. – 425–425.
55. Третьякова И.Н. Эмбриогенные клеточные линии и соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* у лиственницы сибирской / И.Н. Третьякова // Доклады АН. – 2013. – Т. 450, №1. – С. 122–125.
56. Третьякова И.Н. Продуктивность эмбриогенных клеточных линий и их соматическая изменчивость у лиственницы сибирской *in vitro* / И.Н. Третьякова, А.С. Иваницкая, М.Э. Пак // Лесоведение. – 2015. – №1. – С. 27–35.
57. Третьякова И.Н. Соматический эмбриогенез *Pinus pumila* и продуктивность эмбриогенных линий при длительном культивировании *in vitro* / И.Н. Третьякова, Д.Н. Шуваев // Онтогенез. – 2015. – Т. 46, №5. – С. 327–327.
58. Третьякова И.Н. Соматический полиэмбриогенез *Larix sibirica* в эмбриогенной культуре *in vitro* / И.Н. Третьякова, М.Э. Пак // Онтогенез. – 2018. – Т. 49, №4. – С. 251–263.
59. Улитин М.М. Сравнительная оценка таксационных показателей лесных культур лиственницы сибирской (*Larix sibirica*) при интродукции в Нижегородской области / М.М. Улитин, В.П. Бессчетнов // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал. – 2020. – №6. – С. 33–41.
60. Фоменко Т.И. Особенности морфогенеза и регенерации растений в культуре *in vitro* люпина узколистного / Т.И. Фоменко, М.К. Малюш // Физиология и биохимия культурных растений. – 2010. Т. 42, №4. – С. 306–314.
61. Чиркова Т.В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям / Т.В. Чиркова // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 9. – С. 12–17.
62. Шайхразиев Ш.Ш. Исследование лиственничников Республики Татарстан / Ш.Ш. Шайхразиев, С.Г. Глушко // Вестник Казанского ГАУ. – 2017. – №4. – С. 50–53.

63. Широков А.И., Крюков Л.А. Основы биотехнологии растений: электронное учебно-методическое пособие / А.И. Широков, Л.А. Крюков. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет. – 2012. – 49 с.
64. Adebowale Y.A. Lipid composition and molecular speciation of the triacylglycerol of the oil of *Picralima nitida* / Y. A. Adebowale, A. Adewuyi, K. O. Adebowale // GIDA. – 2012. – V. 37, №1. P. 1–7.
65. Agarwal M. Phytochemical screening of sterols extracted from *Cichorium intybus* in vivo and in vitro / M. Agarwal, R. Sarin // WJPPS. – 2014. – V. 3, №2. – P. 1349–1360.
66. Athenstaedt K. The life cycle of neutral lipids: Synthesis, storage and degradation / K. Athenstaedt, G. Daum // Cell. Mol. Life Sci. – 2006. – V. 63. – P. 1355–1369.
67. Almena M. Shaping up the membrane: Diacylglycerol coordinates spatial orientation of signaling / M. Almena, I. Merida // Trends Biochem. Sci. – 2011. – V. 36, №1. – P. 593–603.
68. Alvarez J.M. Hormonal and gene dynamics in de novo shoot meristem formation during adventitious caulogenesis in cotyledons of *Pinus pinea* / J.M. Alvarez, N. Bueno, C. Cuesta [et al.] // Plant Cell Rep. – 2020. – V. 39, №4. – P. 527–541.
69. Arunyanart S. Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.) / S. Arunyanart, M. Chaitrayagun // Sci. Hortic. – 2005. – V. 105, №3. – P. 411–420.
70. Attree S.M. Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance / S.M. Attree, M.K. Pomeroy, L.C. Fowke // Planta. – 1992. – V.187. – P. 395–404.
71. Babiychuk E. Arabidopsis phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function / E. Babiychuk, F. Muller, H. Eubel [et al.] // Plant J. – 2003. – V. 33. – P. 899–909.

72. Bach L. Role of very-long-chain fatty acids in plant development, when chain length does matter / L. Bach, J.D. Faure // *C. R. Biol.* – 2010. – V. 333, №4. – P. 361–370.
73. Bach L. Very-long-chain fatty acids are required for cell plate formation during cytokinesis in *Arabidopsis thaliana* / L. Bach, L. Gissot, J. Marion [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2011. – V. 124, №19. – P. 3223–3234.
74. Barbaglia A.M. Long-distance lipid signaling and its role in plant development and stress response / A.M. Barbaglia, S. Hoffmann-Benning // *Lipids in Plant and Algae Development.* – 2016. – P. 339–361.
75. Bailey R.B. Yeast sterol esters and their relationship to the growth of yeast / R.B. Bailey, L.W. Parks // *J. Bacteriol.* – 1975. – V. 124, №2. – P. 606–612.
76. Bajguz A. Comprehensive overview of the Brassinosteroid biosynthesis pathways: Substrates, products, inhibitors, and connections / A. Bajguz, M. Chmur, D. Gruszka // *Front. Plant Sci.* – 2020. – V. 11. – P. 1–9.
77. Banas A. Cellular sterol ester synthesis in plant is performed by an enzyme (Phospholipid: sterol acyltransferase) different from the yeast and mammalian acyl-CoA: sterol acyltransferases / A. Banas, A.S. Carlsson, B. Huang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280, №41. – P. 34626–34634.
78. Banas W. Activities of acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) and phospholipid: diacylglycerol acyltransferase (PDAT) in microsomal preparations of developing sunflower and safflower seeds / W. Banas, A. S. Garcia, A. Banas [et al.] // *Planta.* – 2013. – V. 237, №6. – P. 1627–1636.
79. Benson E.E. Fluorescent lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in tissue cultures of *Vitis vinifera* L. / E.E. Benson, K.A. Roubelakis-Angelakis // *Plant Sci.* – 1992. – V. 84, №1. – P. 83–90.
80. Bhardwaj L. Changes in the composition of membrane lipids in relation to differentiation in *Aegle marmelos* callus cultures / L. Bhardwaj, J.-M. Merillon, K.G. Ramawat // *PCTOC.* – 1995. – V. 42. P. 33–37.

