

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск, 2022

Работа выполнена в Федеральном Государственном бюджетном учреждении науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный руководитель:

Дударева Любовь Виссарионовна
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Ветчинникова Лидия Васильевна
доктор биологических наук, Институт леса – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, главный научный сотрудник лаборатории лесных биотехнологий.

Аксенов-Грибанов Денис Викторович
кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», г. Иркутск, руководитель лаборатории фармацевтической биотехнологии.

Ведущая организация:

Институт экологии Волжского бассейна Российской академии наук – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Самарского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Тольятти.

Защита диссертации состоится «16» июня 2022 г. в 10.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном Государственном бюджетном учреждении науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения Российской академии наук по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317. Факс (3952)510-754, e-mail: matmod@sifibr.irk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального Государственного бюджетного учреждения науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения Российской академии наук.

Автореферат разослан « » 2022 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
Д 033.047.01,
кандидат биологических наук



Акимова Галина Петровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. 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. 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. Триглицериды служат источником ацильных цепей для биосинтеза мембран и транспорта липидов, имеющих большое значение для нормального роста и развития растений в культуре и в природных условиях. Фосфолипиды принимают активное участие в формировании клеточной полярности и дифференциации клеток. Свободные стеринны играют значимую роль в регуляции текучести мембраны и ее проницаемости, активно участвуют в процессах пролиферации и дифференциации растительных тканей. ЖК с очень длинной цепью (ЖКОДЦ) существенным образом влияют на направление роста и степень растяжения клеток растений в ходе морфогенеза, предотвращают чрезмерную пролиферацию клеток, способствуя тем самым правильному развитию растений.

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 - микроклональному размножению в культуре *in vitro*. Для сохранения редких генотипов с уникальными признаками в качестве наиболее перспективного подхода рассматривается их клональное размножение путем соматического эмбриогенеза и органогенеза. Однако биотехнология получения соматических зародышей остается трудновыполнимой задачей для большинства видов хвойных. Эти трудности вызваны недостатком сведений об условиях и механизмах индукции соматического эмбриогенеза у голосеменных растений. Известно, что генетически детерминированная способность к эмбриогенезу реализуется через клеточную компетентность. 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 том числе о влиянии этих соединений на условия инициации и успешный ход эмбриогенеза в культивируемых растительных тканях, 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.

В связи с этим 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.

Поэтому цель данной работы заключалась в выявлении особенностей состава и содержания липидных компонентов каллусной ткани эмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) на ранней стадии культивирования.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Провести сравнительный анализ ЖК-состава суммарных липидов в тканях эмбрионных и неэмбрионных 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 стеринов 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 стеринов 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 исследования. Впервые изучен липидный состав эмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской *L. sibirica*, включая ЖК суммарных липидов и ЖК отдельных фракций липидов: нейтральных (НЛ), глико- (ГЛ) и фосфолипидов (ФЛ); компонентный профиль НЛ, ФЛ и ГЛ, а также состав стеринов 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 эмбрионных и неэмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской предложено использование полученных сведений для отбора перспективных в отношении эмбриогенеза линий на ранних стадиях культивирования.

Методология и методы исследования. В работе были использованы следующие методы и подходы: газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором (ГХ-МС), колоночная хроматография, тонкослойная хроматография (ТСХ), цифровая денситометрия, количественный спектрофотометрический анализ фосфолипидов и гликолипидов. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ Sigma-Plot, STATISTICA V-10.0 и Microsoft Office Excel 2010.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Полученные результаты имеют важное фундаментальное значение для понимания особенностей

липидного состава каллусных тканей эмбрионных 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 стериннов и их эфиров у эмбрионных 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: стеринны/эфиры стериннов, 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. 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

В качестве растительного материала использовали эмбрионные и неэмбрионные 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).

Были получены клеточные линии двух типов: эмбриогенные – кремового цвета, рыхлые, со сформированными незрелыми соматическими зародышами; неэмбриогенные – кремового цвета, плотные, глобулярные, у которых незрелые соматические зародыши не формировались. Для 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%.

Долгоживущие клеточные линии *L. sibirica* культивировались на питательной среде АИ (Третьякова, 2013) с.н.с. В.Н. Шаковым в лаборатории генетической инженерии растений СИФИБР СО РАН (рук. лаборатории, д.б.н. Ю.М. Константинов). 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 и неэмбриогенные клеточные линии КлЛ, Кл23. 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 лиственницы 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.

Суммарные липиды экстрагировали модифицированным методом Фолча (Folch et al., 1957). Разделение липидов на классы: НЛ, ГЛ и ФЛ проводили методом колоночной хроматографии (Kates, 1986).

Абсолютное содержание суммарных липидов, их фракций (НЛ, ГЛ, ФЛ) и суммарных метиловых эфиров (МЭЖК) определяли взвешиванием с помощью электронных весов GR-120 (A&D Company Ltd., Япония), образец высушивали до постоянного веса.

МЭЖК получали по методу (Christie, 1993). Анализ МЭЖК проводили с использованием хромато-масс-спектрометра Agilent technology 5973N/6890N MSD/DS (США). 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.

Состав НЛ анализировали методом одномерной тонкослойной хроматографии в системе для НЛ: гексан:диэтиловый эфир:уксусная кислота (80:20:1 v/v/v) (Malins and Mangold, 1960). Количественное определение НЛ проводили методом денситометрии (сканер Hewlett-Packard, США), при помощи программного обеспечения Scion Image (Scion Corporation, США, 2000).

