

ВЛИЯНИЕ БЕНЗИЛАМИНОПУРИНА НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ В ПОБЕГАХ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ IN VITRO

© Л. В. Ветчинникова,^{1,*} А. Ф. Титов,² Т. Ю. Кузнецова¹

¹ Институт леса Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, 185910, и

² Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, 185910;

* электронный адрес: vetchin@krc.karelia.ru

Изучено влияние синтетического аналога природного цитокинина 6-бензиламинопурина (БАП) на жирнокислотный состав мембранных липидов в побегах карельской березы *Betula pendula* Roth. var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti в условиях *in vitro*. Установлено, что добавление в питательную среду БАП (в концентрации 0.25, 0.5, 1.0 или 2.0 мг/л) приводит к повышению доли насыщенных жирных кислот в фосфолипидах, тогда как в контрольном варианте в фосфолипидах преобладали ненасыщенные жирные кислоты. В гликолипидах, наоборот, БАП вызывал усиление синтеза ненасыщенных жирных кислот (преимущественно линоленовой), но степень его влияния зависела от концентрации гормона. В частности, в варианте с применением БАП в максимальной из изученных концентраций (2.0 мг/л) зафиксировано снижение доли линоленовой кислоты. Высказано мнение о том, что выявленные изменения в составе гликолипидов являются одним из показателей стимулирующего влияния цитокинина (до определенной его концентрации) на структуру и функцию хлоропластов, которые в силу фотомиксотрофности культуры побегов, являются важным фактором, определяющим не только их фотосинтетическую активность, но и пролиферацию клеток и направленность морфогенеза *in vitro*.

Ключевые слова: *Betula pendula* var. *carelica*, 6-бензиламинопурин, гликолипиды, фосфолипиды, жирные кислоты.

Принятые сокращения: БАП — 6-бензиламинопурин; ИДС — индекс двойной связи; U/S — коэффициент ненасыщенности жирных кислот.

Фитогормоны принимают активное участие в регуляции многих физиолого-биохимических процессов у растений на всех этапах их онтогенеза, начиная от развития оплодотворенной яйцеклетки и заканчивая процессами старения (Кулаева, Кузнецов, 2004; Choi, Hwang, 2007; Werner, Schmülling, 2009; Романов, 2011, и др.). Среди фитогормонов важная роль принадлежит цитокининам, которые синтезируются главным образом в растущих тканях корня, откуда по ксилеме с восходящим током поступают в надземные органы, где принимают участие в регуляции различных физиологических процессов (Кулаева, Кузнецов, 2004; Kurakawa et al., 2007; Зайцев и др., 2013; O'Brien, Benkova, 2013). Однако, как показывают исследования, степень и характер влияния цитокининов во многом зависят от их концентрации (Haberer, Kieber, 2002; Staden et al., 2008; Романов, 2009). При физиологически оптимальных концентрациях цитокинины снимают апикальное доминирование, индуцируют развитие пазушных почек, стимулируют деление клеток и формирование хлоропластов (Choi, Hwang, 2007; Данилова, 2015), положительно влияют на развитие апикальных меристем и рост побега, усиливают аттрагирующую способность отдельных органов или их частей (Парамонова и др., 2002; Романов, 2009). В высоких концентрациях цитокинины вызывают опадание листьев (Haberer, Kieber, 2002;

Vlčková et al., 2006; Романов, 2009), проявляют ростингибирующее и даже апоптотическое действие (Mlejnek, Procházková, 2002; Кулаева, Кузнецов, 2004; Eldoma et al., 2015), причем пролиферирующие клетки являются более чувствительными к фитогормонам, чем покоящиеся (Carrimi et al., 2003).

