

УДК 581.1

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ КАЛЛУСОВ ДВУХ ВИДОВ ЛИСТВЕННИЦЫ (*LARIX GMELINII* И *LARIX SIBIRICA*)

© С.П. Макаренко*, В.Н. Шмаков, Т.А. Коненкина, Л.В. Дударева, Ю.М. Константинов

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
ул. Лермонтова, 132, Иркутск, 664033 (Россия), e-mail: makar@sifibr.irk.ru

Методом газожидкостной хроматографии изучен жирнокислотный состав липидов каллусов лиственницы Гмелина (*L. gmelinii*) и лиственницы сибирской (*L. sibirica*). Жирнокислотный состав липидов каллусов характеризовался высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, составляющих для *L. gmelinii* 57,7% и для *L. sibirica* 59,9%, среди которых линолевая и олеиновая составляла 24,5 и 11,2% для *L. gmelinii* и 26,6 и 14,8% для *L. sibirica* соответственно. В составе липидов каллусов *L. gmelinii* содержание Δ^5 -UPIFA составляло 12,3%, для *L. sibirica* – 11,2%. В составе Δ^5 -UPIFA липидов каллусов лиственницы обоих видов содержание пиноленовой кислоты ($\Delta^5,9,12$ -18:3) составляло 6%. Содержание длинноцепочных насыщенных C20:0, C22:0, C23:0, C24:0 кислот составляло для каллусов *L. gmelinii* 11,4%, для *L. sibirica* – 9,1%.

Ключевые слова: *Larix gmelinii*, *Larix sibirica*, каллусы, жирные кислоты, десатуразы, Δ^5 -полиметилен-разделенные кислоты.

Список сокращений: ЖК – жирные кислоты, АПБ – ацилпереносящий белок, ИН – индекс ненасыщенности, ODR – олеоил–десатуразное отношение, LDR – линолеоил–десатуразное отношение, ПНЖК – полиненасыщенные ЖК, Δ^5 -UPIFA – ненасыщенные полиметиленразделенные ЖК.

Введение

Изучение жирнокислотного состава липидов клеточных мембран высших растений представляет значительный интерес в связи с той исключительно важной ролью, которую играют длинноцепочечные ЖК как в структурно-функциональной организации клеточных мембран, так и в процессах клеточного метаболизма. Состав и структура насыщенных и ненасыщенных ЖК в мембранных липидах позволяет получать информацию о наличии и активности мембранных десатураз, катализирующих введение двойной связи в углеводородную цепь ЖК [1, 2]. У большинства видов высших растений в биосинтезе ненасыщенных ЖК введение первой двойной связи осуществляется растворимой стеароил-АПБ десатуразой [3, 4]. Введение второй и третьей двойных связей в ненасыщенные ЖК с 18 углеродными атомами в хлоропластных мембранах осуществляется с участием ацил-липидных Δ^12 (*Fad5* и *Fad6*) и ω^3 (*Fad7* и *Fad8*) мембранных десатураз [4–6]. В нефотосинтетических тканях растений (семенах, корнях) образование полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) происходит с участием микросомальных ацил-липидных Δ^12 (*Fad2*) и ω^3 (*Fad3*) мембранных десатураз [2, 7–9].

Макаренко Сергей Петрович – старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, тел.: (3952) 42-58-92, e-mail: makar@sifibr.irk.ru

Шмаков Владимир Николаевич – старший научный сотрудник, кандидат биологических наук

Коненкина Татьяна Александровна – ведущий технолог

Дударева Любовь Виссарионовна – заведующая лабораторией фи зико-химических методов исследований, кандидат биологических наук

Константинов Юрий Михайлович – заведующий лабораторией генетической инженерии растений, доктор биоргических наук, профессор

В составе липидов семян, почек и листы хвойных растений присутствуют ЖК, в биосинтезе которых участвует Δ^5 -десатураза [10]. Десатурация длинноцепочечных Δ^5 -ненасыщенных ЖК в липидах растений, животных и грибов связана с цитохромом b_5 , который в виде домена включается в состав Δ^5 -десатуразы либо с N- или с C-концевой части аминокислотной последовательности фермента [11–13]. Цитохром b_5 является одним из ключевых ферментов

* Автор, с которым следует вести переписку.

в синтезе ПНЖК в животных и растительных клетках, а также мхах, грибах и бактериях. Показано, что цитохром b_5 в клетках животных и растений, с одной стороны, является универсальным переносчиком электронов в различных окислительно-восстановительных реакциях, а с другой – участвует в реакциях образования двойных связей в молекулах жирных кислот. $\Delta 5$ -Десатураза катализирует образование двойной связи между 5 и 6 углеводородными атомами в молекулах жирных кислот с длиной цепи 18 и более атомов. Рассмотрение функциональных характеристик *front-end* десатураз ($\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$ и $\Delta 8$), включаемых в биосинтез ненасыщенных ЖК с двумя и более двойными связями, показывает, что $\Delta 5$ -десатураза у мхов, грибов, микроводорослей и в клетках животных принимает участие в образовании арахидоновой ($\Delta 5,8,11,14$ -C20:4) и эйкозапентаеновой ($\Delta 5,8,11,14,17$ -C20:5) кислот [11, 12].