Стерины выделяли и идентифицировали с помощью метода ТСХ в системе для НЛ. Для получения необходимых для анализа методом ГХ-МС летучих производных стерина и эфиры стерinov, подвергали модификации – силилированию путем обработки N,O-бис-(триметилсилил)трифторацетамидом с триметилхлорсиланом (200 мкл) (Fluka, США). Полученные триметилсилил-производные анализировали с использованием хромато-масс-спектрометра 7890A/7000 GC/MS Triple Quad Agilent Technologies (США). Идентификацию свободных стерinov и их эфиров проводили с использованием стандартов целевых компонентов сравнением времени удерживания, а также библиотек масс-спектров NIST08, Wiley7. Количественный анализ целевых компонентов проводили методом внешней калибровки с учетом отклика внутреннего стандарта.

ФЛ количественно определяли аналитической тонкослойной хроматографией по неорганическому фосфору методом Васьковского (Vaskovsky et al., 1975). ГЛ количественно определяли аналитической тонкослойной хроматографией по галактозе методом (Dubois et al., 1956) в модификации (Roughan and Batt, 1968).

В таблицах представлены средние данные шести независимых экспериментов и их стандартные отклонения для каждой анализируемой клеточной линии как эмбриогенной, так и неэмбриогенной. 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание липидов

Абсолютное содержание липидов и их качественный и количественный анализ, в том числе ЖК-состав клеточных линий лиственницы сибирской у эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий, может дать важную информацию об особенностях липидного обмена в этих типах тканей. Результаты сравнительного анализа содержания суммарных липидов, а также отдельных групп липидов (НЛ, ГЛ, ФЛ) в эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линиях лиственницы сибирской приведены в таблице 1.

Установлено, что абсолютное содержание суммарных липидов в эмбриогенных линиях было достоверно выше, чем в неэмбриогенных (табл. 1). Содержание НЛ также было достоверно выше для эмбриогенных клеточных линий по сравнению с неэмбриогенными (табл. 1). Полученные результаты совпадают с литературными данными, в работе (Reidiboym-Talleux and Grenier-De March, 1999) для каллусов *Prunus avium* у трех эмбриогенных линий каллусов также было показано более высокое содержание НЛ, по сравнению с неэмбриогенными линиями. Абсолютное содержание ГЛ во всех клеточных линиях было достоверно выше, чем абсолютное содержание ФЛ (табл. 1).

Таблица 1

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 ΣЛ	41,1	36,2	48,9	39,6	35,5	33,7	-	-
ГЛ	мг/г с.в.	19,2 ± 4,5 ^б	25,7 ± 4,3 ^б	19,9 ± 4,4 ^б	19,2 ± 3,6 ^б	17,4 ± 3,9 ^б	20,5 ± 0,4 ^б	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 ^б	9,5 ± 2,2 ^б	5,5 ± 1,9 ^б	8,3 ± 2,4 ^б	5,7 ± 1,6 ^б	5,2 ± 0,2 ^б	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. n=6, в таблице приведены средние значения (для нормального распределения) и их стандартные отклонения или Ме с планками погрешностей 25% и 75% процентилями, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия и U-критерия Манна–Уитни. ^{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 $p \leq 0,05$. *,** - наличие статистически значимых различий для двух типов линий при $p \leq 0,05$.

Жирнокислотный состав суммарных липидов

Жирные кислоты являются основными структурными компонентами мембранных липидов, а также входят в состав запасных липидов (Cheng et al., 2016), и, кроме того, участвуют в процессах дифференциации клеток *in vivo* и *in vitro*. Поэтому, при изучении липидного обмена клеточных линий с разной способностью к эмбриогенезу, представлялось важным изучить качественный и количественный состав их ЖК.

ЖК-состав суммарных липидов каллусов в культуре *in vitro* лиственницы сибирской приведен в таблице 2.

Таблица 2

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

ЖК	Клеточные линии						
	Эмбрионные линии					Неэмбрионные линии	
	Кл4	Кл6	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

ЖК	Клеточные линии						
	Эмбриогенные линии					Неэмбриогенные линии	
	Кл4	Кл6	Кл2	Кл10	Кл5	Кл23	КлЛ
C18:2Δ5,9	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
C18:2Δ9,12	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
C18:3Δ5,9,12	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
C18:3Δ9,12,15	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
C20:0	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
C20:1Δ11	0,9±0,1	0,5±0,1	1,1±0,1	н/о	2,5±0,1	н/о	0,3±0,1
C20:2Δ9,12	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
C20:3Δ5,11,14	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
C22:0	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. n=6, в таблице приведены средние значения и их стандартные отклонения, ^{а,б} – различия между КлЛ и всеми эмбриогенными линиями (^а), различия между Кл23 и всеми эмбриогенными линиями (^б) считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Наиболее существенные различия обнаружены в относительном и абсолютном содержании мононенасыщенных кислот, в первую очередь олеиновой. Абсолютное содержание этой кислоты было заметно выше для эмбриогенных клеточных линий по сравнению с неэмбриогенными (20,4 [18,0;23,4] мг/г сухого веса для эмбриогенных линий и 4,2 [3,2;4,8] мг/г сухого веса для неэмбриогенных линий) (рис. 1).