Необходимо отметить, что большая часть работ, посвященных физиологической роли цитокининов и изучению механизмов их действия, проведена на целых растениях. Культура побегов *in vitro* в этом плане используется гораздо реже и соответственно изучена намного хуже (Концевая, Шевцова, 2012; Ветчинникова и др., 2013; Макаренко и др., 2014). Например, практически отсутствуют работы, направленные на изучение влияния цитокининов *in vitro* на липиды мембран, которые, безусловно, важны для более полного понимания механизмов гормональной регуляции процессов клеточного деления и дифференцировки. Поскольку одним из основных структурных компонентов липидов являются жирные (или высшие карбоновые) кислоты, логично предположить, что экзогенный цитокинин, попадая в клетки и ткани из питательной среды *in vitro*, способен вызывать определенные изменения в составе жирных кислот и, возможно, сказывается на степени их ненасыщенности, от которой зависит структура и функции мембран. При этом изменения,

происходящие в изолированной культуре клеток, тканей или побегов, могут отличаться от тех, которые наблюдаются в целых растениях.

Исходя из сказанного нами проведено изучение влияния цитокинина (БАП) как одного из главных компонентов питательной среды гормональной природы на жирнокислотный состав разных фракций липидов в побегах карельской березы в условиях *in vitro*.

Материал и методика

В качестве объекта исследований использовали культуру побегов карельской березы *Betula pendula* Roth. var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, полученную из конуса нарастания вегетативных почек и являющуюся частью создаваемой нами коллекции клонов *in vitro* (<http://forestry.krc.karelia.ru/section.php?plang=r&id=2635>). Исходные сегменты побегов состояли из стебля (длиной около 5 мм) с 1—2 листьями. Питательной средой служила агаризованная минеральная основа по Мурасиге—Скугу (Murashige, Skoog, 1962). При изучении влияния цитокинина на жирнокислотный состав мембранных липидов в побегах, полученных в результате морфогенеза *in vitro*, использовали БАП (6-бензиламинопурин) в концентрациях 0.25, 0.5, 1.0 или 2.0 мг/л, который вносили в питательную среду одноразово при организации эксперимента. Исходя из данных литературы (Ryynänen, Ryynänen, 1986; Концевая, Шевцова, 2012; Rathwell et al., 2016, и др.) использовали набор возрастающих концентраций (от 0.25 до 2.0 мг/л), не оказывающих негативных последствий на культуру побегов. Контролем служили сегменты побегов, размещенные на питательной среде, не содержащей БАП. Стеклянные сосуды объемом 125 мл (диаметром 55 мл) с питательной средой автоклавировали при давлении 1 атм в течение 30 мин в вертикальном стерилизаторе ВК-30 (Россия). Перенос сегментов побегов на питательную среду осуществляли в асептических условиях ламинар-бокса (Россия). Культивирование побегов осуществляли при 25 ± 2 °С, 16-часовом фотопериоде и искусственном освещении (4500 лк). Продолжительность экспериментов составляла 30 сут. Их повторяли трижды в десятикратной биологической повторности.

Липиды из тканей побегов экстрагировали смесью хлороформа и метанола в соотношении 2 : 1 по объему (Folch et al., 1957). Разделение липидов на фракции проводили методом колоночной хроматографии с использованием силикагеля (Bio-Sil A100-200 меш). В качестве колонки служили пипетки Пастера длиной 145 мм (Кузнецова и др., 2008). Фракции липидов извлекали отдельно: нейтральные липиды — хлороформом, гликолипиды — ацетоном, фосфолипиды — смесью хлороформа с метанолом (1 : 1), а затем метанолом (Piispanen, Saranpää, 2002). Полноту экстракции отдельных фракций контролировали путем их порционного сбора и индивидуального сжигания в концентрированной серной кислоте с последующим спектрофотометрированием растворов при длине волны 375 нм (Marsh, Weinstein, 1966). Метилловые эфиры жирных кислот получали в результате переэтерификации липидов метанолом в присутствии ацетилхлорида и анализировали на газожидкостном хроматографе «Хроматэк — Кристалл 5000 М.1» (Россия) с использованием капиллярной колонки HP-INNOWAX (30 м × 0.32 мм) при температурах (°С): термостата — 180 (изотерма), пламенно-ионизационного детектора —