81. Bligny R. A precise localization of cardiolipin in plant cells / R. Bligny, R. Douce // BBA. – 1980. – V. 617. – P. 254–263.
82. Bonga J.M. Can explant choice help resolve recalcitrance problems in *in vitro* propagation, a problem still acute especially for adult conifers? / J.M. Bonga // Trees. – 2017. – V. 31, №3. – P. 781–789.
83. Bonfils F. Enhanced solvent extraction of polar lipids associated with rubber particles from *Hevea brasiliensis* / F. Bonfils, E.E. Ehabe, C. Aymard [et al.] // Phytochem. Anal. – 2007. – V. 18, №2. – P. 103–108.
84. Brownfield D.L. Patterns of storage protein and triacylglycerol accumulation during loblolly pine somatic embryo maturation / D.L. Brownfield, C.D. Todd, S.L. Stone [et al.] // PCTOC. – 2007. – V. 88, №2. – P. 217–223.
85. Cai Z. Direct and indirect *in vitro* plant regeneration and the effect of brassinolide on callus differentiation of *Populus euphratica* Oliv. / Z. Cai, X. Jing, X. Tian [et al.] // S. Afr. J. Bot. – 2015. – V. 97. – P. 143–148.
86. Calney J. Cellular and molecular biology of coniferon biogenesis / J. Calney, G.S. Pullman // New Phytol. – 2007. – V. 176. – P. 511–536.
87. Cao H. Non-specific phospholipase C1 affects silicon distribution and mechanical strength in stem nodes of rice / H. Cao, L. Zhuo, Y. Su [et al.] // Plant J. – 2016. – V. 86, №4. – P. 308–321.
88. Carland F.M. The identification of CVP1 reveals a role for sterols in vascular patterning / F.M. Carland, S. Fujioka, S. Takatsuto [et al.] // Plant Cell. – 2002. – V. 14. – P. 2045–2058.
89. Cartea M.E. Comparison of sense and antisense methodologies for modifying the fatty acid composition of *Arabidopsis thaliana* oilseed / M.E. Cartea, M. Migdal, A.M. Galle [et al.] // Plant Sci. – 1998. – V. 136, №2. – P. 181–194.
90. Chapman K.D. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants / K.D. Chapman, J.M. Dyer, R.T. Mullen // J. Lipid Res. – 2012. – V. 53, №2. – P. 215–226.
91. Chen J.E. A look at diacylglycerol acyltransferases (DGATs) in algae / J.E. Chen, A.G. Smith // J. Biotechnol. – 2012. – V. 162. – P. 28–39.

92. Cheng W.H. De novo transcriptome analysis reveals insights into dynamic homeostasis regulation of somatic embryogenesis in upland cotton (*G. hirsutum* L.) / W.H. Cheng, H.G. Zhu, W.G. Tian [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2016. – V. 92, №3. – P. 279–292.
93. Chiu P.L. Sterol composition of nystatin and amphotericin B resistant tobacco calluses / P.L. Chiu, P.J. Bottino, G.W. Patterson // *Lipids.* – 1980. – V. 15, №1. – P. 50–54.
94. Christie W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis / W.W. Christie // *Adv. Lipid Methodology.* – 1993. – №. 2. – P. 69–111.
95. Christenhusz M.J.M. A new classification and linear sequence of extant gymnosperms / M.J.M. Christenhusz, J.L. Reveal, A. Farjon [et al.] // *Phytotaxa.* – 2011. – V. 19. – P. 55–70.
96. Clouse S.D. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development / S.D. Clouse // *Plant Cell.* – 2011. – V. 23, №4. – P. 1219–1230.
97. Cuesta C. Caulogenic induction in cotyledons of stone pine (*Pinus pinea*): relationship between organogenic response and benzyladenine trends in selected families / C. Cuesta, A. Rodríguez, M.L. Centeno [et al.] // *J. Plant Physiol.* – 2009. – V. 166, №11. – P. 1162–1171.
98. Cunha A.C. Ontogenic variations in free and esterified fatty acids during somatic embryogenesis of flax (*Linum usitatissimum* L.) / A.C. Cunha, M. Fernandes-Ferreira // *Plant Sci.* – 2003. – V. 164, №5. – P. 863–872.
99. Cunha A. Differences in free sterols content and composition associated with somatic embryogenesis, shoot organogenesis and calli growth of flax / A. Cunha, M. Fernandes Ferreira // *Plant Sci.* 1997. V. 124. P. 97–105.
100. Deng S. Phytosterol content and the campesterol: sitosterol ratio influence cotton fiber development: role of phytosterols in cell elongation / S. Deng, T. Wei, K. Tan [et al.] // *Sci. China Life Sci.* – 2016. – V. 59, №2. – P. 183–193.

101. Deng S. WRINKLED1 transcription factor orchestrates the regulation of carbon partitioning for C18: 1 (oleic acid) accumulation in Siberian apricot kernel / S. Deng, Y. Mai, L. Shui [et al.] // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9, №1. – P. 1–11.
102. Destailats F. Identification of monoacylglycerol regio-isomers by gas chromatography–mass spectrometry / F. Destailats, C. Cruz-Hernandez, K. Nagy [et al.] // *J. Chromatogr A.* – 2010. – V. 1217, №9. – P. 1543–1548.
103. Diener C.A. *Sterol methyltransferase 1* controls the level of cholesterol in plants / C.A. Diener, H. Li, W. Zhou [et al.] // *Plant Cell.* – 2000. – V. 12. – P. 853–870.
104. Dobrzyn A. The role of stearoyl-CoA desaturase in the control of metabolism / A. Dobrzyn, J.M. Ntambi // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* – 2005. – V. 73. – P. 35–41.
105. Dodeman V.L. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis / V.L. Dodeman, G. Ducreux, M. Kreis // *J. Exp. Bot.* – 1997. – V. 48, №8. – P. 1493–1509.
106. Dolch L.J. Inventory of fatty acid desaturases in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* / L.J. Dolch, E. Marechal // *Mar. drugs.* – 2015. – V. 13, №3. – P. 1317–1339.
107. Dong W. Does diacylglycerol serve as a signaling molecule in plants? / W. Dong, H. Lv, G. Xia [et al.] // *Plant signal. Behav.* – 2012. – V. 7, №4. – P. 472–475.
108. Drobak B.K. The plant phosphoinositide system / B.K. Drobak // *Biochem. J.* – 1992. – V. 288. – P. 697–712.
109. Dubois M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton [et al.] // *Anal. Chem.* – 1956. – V. 28, №3. – P. 350–356.
110. Dubots E. Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis / E. Dubots, C. Botte, L. Boudiere [et al.] // *Biochimie.* – 2012. – V. 94, №1. – P. 86–93.

111. Dupont S. Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? / S. Dupont, G.Lemetais, T. Ferreira [et al.] // *Evol.; Int. J. Org. Evol.* – 2012. – V. 66, №9. – P. 2961–2968.
112. Dyas L. Steryl esters in a cell suspension culture of celery (*Apium graveolens*) / L. Dyas, M.C. Prescott, R.P. Evershed [et al.] // *Lipids.* – 1991. – V. 26, №7. – P. 536–541.
113. Fahy E. Lipid classification, structures and tools / E. Fahy, D. Cotter, M. Sud [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* – 2011. – V. 1811, №11. – P. 637–647.
114. Fan J. Dual role for phospholipid: diacylglycerol acyltransferase: enhancing fatty acid synthesis and diverting fatty acids from membrane lipids to triacylglycerol in Arabidopsis leaves / J. Fan, C. Yan, X. Zhang [et al.] // *Plant Cell.* – 2013. – V. 25, №9. – P. 3506–3518.
115. Fan J. Arabidopsis lipins, PDAT1 acyltransferase, and SDP1 triacylglycerol lipase synergistically direct fatty acids toward β -oxidation, thereby maintaining membrane lipid homeostasis / J. Fan, C. Yan, R. Roston [et al.] // *Plant Cell.* – 2014. – V. 26, №10. – P. 4119–4134.
116. Farjon A. The Kew review: Conifers of the world / A. Farjon // *Kew Bulletin.* – 2018. – V. 73, №. 1. – P. 1–16.
117. Feher A. Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate / A. Feher // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* – 2015. – V. 1849, №4. – P. 385–402.
118. Feher A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? / A. Feher // *Front. Plant Sci.* – 2019. – V. 10. – P. 536.
119. Feirer R.P. Triglycerides in embryogenic conifer calli: A comparison with zygotic embryos / R.P. Feirer, J.H. Conkey, S.A. Verhagen // *Plant Cell Rep.* – 1989. – V. 8. – P. 207–209.