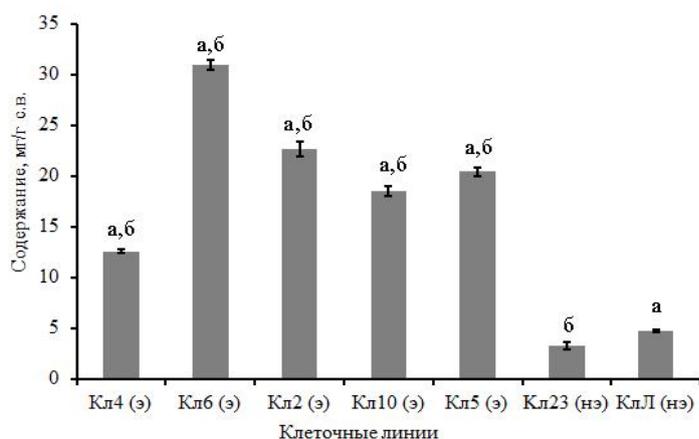


Рис. 1. Содержание олеиновой кислоты в суммарных липидах эмбриогенных (э) и неэмбриогенных (нэ) клеточных линий *L. sibirica* (мг/г сухого веса)

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 достоверности различий средних значений суммарного содержания олеиновой кислоты между двумя типами линий, различающихся по способности к эмбриогенезу, различия были статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Для подтверждения достоверности обнаруженных различий в ЖК-составе у изученных клеточных линий лиственницы был проведен кластерный анализ полученных результатов (рис. 2). Установлено, что по составу ЖК неэмбриогенные клеточные линии КлЛ и Кл23 сходны и образуют гомогенный кластер.

Эмбриогенные клеточные линии также образовывали отдельный кластер, который включал два субкластера – первый сформировали линии Кл2, Кл6, второй – линии Кл4, Кл5 и Кл10. 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.

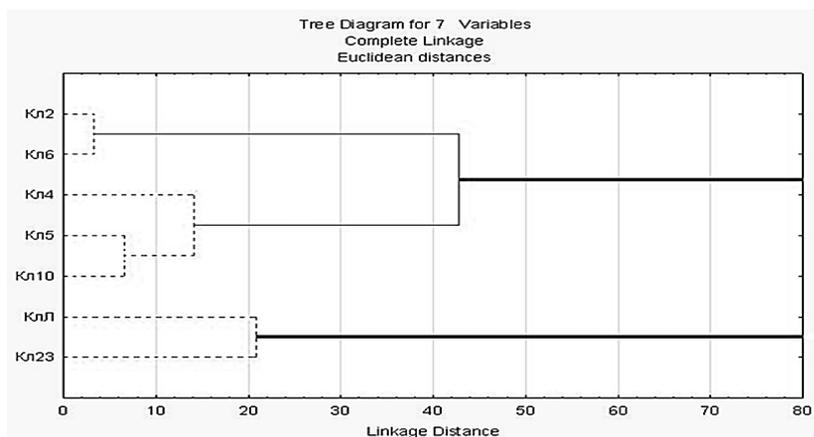


Рис. 2. Дендрограмма кластерного анализа данных по ЖК-составу суммарных липидов эмбриогенных клеточных линий (Кл2, Кл6, Кл4, Кл5, Кл10) и неэмбриогенных (КлЛ, Кл23) клеточных линий *L. sibirica* (дендрограмма построена с помощью программы STATISTICA V-10.0)

Показано, что высокие содержания жирных кислот с очень длинной цепью (ЖКОДЦ) оказывают положительное влияние на формирование каллуса у *A. thaliana* и его пролиферацию (Trinh et al., 2019). Известно также, что ЖКОДЦ, входящие в состав ФЛ и сфинголипидов являются важными компонентами структуры мембран и участвуют в регуляции размеров клеток, и в их делении и дифференциации (Жуков, 2018), они играют важную роль в направлении и степени растяжения клеток растений в ходе морфогенеза (Zheng et al., 2005, Жуков, 2018). Важно отметить, что для клеточных линий лиственницы сибирской суммарное содержание ЖКОДЦ различалось между двумя типами линий. Содержание этих кислот было достоверно выше для эмбриогенных клеточных линий по сравнению с неэмбриогенными (рис. 3). Возможно, что более высокие содержания ЖКОДЦ для эмбриогенных клеточных линий, могут указывать на их участие в процессах эмбриогенеза в этих тканях в связи с важной ролью этих кислот в процессах дифференциации клеток.

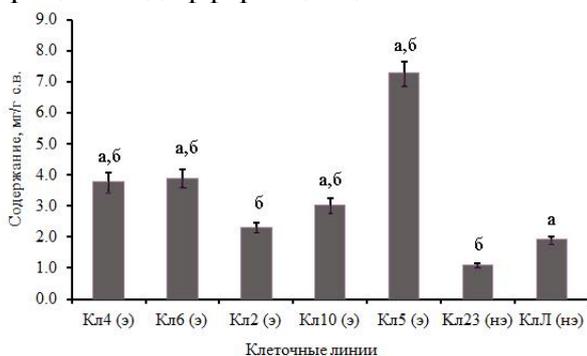


Рис. 3. Содержание ЖКОДЦ в суммарных липидах эмбриогенных (Э Кл) и неэмбриогенных (НЭ Кл) клеточных линиях *L. sibirica*

Примечания. n=6, данные представлены средними значениями и их стандартными отклонениями, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{a,b} – различия между КлЛ и эмбриогенными линиями Кл4, Кл6, Кл10, Кл5 (^a), 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 $p \leq 0,05$.

Жирнокислотный состав НЛ, ГЛ и ФЛ

Для выяснения количественного распределения основных липидных групп (НЛ, ГЛ и ФЛ) и состава ЖК у клеточных линий *L. sibirica* проводили сравнительный анализ их содержания. Особый интерес представляло выявление преимущественной локализации олеиновой кислоты в отдельных липидных группах при соматическом эмбриогенезе, поскольку нами было обнаружено высокое содержание этой кислоты в суммарных липидах эмбриогенных линий. Полученные результаты представлены на рис. 4.