240, испарителя — 220, а также при скорости газа-носителя (азот) 50 мл/мин. Жирные кислоты идентифицировали сравнением хроматографических подвижностей со стандартными жирными кислотами (Supelco 37 component FAME Mix, Германия), а также сопоставлением эквивалентной длины цепи экспериментально полученных компонентов с известными длинами (Сиймер и др., 1971; Nakamura et al., 2014). Вычисляли содержание индивидуальных жирных кислот, а также их групп, объединенных по числу двойных связей в углеродной цепочке: моноеновые (М), диеновые (Д) и триеновые (Тр). Коэффициент ненасыщенности (U/S) жирных кислот определяли как отношение суммы ненасыщенных (U) кислот к сумме насыщенных (S), а индекс двойной связи (ИДС), характеризующий степень ненасыщенности липидов, рассчитывали по формуле $ИДС = (M + 2D + 3Tr)/100$ (Lyons et al., 1964; Кузнецова и др., 2008; Романова и др., 2016).

Математическую обработку данных осуществляли с помощью общепринятых методов вариационной статистики с использованием пакета программ Microsoft Excel. На рисунках приведены средние арифметические значения трех и более независимых экспериментов и их стандартные отклонения. О достоверности различий судили с помощью критерия Стьюдента при $P \leq 0.05$.

Для культивирования побегов использовали минеральные соли: нитрат аммония (NH_4NO_3), хлорид кальция ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), сульфат магния ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), дигидрофосфат калия (KH_2PO_4) и нитрат калия (KNO_3); микроэлементы: борная кислота (H_3BO_3), хлорид кобальта ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), сульфат меди ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), сульфат железа ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), сульфат марганца ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$), иодид калия (KI), молибдат натрия ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) и сульфат цинка ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (ООО НеваРеактив, Россия, Украина); другие использованные реактивы: ди-натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Na_2 -ЭДТА), железный купорос ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (ООО НеваРеактив, Россия), витамины (тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота, мезоинозит), сахароза, БАП, агар-агар бактериологический, американский тип, QP, Panreac (ООО НТК Диаэм, Россия, Sigma/Aldrich, США), NaOH для достижения pH раствора 5.8 (ООО НеваРеактив, Россия). Для анализа жирнокислотного состава липидов использовали метанол, хлороформ (ООО НТК Диаэм, Россия), ацетон, гексан (ООО НеваРеактив, Россия), силикагель Bio-Sil A100-200 меш (ООО НеваРеактив, Sigma/Aldrich, США), смесь метиловых эфиров жирных кислот Supelco 37 component FAME Mix (ООО НТК Диаэм Supelco/Sigma-Aldrich/Германия).

Результаты

Проведенные исследования показали, что в побегах растений карельской березы, выращенных в условиях *in vitro* с неодинаковым содержанием БАП в питательной среде, существуют значительные различия по ряду показателей липидного обмена. В частности, культивирование в течение 30 сут изолированных побегов на питательной среде с добавлением БАП в концентрации, варьирующей от 0.25 до 2.0 мг/л, приводило к заметным изменениям относительного содержания жирных кислот (табл. 1), входящих в состав мембранных липидов. Под влиянием БАП количественное соотношение индивидуальных жирных кислот заметно отличалось от контрольного варианта, но в разной степени в зависимости от кон-

Доля жирных кислот в мембранных липидах побегов карельской березы *in vitro* в зависимости от концентрации БАП