120. Filek M. Changes of surface potential and phospholipid composition of winter wheat callus cells grown at 5 and 25 °C / M. Filek, K. Pazurkiewicz-Kocot, F. Dubert [et al.] // J. Agron. Crop. Sci. – 1993. – V. 171. – P. 243–250.
121. Filek M. Effect of indole-3-acetic acid on surface properties of the wheat plastid lipids / M. Filek, B. Gzyl, P. Laggner [et al.] // J. Plant Physiol. – 2005. – V. 162, №3. – P. 245–252.
122. Finkelstein R. Abscisic acid or high osmoticum promote accumulation of long-chain fatty acids in developing embryos of *Brassica napus* / R. Finkelstein, C. Somerville // Plant Sci. – 1989. – V. 61, №2. – P. 213–217.
123. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley // J. Biol. Chem. – 1957. – V. 226, №1. – P. 497–509.
124. Fujii S. Role of galactolipids in plastid differentiation before and after light exposure / S. Fujii, H. Wada, K. Kobayashi // Plants. – 2019a. – V. 8, №10. – P. 1–17.
125. Fujii S. Galactolipids are essential for internal membrane transformation during etioplast-to-chloroplast differentiation / S. Fujii, N. Nagata, T. Masuda [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2019b. – V. 60, №6. – P. 1224–1238.
126. Gao F. Selection of culture conditions for callus induction and proliferation by somatic embryogenesis of *Pinus koraiensis* / F. Gao, C. Peng, H. Wang [et al.] // J. For. Res. – 2021. – V. 32. – P. 483–491.
127. Gaspar T. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture / T. Gaspar, C. Kevers, C. Penel [et al.] // In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 1996. – V. 32, №4. – P. 272–289.
128. Geng P. Differentiation of whole grain from refined wheat (*T. aestivum*) flour using lipid profile of wheat bran, germ, and endosperm with UHPLC-HRAM mass spectrometry / P. Geng, J.M. Harnly, P. Chen // J. Agric. Food Chem. – 2015. – V. 63, №27. – P. 6189–6211.

129. Gibellini F. The Kennedy pathway – *de novo* synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine / F. Gibellini, T.K. Smith // IUBMB Life. – 2010. – V. 62, №6. – P. 414–428.
130. Giagnacovo G. Organogenesis and embryogenesis from callus cultures of *Azadirachta excelsa* / G. Giagnacovo, G. Pasqua, B. Monacelli [et al.] // Plant Biosystems. – 2001. – V. 135, №1. – P. 13–18.
131. Gomez-Fernandez J.C. Diacylglycerols, multivalent membrane modulators / J.C. Gomez-Fernandez, S. Corbalan-Garcia // Chem. Phys. Lipids. – 2007. – V. 148. – P. 1–25.
132. Grafi G. How cells dedifferentiate: a lesson from plants / G. Grafi // Dev. Biol. – 2004. – V. 268, №1. – P. 1–6.
133. Grafi G. Plant response to stress meets dedifferentiation / G. Grafi, V. Chalifa-Caspi, T. Nagar [et al.] // Planta. – 2011. – V. 233, №3. – P. 433–438.
134. Graham I.A. Seed storage oil mobilization / I.A. Graham // Annu. Rev. Plant Biol. – 2008. – V. 59. – P. 115–142.
135. Grigova M. Storage lipid dynamics in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*): Histochemical and quantitative analyses / M. Grigova, M. Kubes, N. Drazna [et al.] // Tree Physiol. – 2007. – V. 27. – P. 1533–1540.
136. Guan Y. Application of somatic embryogenesis in woody plants / Y. Guan, S.G. Li, X.F. Fan [et al.] // Front. Plant Sci. – 2016. – V. 7. – P. 1–12.
137. Guo Q. Membrane lipid remodeling in response to salinity / Q. Guo, L. Liu, B.J. Barkla // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – V. 20, №17. – P. 1–31.
138. Gupta S.D. Light emitting diode (LED)-induced alteration of oxidative events during *in vitro* shoot organogenesis of *Curculigo orchioides* Gaertn. / S.D. Gupta, T.K. Sahoo // Acta Physiol. Plant. – 2015. – V. 37, №11. – P. 1–9.
139. Guschina I.A. Studies on the regulation of lipid biosynthesis in plants: application of control analysis to soybean / I.A. Guschina, J.D. Everard, A.J. Kinney [et al.] // BBA. – 2014. – V. 1838. – P. 1488–1500.

140. Gzyl-Malcher B. Studies of lipid monolayers prepared from native and model plant membranes in their interaction with zearalenone and its mixture with selenium ions / B. Gzyl-Malcher, M. Filek, E. Rudolphi-Skorska [et al.] // *J. Membr. Biol.* – 2017. – V. 250, №3. – P. 273–284.
141. Hake S. The role of knox genes in plant development / S. Hake, H.M. Smith, H. Holtan [et al.] // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2004. – V. 20. – P. 125–151.
142. Hartmann M.A. Plant sterols and the membrane environment / M.A. Hartmann // *Trends Plant Sci.* – 1998. – V. 3, №5. – P. 170–175.
143. Harvey A.E. Procedures and media for obtaining tissue cultures of 12 conifer species / A.E. Harvey, J.L. Grasham // *Canad. J. Bot.* – 1969. – V. 47, №4. – P. 547–549.
144. Harwood J.L. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids / J.L. Harwood // *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* – 1996. – V. 1301, №1–2. – P. 7–56.
145. Harwood J.L. Plant acyl lipids: structure, distribution, and analysis / J.L. Harwood // *Lipids: Structure and Function.* – Academic Press, 1980. – C. 1–55.
146. Heilmann I. Phosphoinositide signaling in plant development / I. Heilmann // *Development.* – 2016. – V. 143, №12. – P. 2044–2055.
147. Helling D. Pollen tube tip growth depends on plasma membrane polarization mediated by tobacco PLC3 activity and endocytic membrane recycling / D. Helling, A. Possart, S. Cottier [et al.] // *Plant Cell.* – 2006. – V. 18, №12. – P. 3519–3534.
148. Hu X. Early signals transduction linking the synthesis of jasmonic acid in plant / X. Hu, L. Wansha, Q. Chen [et al.] // *Plant Signal. Behav.* – 2009. – V. 4, №8. – P. 696–697.
149. Huang J. The mechanism of high contents of oil and oleic acid revealed by transcriptomic and lipidomic analysis during embryogenesis in *Carya cathayensis* Sarg. / J. Huang, T. Zhang, Q. Zhang [et al.] // *BMC Genomics.* – 2016. – V. 17. – P. 1–18.