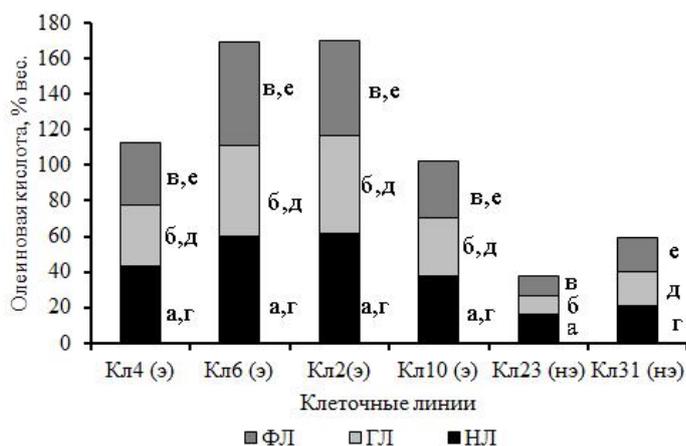


Рис. 4. Содержание олеиновой кислоты в эмбриогенных (Э Кл) и неэмбриогенных (Н) клеточных линиях *L. sibirica* в разных фракциях липидов (% от суммы кислот)

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 $p \leq 0,05$.

При анализе содержания олеиновой кислоты в отдельных липидных фракциях показано, что количество олеиновой кислоты было значительно выше у эмбриогенных клеточных линий во всех фракциях липидов (31,5-61,4% вес.), по сравнению с неэмбриогенными (10,4-20,6% вес.) (рис. 4). Распределение данной кислоты среди липидных фракций внутри каждой линии носило практически равномерный характер (рис. 4).

Нейтральные липиды

НЛ в культуре *in vitro* лиственницы сибирской составляют от 33,7 (Кл31) до 48,9% (Кл2) от суммарного содержания липидов. Компонентный состав НЛ представлен в таблице 3. Для всех клеточных линий основную долю НЛ составляли глицериды. Для эмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской содержание ТГ было достоверно выше по сравнению с неэмбриогенными (табл. 3). Эта тенденция сохранялась и для 1,2-ДГ (табл. 3).

Анализ литературных данных показывает, что ТГ активно накапливаются в эмбриогенных (морфогенных) тканях (Attree et al., 1992; Reidiboyum-Talleux and Grenier-De March, 1999). Авторы утверждают, что накопление ТГ играет существенную роль для развития каллусной культуры и наличия дифференциации. 1,2-ДГ действуют как вторичные мессенджеры в клеточных процессах, являясь промежуточными звеньями в биосинтезе и катаболизме ТГ, в биосинтезе некоторых ФЛ, а также показано их активное участие в процессах роста (Helling et al., 2006; Yuan et al., 2019).

Эксперименты показали, что для эмбриогенных клеточных линий *L. sibirica* содержание СЖК было достоверно выше как минимум в 2 раза по сравнению с

неэмбриогенными (табл.3) и, в целом, было довольно высоким. Обычно количество СЖК в клетках высших растениях невелико, они редко аккумулируются в здоровых тканях. Однако для культуры растительных тканей содержание СЖК может быть еще более высоким, чем в наших экспериментах. Например, для эмбриогенных каллусов льна обыкновенного (Cunha and Fernandes-Ferreira, 2003) было показано весьма высокое содержание СЖК – 146 мкг/мг общих липидов, а для неэмбриогенных каллусов эта величина была ниже на 10%.

Таблица 3

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. 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 $p \leq 0,05$.

Содержание свободных стерин не имело существенных различий между двумя типами линий (табл. 3). Для количественной оценки конвертации стерин из связанной формы в свободную (Taylor and Parks, 1978; Kalo and Kuuranne, 2001), нами было рассчитано отношение количества стерин к количеству эфир стерин для эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий (рис. 5). Высокие значения отношения стерин к их эфирам характерны для эмбриогенных линий, вероятно, ввиду участия свободных стерин в процессах, связанных с дифференциацией и пролиферацией. Свободные стерин в процессе созревания соматических зародышей активно участвуют в формировании мембран и поэтому накопления их эфир не происходит. Напротив, конвертация свободных стерин в эфиры является результатом

прекращения деления клеток, и именно тогда избыточные стеринны этерифицируются (Bailey and Parks, 1975).

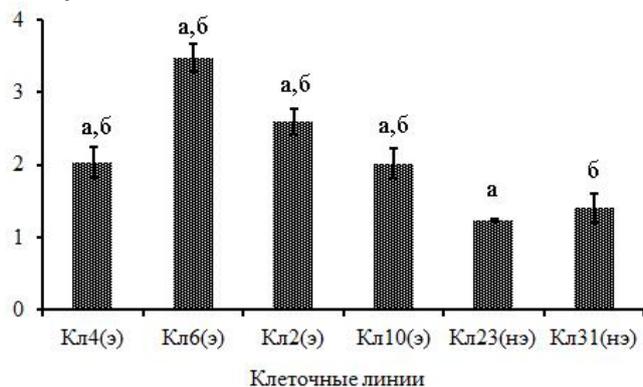


Рис. 5. Отношение стериннов к их эфирам для эмбриогенных (Э Кл) и неэмбриогенных (НЭ Кл) клеточных линий *L. sibirica*

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 стериннов к их эфирам между двумя типами линий, различающихся по способности к эмбриогенезу, различия были статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Компонентный состав стериннов

Различия в содержании свободных стериннов и их эфиров (их соотношение), могут свидетельствовать об активном участии этих соединений в процессах эмбриогенеза. В клеточных линиях *L. sibirica* обоих типов среди свободных стериннов 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 стериннов с двойными связями в положении $\Delta 7$ и $\Delta 5$. Основной вклад в суммарное содержание свободных стериннов вносят $\Delta 5$ -стеринны. При этом, наибольший вклад в этот показатель у эмбриогенных клеточных линий вносят: β -ситостерин, кампестерин, изофукостерин и стигмастерин, а у неэмбриогенных – β -ситостерин, кампестерин и стигмастерин.