Жирные кислоты	Контроль		Концентрация БАП, мг/л							
			0.25		0.5		1.0		2.0	
	ФЛ	ГЛ	ФЛ	ГЛ	ФЛ	ГЛ	ФЛ	ГЛ	ФЛ	ГЛ
Пальмитиновая (16)	32.6	39.0	44.3	36.7	39.5	34.9	44.1	36.3	38.3	36.6
Стеариновая (18)	3.5	10.0	4.0	4.6	3.1	6.7	4.0	3.8	2.9	3.8
Арахидиновая (20)	1.0	1.7	1.0	2.0	0.5	2.2	0.9	1.3	0.5	1.4
Пальмитоолеиновая (16 : 1Δ9)	0.7	0.0	1.5	0.0	1.2	0.0	1.4	0.0	0.9	0.0
Олеиновая (18 : 1Δ9)	29.5	20.6	24.3	18.2	23.8	16.5	20.8	13.6	22.8	16.7
Линолевая (18 : 2Δ9,12)	21.1	11.3	15.0	15.0	19.9	14.2	17.8	16.3	21.7	17.7
Линолевая (18 : 3Δ9,12,15)	11.6	17.5	9.8	23.5	11.9	26.6	11.8	28.8	12.9	23.8
Линоленовая / линолевая	0.5	1.5	0.5	1.6	0.6	1.9	0.7	1.8	0.6	1.3

Примечание. Указана доля кислоты в % от общей суммы кислот. Цифры в скобках показывают число углеродных атомов, число и местоположение двойной связи соответственно. Здесь и в табл. 2: ГЛ — гликолипиды, ФЛ — фосфолипиды.

центрации БАП, а также от фракции липидов (фосфо- или гликолипиды).

Изучение жирнокислотного состава мембранных липидов показало, что в побегах карельской березы *in vitro* в отсутствие БАП в питательной среде присутствовало семь жирных кислот с числом углеродных атомов от 16 до 20 как насыщенных, так и ненасыщенных, но относительное содержание каждой из них было различным. Например, в контроле как в фосфо-, так и в гликолипидах доминирующей среди насыщенных жирных кислот была пальмитиновая $C_{16:0}$ (32.6 и 39.0 % от суммы жирных кислот соответственно), а среди ненасыщенных — олеиновая $C_{18:1}$ (29.5 и 20.6 % от суммы жирных кислот соответственно) (табл. 1).

Анализ состава жирных кислот в отдельных фракциях липидов показал следующее. В присутствии БАП независимо от его концентрации содержание пальмитиновой кислоты ($C_{16:0}$) в фосфолипидах увеличилось в среднем в 1.4 раза ($P < 0.05$), а в гликолипидах, наоборот, зафиксирована тенденция к ее уменьшению (табл. 1). При этом именно доля пальмитиновой кислоты определяла как повышение общего уровня насыщенных жирных кислот в фосфолипидах, так и его снижение в гликолипидах под влиянием БАП (рис. 1). Содержание олеиновой кислоты в обеих фракциях уменьшалось с увеличением концентрации БАП в питательной среде (табл. 1). Отличительной особенностью гликолипидов при добавлении БАП явилось повышение доли линоленовой кислоты ($C_{18:3}$) (до 28.8 % от суммы жирных кислот), но при добавлении

БАП в концентрации 2 мг/л отмечена тенденция снижения ее уровня, хотя по-прежнему он превышал контроль.

Из полученных данных также следует, что внесение БАП в питательную среду ощутимо влияло на соотношение групп жирных кислот. Так, если в контроле во фракции фосфолипидов содержание ненасыщенных жирных кислот преобладало над суммой насыщенных в 1.7 раза (рис. 1, а), то БАП вызывал увеличение доли насыщенных жирных кислот, что вело к снижению величины коэффициента ненасыщенности липидов (табл. 2). Более того, при самой низкой из изученных концентраций (0.25 мг/л) происходило почти полное выравнивание сумм ненасыщенных и насыщенных жирных кислот (рис. 1, а), а показатель U/S становился близким к единице (табл. 2). Внесение возрастающих концентраций БАП способствовало увеличению суммы ненасыщенных жирных кислот, которые хотя и преобладали над насыщенными во фракции фосфолипидов, однако их величина оказалась ниже уровня контроля.

Во фракции гликолипидов, наоборот, в контроле содержание насыщенных и ненасыщенных жирных кислот было примерно одинаковым (рис. 1, б). БАП в концентрациях 0.25 и 0.5 мг/л нарушал данное равновесие, а при их увеличении до 1.0 и 2.0 мг/л доля ненасыщенных жирных кислот повышалась ($P < 0.05$), сохраняясь на довольно высоком уровне даже при наибольшей из изученных концентраций. Для гликолипидов это привело соответственно и к увеличению коэффициента ненасыщенности липидов (табл. 2).

