

## НЕЙТРАЛЬНЫЕ ЛИПИДЫ ЭМБРИОГЕННЫХ И НЕЭМБРИОГЕННЫХ КАЛЛУСНЫХ ЛИНИЙ *LARIX SIBIRICA* LEDEB.

Н.В. Семёнова, В.Н. Шмаков, Л.В. Дударева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *tashasemyonova@mail.ru*

**Аннотация.** Показано, что содержание и состав НЛ каллусов лиственницы сибирской с разным эмбрионным потенциалом закономерно различается. Установлено, что для эмбрионных каллусов характерно высокое относительное содержание ТГ и СЖК. Обнаруженные различия в составе и содержании стероидов между разными типами эмбрионных каллусов позволяют предположить, что кампестерин и  $\beta$ -ситостерин участвуют в процессах роста и развития у эмбрионных каллусов, способных к регенерации.

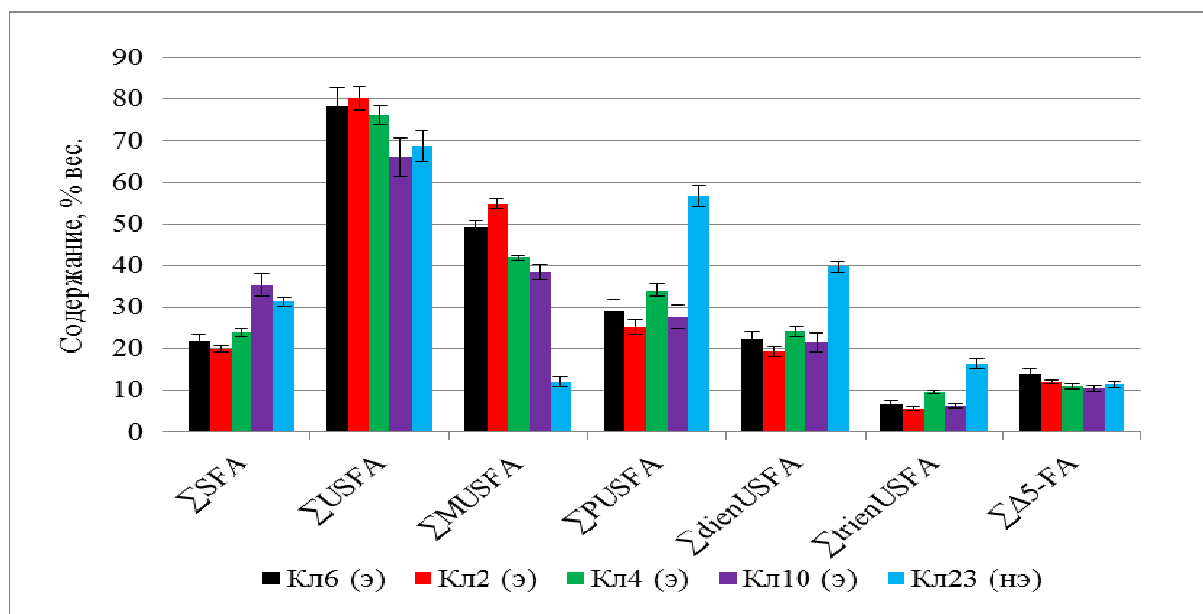
**Ключевые слова:** Каллусы, нейтральные липиды, *Larix sibirica*