Доминирующим стеринном во всех клеточных линиях был β -ситостерин, его содержание было достоверно выше для эмбриогенных клеточных линий, по сравнению с неэмбриогенными (табл. 4). Вероятно, это обусловлено существованием связи между накоплением β -ситостерина и ростом биомассы неэмбриогенных каллусов (Cunha and Fernandes Ferreira, 1997). 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).

В растениях предшественником β -ситостерина в биосинтезе стериннов является изофукостерин (Schaller, 2003; Sonawane et al., 2016). В наших исследованиях содержание изофукостерина для эмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской было выше 13% от суммы свободных стериннов. У неэмбриогенных клеточных линий этот стерин был обнаружен только для линии Кл31 (относительное содержание было меньше 3%).

Можно предположить, что в эмбриогенных клеточных линиях идет активный синтез стериннов, необходимых для роста и развития, за счет накопления изофукостерина, который далее конвертируется в β -ситостерин посредством работы фермента 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 из 24-метилхлестерина кампестерина (Sonawane et al., 2016; Vajguz et al., 2020), содержание которого в наших экспериментах было достоверно выше для эмбриогенных клеточных линий по сравнению с неэмбриогенными (табл. 4). Такая существенная разница в абсолютном содержании кампестерина между линиями с разной эмбриогенностью показывает, что он, по-видимому, активно участвует в процессах эмбриогенеза у *L.*

sibirica. Известно, что кампестерин является субстратом для С28-брасиностероидов (Bajguz 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; Bajguz et al., 2020).

Таблица 4

Содержание фракции свободных стеринов в эмбрионных (э) и неэмбрионных (нэ) клеточных линиях листовенницы сибирской *L. sibirica*

Названия соединений		Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл2 (э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)
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-С	% 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-С	% 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
ΣСР2С	% от ΣС	0,2±0,0	0,1±0,0	1,8±0,2	0,1±0,0	0,03±0,0	1,2±0,1
ΣСБ2С	% 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

Таблица 5

Содержание фракции эфиров стеринов (в этой же фракции выявлен сквален) в эмбрионных (э) и неэмбрионных (нэ) клеточных линиях *L. sibirica*

Название соединений		Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл2 (э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)
Сквален	% от ΣЭС	25,8±2,8 ^{а,б}	34,2±3,3 ^{а,б}	12,5±0,1 ^{а,б}	15,1±1,6 ^{а,б}	2,3±0,3 ^а	2,9±0,0 ^б
	19,9 [12,8;30,3] *					2,8 [2,2;2,9]	
ΣΔ5-С	% 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
ΣСБ2С	% 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 4 и 5. С – стерин, ЭС – эфиры стеринов, ΣСР2С – сумма стеринов с различными двойными связями в структуре колец, ΣСБ2С – сумма стеринов без двойных связей в структуре колец. n=6, приведены средние значения и их стандартные отклонения, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{а,б} – различия между Кл23 и всеми эмбрионными линиями (^а), различия между Кл31 и всеми эмбрионными линиями (^б), различия между Кл23 и эмбрионными линиями Кл4, Кл6, Кл10 (^в), различия между Кл31 и эмбрионными 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% перцентилими, * - наличие значимых различий, значимость различий средних значений содержания стериновых компонентов и сквалена рассчитана с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Наибольший вклад в суммарное содержание эфиров стеринов во всех клеточных линиях вносили соединения без двойной связи в структуре циклопентанопергидрофенантрена до 62,6% от суммы эфиров стеринов. Помимо стеринов и их эфиров в процессе анализа был идентифицирован сквален – тритерпен, принадлежащий к группе каротиноидов и являющийся промежуточным соединением в биосинтезе стеринов (Валитова и др., 2016; Vajguz et al., 2020). Содержание этого компонента в эмбрионных линиях было в 4 и более раза выше, чем в неэмбрионных (табл. 5). Это дает основание полагать, что в эмбрионных клеточных линиях идет более активный синтез стеринов, чем в неэмбрионных.

Фосфолипиды

Таблица 6

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. 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 эмбрионными линиями (э), различия между Кл31 и всеми эмбрионными

линиями (^б), различия между Кл31 и мбриогенными линиями Кл4, Кл6, Кл10 (^б) 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% перцентилями, * - наличие значимых различий, значимость различий средних значений между двумя типами линий рассчитана с помощью t-критерия и U-критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

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). Для культуры *in vitro* листовницы сибирской суммарное содержание ФЛ было достоверно выше у эмбриогенных клеточных линий по сравнению с неэмбриогенными (табл. 6). Для эмбриогенных клеточных линий также показано, что содержание ФХ и ФЭ было достоверно выше, чем для неэмбриогенных (табл. 6). Это совпадает с литературными данными, где также отмечено высокое содержание ФХ для эмбриогенных каллусов, по сравнению с неэмбриогенными (Reidiboyum-Talleux and Grenier-De March, 1999; Zur et al., 2002b). Авторы делают вывод, что ФХ играет важную роль на самых ранних стадиях дифференциации, и анализ изменений в его содержании может быть полезным в качестве возможного раннего прогностического теста на органогенную способность каллусов.