150. Hudec L. Norway spruce embryogenesis: changes in carbohydrate profile, structural development and response to polyethylene glycol / L. Hudec, H. Konradova, A. Haskova [et al.] // *Tree Physiol.* – 2016. – V. 36, №5. – P. 548–561.
151. Hussein H.M. Antimicrobial Activity and spectral chemical analysis of methanolic leaves extract of *Adiantum Capillus-Veneris* using GC-MS and FT-IR spectroscopy / H.M. Hussein, I.H. Hameed, O.A. Ibraheem // *J. Pharmacogn. Phytochem.* – 2016. – V. 8, №3. – P. 369–385.
152. Iheagwam F.N. GC-MS analysis and inhibitory evaluation of *Terminalia catappa* leaf extracts on major enzymes linked to diabetes / F.N. Iheagwam, E.N. Israel, K.O. Kayode [et al.] // *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* – 2019. – V. 2019. – P. 1–14.
153. Ines C. Regulation of sterol content and biosynthetic gene expression during flower opening and early fruit development in olive / C. Ines, J. Corbacho, M. A. Paredes [et al.] // *Physiol. Plant.* – 2019. – V. 167, №4. – P. 526–539.
154. Jacomini D. Lipid profile and antiproliferative activity of callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. / D. Jacomini, R.C. Sinzker, C.A. Mangolin [et al.] // *Ind. Crops Prod.* – 2015. – V. 69. – P. 408–414.
155. Janeczko A. Temperature-dependent impact of 24-epibrassinolide on the fatty acid composition and sugar content in winter oilseed rape callus / A. Janeczko, K. Hura, A. Skoczowski [et al.] // *Acta Physiol. Plant.* – 2009. – V. 31, №1. – P. 71–79.
156. Jang J.C. A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the fackel mutants of *Arabidopsis thaliana* / J.C. Jang, S. Fujioka, M. Tasaka [et al.] // *Genes Dev.* – 2000. – V. 14, №12. – P. 1485–1497.
157. Kachroo A. Plastidial fatty acid signaling modulates salicylic acid–and jasmonic acid–mediated defense pathways in the *Arabidopsis ssi2* mutant / A. Kachroo, L. Lapchyk, H. Fukushige [et al.] // *Plant Cell.* – 2003. – V. 15, №12. – P. 2952–2965.

158. Kachroo A. An oleic acid-mediated pathway induces constitutive defense signaling and enhanced resistance to multiple pathogens in soybean / A. Kachroo, D.Q. Fu, W. Havens [et al.] // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2008. – V. 21, №5. – P. 564–575.
159. Kaewubon P. Ultrastructural and biochemical alterations during browning of pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Swartz.) callus / P. Kaewubon, N. Hutadilok-Towatana, J.A.T. da Silva [et al.] // *PCTOC.* – 2015. – V. 121, №1. – P. 53–69.
160. Kalisch B. DGDG and glycolipids in plants and algae / B. Kalisch, P. Dormann, G. Hölzl // *Lipids in Plant and Algae Development.* – 2016. – V.3. – P. 51–83.
161. Kalo P. Analysis of free and esterified sterols in fats and oils by flash chromatography, gas chromatography and electrospray tandem mass spectrometry / P. Kalo, T. Kuuranne // *J. Chromatogr. A.* – 2001. – V. 935, №1–2. – P. 237–248.
162. Kates M. Techniques of lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids. 2 ed. / M. Kates. – Amsterdam-NY-Oxford: Elsevier, 1986. – 464 p.
163. Khan K. Wheat: Chemistry and Technology / K. Khan, P.R. Shewry. – American Association of Cereal Chemists, Inc. (AACC): St. Paul, MN, USA, 2009. – 466 p.
164. Khater N. Preservation of *Juniperus thurifera* L.: a rare endangered species in Algeria through *in vitro* regeneration / N. Khater, H. Benbouza // *J. For. Res.* – 2019. – V. 30, №1. – P. 77–86.
165. Kim H.U. Senescence - inducible LEC2 enhances triacylglycerol accumulation in leaves without negatively affecting plant growth / H.U. Kim, K.R. Lee, S.J. Jung [et al.] // *Plant Biotechnol. J.* – 2015. – V. 13, №9. – P. 1346–1359.
166. Klimaszewska K.K. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000 / K.K. Klimaszewska, C. Hargreaves, M.A. Lelu-Walter [et al.] // *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology.* – 2016. – V.1359. – P. 131–166.

167. Komamine A. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology / A. Komamine, R. Kawahara, M. Matsumoto [et al.] // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 1992. – V. 28, №1. – P. 11–14.
168. Kreis W. Biochemistry of sterols, cardiac glycosides, brassinosteroids, phytoecdysteroids and steroid saponins. / W. Kreis, F. Muller-Uri // *Annu. Plant Rev.* – 2010. – V. 40. – P. 304–363.
169. Krishnamoorthy P. Regulatory roles of phosphoinositides in membrane trafficking and their potential impact on cell-wall synthesis and re-modelling / P. Krishnamoorthy, C. Sanchez-Rodriguez, I. Heilmann [et al.] // *Ann. Bot.* – 2014. – V. 114, №6. – P. 1049–1057.
170. Kumar N.U. A microdroplet cell culture based high frequency somatic embryogenesis system for pigeonpea, *Cajanus cajan* (L.) Millsp. / N.U. Kumar, M. Gnanaraj, V. Sindhuja [et al.] // *Indian J. Exp. Biol.* – 2015. – V. 53. – P. 600–610.
171. Lelu-Walter M.A. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlinsii*). Perspectives for breeding / M.A. Lelu-Walter, L.E. Paques // *Ann. For. Sci.* – 2009. – V. 66. – P. 104p1–104p10.
172. Li N. Fatty acid and lipid transport in plant cells / N. Li, C. Xu, Y. Li-Beisson [et al.] // *Trends Plant Sci.* – 2016. – V. 21, №2. – P. 145–158.
173. Li-Beisson Y. Acyl-lipid metabolism / Y. Li-Beisson, B. Shorrosh, F. Beisson [et al.] // *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists.* – 2013. – P. 1–70.
174. Li-Beisson Y. Lipids: from chemical structures, biosynthesis, and analyses to industrial applications / Y. Li-Beisson, Y. Nakamura, J. Harwood // *Lipids in Plant and Algae Development.* – 2016. – V. 1. – P. 1–18.
175. Lim G.H. Fatty acid–and lipid-mediated signaling in plant defense / G.H. Lim, R. Singhal, A. Kachroo [et al.] // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2017. – V. 55. – P. 505–536.