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-1367-1371

Липиды являются важнейшим структурным, запасным и функциональным компонентом растительных клеток, который обеспечивает работу мембран всех органоидов и дает информацию об активности разных клеточных структур. Содержание липидов и их жирнокислотный состав варьирует в зависимости от вида, внутри вида и в онтогенезе растений. Степень этого варьирования определяется генотипом и зависит от факторов среды [Лось, 2001; Ширшова, 2012]. Известно, что нейтральные липиды и жирные кислоты играют важную роль в росте и развитии культуры *in vitro* [Feirer et al., 1989]. Глицериды являются наиболее доступными запасными источниками энергии, обеспечивающими обменные процессы в растительных организмах. В то же время, физиологическая роль глицеридов не ограничивается функцией резерва энергии. Запасы этих веществ могут служить источником структурных элементов – глицерина, жирных кислот, являющихся исходными продуктами при биосинтезе различных соединений [Алаудинова, 2009]. Так, триглицериды являются запасными липидами, которые легко могут быть вовлечены в катаболизм для получения необходимой клетке для роста и развития энергии, а также для участия жирных кислот в клеточной сигнализации. Поэтому количество и состав жирных кислот и липидов и динамика изменений этих показателей в процессе культивирования оказываются зачастую источником информации к пониманию многих процессов, происходящих в клетке или ткани. Например,  $\beta$ -ситостерин и кампестерин - участвуют в упорядочивании жирнокислотных цепей в мембране, что может влиять на ее проницаемость для воды и ионов. Известно также, что  $\beta$ -ситостерин и стигмастерин играют ключевую роль в клеточной дифференциации и пролиферации [Diener et al., 2000; Carland et al., 2002]. Для выяснения возможного участия нейтральных липидов в процессах дифференциации и последующей регенерации каллусных тканей лиственницы сибирской была предпринята попытка сравнительного анализа содержания нейтральных липидов в клеточных линиях с разным эмбрионным потенциалом. В качестве материала для индукции соматического эмбриогенеза были взяты изолированные зиготические зародыши на стадии инициации семядолей из семян. Полученные в результате индукции клеточные линии лиственницы отличались между собой по пролиферативной активности, по количеству незрелых соматических зародышей внутри эмбриональной массы, а также по возможности получения регенерантов [Третьякова, 2012, 2013]: эмбрионные каллусы – Кл2, Кл6 (зародыши вызревают, получены регенеранты), Кл4, Кл5, Кл10

(зародыши не вызревают) и неэмбриогенные – Кл23 клеточные линии. Липиды экстрагировали по модифицированному методу Фолча. Методом колоночной хроматографии получали фракцию нейтральных липидов. Профиль нейтральных липидов получали методом ТСХ, система гексан:диэтиловый эфир:уксусная кислота (80:20:1 v/v/v). Стерины выделяли и идентифицировали с помощью метода ТСХ (Rf, стерин – 0.19). Зону стеринов элюировали хлороформом и дериватизировали их с помощью BSA (Bis(trimethylsilyl)acetamide) и HMDS (Hexamethyldisilazane). Полученные производные анализировали с использованием хромато-масс-спектрометра 5973/6890N MSD/DS Agilent Technologies (США). Относительное содержание ЖК определяли методом внутренней нормализации – в весовых процентах (% вес.) от общего их содержания в исследуемом образце, с учетом коэффициента отклика ЖК.

Ранее нами было установлено, что в ЖК-составе суммарных липидов эмбриогенных и неэмбриогенных каллусов главными насыщенными кислотами были: пальмитиновая (16:0), стеариновая (18:0), арахиновая (C20:0) и бегеновая (22:0). В составе главных ненасыщенных ЖК идентифицированы: олеиновая (C18:1Δ9), линолевая (C18:2Δ9,12), линоленовая (C18:Δ9,12,15) [Макаренко и др., 2016]. Кроме того, были обнаружены необычные ЖК Δ5-серии (таксолеиновая, пиноленовая и скиадоновая (C20:3Δ5,11,14), 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 мононенасыщенных ЖК установлено, что для липидов неэмбриогенных каллусов относительное содержание олеиновой кислоты составляло 12.0–14.8%, в то время как для эмбриогенных, особенно способных к регенерации этот показатель составлял более 50% от суммы кислот [Макаренко и др., 2016]. Возможно, эта кислота выполняет важную метаболическую и/или регуляторную роль при соматическом эмбриогенезе в процессе образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) в культуре клеток и тканей. Известно, например, что эта ЖК служит



**Рисунок.** Интегральные параметры ЖК-состава каллусов *Larix sibirica* с разным эмбриогенным потенциалом.  $\Sigma_{SFA}$  – сумма насыщенных ЖК,  $\Sigma_{USFA}$  – сумма ненасыщенных ЖК,  $\Sigma_{MUSFA}$  – сумма мононенасыщенных ЖК,  $\Sigma_{PUSFA}$  – сумма полиненасыщенных ЖК,  $\Sigma_{dienUSFA}$  – сумма диеновых ЖК,  $\Sigma_{trienUSFA}$  – сумма триеновых ЖК,  $\Sigma_{\Delta 5-FA}$  – сумма кислот Δ5-серии.