Таблица 2

Коэффициент ненасыщенности (U/S) и индекс двойной связи (ИДС) отдельных фракций липидов, содержащихся в побегах карельской березы *in vitro* в зависимости от концентрации БАП

Фракция липидов	Контроль		Концентрация БАП, мг/л							
			0.25		0.5		1.0		2.0	
	U/S	ИДС	U/S	ИДС	U/S	ИДС	U/S	ИДС	U/S	ИДС
ФС	1.7	1.1	1.0	0.8	1.3	1.0	1.0	0.9	1.4	1.1
ГЛ	1.0	1.0	1.3	1.2	1.3	1.2	1.4	1.3	1.4	1.2

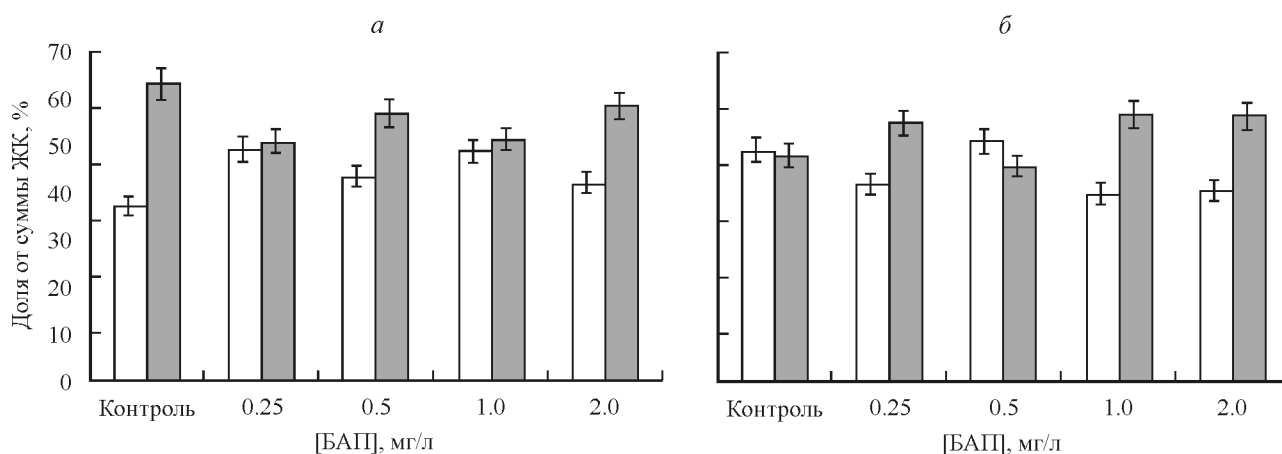


Рис. 1. Влияние БАП на содержание насыщенных (светлые столбцы) и ненасыщенных (темные столбцы) жирных кислот в фосфо- (а) и гликолипидах (б) побегов карельской березы *in vitro*.

ЖК — жирные кислоты.

Исследования показали, что внесение в питательную среду БАП влияло также и на соотношение моно-, ди- и триеновых жирных кислот. В контроле фракция фосфолипидов была представлена преимущественно моно- и диеновыми жирными кислотами, а гликолипидов — моно- и триеновыми (рис. 2). В присутствии БАП и с увеличением его концентрации в питательной среде во фракции фосфолипидов наблюдалось постепенное снижение доли моноеновых жирных кислот и небольшое, но достоверное увеличение доли ди- и триеновых жирных кислот (рис. 2, а). Во фракции гликолипидов при добавлении БАП отмечено увеличение триеновых в 1.4 раза и уменьшение моноеновых жирных кислот в среднем в 1.8 раза ($P < 0.05$) (рис. 2, б). Увеличение концентрации БАП до 2.0 мг/л, однако, вызывало снижение триеновых на фоне одновременного повышения моноеновых жирных кислот. Кроме того, во фракции гликолипидов с ростом концентрации БАП увеличилось соотношение линоленовой кислоты к линолевой ($C_{18:3}/C_{18:2}$) по сравнению с контролем (табл. 1). При использовании БАП в концентрации 2.0 мг/л зафиксировано снижение этого соотношения вследствие повышения доли линолевой кислоты, хотя суммарное содержание этих двух кислот оставалось в 1.4 раза выше по сравнению с контролем.