Несмотря на большое внимание, уделяемое в настоящее время изучению мембранных липидов растительной клетки, многие вопросы липидного обмена у растений остаются малоизученными. Одним из перспективных подходов в исследовании этих вопросов может быть получение и использование культур клеток *in vitro*, являющихся важным инструментом в физиолого-биохимических исследованиях [13–15]. Для размножения ценных пород древесных растений *in vitro* применяют культуры клеток и органов. Для этого используются различные ткани растений, у которых с помощью регуляторов роста на питательных средах вызывают дедифференцирование тканей и получение каллусных культур, затем в полученных каллусных культурах стимулируют органогенез, т.е. формирование побегов, соматических зародышей или других форм регенерантов [18]. Для хвойных растений, таких как *P. sylvestris* L., *P. patula* Schiele et Depper, *P. abies*, *P. Virginea* Vill, и других видов древесных родов и видов известны способы получения регенерантов *in vitro* путем соматического эмбриогенеза и органогенеза. В работе [19] показано, что клональное размножение хвойных через соматический эмбриогенез является одним из перспективных направлений в решении проблем лесовосстановления. Эмбриогенный каллус хвойных, по данным [19], получен у 16 видов рода *Pinus*, 11 видов родов *Picea*, 4 видов и 2 гибридов рода *Abies*, 6 видов и гибридов рода *Larix*, а также у *Pseudotsuga menziesii*. В качестве источника соматических клеток для индукции соматического эмбриогенеза у хвойных используются мегагаметофиты, зрелые и незрелые зародыши, семядоли, гипокотили, хвоя, а также сегменты вегетативных побегов зрелых деревьев. В связи с недостаточностью сведений относительно ЖК состава мембранных липидов клеток лиственницы, а также изменчивости этого биохимического параметра в условиях действия тех или иных экологических факторов значительный интерес представляет изучение ЖК состава липидов у деревьев разных популяций этого вида. Каллусные культуры меристематических тканей хвойных для изучения различных аспектов ЖК синтеза в липидах нами рассмотрены в работах по изучению особенностей ЖК состава липидов клеток лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. под действием фторсодержащих соединений [20], а также ЖК состав липидов каллусов хвои двух видов сосны: сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) и сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L) [21].

Цель настоящей работы – изучение ЖК состава липидов каллусной культуры меристематических тканей двух близкородственных видов лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb) и лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii*) методами газожидкостной хроматографии.

Экспериментальная часть

В качестве растительного материала использовали долгоживущую каллусную культуру, полученную из меристематических тканей ауксибластов ветвей, находящихся в средней трети кроны пятнадцати 30–35-летних деревьев лиственниц Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) и сибирской (*Larix sibirica* Ledeb). Каллусные штаммы культивировали на питательной среде следующего состава: минеральные соли по Murgashige, Scoog [22] – половинный состав (ICN, USA), тиамин – 2 мг/л (Sigma, USA), инозит – 8,0 мг/л (Sigma, USA), сахароза – 30 г/л (Мосреактив, Россия), НУК (1-нафтилуксусная кислота) – 1 мг/л (Sigma, USA), БАП (6-бензиламинопуридин) – 0,2 мг/л (Sigma, USA), агар – 7 г/л (Sigma, USA). Культуру поддерживали при температуре 23 °С в условиях 16-часового светового дня при интенсивности освещения 1500 лк. Продолжительность одного цикла культивирования составляла 28 сут. Длительность поддержания каллусных клеток лиственницы в культуре составляла в среднем 36 месяцев. Образцы каллусов замораживали в жидком азоте и растирали в агатовой ступке до получения однородной массы, переносили в делительную воронку объемом 50 мл и экстрагировали липиды смесью хлороформ – метанол – вода (1 : 2 : 0,8 v/v) [23]. При разделении образуется двухфазная система – нижний слой состоит из хлороформа, верхний – из метанола и воды. Водорастворимые нелипидные примеси переходят в водно-метанольный раствор, а хлороформенный