посредником в передаче сигналов, в том числе в процессах клеточной дифференцировки. Интегральные параметры ЖК-состава каллусов лиственницы, которые выявляют роль разных по насыщенности групп ЖК, представлены на рисунке.

В представляемой работе установлено, что в нейтральных липидах каллусов *L. sibirica* высокое содержание мононенасыщенных кислот характерно для эмбриогенных линий, в то время как у неэмбриогенных относительное содержание главной мононенасыщенной олеиновой кислоты было значительно ниже (40-53% отн. против 23% отн., соответственно). Для кислот Δ-5 серии в нейтральных липидах наблюдали в два-три раза более высокое суммарное их содержание у эмбриогенных линий, потенциально способных образовывать регенеранты, по сравнению с неэмбриогенными. Методом ТСХ определили состав нейтральных липидов (таблица).

**Таблица.**

**Состав нейтральных липидов эмбриогенных (э) и неэмбриогенных (нэ) каллусов *Larix sibirica* Ledeb. в мкг на 50 мкг общих липидов**

НЛ	Кл2 (э)	Кл6 (э)	Кл4 (э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)
МГ	1,4±0,6	2,0±0,3	1,5±0,0	1,4±0,0	2,1±0,2
1,2-ДГ	3,2±0,8	2,9±0,2	3,9±0,2	3,3±0,7	2,8±0,7
Стерины	7,6±0,6	7,2±0,1	7,3±0,2	6,8±0,4	7,1±0,0
1,3-ДГ	2,2±0,5	2,6±0,3	2,2±0,2	2,5±0,3	2,0±0,0
СЖК	9,3±2,9	10,3±1,9	8,7±0,2	9,9±1,2	7,1±1,2
ТГ	6,3±1,3	5,4±1,9	6,7±0,8	7,1±0,5	4,6±0,6
МЭЖК	3,1±1,6	3,7±0,0	1,5±0,0	-	3,5±0,5
Эф. Стеринов	2,8±0,2	3,2±0,3	3,3±1,2	2,0±1,3	3,8±0,8
Воска	8,5±1,0	7,0±0,2	8,4±2,3	8,7±1,6	9,5±1,8

**Примечание.** НЛ – нейтральные липиды, МГ – моноглицериды, ДГ – диглицериды, СЖК – свободные жирные кислоты, ТГ – триглицериды, МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот. В таблице приведены средние арифметические величины трех повторностей и их стандартные отклонения

Как видно из таблицы, для эмбриогенных каллусов характерно высокое относительное содержание триглицеридов (ТГ) и свободных жирных кислот (СЖК), по сравнению с неэмбриогенными. При этом неэмбриогенные каллусы отличались довольно высоким содержанием моноглицеридов (МГ), эфиров стеринов и восков. В рамках представляемой работы был изучен профиль стеринов в каллусах с разным потенциалом эмбриогенности. Показано, что в состав стеринов всех типов каллусов входят: холестерин, кампестерин, стигмастерин и β-ситостерин. β-ситостерин является доминирующим компонентом для клеточных линий всех типов, что является характерным для растительных объектов. В нашем исследовании содержание этого фитостерина в ряде случаев превышало 80%. Обычно, соотношение преобладающих стеринов растений составляет примерно 70% β-ситостерина, 5% стигмастерина и 20% кампестерина [Валитова, 2016]. Нашими экспериментами установлено, что эмбриогенные каллусы, дающие регенеранты, отличались меньшим содержанием стигмастерина, но большим содержанием кампестерина, что указывает на его участие в эмбриогенезе в каллусной ткани *L. sibirica*. Известно, что кампестерин участвует в процессах роста и развития у растений, поскольку снижение его содержания влечет за собой снижение содержания brassinosterin, что в свою очередь вызывает торможение роста и развития [Валитова, 2016].