176. Liu C. PHOSPHATIDYLSERINE SYNTHASE1 is required for inflorescence meristem and organ development in Arabidopsis / C. Liu, H. Yin, P. Gao [et al.] // J. Integr. Plant Biol. – 2013. – V. 55, №8. – P. 682–695.
177. Liu L. Accumulation of petroselinic acid in developing somatic carrot embryos / L. Liu, E.G. Hammond, E.S. Wurtele // Phytochemistry. – 1994. – V. 37, №3. – P. 749–753.
178. Long L.H. Instability of, and generation of hydrogen peroxide by, phenolic compounds in cell culture media / L.H. Long, A. Hoi, B. Halliwell // Arch. Biochem. Biophys. – 2010. – V. 501, №1. – P. 162–169.
179. Mabuchi K. MYB30 links ROS signaling, root cell elongation, and plant immune responses / K. Mabuchi, H. Maki, T. Itaya [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2018. – V. 115, №20. – P. E4710–E4719.
180. Makarenko S.P. Characteristics of lipid fatty acids in calli of two geographic populations of *Larix gmelinii* / S.P. Makarenko, Y.M. Konstantinov, V.N. Shmakov [et al.] // Russ. J. Plant Physiol. – 2005. – V. 52, №3. – P. 298–303.
181. Makarenko S.P. Fatty acid composition of lipids in the calluses of two pine species *Pinus sibirica* and *Pinus sylvestris* / S.P. Makarenko, Y.M. Konstantinov, V.N. Shmakov [et al.] // Russ. J. Plant Physiol. – 2010. – V. 57, №5. – P. 739–743.
182. Malins D.C. Analysis of complex lipid mixtures by thin-layer chromatography and complementary methods / D.C. Malins, H.K. Mangold // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1960. – V. 37, №11. – P. 576–578.
183. Manoharan K. Greening and shoot-differentiation related lipid changes in callus cultures of *Datura innoxia* / K. Manoharan, R. Prasad, S. Guha-Mukherjee // Phytochemistry. – 1987. – V. 26, №2. – P. 407–410.
184. Manoharan K. Senescence-related lipid changes in callus cultures of *Datura innoxia* / K. Manoharan, R. Prasad, S. Guha-Mukherjee // Phytochemistry. – 1990. – V. 29, №8. – P. 2529–2531.

185. Manoharan K. Acclimation of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) to prolonged darkness by use of an alternative carbon source from triacylglycerides and galactolipids / K. Manoharan, T.K. Lee, J.M. Cha [et al.] // Journal of phycology. – 1999. – V. 35, №. 2. – P. 287–292.
186. Manzano D. Suppressing farnesyl diphosphate synthase alters chloroplast development and triggers sterol-dependent induction of jasmonate-and Fe-related responses / D. Manzano, P. Andrade, D. Caudepon [et al.] // Plant Physiol. – 2016. – V. 172, №1. – P. 93–117.
187. Mei C. Levels of polyunsaturated fatty acids correlate with growth rate in plant cell cultures / C. Mei, M. Michaud, M. Cussac [et al.] // Sci. Rep. – 2015. – V. 5, №1. – P. 1–9.
188. Meijer H.J.G. Phospholipid-based signaling in plants / H.J.G. Meijer, T. Munnik // Annu. Rev. Plant Biol. – 2003. – V. 54, №1. – P. 265–306.
189. Michaud M. Glycerolipid synthesis and lipid trafficking in plant mitochondria / M. Michaud, W.A. Prinz, J. Jouhet // FEBS J. – 2016. – V. 284, №3. – P. 376–407.
190. Miras-Moreno B. Bioactivity of phytosterols and their production in plant *in vitro* cultures / B. Miras-Moreno, A.B. Sabater-Jara, M.A. Pedreno [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2016. – V. 64, №38. – P. 7049–7058.
191. Moessinger C. Two different pathways of phosphatidylcholine synthesis, the Kennedy Pathway and the Lands Cycle, differentially regulate cellular triacylglycerol storage / C. Moessinger, K. Klizaite, A. Steinhagen [et al.] // BMC Cell Biol. – 2014. – V. 15, №1. – P. 1–17.
192. Msanne J. Glucosylceramides are critical for cell-type differentiation and organogenesis, but not for cell viability in Arabidopsis / J. Msanne, M. Chen, K.D. Luttgeharm [et al.] // Plant J. – 2015. – V. 84. – P. 188–201.
193. Munnik T. Green light for polyphosphoinositide signals in plants / T. Munnik, E. Nielsen // Curr. Opin. Plant Biol. – 2011. – V. 14. – P. 489–497.

194. Nagalakshmi M.A.H. Phytochemical profile of crude seed oil of *Wrightia tinctoria* R. BR. and *Wrightia arborea* (DENNST.) MABB. by GC-MS / M.A.H. Nagalakshmi, K.S.R. Murthy // Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. – 2015. – V. 31. – P. 46–51.
195. Nakamoto M. Diversification of sterol methyltransferase enzymes in plants and a role for β -sitosterol in oriented cell plate formation and polarized growth / M. Nakamoto, A.C. Schmit, D. Heintz [et al] // Plant J. – 2015. – V. 84, №5. – P. 860–874.
196. Nakamura Y. Plant phospholipid diversity: emerging functions in metabolism and protein–lipid interactions / Y. Nakamura // Trends Plant Sci. – 2017. – V. 22, №12. – P. 1027–1040.
197. Nandi A. Arabidopsis *sfd* mutants affect plastidic lipid composition and suppress dwarfing, cell death, and the enhanced disease resistance phenotypes resulting from the deficiency of a fatty acid desaturase / A. Nandi, K. Krothapalli, C. M. Buseman [et al.] // Plant Cell. – 2003. – V. 15, №10. – P. 2383–2398.
198. Niu Q. Modification of phytosterol composition influences cotton fiber cell elongation and secondary cell wall deposition / Q. Niu, K. Tan, Z. Zang, [et al.] // BMC Plant Biol. – 2019. – V. 19, №1. – P. 1–9.
199. Nobusawa T. Synthesis of very-long-chain fatty acids in the epidermis controls plant organ growth by restricting cell proliferation / T. Nobusawa, Y. Okushima, N. Nagata [et al.] // PLoS Biol. – 2013. – V. 11, №4. – P. 1–15.
200. Nolan T. Cross-talk of Brassinosteroid signaling in controlling growth and stress responses / T. Nolan, J. Chen, Y. Yin // Biochem. J. – 2017. – V. 474, №16. – P. 2641–2661.
201. Ohlrogge J. Lipid biosynthesis / J. Ohlrogge, J. Browse // Plant Cell. – 1995. – V. 7. – P. 957–970.
202. Okazaki Y. Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants / Y. Okazaki, K. Saito // Plant J. – 2014. – V. 79, №4. – P. 584–596.

203. Ozyigit I. I. Phenolic changes during in vitro organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips / I. I. Ozyigit // Afr. J. Biotechnol. – 2008. – V. 7, №8. – P. 1145–1150.
204. Park J. Phosphatidic acid induces leaf cell death in Arabidopsis by activating the Rho-related small G protein GTPase-mediated pathway of reactive oxygen species generation / J. Park, Y. Gu, Y. Lee [et al.] // Plant Physiol. – 2004. – V. 134, №1. – P. 129–136.
205. Pescador R. Comparative study of reserve lipid accumulation during somatic and zygotic *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret embryogenesis / R. Pescador, G.B. Kerbauy, D.Y.A.C. dos Santos [et al.] // Acta Physiol. Plant. – 2012. – V. 34, №2. – P. 771–778.
206. Petereit J. Cardiolipin supports respiratory enzymes in plants in different ways / J. Petereit, K. Katayama, C. Lorenz [et al.] // Front. Plant Sci. – 2017. – V. 8. – P. 1–14.
207. Petrie J. R. Recruiting a new substrate for triacylglycerol synthesis in plants: the monoacylglycerol acyltransferase pathway [et al.] / J.R. Petrie, T. Vanhercke, P. Shrestha [et al.] // PLoS One. – 2012. – V. 7, №4. – P. 1–8.
208. Phillips G.C. Plant tissue culture media and practices: an overview / G. C. Phillips, M. Garda // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2019. – V. 55, №3. – P. 242–257.
209. Pokorna L. Specific degradation of phosphatidylglycerol is necessary for proper mitochondrial morphology and function / L. Pokorna, P. Cermakova, A. Horvath [et al.] // Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg. – 2016. – V. 1857. – P. 34–45.
210. Pollard M. Lipid analysis of developing *Camelina sativa* seeds and cultured embryos / M. Pollard, T.M. Martin, Y. Shachar-Hill // Phytochemistry. – 2015. – V. 118. – P. 23–32.
211. Poot-Poot W. Aluminum stress and its role in the phospholipid signaling pathway in plants and possible biotechnological applications / W. Poot-Poot, T.S.M. Hernande-Sotomayor // IUBMB Life. – 2011. – V. 63, №10. – P. 864–872.