слой содержит липиды. Хлороформ из липидного экстракта удаляли под вакуумом с помощью роторного испарителя RVO-64 (Чехия). Метилловые эфиры ЖК получали по методу [24]. К экстракту липидов после удаления растворителя добавляли 1%-ный метанольный раствор H_2SO_4 и нагревали на водяной бане при $60\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. После охлаждения к полученной смеси добавляли воду (до $\frac{1}{2}$ объема смеси) и трижды экстрагировали метилловые эфиры ЖК гексаном (3×5 мл). Дополнительную очистку метилловых эфиров ЖК проводили методом ТСХ на стеклянных пластинках с силикагелем КСК (Россия). Анализ метилловых эфиров ЖК проводили методом газожидкостной хроматографии с использованием хромато-масс-спектрометра 5973N/6890N MSD/DS Agilent Technologies (США). Детектор – масс-спектрометр – квадруполь, способ ионизации – электронный удар (EI), энергия ионизации 70 эВ, для анализа использовали режим регистрации полного ионного тока. Для разделения использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX ($30\text{ м} \times 250\text{ мкм} \times 0,50\text{ мкм}$). Неподвижная фаза – полиэтиленгликоль. Подвижная фаза: гелий, скорость потока газа – 1 мл/мин. Температура испарителя $250\text{ }^\circ\text{C}$, источника ионов $230\text{ }^\circ\text{C}$, детектора $150\text{ }^\circ\text{C}$, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, $280\text{ }^\circ\text{C}$. Диапазон сканирования 41–450 а.е.м. Объем вводимой пробы – 1 мкл, разделение потоков 5 : 1. Хроматографирование выполняли в изотермическом режиме при $200\text{ }^\circ\text{C}$. Идентификацию метилловых эфиров ЖК проводили с помощью стандартов метилловых эфиров (Sigma, USA) и методом масс-спектрометрии с использованием библиотеки масс-спектров NIST 05 [25, 26]. Относительное содержание ЖК определяли в весовых процентах от общего их содержания в исследуемом образце. Для оценки ненасыщенности ЖК в липидах каллусов лиственницы использовали индекс ненасыщенности: $ИН = \sum P_j / 100$, где P_j – содержание (вес. %) ненасыщенных ЖК, умноженное на число двойных связей в каждой кислоте [25, 26]. Активность ацил-липидных $\omega 6$ - и $\omega 3$ -мембранных десатураз, участвующих в биосинтезе линолевой и α -линоленовой кислот, определяли из процентного содержания олеиновой, линолевой и α -линоленовой кислот как олеил-десатуразное (ODR) и линолеил-десатуразное (LDR) отношения (урав. 1, 2) [27].

$$ODR = (\%C18:2 + \%C18:3) / (\%C18:1 + \%C18:2 + \%C18:3) \quad (1)$$

$$LDR = (\%C18:3) / (\%C18:2 + \%C18:3) \quad (2)$$

Обсуждение результатов

ЖК состав (вес. %) липидов каллусной культуры двух видов лиственницы (Гмелина и сибирской) показан в таблице. В таблице представлены средние данные из 3–4 биологических повторностей и их стандартные отклонения. Достоверность различий сравниваемых средних значений оценивали с помощью t -критерия ($P < 0,05$). В составе ЖК липидов недифференцированных клеток каллусной культуры обеих видов лиственницы содержание насыщенных ЖК составляло 40,1% для *L. sibirica* и несколько выше – 43,2% – для *L. gmelinii*. В составе насыщенных ЖК каллусов лиственницы преобладала пальмитиновая кислота (16 : 0), относительное содержание которой составляло 19,9% для *L. gmelinii* и 20,7% для *L. sibirica*. Содержание стеариновой (C18:0) кислоты для липидов каллусов *L. gmelinii* и *L. sibirica* было близким – 3,2 и 2,6% соответственно. Среди других очень длинноцепочечных насыщенных ЖК свыше C20 (VLCPUFA) в составе липидов каллусов в равных или близких количествах идентифицированы арахидоновая (C20:0), бегеновая (C22:0), трикозановая (C23:0) и лигноцериновая (C24:0) кислоты, среди которых относительное содержание C22:0 в обоих видах лиственницы составляло одинаковую величину 5,0%. Содержание C24:0 кислоты для липидов каллусов было 3,3% для *L. gmelinii* и 2,1% для *L. sibirica*. Следует отметить, что в значительных количествах VLCPUFA идентифицированы в липидах каллусов хвой *Pinus sylvestris* и *Pinus sibirica* [21], а также в липидах хвой других *Pinaceae* [28].