Обсуждение

Исследования проводили на начальном этапе формирования клеточных структур пазушных побегов из меристемы и ее производных в условиях *in vitro*. Изучение действия цитокинина на мембранные липиды в побегах карельской березы показало, что гормон оказывает значительное влияние на их жирнокислотный состав. Но характер влияния цитокинина существенным образом зависит от его концентрации в питательной среде и от фракции липидов (глико- или фосфолипиды). В частности, под влиянием гормона в фосфолипидах побегов снижалось содержание ненасыщенных жирных кислот, в гликолипидах, наоборот, повышалось. Во фракции фосфолипидов это происходило в основном за счет снижения моноеновых жирных кислот, тогда как в гликолипидах — за счет увеличения диеновых и особенно триеновых жирных кислот, представленных преимущественно линоленовой кислотой. Эти процессы сопровождались изменением величин коэффициента ненасыщенности и ИДС в сторону их снижения в фосфолипидах (за исключением ИДС при концентрации БАП 2 мг/л, где он сравнивался с контролем) и повышения — в гликолипидах.

Судя по данным из литературы, влияние цитокинина на жирнокислотный состав липидов растений до сих пор

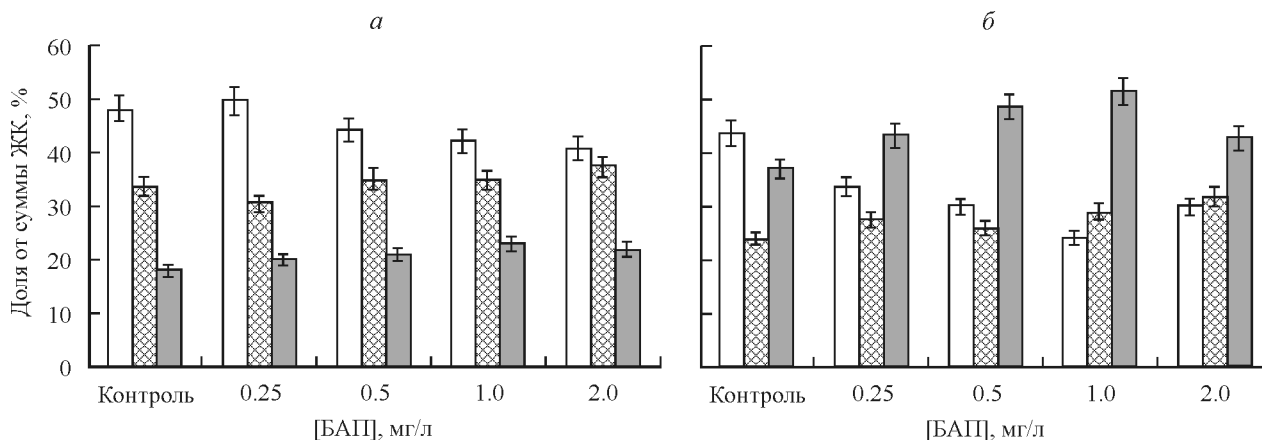


Рис. 2. Влияние БАП на содержание моно- (светлые столбцы), ди- (заштрихованные столбцы) и триеновых (темные столбцы) жирных кислот (ЖК) в фосфо- (а) и гликолипидах (б) побегов карельской березы *in vitro*.

изучено недостаточно, хотя именно липиды являются каркасообразующим элементом клеточных мембран и уже в силу этого оказывают существенное влияние на жизнедеятельность клеток, тканей и растения в целом, а в нашем случае — культуры побегов *in vitro*.