ФЭ играет важную роль в мембранной архитектуре – молекула имеет коническую форму с небольшой относительно поперечного сечения гидрофобных хвостов полярной головной группой (Gibellini and Smith, 2010). По этой причине ФЭ способен образовывать обращенные неламеллярные структуры, например, гексагональную.

При анализе содержания 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). Рассчитанное по результатам наших экспериментов отношение ФХ/ФЭ для клеточных линий *L. sibirica* (рис. 6) у эмбриогенных линий листовницы было достоверно выше, чем у неэмбриогенных.

Анализируя полученные и литературные данные, логично предположить, что высокое относительное содержание ФХ и ФЭ, а также высокие показатели соотношения ФХ/ФЭ, по-видимому, сопровождают и, возможно, в какой-то степени определяют активность ростовых процессов у эмбриогенных клеточных линий *L. sibirica* в процессе культивирования.

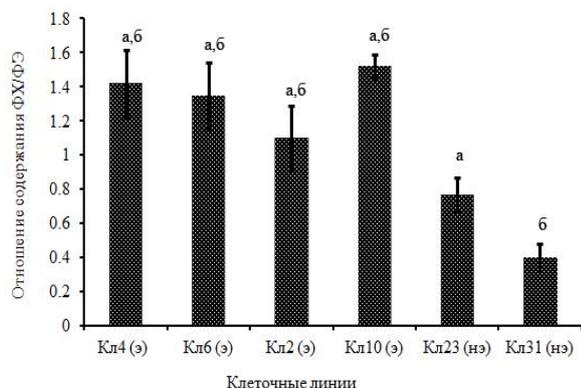


Рис. 6. Отношение содержания ФХ/ФЭ у эмбриогенных (Э Кл) и неэмбриогенных (НЭ Кл) клеточных линий *L. Sibirica*

Примечания. n=6, данные представлены средними значениями и их стандартными отклонениями, значимость различий рассчитана с помощью t-критерия, ^{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 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 $p \leq 0,05$.

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). Для клеточных линий *L. sibirica* нами установлено, что абсолютное содержание ФИ достоверно различается между эмбрионными и неэмбрионными линиями (табл. 6). Наблюдаемое высокое содержание ФИ в эмбрионных клеточных линиях по сравнению с неэмбрионными, вероятно, связано с их участием в синтезе ПФИ. Кроме того показано, что низкие содержания ФИ вызывают дефекты клеточного деления (Zhou et al., 2013). Высокое содержание ФИ в эмбрионных клеточных линиях показывает, что они, вероятно, играют важную роль в процессах эмбриогенеза в тканях листовенницы сибирской *in vitro* на ранних стадиях культивирования.

Абсолютные содержания ФК для неэмбрионных и эмбрионных клеточных линий *L. sibirica* достоверно не различались (табл. 6). Что касается относительного содержания ФК, то для неэмбрионных клеточных линий оно составляло более 64% от общего содержания ФЛ (76,8% – Кл23 и 64,8% – Кл31), в то время как для эмбрионных ее относительное содержание было заметно ниже – от 16 (Кл10) до 50% (Кл2). Эти результаты позволяют предположить, что ФК является основным типом ФЛ неэмбрионных клеточных линий у листовенницы сибирской. 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. Кроме того, показано, что с накоплением ФК происходит снижение содержания brassinosterin (Wu et al., 2014), которые являются регуляторами роста и развития растений *in vivo* и *in vitro* (Nolan et al., 2017). Поскольку ФК содержится в неэмбрионных линиях в значительно более высоких относительных количествах по сравнению с эмбрионными, можно предположить, что высокое содержание ФК способно оказывать негативное влияние на способность культуры листовенницы сибирской *in vitro* к эмбриогенезу.

Гликолипиды

Таблица 7

Содержание ГЛ в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях листовенницы 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. 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 эмбрионными линиями (^а), различия между Кл31 и всеми эмбрионными 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 считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

В целом, в каллусных тканях клеточных линиях лиственницы сибирской содержание ГЛ было достаточно высоким (от 39,9% (Кл2) до 52,7% (Кл31) от суммы липидов). В составе ГЛ были обнаружены и идентифицированы: моногалактозилдиглицерид (МГДГ) и дигалактозилдиглицерид (ДГДГ). Было установлено, что содержание МГДГ в клетках эмбрионных линий достоверно выше, чем в неэмбрионных (табл. 7). В работах связанных с изучением каллусогенеза и процессов дифференциации и регенерации каллусных тканей, было показано накопление МГДГ в процессе культивирования. Так, в исследовании (Manoharan et al., 1987) установлено, 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.

В наших исследованиях соотношение МГДГ/ДГДГ было достоверно выше примерно в 1,5 раза для эмбрионных линий по сравнению с неэмбрионными (табл. 7). Это соотношение используется при описании активности процессов дифференциации каллусов (Manoharan et al., 1987; Zur et al., 2002a). Многочисленными работами показано, что в ходе дифференциации 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). Таким образом, можно заключить, что МГДГ, вероятно, принимает непосредственное участие в процессах эмбриогенеза лиственницы сибирской, а высокое соотношение МГДГ/ДГДГ можно использовать в качестве маркера эмбрионности для клеточных линий этого вида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для клеточных линий *L. sibirica* с разной способностью к эмбриогенезу отмечены существенные различия в их липидном составе. Например, в составе ненасыщенных ЖК суммарных липидов неэмбрионных клеточных линий относительное содержание олеиновой кислоты составляло 12,0–14,8%, в то время как в составе суммарных липидов эмбрионных линий оно было существенно выше и достигало 32,1–56,5%. Известно, что олеиновая кислота служит 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 эмбрионных и неэмбрионных линий различаются. Если в тканях эмбрионных линий олеиновая кислота, как сигнальная молекула, способствует дифференциации клеток, то в тканях неэмбрионных линий ее функция, скорее всего, преимущественно 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 brassinosterоинов, 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 неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской играет негативную роль в клеточной дифференциации. ФК, синтезированная из ДГ в тканях эмбрионных линий, может активно расходоваться на синтез других необходимых для процессов