В составе ЖК липидов каллусов лиственницы в небольших количествах 0,2–0,4% определены разветвленные *изо*-C15:0 (12-метил-тетрадекановая кислота с молекулярной массой $M^+ = 256$), а также *анте**изо*-C17:0 кислота с молекулярной массой $M^+ = 284$ (14-метил-гексадекановая), относительное содержание которых в липидах каллусов *L. gmelinii* и *L. sibirica* – 5,4 и 4,8%, а также *изо*-C18:0 с $M^+ = 298$ (16-метил-гептадекановая кислота). По данным [28, 29], в составе липидов семян *Larix leptolepis* методами ГЖХ-масс-спектрометрии также идентифицированы две *изо*-C17:0 (метил-пальмитиновые кислоты) с молеку-

лярной массой $M^+=284$, относительное содержание которых составляло 0,8 и 6,6% соответственно. По данным [28, 29], присутствие разветвленных *изо*- и *антеизо*-метил-С16:0 кислот в составе липидов голосеменных является одним из характерных признаков ЖК хлоропластных липидов хвойных. Присутствие ЖК с нечетным числом C_{15} и C_{17} -атомов нами было отмечено в составе липидов хвои лиственницы *L. Gmelinii* – 2,2% [20], и *L. kaempferi* – 2,0% [29], липидах каллусов *Pinaceae* [21].

Содержание ненасыщенных ЖК липидов каллусов обоих видов лиственницы составляло 57,7% для *L. gmelinii* и 59,9% для *L. sibirica*. Относительное содержание моноеновых ЖК 16:1 Δ 7, 16:1 Δ 9 (пальмитолеиновые), 18:1 Δ 9 (олеиновая), 18:1 Δ 11 (*цис*-вакценовая) и 20:1 Δ 11 (гадолеиновая) было в сумме 13,7% для липидов каллусов *L. Gmelinii* и несколько выше – 16,9% – для *L. sibirica*, причем в составе моноеновых ЖК липидов каллусов преобладала олеиновая кислота, относительное содержание которой составляло 11,2% для *L. gmelinii* и 14,8% для *L. sibirica*.

Относительное содержание ПНЖК в составе липидов каллусов обоих видов лиственницы было 43,0% с небольшим преобладанием линолевой (18:2 ω 6) в *L. sibirica* (табл.). Содержание α -линоленовой кислоты для липидов каллусов *L. gmelinii* и *L. sibirica* – 5,8 и 3,9% соответственно. Рассчитанные значения десатуразных LDR и ODR соотношений, характеризующих активность ацил-липидных ω 6- и ω 3-хлоропластных десатураз, показали, что для каллусов *L. gmelinii* и *L. sibirica* уровень ODR составил 0,730 и 0,673, тогда как для LDR оно было как 0,197 и 0,127, что показывает большую активность олеатной десатуразы, которая может быть обусловлена более высоким уровнем экспрессии гена *fad2*, кодирующего хлоропластную ω 6-десатуразу в каллусах.

Жирнокислотный состав липидов (вес. %) каллусов двух видов лиственницы

Жирные кислоты	<i>Larix gmelinii</i>	<i>Larix sibirica</i>	M^+
C12:0	0,1	0,2	214
C14:0	0,2	0,6±0,2	242
<i>anteiso</i> -C15:0	0,2	0,3±0,1	256
C15:0	0,3±0,1	0,3±0,1	256
<i>iso</i> -15	0,4±0,1	0,3±0,1	256
C16:0	19,9±0,7	20,7±0,6	270
C16:1 Δ 7	0,8±0,1	0,5±0,1	268
C16: Δ 9	0,3±0,1	0,2	268
<i>iso</i> -C17:0 (14-метил)	5,4±0,2	4,8±0,3	284
C17:0	0,4±0,1	0,4±0,1	284
<i>iso</i> C17:0	0,3±0,1	0,5±0,1	284
<i>iso</i> -C18:0	0,4±0,1	0,3±0,1	298
C18:0	3,2±0,3	2,6±0,2	298
C18:1 Δ 9	11,2±0,4	14,8±0,3	296
C18:1 Δ 11	1,0±0,1	1,1±0,2	286
C18:2 Δ 5.9	0,8±0,1	1,4±0,2	284
C18:2 ω 6	24,5±0,7	26,6±0,6	294
C18:3 Δ 5.9.12	6,0±0,2	6,1±0,1	292
C18:3 ω 3	5,8±0,2	3,9±0,1	292
C18:4 Δ 5.9.12.15	0,5±0,1	0,5±0,1	290
C20:0	1,8±0,3	1,0±0,1	326
C20:1 Δ 9	0,4±0,1	0,3±0,1	324
C20:2 ω 6	1,1±0,2	1,0±0,1	322
C20:3 Δ 5.11.14	3,8±0,3	2,2±0,1	320
C20:3 Δ 7.11.14	1,0±0,2	0,8±0,1	320
C20:3 ω 3	0,2±0,1	0,3 ±0,1	320
C20:4 Δ 5.11.14.17	0,2	0,2	288
C22:0	5,5±0,3	5,6±0,2	354
C23:0	0,8±0,2	0,4±0,1	368
C24:0	3,3±0,2	2,1±0,2	382
Насыщен. ж.к.	42,2±2,9	40,1±2,5	
Ненасыщ. ж.к.	57,7±2,8	59,9±2,3	
Δ5-UPFA	12,3	11,2	
ИН	1,20	1,17	

Примечания. M^+ = мол. вес метиловых эфиров жирных кислот, 14 метил- гексадекановая, 16 -метил-гептадекановая).