Ранее показано, что моноеновые жирные кислоты не только являются наиболее распространенными в составе фосфолипидов, но и служат посредниками в передаче сигналов, в том числе в процессах клеточной дифференцировки (Dobrzyn, Ntambi, 2005). Поэтому обнаруженное нами повышенное содержание моноеновых жирных кислот в фосфолипидах представляется вполне закономерным. Внесение возрастающих концентраций БАП не повлияло на суммарное содержание моно- и диеновых жирных кислот в фосфолипидах, но изменило их соотношение в сторону увеличения диеновых жирных кислот, что, по всей вероятности, обусловлено важной регуляторной ролью цитокининов в процессе регенерации побегов. Преобладание олеиновой кислоты во фракции гликолипидов в контрольном варианте вполне ожидаемо, поскольку она является основной мононенасыщенной жирной кислотой, синтезируемой и экспортируемой пластидами (Лось, 2014). Уменьшение ее содержания по мере увеличения концентрации гормона свидетельствует о повышении активности ацил-липидных мембранных десатураз $\omega 6$ и $\omega 3$, определяющих появление в углеводородной цепи жирных кислот второй и третьей двойных связей (Алаудинова, Миронов, 2009; Лось, 2014) и синтез соответственно ди- и триеновых (линолевой и линоленовой) жирных кислот.

Очевидно, такие структурные перестройки в тилакоидных мембранах хлоропластов могут играть существенную роль в регуляции световых реакций фотосинтеза. Это обусловлено тем, что линоленовая кислота, снижая вязкость липидного бислоя тилакоидной мембраны, способствует возрастанию скорости как электронно-транспортных процессов, протекающих с участием пластохинона, так и всей цепи электронного транспорта хлоропластов. Однако при сильном разрыхлении липидного бислоя возникает значительная утечка протонов, и хлоропласты могут терять способность синтезировать АТФ (Тихонов, 1999). Наши результаты показали, что увеличение концентрации БАП до 2.0 мг/л могло оказать влияние на синтез линоленовой кислоты и соответственно на изменение состояния липидного бислоя мембран. При этом, несмотря на небольшое уменьшение общей биомассы побегов при наибольшей из изученных концентраций БАП, отмечено торможение развития хлороза листьев в культуре *in vitro* (Ветчинникова и др., 2013). Вероятно, это происходило благодаря способности цитокинина стимулировать процессы образования новых тилакоидов гран и стромы хлоропластов (Hendrickson et al., 2006; Роньжина и др., 2009). Не исключено также, что под влиянием гормона усиливались аттрагирующая активность сформированных листьев (Парамонова и др., 2002) и общая способность клеток к синтетической деятельности.

Таким образом, устойчивое преобладание моноеновых и диеновых жирных кислот в фосфолипидах стабилизирует текучесть мембран на физиологически необходимом уровне и, как мы полагаем, способствует активизации морфогенеза при клонировании побегов. Изменения, выявленные в составе гликолипидов, играющих важную роль в процессе фотосинтеза, можно рассматривать как один из механизмов стимулирующего влияния цитокинина (до определенной его concentra-

ции) на структуру и функцию хлоропластов, которые вследствие фотомиксотрофности культуры побегов выступают основным фактором, определяющим не только их фотосинтетическую активность, но и пролиферацию клеток, и направленность морфогенеза *in vitro*.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Аналитическая лаборатория» Института леса Карельского научного центра РАН.

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на выполнение государственного задания Министерства образования и науки РФ (темы 0220-2014-0009 и 0201-2014-0032), а также при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований президиума РАН (проект 0220-2015-0014).