212. Prabha T.N. Lipid profile of cultured cells of apple (*Malus sylvestris*) and apple tissue / T.N. Prabha, P.L. Raina, M.V. Patwardhan // J. Biosciences. – 1988. – V. 13, №1. – P. 33–38.
213. Pukacki P.M. The effect of industrial air pollution on membrane lipid composition of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles / P.M. Pukacki // Acta Soc. Bot. Pol. – 2004. – V. 73, №3. – P. 187–191.
214. Pullman G.S. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice / G. S. Pullman, Y. Zhang, B.H. Phan // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 22, №2. – P. 96–104.
215. Qian P. Sterols are required for cell-fate commitment and maintenance of the stomatal lineage in Arabidopsis / P. Qian, B. Han, E. Forestier [et al.] // Plant J. – 2013. – V. 74, №6. – P. 1029–1044.
216. Quiroz-Figueroa F.R. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants / F.R. Quiroz-Figueroa, R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Avalos [et al.] // PCTOC. – 2006. – V. 86, №3. – P. 285–301.
217. Rademacher W. Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production / W. Rademacher // J. Plant Growth Regul. – 2015. – V. 34, №4. – P. 845–872.
218. Radwan S.S. Lipids in plant tissue cultures IV. The characteristic patterns of lipid classes in callus cultures and suspension cultures / S.S. Radwan, F. Spenser, H.K. Mangold // Chem. Phys. Lipids. – 1975. – V. 14. – P. 72–80.
219. Ramli U.S. Control mechanisms operating for lipid biosynthesis differ in oil-palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and olive (*Olea europaea* L.) callus cultures / U.S. Ramli, D.S. Baker, P.A. Quant [et al.] // Biochem. J. – 2002. – V. 364, №2. – P. 385–391.
220. Rast A. Biogenesis of thylakoid membranes / A. Rast, S. Heinz, J. Nickelsen // Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg. – 2015. – V. 1847, №9. – P. 821–830.

221. Reidiboym-Talleux L. Lipid and fatty acid composition in non-embryogenic calli and embryogenic tissues in wild cherry (*Prunus avium*) / L. Reidiboym-Talleux, G. Grenier-De March // *Physiol. Plant.* – 1999. – V. 105. – P. 513–520.
222. Reinert J. The Cultivation *in vitro* of Tumor Tissues and Normal Tissues of *Picea glauca* / J. Reinert, P.R. White // *Physiol. Plant.* – 1956. – V. 9, №2. – P. 177–189.
223. Rodriguez-Villalon A. Primary root protophloem differentiation requires balanced phosphatidylinositol-4, 5-biphosphate levels and systemically affects root branching / A. Rodriguez-Villalon, B. Gujas, R. van Wijk [et al.] // *Development.* – 2015. – V. 142, №8. – P. 1437–1446.
224. Roudier F. Very-long-chain fatty acids are involved in polar auxin transport and developmental patterning in Arabidopsis / F. Roudier, L. Gissot, F. Beaudoin [et al.] // *Plant Cell.* – 2010. – V. 22, №2. – P. 364–375.
225. Roughan P.G. Quantative analysis of sulfolipid (sulfoquinovosyl diglyceride) and galactolipids (monogalactosyl and digalactosyl diglycerides) in plant tissues / P.G. Roughan, R.D. Batt // *Anal. Biochem.* – 1968. – V. 22. – P. 74–88.
226. Routaboul J.M. The TAG1 locus of Arabidopsis encodes for a diacylglycerol acyltransferase / J.M. Routaboul, C. Benning, N. Bechtold [et al.] // *Plant Physiol. Biochem.* – 1999. – V. 37, №11. – P. 831–840.
227. Ruelland E. Role of phospholipid signalling in plant environmental responses / E. Ruelland, V. Kravets, M. Derevyanchuk [et al.] // *Environ. Exp. Bot.* – 2015. – V. 114. – P. 129–143.
228. Rupps A. Identification of putative homologs of *Larix decidua* to Babyboom (BBM), leafy cotyledon1 (LEC1), Wuschel-related Homeobox2 (WOX2) and somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) during somatic embryogenesis / A. Rupps, J. Raschke, M. Rummeler [et al.] // *Planta.* – 2016. – V. 243, №2. – P. 473–488.

229. Rutter A.J. The effect of dimethoate on lipid biosynthesis in olive (*Olea europaea*) callus cultures / A.J. Rutter, J. Sanchez, J.L. Harwood // *Phytochemistry*. – 1998. – V. 47, №5. – P. 735–741.
230. Sahakyan N.Z. Content of neutral lipids and fatty acids in callus cultures and leaves of intact plants of *Ajuga genevensis* and *Ajuga chia* / N.Z. Sahakyan, M.T. Petrosyan, Y.G. Popov [et al.] // *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* – 2010. – V. 24, №1. – P. 87–90.
231. Santos A.L.W. Somatic embryogenesis in parana pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze) / A.L.W. Santos, V. Silveira, N. Steiner [et al.] // *Braz. Arch. Biol. Technol.* – 2002. – V. 45, №1. – P. 97–106.
232. Sarmast M.K. Genetic transformation and somaclonal variation in conifers / M.K. Sarmast // *Plant Biotechnol. Rep.* – 2016. – V. 10, №6. – P. 309–325.
233. Sathishkumar R. Lipid changes due to growth-factor supplements in callus and plasma membrane-enriched fraction of rice cultures / R. Sathishkumar, K. Manoharan // *Phytochemistry*. – 1996. – V. 43, №6. – P. 1171–1174.
234. Sato M. Effect of exogenous mevalonic acid on sterol lipid classes in *Larix kaempferi* callus. / M. Sato, N. Saito, K. Seki [et al.] // *J. Oleo Sci.* – 2007. – V. 56, №1. P. – 25–28.
235. Schaeffer A. Plant sterol-C24-methyl transferases: different profiles of tobacco transformed with SMT1 or SMT2 / A. Schaeffer, P. Bouvier-Nave, P. Benveniste [et al.] // *Lipids*. – 2000. – V. 35, №3. – P. 263–269.
236. Schaller H. The role of sterols in plant growth and development / H. Schaller // *Prog. Lipid Res.* – 2003. – V. 42, №3. – P. 163–175.
237. Schrick K.A dynamic role for sterols in embryogenesis of *Pisum sativum* / K.A. Schrick, C. Cordova, G. Li [et al.] // *Phytochemistry*. – 2011. – V. 72, №6. – P. 465–475.
238. Severin F.F. Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria targeted protonophore / F.F. Severin, I.I. Severina, Yu.N. Antonenko [et al.] // *PNAS*. – 2010. – V. 107, №2. – P. 663–668.