Ранее при исследовании ЖК каллусов и хвои сосны *Pinus sylvestris* было показано, что липиды каллусов характеризовались высоким содержанием олеиновой кислоты (17,5%), тогда как в липидах хвои содержание этой кислоты было в 3 раза меньше (5,2%), при этом α -линоленовая кислота составляла 4% [21]. В составе липидов каллусов *P. sibirica* уровень олеиновой кислоты составлял 22,6%, что на 5% выше, чем для *P. sylvestris* [21]. Высокое содержание олеиновой кислоты (до 22%) ранее нами отмечено в ЖК составе каллусов *L. gmelinii* двух географических популяций, при этом уровень α -линоленовой кислоты составлял 10% [20].

При изучении культуры клеток оливы отмечалось, что биосинтез ЖК в гетеротропных каллусах *Olea europaea* сопровождался высоким уровнем олеиновой кислоты (до 42%), тогда как уровень линолевой и α -линоленовой кислот был значительно ниже и составлял 8 и 10% соответственно. Для фотомиксотропных каллусов этой же культуры содержание 18:1 Δ 9 было 36%, а уровень линолевой и α -линоленовой кислот – 16 и 22% соответственно [13]. В работе [18] было показано, что механизм липидного биосинтеза при исследовании каллусных культур оливы и масличной пальмы может иметь различный характер в зависимости от температуры. Так, при 20 °С содержание 18:1 Δ 9 для каллусов *Olea europaea* L. составляло 52,5%, но при 30 °С ее содержание увеличивалось до 60,0%. Можно заключить, что высокий уровень олеиновой кислоты в составе липидов каллусов растений, вероятно, обусловлен особенностью биосинтеза липидов *in vitro* в пластидах и связан с высокой активностью гена Δ 9-стеароил-АПБ десатуразы и высокое содержание этого продукта в липидах каллусов растений может быть одной из важных характеристик каллусогенеза.

Одним из важных признаков, характеризующих липиды каллусов и хвои хвойных, является также присутствие в них «реликтовых» Δ 5-метилен разделенных ЖК, концентрация которых в липидах хвои для лиственницы сибирской составляла 5,1% [20, 21, 28], а для липидов каллусов *L. gmelinii* и *L. sibirica* – в 2–2,5 раза выше и составляло 12,3 и 11,3% соответственно (табл.). В липидах семян хвойных содержание Δ 5-UPIFA может достигать 30% и более [11, 26], что характеризует различные пути биосинтеза ЖК липидов в высших растениях – прокариотический в хвое и эукариотический в семенах хвойных [1, 2, 12]. Физиологическая роль некоторых ненасыщенных ЖК как в хлоропластных, так и микросомальных мембранах деревьев хвойных пород во многом не ясна. Важная роль в этих процессах отводится цитохрому *b*₅, который является в клетках животных и растений одним из ключевых ферментов синтеза ПНЖК [10, 11]. Предполагается, что Δ 5-UPIFA могут играть важную роль в адаптации растений к низким температурам, о чем может свидетельствовать замещение α -линоленовой кислоты пиноленовой в ЖК липидов семян деревьев хвойных пород. Так, предполагается, что пиноленовая кислота может быть эквивалентна γ -линоленовой кислоте как промежуточное звено, сохранившееся в ходе эволюции при биосинтезе арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот с последующим изменением из Δ 6,9,12-C18 (в птереофитах) в Δ 5,9,12-C18 (в хвойных). Арахидоновая и эйкозанпентаеновая кислоты в значительных количествах обнаруживаются в микроорганизмах, мхах, лишайниках, грибах, а также в животных организмах [11, 12], но практически не обнаруживаются аналитическими методами в липидах хвойных – семенах, хвое [25, 26, 28]. Эволюционный порядок метаболических путей этих кислот заметно прослеживается от низших к высшим растениям [10, 13]. В низших растениях биосинтез ПНЖК идет по ω 6-пути с образованием линолевой – γ -линоленовой – арахидоновой – эйкозапентаеновой кислот, тогда как в высших биосинтез ПНЖК идет по ω 3-пути с образованием линолевой – α -линоленовой кислот и может заканчиваться получением эйкозапентаеновой кислоты, минуя арахидоновую [11, 26].