эмбриогенеза ФЛ, таких как ФХ, ФИ, ФЭ и др. (Li-Beisson et al., 2016). Наши исследования показали, что эмбрионные клеточные линии лиственницы сибирской отличались высоким содержанием ФХ, ФИ, ФЭ, по сравнению с неэмбрионными. 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 (Zug 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 неэмбрионных линиях вероятно, в основном, расходуется на образование ФК, а не на синтез ТГ, поскольку в неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской отмечено более низкое содержание ТГ, чем в эмбрионных. В эмбрионных линиях, напротив, наблюдали: низкое содержание ФК и высокое содержание ТГ, которые, как известно, активно накапливаются в ходе культивирования растений для обеспечения процессов роста и развития тканей (Attree et al., 1992; Brownfield et al., 2007; Fan et al., 2013; Xu et al., 2018; Shimada et al., 2018). Кроме олеиновой кислоты, ТГ могут быть источником и других ЖК.

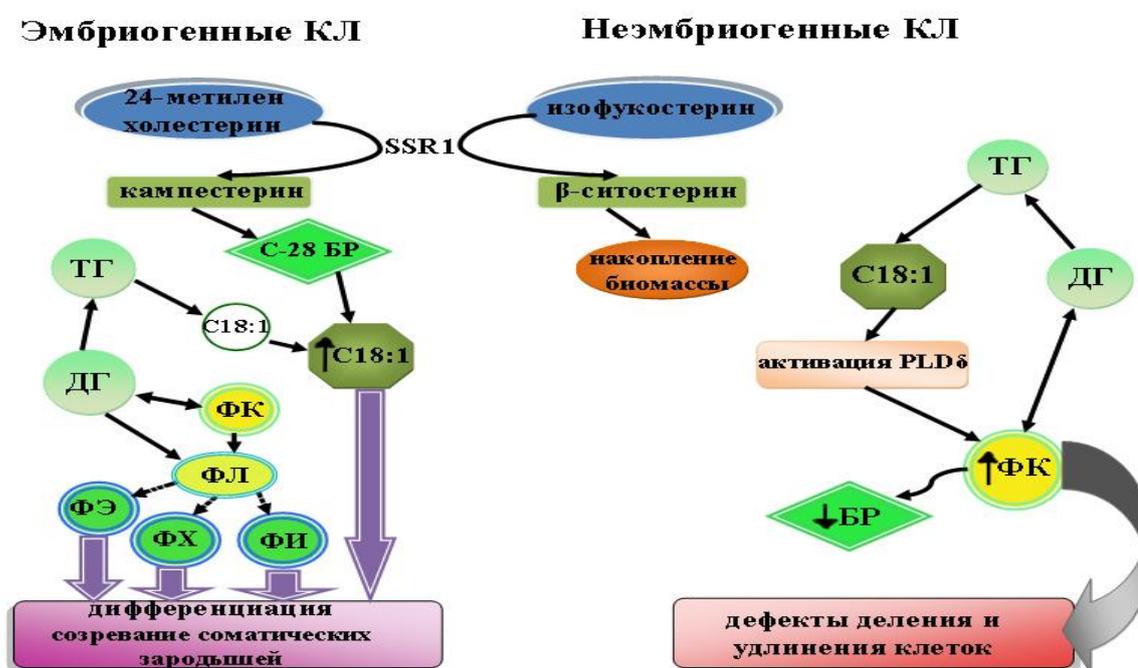


Рис. 7. Схема липидного обмена в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской *L. sibirica* Ledeb.

Примечания. КЛ – клеточные линии, SSR1 - редуктаза боковой цепи, C-28 БР – C28 брассиностероиды, ↑C18:1 – повышение содержания олеиновой кислоты, ↑ФК – повышение содержания фосфатидной кислоты, ↓БР – понижение содержания брассиностероидов, ТГ – триглицериды, ДГ – диглицериды, ФЛ – фосфолипиды, ФЭ – фосфатидилэтаноламины, ФХ – фосфатидилхолины, ФИ – фосфатидилинозиты.

Известно, что 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). Поэтому важно отметить, что для клеточных линий лиственницы сибирской суммарное содержание ЖКОДЦ отличалось для групп с разным потенциалом эмбрионности. Содержание этих кислот было достоверно выше для эмбрионных клеточных линий (Кл4, Кл6, Кл10, Кл5), по сравнению с неэмбрионными (Кл23 и КлЛ).

В целом, 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. 7).

В многочисленных работах (Qian et al., 2013; Jang et al., 2000; Diener et al., 2000; Carland et al., 2002 и др.) показано, что стерин является 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 был обнаружен или обнаружен в малых количествах. Вероятно, изофукостерин активно конвертировался в процессе биосинтеза в β -ситостерин, 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 лиственницы 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 С29-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 С28-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 масличного рапса внесение в питательную среду 24-эпибрасинолида вызывало увеличение содержания олеиновой кислоты, в частности в ДГДГ. Вероятно, С28-брасинолиды 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 способными и неспособными к эмбриогенезу.