Анализ полученных результатов показывает, что содержание и качественный состав липидов культуры *in vitro* закономерно различается между каллусами с разным эмбриогенным потенциалом. Обнаруженное нами более высокое содержание мононенасыщенных кислот у эмбриогенных каллусов позволяет предположить, что, возможно, они выполняют важную метаболическую и/или регуляторную роль при соматическом эмбриогенезе в процессе образования зародышеподобных структур в культуре клеток и тканей. Известно, что эти ЖК, в первую очередь олеиновая кислота, служат посредниками в передаче сигналов, в том числе в процессах клеточной дифференцировки. Вполне закономерным является и высокое содержание ТГ для эмбриогенных каллусов, так как триглицериды являются запасными липидами, которые легко могут быть вовлечены в катаболизм для получения необходимой клетке для роста и развития энергии, а также для участия жирных кислот в клеточной сигнализации. Различия в стеринном составе указывают на то, что у эмбриогенных каллусов дающих регенеранты активное участие в процессах роста и развития, по-видимому, играют кампестерин и  $\beta$ -ситостерин. Дальнейшее изучение закономерностей изменений липидного состава в ходе эмбриогенеза в культуре *in vitro* позволит выяснить биологическую роль перестроек липидного метаболизма на начальных стадиях формирования зон вторичной дифференцировки.

#### Литература

Алаудинова Е.В., Миронов П.В. Особенности обмена глицеридов меристем почек *Larix sibirica* Ledeb. // Хвойные бореальной зоны. – 2009. – Т.26 (2). – С. 291–293.

Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А.Г., Минибаева Ф.В. Растительные стерины: многообразие, биосинтез, физиологические функции // Биохимия. – 2016. – Т. 81, № 8. – С. 1050–1068.

Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 163–198.

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

Третьякова И.Н. Эмбриогенные клеточные линии и соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* у лиственницы сибирской // Доклады АН. – 2013. – Т. 450, № 1. – С. 122–125.

Третьякова И.Н., Барсукова А.В. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы // Онтогенез. – 2012. – Т. 43, № 6. – С. 1–11.

Ширшова Т.И., Матистов Н.В., Саакян Н.Ж., Петросян М.Т., Попов Ю.Г., Володин В.В. Содержание нейтральных липидов и жирных кислот в листьях интактных растений и каллусных культурах *Ajuga chia* и *A. genevensis* (Lamiaceae) // Раст. ресурсы. – 2012. – Вып. 3. – С. 389–395.

Carland F.M., Fujioka Sh., Takatsuto S., Yoshida Sh., Nelson T. The identification of *CVPI* reveals a role for sterols in vascular patterning // The plant cell. – 2002. – V. 14. – P. 2045–2058.

Diener C.A., Li H., Zhou W., Whoriskey J.W., Nes D.W., Fink. G.R. Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants // The plant cell. – 2000. – V. 12. – P. 853–870.

Feirer R.P., Conkey J.H., Verhagen S.A. Triglycerides in embryogenic conifer calli: a comparison with zygotic embryos // Plant cell reports. – 1989. – V. 8. – P. 207–209.

Wolff R.L., Comps B., Deluc L.G., and Marpeau A.M. Fatty acids of the seeds from pine species of the ponderosa-banksiana and halepensis sections. The peculiar taxonomic position of *Pinus pinaster* // JAOCS. – 1998. – V. 75, No. 1. – P. 45–50.

**NEUTRAL LIPIDS OF EMBRYOGENIC AND NON-EMBRYOGENIC  
CALLUS LINES OF *LARIX SIBIRICA* LEDEB.**

N.V. Semenova, V.N. Shmakov, L.V. Dudareva

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *tashasemyonova@mail.ru*

**Abstract.** The results obtained show that the neutral lipids content and composition of Siberian larch calluses, different by embryogenic potential, naturally differs. It was found that embryogenic callus is characterized by a high relative content of TG and FFA. Differences in the sterols composition and content between different types of embryogenic calluses suggests that campesterol and  $\beta$ -sitosterol are involved in growth and development processes of embryogenic calluses capable of regeneration.

**Keywords:** *callus, neutral lipids, Larix sibirica*