Исследован жирнокислотный состав липидов каллусов двух видов лиственницы, характеризующихся высоким содержанием ненасыщенных ЖК (57,7% для *L. Gmelinii*, и 59,9% для *L. sibirica*), среди которых преобладали линолевая и олеиновая кислоты. Одной из важных характеристик липидов каллусов двух видов лиственницы, как и каллусов других видов хвойных, может служить высокое содержание олеиновой кислоты, составляющей для *L. gmelinii* 11,2% и *L. sibirica* 14,8%, и низкое – α -линоленовой (5,8% для *L. gmelinii* и 3,9% для *L. sibirica*). Другой важной характеристикой липидов каллусов лиственницы, как и всех хвойных служит присутствие Δ 5-UPIFA, содержание которых составляло 12,3 и 11,2% для *L. gmelinii* и *L. Sibirica* соответственно, среди которых выделялись пиноленовая и скиадоновая. В составе насыщенных ЖК липидов каллусов двух видов лиственниц преобладали пальмитиновая (19,9 и 20,7%) и олеиновая (11,2 и 14,8%) кислоты.

Список литературы

1. Ohlrogg J., Browse J. Lipid Biosynthesis // Plant Cell. 1995. Vol. 7. Pp. 957–970.
2. Wang Z., Benning C. Chloroplast lipids synthesis and lipid trafficking through ER-plastid membrane contact sites // Biochem. Soc. Trans. 2012. Vol. 40. Pp. 457–463.
3. Schultz D.J., Suh M.C., Ohlrogg J. Stearoyl-acyl carrier protein and unusual acyl-acyl carrier protein desaturase activities are differentially influenced by ferredoxin // Plant Physiol. 2000. Vol. 124. Pp. 681–692.