239. Sharma P. Quantification of β -sitosterol from field grown plants and callus of *Crataeva tapia* L. / P. Sharma, A. Patil, D. Patil // Int. J. Pharm. Sci. – 2016. – V. 7, №4. – P. 1556–1563.
240. Shimada T.L. Membrane dynamics and multiple functions of oil bodies in seeds and leaves / T.L. Shimada, M. Hayashi, I. Hara-Nishimura // Plant Physiol. – 2018. – V. 176, №1. – P. 199–207.
241. Shmakov V.N. Somatic embryogenesis in Larix: the state of art and perspectives / V.N. Shmakov, Y.M Konstantinov // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2020. – V. 24. – №6. – P. 575–588.
242. Silvestro D. Plant sterol metabolism. Δ^7 -Sterol-C5-desaturase (STE1/DWARF7), $\Delta^5,7$ -sterol- Δ^7 -reductase (DWARF5) and Δ^24 -sterol- Δ^24 -reductase (DIMINUTO/DWARF1) show multiple subcellular localizations in *Arabidopsis thaliana* (Heynh) L. / D. Silvestro, T.G. Andersen, H. Schaller [et al.] // PloS One. – 2013. – V. 8. – P. 1–11.
243. Simola L.K. Growth, differentiation, and ultrastructure of microspore callus of *Picea abies* as affected by nitrogenous supplements and light / L.K. Simola, O. Huhtinen // N. Z. J. For. Sci. – 1986. – V. 6, №3. – P. 357–368.
244. Sonawane P.D. Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism / P.D. Sonawane, J. Pollier, S. Panda [et al.] // Nat. Plants. – 2016. – V. 3, №1. – P. 1–13.
245. Stasolla C. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology / C. Stasolla, L. Kong, E. C. Yeung [et al.] // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2002. – V. 38, №2. – P. 93–105.
246. Steward F.C. Growth and organized development of cultured cells I. Growth and division of freely suspended cells / F.C. Steward, M.O. Mapes, J. Smith // Am. J. Bot. – 1958. – V. 45, №9. – P. 693–703.
247. Svobodova H. Somatic embryogenesis in Norway spruce: anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation

process / H. Svobodova, J. Albrechtova, L. Kumstyrova [et al.] // *Plant Physiol. Biochem.* – 1999. – V. 37, №3. – P. 209–221.

248. Sugiyama M. Historical review of research on plant cell dedifferentiation / M. Sugiyama // *J. Plant Res.* – 2015. – V. 128, №3. – P. 349–359.

249. Suzuki M. Lipid droplets: Size matters / M. Suzuki, Y. Shinohara, Y. Ohsaki [et al.] // *Microscopy.* – 2011. – V. 60, №1. – P. S101–S116.

250. Testerink C. Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants / C. Testerink, T. Munnik // *Trends Plant Sci.* – 2005. – V. 10. – №8. – P. 368–375.

251. Taylor F.R. Metabolic interconversion of free sterols and steryl esters in *Saccharomyces cerevisiae* / F.R. Taylor, L.W. Parks // *J. Bacteriol.* – 1978. – V. 136, №2. – P. 531–537.

252. Tejos R. Bipolar plasma membrane distribution of phosphoinositides and their requirement for auxin-mediated cell polarity and patterning in *Arabidopsis* / R. Tejos, M. Sauer, S. Vanneste [et al.] // *Plant Cell.* – 2014. – V. 26, №5. – P. 2114–2128.

253. Testillano P.S. Somatic embryogenesis of *Quercus suber* L. From immature zygotic embryos / P.S. Testillano, A. Gómez-Garay, B. Pintos [et al.] // *Plant Cell Culture Protocols.* – Humana Press, New York, NY, 2018. – P. 247–256.

254. Thelen J.J. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants / J.J. Thelen, J.B. Ohlrogge // *Metab. Eng.* – 2002. – V. 4, №1. – P. 12–21.

255. Thole J.M. Root hair defective encodes a phosphatidylinositol-4-phosphate phosphatase required for proper root hair development in *Arabidopsis thaliana* / J.M. Thole, J.E. Vermeer, Y. Zhang [et al.] // *Plant Cell.* – 2008. – V. 20, №2. – P. 381–395.

256. Thomas D.R. Lipids of Tissue cultures of *Kalanchoë crenata* / D.R. Thomas, A.K. Stobart // *J. Exp. Bot.* – 1970. – V. 21, №67. – P. 274–285.

257. Tian X. Effects of heterologous expression of *Populus euphratica* brassinosteroids biosynthetic enzyme genes CPD (PeCPD) and DWF4 (PeDWF4) on

tissue dedifferentiation and growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings / X. Tian, L. Xuan, B. Liu [et al.] // PCTOC. – 2018. – V. 132, №1. – P. 111–121.

258. Tjellstrom H. Tracking synthesis and turnover of triacylglycerol in leaves / H. Tjellstrom, M. Strawsine, J. B. Ohlrogge // J. Exp. Bot. – 2015. – V. 66, №5. – P. 1453–1461.

259. Trinh D.C. PUCHI regulates very long chain fatty acid biosynthesis during lateral root and callus formation / D.C. Trinh, J. Lavenus, T. Goh [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2019. – V. 116, №28. – P. 14325–14330.

260. Tsai C.H. Tissue culture of cocoa bean (*Theobroma cacao* L.): changes in lipids during maturation of beans and growth of cells and calli in culture / C.H. Tsai, J.E. Kinsella // Lipids. – 1981. – V. 16, №8. – P. 577–582.

261. Uchida H. Triterpenoid levels are reduced during *Euphorbia tirucalli* L. callus formation / H. Uchida, K. Ohyama, M. Suzuki [et al.] // Plant Biotechnol. – 2010. – V. 27, №1. – P. 105–109.

262. Valitova J. Membrane sterols and genes of sterol biosynthesis are involved in the response of *Triticum aestivum* seedlings to cold stress / J. Valitova, A. Renkova, F. Mukhitova [et al.] // Plant Physiol. Biochem. – 2019. – V. 142. – P. 452–459.

263. van der Graaff E. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family / E. van der Graaff, T. Laux, S. A. Rensing // Genome Biol. – 2009. – V. 10, №12. – P. 1–9.

264. Vaskovsky V.E. A universal reagent for phospholipid analysis / V.E. Vaskovsky, E.Y. Kostetsky, I.M. Vasendin // J. Chromatogr. – 1975. – V. 114. – P. 129–141.

265. Vining K. Methylome reorganization during in vitro dedifferentiation and regeneration of *Populus trichocarpa* / K. Vining, K.R. Pomraning, L.J. Wilhelm // BMC Plant Biol. – 2013. – V. 13, №1. – P. 1–15.