Следует отметить также, что выявленные нами особенности состава ЖК, НЛ, ФЛ, ГЛ и стерина эмбрионных 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: стерин/эфиры стерина, ФХ/ФЭ, МГДГ/ДГДГ; а также высокое содержание олеиновой кислоты для эмбрионных клеточных линий, по сравнению с неэмбрионными.

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 стероидов и эфиров стероидов 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 большей 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 стероидов, жирных кислот (в первую очередь моноеновых), ФИ, ФЭ, ФХ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. Макаренко С.П. Жирнокислотный состав суммарных липидов эмбриогенных и неэмбриогенных каллусных линий лиственницы / С.П. Макаренко, В.Н. Шмаков, Л.В. Дударева, А.В. Столбикова, **Н.В. Семёнова**, И.Н. Третьякова, Ю.М. Константинов // Физиология растений. – 2016. – Т. 63, №2. – С. 267-274.

2. **Семенова Н.В.** Жирнокислотный состав суммарных липидов хвои и каллусов некоторых хвойных: *Pinus sylvestris* L., *Picea pungens* Engelm., *Pinus koraiensis* Siebold & Zucc. и *Larix sibirica* Ledeb. / **Н.В. Семенова**, С. П. Макаренко, В.Н. Шмаков, Ю. М. Константинов, Л.В. Дударева // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2017. – Т. 34, № 4. – С. 298-306.

3. **Семёнова Н.В.** Особенности состава нейтральных липидов эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий *Larix sibirica* Ledeb. / **Н.В. Семёнова**, В.Н. Шмаков, М.Э. Пак, И.Н. Третьякова, Ю.М. Константинов, Л.В. Дударева // Биологические мембраны. – 2020. – Т. 37, № 3. – С. 215–223. – DOI: 10.31857/S0233475520020127

4. **Семёнова Н. В.** Фосфолипиды эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий *Larix sibirica* Ledeb. / **Н.В. Семёнова**, В.Н. Шмаков, Ю.М. Константинов, Л.В. Дударева // Физиология растений. – 2020. – Т. 67, № 6. – С. 654–660. – DOI: 10.31857/S0015330320060159.

Работы, опубликованные в материалах научных мероприятий

5. Дударева Л.В. Особенности жирнокислотного состава каллусных тканей хвойных / Л.В. Дударева, В.Н. Шмаков, **Н.В. Семенова**, С.П. Макаренко, Ю.М. Константинов // Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири: Материалы 4-ого

Международного совещания (Барнаул, 24-29 августа). Красноярск: Институт леса имени В.И. Сукачева. – 2015. – С. 52-54.

6. Шмаков В.Н. Оптимизация методов получения каллусной культуры лиственницы сибирской из различного исходного материала / В.Н. Шмаков, Л.В. Дударева, **Н.В. Семенова**, С.П. Макаренко, Ю.М. Константинов // Актуальные проблемы науки Прибайкалья: Сборник статей. отв. ред. И.В. Бычков, А.Л. Казаков. Выпуск 1. Иркутск: Издательство Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН. – 2015. – С. 254-258.

7. **Семёнова Н.В.** Жирнокислотный профиль липидных классов каллусов *Larix sibirica* / **Н.В. Семёнова**, В.Н. Шмаков, Л.В. Дударева // Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы: Материалы IV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием (Улан-Удэ, 23–27 июня) Улан-Удэ: Издательство БНЦ СО РАН. – 2016. – С. 257.

8. **Семёнова Н.В.** Фитостериновый профиль тканей *in vitro* некоторых хвойных / **Н.В. Семёнова**, В.Н. Шмаков, Л.В. Дударева // В сборнике: Байкальская школа-конференция по химии - 2017. Сборник научных трудов Всероссийской школы-конференции с международным участием БШКХ-2017. Иркутск. – 2017. – С. 183-184.

9. **Семёнова Н.В.** Состав и содержание фитостеринов в тканях *in vitro* лиственницы сибирской *Larix sibirica* / **Н.В. Семёнова**, В.Н. Шмаков, Л.В. Дударева // В сборнике: Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. Материалы VII Всероссийской конференции с международным участием. Барнаул. – 2017. – С. 227-228.

10. **Семёнова Н.В.** Нейтральные липиды эмбриогенных и неэмбриогенных каллусных линий *Larix Sibirica* Ledeb./ **Н.В. Семёнова**, В.Н. Шмаков, Л.В. Дударева // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды: Сборник материалов Годичного собрания Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (в 2-х частях) (Иркутск, 10–15 июля 2018 г.). Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН. – 2018. – Ч. II. – С. 1367–1371.

11. Дударева Л. В.. Особенности состава стеринов изолированных митохондрий *Larix Sibirica* Ledeb. / Л.В. Дударева, И.В. Горбенко, В.Н. Шмаков, **Н.В. Семенова**, Е.Г. Рудиковская // Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки: Материалы докладов II Всероссийской научной конференции с международным участием (Иркутск, 22–24 мая 2018 г.). Иркутск: Изд-во Института географии им. В. Б. Сочавы СО РАН. 2018. – С. 35–37.

12. Горбенко И. В. Особенности липидного обмена ткани некоторых хвойных / И. В. Горбенко, **Н. В. Семенова** // Социально-экологические проблемы байкальского региона и сопредельных территорий: Тезисы докладов Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященной 100-летию Иркутского государственного университета (Иркутск, 23 апреля 2018 г.). Иркутск: Изд-во ИГУ. – 2018 – С. 200.