4. Kang J., Snapp A.R., Lu C. Identification of three genes encoding microsomal oleate desaturases (FAD2) from the oilseed crop *Camelina sativa* // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2011. Vol. 49. Pp. 223–229.
5. Theocharis A., Clement C., Barka E.A. Physiological and molecular changes in plants grow at low temperatures // *Planta*. 2012. Vol. 235. Pp. 1091–1105.
6. Roman A., Andreu V., Hernandez M.L., Lagunas B., Picorel R., Martinez-Rivas J.M., Alfonso M. Contribution of the different omega-3 fatty acid desaturase genes to the cold response in soybean // *J. Exp. Bot.* 2012. Vol. 63. Pp. 4973–4982.
7. Sayanova O., Ruiz-Lopez N., Haslam R. P., Napier J.A. Role of $\Delta 6$ -desaturase acyl-carrier specificity in the efficient synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic plants // *Plant Biotechnology J.* 2012. Vol. 10. Pp. 195–206.
8. Астахова Н.В., Дёмин И.Н., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Влияние гена *desA delta12*-ацил-липидной десатуразы на структуру хлоропластов и устойчивость к гипотермии растений картофеля // *Физиология растений*. 2011. Т. 58. С. 21–27.
9. Cao S., Zhou X.R., Wood C.C., Green A.G., Singh S.P., Liu L., Liu Q. A large and functionally diverse family of *Fad2* genes in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) // *BMC Plant Biol.* 2013. Vol. 13. Pp. 1–18.
10. Napier J.A., Michaelson L.V., Dunn T.M. A new class of lipid desaturase central to sphingolipid biosynthesis and signaling // *Trend Plant Sci.* 2002. Vol. 7. Pp. 475–478.
11. Wolff R.L., Lavialle O., Pedrono F., Pasquier E., Destailats F., Marpeau A., Angers P., Aitzetmuller K. Abietoid seed fatty acid compositions - a review of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Hesperopeuce*, *Keteleeria*, *Pseudolarix*, *Tsuga* and preliminary inferences on the taxonomy of *Pinaceae* // *Lipids*. 2002. Vol. 37. Pp. 17–26.
12. Meesapyodsuk D., Qiu X. The front-end desaturase: structure, function, evolution and biotechnological use // *Lipids*. 2012. Vol. 47(3). Pp. 227–237.
13. Williams M., Sanchez J., Hann A.C., Harwood J.L. Lipid Biosynthesis in Olive Cultures *Lipid Biosynthesis* // *J. Exp. Bot.* 1993. Vol. 44. Pp. 1717–1723.
14. Salas J., Sanchez J., Ramli U.S., Manal A.M., Williams M., Harwood J.L. Biochemistry of Lipid Metabolism in olive and other oil fruits // *Prog. Lipid Res.* 2000. Vol. 39. Pp. 151–180.
15. Hernandez M.L., Guschina I.A., Martinez-Rivas J.V., Mancha M., Harwood J.L. The utilization and desaturation of oleate and linoleate during glycerolipid biosynthesis in olive (*Olea europaea* L.) callus culture // *J. Exp. Bot.* 2008. Vol. 59. Pp. 2425–2435.
16. Ramli U.S., Salas J.J., Quant P.A., Harwood J.L. Use of metabolic control analysis to give quantitative information on control of lipid biosynthesis in the important oil crop, *Elaeis guineensis* (oilpalm) // *New Phytologist*. 2009. Vol. 184. Pp. 330–339.
17. Тимофеева О.А., Румянцева Н.И. Культура клеток и тканей растений. Казань, 2012. С. 1–91.
18. Третьякова Н.И., Ижболдина М.В. Индукция соматического эмбриона у кедр сибирского // *Лесоведение*. 2009. №5. С. 43–49.
19. Салаяев Р.К., Рекославская Н.И. Получение каллусной культуры клеток кедр сибирского // *Лесоведение*. 2009. №5. С. 57–62.
20. Макаренко С.П., Константинов Ю.М., Шмаков В.Н., Хотимченко С.В. Коненкина Т.А. Жирнокислотный состав липидов лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) // *Биологически мембраны*. 2005. Т. 52. С. 343–348.
21. Макаренко С.П., Константинов Ю.М., Шмаков В.Н., Коненкина Т.А. Жирнокислотный состав липидов каллусов двух видов сосны *Pinus sibirica* и *Pinus silvestris* // *Физиология растений*. 2010. Т. 57. С. 790–794.
22. Murashige T., Scoog F. A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Plant Physiol.* 1962. Vol. 15. Pp. 473–497.
23. Bligh E.C., Dyer W.J. A Rapid method of total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. Vol. 37. Pp. 911–917.
24. Christie W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis // *Advances in Lipid Methodology*. Dundee, 1993. Pp. 69–111.
25. Dobson G., Christie W.W. Mass spectrometry of fatty acid derivatives // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002. Vol. 104. Pp. 36–43.
26. Wolff R.L., Christie W.W. Structure, practical sources (gymnosperm seeds), gas-chromatographic data (equivalent chain lengths), and mass spectrometric characteristics of all-cis $\Delta 5$ -olefinic acids // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002. Vol. 104. Pp. 234–244.
27. Cartea M.E., Migdal M., Galle A.M., Pelletier G., Guerche P. Comparison of sense and antisense methodologies for modifying the fatty acid composition of arabidopsis oilseed // *Plant Sci.* 1998. Vol. 136. Pp. 181–194.
28. Mongrad S., Badoc A., Patouille B., Lacomblez C., Chavent M., Cassagne C., Bessoule J.J. Taxonomy of gymnospermae: multivariate analyses of leaf fatty acid composition // *Phytochemistry*. 2001. Vol. 58. Pp. 101–115.
29. Plattner R.D., Spencer G.F., Kleiman R. cis- $\Delta 5$ -Polyenoic acids in *Larix leptolepis* seed oil // *Lipids*. 1975/ Vol. 10. Pp. 413–416.
30. Sato M., Seki K., Kita K., Moriguchi Y., Yunoki K., Kofujita H., Ohnishi M. Prominent differences in leaf fatty acid composition in the F1 hybrid compared with parent trees *Larix gmelinii* var. *japonica* and *L. kaempferi* // *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008. Vol. 72. Pp. 2895–2902.

Makarenko S.P.* , Shmakov V.N., Konenkina T.A., Dudareva L.V., Konstantinov Yu.M. FATTY ACIDS COMPOSITION OF LIPIDS IN THE CALLUSES OF TWO LARIX SPECIES (*LARIX GMELINII* AND *LARIX SIBIRICA*)

Siberian institute of physiology and biochemistry of plants, of the Siberian branch of the Academy of Sciences, Lermontova st., 132, Irkutsk, 664033 (Russia), e-mail: makar@sifibr.irk.ru

The fatty acid (FA) composition of callus lipids in two larch species (*Larix gmelinii* and *Larix sibirica*) was studied by gas-liquid chromatography. Callus lipids were characterized by a high content of unsaturated FAs: 57,7% in *L. gmelinii* and 59,9% *L. sibirica*. Among them, oleic and linoleic acids predominated (11,2 and 24,5% of total FAs in *L. gmelinii* and 14,8 and 26,6% in *L. sibirica*, respectively). Callus lipids also contained $\Delta 5$ -UPIFA (unsaturated polymethylene-interrupted FAs (12,3% in *L. gmelinii* and 11,2% in *L. sibirica*, respectively), where pinoleic and sciadonic acids predominated. Callus lipids also contained high content of VLCPUFA (C20, C22, C23, C24) 11,4% in callus *L. gmelinii* and 9,1% *L. sibirica*.

Keywords: *Larix gmelinii*, *Larix sibirica*, каллусы, fatty acid desaturase gene, $\Delta 5$ -polimethylenrazdelenyye acid.