266. Wagatsuma T. The membrane lipid bilayer as a regulated barrier to cope with detrimental ionic conditions: making new tolerant plant lines with altered

membrane lipid bilayer / T. Wagatsuma // *Soil Sci. Plant Nutr.* – 2017. – V. 63, №5. – P. 507–516.

267. Wang W. Overexpression of CCCH zinc finger protein gene delays flowering time and enhances salt tolerance in *Arabidopsis* by increasing fatty acid unsaturation / W. Wang, H. Zheng, Y. Wang [et al.] // *Acta Physiol. Plant.* – 2018. – V. 40, №11. – P. 1–13.

268. Wang Y. Plantlet regeneration of adult *Pinus massoniana* Lamb. trees using explants collected in March and thidiazuron in culture medium / Y. Wang, R. Yao // *J. For. Res.* – 2017. – V. 28, №6. – P. 1169–1175.

269. Williams M. Changes in lipid composition during callus differentiation in cultures of oilseed rape (*Brassica napus* L.) / M. Williams, D. Francis, A. C. Hann [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 1991. – V. 42, №245. – P. 1551–1556.

270. Williams M. Lipid biosynthesis in olive cultures / M. Williams, J. Sanchez, A. C. Hann [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 1993. – V. 44, №268. – P. 1717–1723.

271. Wolff R.L. Fatty acids of the seeds from pine species of the *Ponderosa-Banksiana* and *Halepensis* sections. The peculiar taxonomic position of *Pinus pinaster* / R.L. Wolff, B. Comps, L.G. Deluc [et al.] // *JAOCS.* – 1998. – V. 75, №1. – P. 45–50.

272. Woodfield H.K. Using lipidomics to reveal details of lipid accumulation in developing seeds from oilseed rape (*Brassica napus* L.) / H.K. Woodfield, A. Cazenave-Gassiot, R.P. Haslam [et al.] // *Bioch. Biophys. Acta Mol. Cell Biol Lipids.* – 2018. – V. 1863, №3. – P. 339–348.

273. Wu B. Comparative transcriptomic analysis of high-and low-oil *Camellia oleifera* reveals a coordinated mechanism for the regulation of upstream and downstream multigenes for high oleic acid accumulation / B. Wu, C. Ruan, P. Han [et al.] // *3 Biotech.* – 2019. – V. 9, №7. – P. 1–19.

274. Wu J. The response of plasma membrane lipid composition in callus of the halophyte *Spartina patens* (Poaceae) to salinity stress / J. Wu, D.M. Seliskar, J.L. Gallagher // *Am. J. Bot.* – 2005. – V. 92, №5. – P. 852–858.

275. Wu P. Phosphatidic acid regulates BZR1 activity and brassinosteroid signal of Arabidopsis / P. Wu, H.B. Gao, L.L. Zhang // *Mol. Plant.* – 2014. – V. 7, №2. – P. 445–447.
276. Xu Y. Properties and biotechnological applications of acyl - CoA: diacylglycerol acyltransferase and phospholipid: diacylglycerol acyltransferase from terrestrial plants and microalgae / Y. Xu, K.M.P. Caldo, D. Pal-Nath [et al.] // *Lipids.* – 2018. – V. 53, №7. – P. 663–688.
277. Xue H.-W. Function and regulation of phospholipid signaling in plants / H.-W. Xue, X. Chen, Y. Mei // *Biochem. J.* – 2009. – V. 421. –P. 145–156.
278. Yang F. Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii* engelm): Improving initiation of embryogenic tissues and maturation of somatic embryos / F. Yang, X.R. Xia, X. Ke [et al.] // *PCTOC.* – 2020. – V. 143, №1. – P. 159–171.
279. Yang W. A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with sn-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol / W. Yang, M. Pollard, Y. Li-Beisson [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2010. – V. 107. – №26. – P. 12040–12045.
280. Yang X. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants / X. Yang, X. Zhang // *Crit. Rev. Plant Sci.* – 2010. – V. 29, №1. – P. 36–57.
281. Yamauchi T. Ethylene biosynthesis is promoted by very-long-chain fatty acids during lysigenous aerenchyma formation in rice roots / T. Yamauchi, K. Shiono, M. Nagano [et al.] // *Plant Physiol.* – 2015. – V. 169, №1. – P. 180–193.
282. Yoon K. Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* / K. Yoon, D. Han, Y. Li [et al.] // *Plant Cell.* – 2012. – V. 24, №9. – P. 3708–3724.
283. Yuan S. Diacylglycerol kinase and associated lipid mediators modulate rice root architecture / S. Yuan, S.C. Kim, X. Deng [et al.] // *New Phytol.* – 2019. – V. 223, №1. – P. 261–276.

284. Zarei M. Effects of temperature and season on *in vitro* establishment and shoot multiplication of *Picea abies* (L.) H. Karst / M. Zarei, H. Salehi, A. Jowkar // Int. J. Hortic. Sci. Technol. – 2017. – V. 4, №1. – P. 51–56.
285. Zarei M. Controlling the barriers of cloning mature *Picea abies* (L.) H. Karst. via tissue culture and co-cultivation with *Agrobacterium rhizogenes* / M. Zarei, H. Salehi, A. Jowkar // Trees. – 2020. – V. 34, №3. – P. 637–647.
286. Zhang W. The oleate-stimulated phospholipase D, PLD δ , and phosphatidic acid decrease H₂O₂-induced cell death in Arabidopsis / W. Zhang, C. Wang, C. Qin [et al.] // Plant Cell. – 2003. – V. 15, №10. – P. 2285–2295.
287. Zheng H. Disruptions of the Arabidopsis enoyl-CoA reductase gene reveal an essential role for very-long-chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis / H. Zheng, O. Rowland, L. Kunst // Plant Cell. – 2005. – V. 17, №5. – P. 1467–1481.
288. Zhiponova M. K. Brassinosteroid production and signaling differentially control cell division and expansion in the leaf / M.K. Zhiponova, I. Vanhoutte, V. Boudolf [et al.] // New Phytol. – 2013. – V. 197, №2. – P. 490–502.
289. Zhou Y. Extraplasmid cytidinediphosphate diacylglycerol synthase activity is required for vegetative development in *Arabidopsis thaliana* / Y. Zhou, H. Peisker, A. Weth [et al.] // Plant J. – 2013. – V. 75. – P. 867–879.
290. Zou J. Embryogenic callus induction and fatty acid composition analysis of oil palm (*Elaeis guineensis* cv. Tenera) / J. Zou, Q. Zhang, Z. Zhu [et al.] // Sci. Hortic. – 2019. – V. 245. – P. 125–130.
291. Zur I. Changes in the composition of fatty acids and sterols of membrane lipids during induction and differentiation of *Brassica napus* (var. oleifera L.) callus / I. Zur, A. Skoczowski, E. Niemczyk [et al.] // Acta Physiol. Plant. – 2002a. – V. 24, №1. – P. 3–10.
292. Zur I. Kinetics of ¹⁴C-labelled sucrose, myo-inositol and phosphatidylcholine uptake during induction and differentiation in *Brassica napus*

callus culture / I. Zur, A. Skoczowski, S. Pienkowski [et al.] // *Acta Physiol. Plant.* – 2002b. – V. 24, №1. – P. 11–17.