References

1. Ohlrogg J., Browse J. *Plant Cell.*, 1995, vol. 7, pp. 957–970.
2. Wang Z., Benning C. *Biochem. Soc. Trans.*, 2012, vol. 40, pp. 457–463.
3. Schultz D.J., Suh M.C., Ohlrogg J. *Plant Physiol.*, 2000, vol. 124, pp. 681–692.
4. Kang J., Snapp A.R., Lu C. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, vol. 49, pp. 223–229.
5. Theocharis A., Clement C., Barka E.A. *Planta*, 2012, vol. 235, pp. 1091–1105.
6. Roman A., Andreu V., Hernandez M.L., Lagunas B., Picorel R., Martinez-Rivas J.M., Alfonso M. *J. Exp. Bot.*, 2012, vol. 63, pp. 4973–4982.
7. Sayanova O., Ruiz-Lopez N., Haslam R. P., Napier J.A. *Plant Biotechnology J.*, 2012, vol. 10, pp. 195–206.
8. Astahova N.V., Dëmyan Y.N., Narajkyna N.V., Trunova T.Y. *Fyzyologyja rastenyj*, 2011, vol. 58, pp. 21–27. (in Russ.).
9. Cao S., Zhou X.R., Wood C.C., Green A.G., Singh S.P., Liu L., Liu Q. *BMC Plant Biol.*, 2013, vol. 13, pp. 1–18.
10. Napier J.A., Michaelson L.V., Dunn T.M. *Trend Plant Sci.*, 2002, vol. 7, pp. 475–478.
11. Wolff R.L., Lavielle O., Pedrono F., Pasquier E., Destailhats F., Marpeau A., Angers P., Aitzetmuller K. *Lipids*, 2002, vol. 37, pp. 17–26.
12. Meesapyodsuk D, Qiu X. *Lipids*, 2012, vol. 47(3), pp. 227–237.
13. Williams M., Sanchez J., Hann A.C., Harwood J.L. *J. Exp. Bot.*, 1993, vol. 44, pp. 1717–1723.
14. Salas J., Canchez J., Ramli U.S., Manal A.M., Williams M., Harwood J.L. *Prog. Lipid Res.*, 2000, vol. 39, pp. 151–180.
15. Hernandez M.L., Guschina I.A., Martinez-Rivas J.V., Mancha M., Harwood J.L. *J. Exp. Bot.*, 2008, vol. 59, pp. 2425–2435.
16. Ramli U.S., Salas J.J., Quant P.A., Harwood J.L. *New Phytologist.*, 2009, vol. 184, pp. 330–339.
17. Tymofeeva O.A., Rumjanceva N.Y. *Kul'tura kletok y tkanej rastenyj*. [Culture cells and plant tissues]. Kazan, 2012, pp. 1–91. (in Russ.).
18. Tret'jakova N.Y., Yzhboldyna M.V. *Lesovedenye*, 2009, no. 5, pp. 43–49. (in Russ.).
19. Saljaev R.K., Rekoslavskaja N.Y. *Lesovedenye*, 2009, no. 5, pp. 57–62. (in Russ.).
20. Makarenko S.P., Konstantinov Iu.M., Shmakov V.N., Khotimchenko S.V. Konenkina T.A. *Biologicheski membrany*, 2005, vol. 52, pp. 343–348. (in Russ.).
21. Makarenko C.P., Konstantinov Iu.M., Shmakov V.N., Konenkina T.A. *Fiziologija rastenii*, 2010, vol. 57, pp. 790–794. (in Russ.).
22. Murashige T., Scoog F. *Plant Physiol.*, 1962, vol. 15, pp. 473–497.
23. Bligh E.C., Dyer W.J. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, vol. 37, pp. 911–917.
24. Christie W.W. *Advances in Lipid Methodology*, Dundee, 1993, pp. 69–111.
25. Dobson G., Christie W.W. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2002, vol. 104, pp. 36–43.
26. Wolff R.L., Christie W.W. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2002, vol. 104, pp. 234–244.
27. Cartea M.E., Migdal M., Galle A.M., Pelletier G., Guerche P. *Plant Sci.*, 1998, vol. 136, pp. 181–194.
28. Mongrad S., Badoc A., Patouille B., Lacomblez C., Chavent M., Cassagne C., Bessoule J.J. *Phytochemistry*, 2001, vol. 58, pp. 101–115.
29. Plattner R.D., Spencer G.F., Kleiman R. *Lipids*, 1975, vol. 10, pp. 413–416.
30. Sato M., Seki K., Kita K., Moriguchi Y., Yunoki K., Kofujita H., Ohnishi M. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 2008, vol. 72, pp. 2895–2902.

Received May 16, 2013

* Corresponding author.