Список литературы

- Алаудинова Е. В., Миронов П. В. 2009. Липиды меристем лесообразующих хвойных пород Центральной Сибири в условиях низкотемпературной адаптации. 2. Особенности метаболизма жирных кислот фосфолипидов меристем *Larix sibirica* Ledeb., *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. Химия растительного сырья. 2 : 71—76. (Alaudinova E. V., Mironov P. V. 2009. Lipids of the meristems of the main coniferous edificators from Central Siberia under low-temperature adaptation. 2. Features of the fatty acid metabolism of phospholipids from winter meristems of *Larix sibirica* Ledeb., *Picea obovata* L. and *Pinus sylvestris* L. Chemistry of Plant Raw Material (Himija rastitel'nogo syr'ja). 2 : 71—76.)
- Ветчинникова Л. В., Титов А. Ф., Кузнецова Т. Ю. 2013. Карельская береза: биологические особенности, динамика ресурсов и воспроизводство. Петрозаводск: КарНЦ РАН. 312 с. (Vetchinnikova L., Titov A., Kuznetsova T. 2013. Karelian birch: biological characteristics, resource dynamics, and reproduction. Petrozavodsk. 312 p.)
- Данилова М. Н. 2015. Влияние мутаций по генам мембранных рецепторов цитокининов на экспрессию генов хлоропластных белков *Arabidopsis thaliana*: Автореф. канд. дис. М.: Ин-т физиол. раст. 23 с. (Danilova M. N. 2015. Effects of mutation in cytokinin membrane receptor genes on gene expression of chloroplast proteins in *Arabidopsis thaliana*. PhD Thesis. Moscow: Institute of Plant Physiol. 23 p.)
- Зайцев Д. Ю., Сельдимирова О. А., Галин И. Р., Круглова Н. Н. 2013. Иммунолокализация цитокининов в клетках корней, формирующихся в каллусах пшеницы зародышевого происхождения. Изв. Самар. науч. центра РАН. 15 (3/5): 1606—1609. (Zaitsev D. Yu., Seldimirova O. A., Galin I. R., Kruglova N. N. 2013. Immunolocalization of cytokinins in cells of roots, forming in calli of the immature embryo origin. Izvestiya of the Samara Scientific Centre RAS. 15 (3/5) : 1606—1609.)
- Концевая И. И., Шевцова Л. В. 2012. Действие цитокининов и антибиотика цефотаксима на процесс регенерации листовых эксплантов *Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merckl. Вестн. БГУ. 2 (2) : 30—34. (Kontsevaya I. I., Shevtsova L. V. 2012. The effect of cytokinins and the antibiotic cefotaxime on the regeneration of leaf explants of *Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merckl. Vestnik BSU. 2 (2) : 30—34.)
- Кузнецова Т. Ю., Ветчинникова Л. В., Титов А. Ф., Ильинова М. К. 2008. Влияние кадмия на состав жирных кислот липидов в побегах карельской березы *in vitro*. Физиол. раст. 55 (5) : 731—737. (Kuznetsova T. Yu., Vetchinnikova L. V., Titov A. F., Il'ina M. K. 2008. Effect of cadmium on fatty acid composition of lipids in the shoots of Karelian birch cultured *in vitro*. Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastenii). 55 (5) : 657—662.)

- Кулаева О. Н., Кузнецов В. В. 2004. Аналитический обзор: новейшие достижения и перспективы изучения механизма действия фитогормонов и их участия в сигнальных системах целого растения. Вестн. РФФИ. 2 : 25 с. (Kulaeva O. N., Kuznetsov V. V. 2004. Analytical essay: latest achievements and prospects in the study of the action mechanism of phytohormones and their involvement in whole plant signaling systems. RFBR Inform. Bull. 2 : 25 p.)
- Лось Д. А. 2014. Десатуразы жирных кислот. М.: Научный мир. 372 с. (Los Dm. A. 2014. Fatty acid desaturases. Moscow: Scientific World. 372 p.)
- Макаренко С. П., Шмаков В. Н., Коненкина Т. А., Дударева Л. В., Константинов Ю. М. 2014. Жирнокислотный состав липидов каллусов двух видов лиственницы (*Larix gmelinii* и *Larix sibirica*). Химия растительного сырья. 2 : 121—127. (Makarenko S. P., Shmakov V. N., Konenkina T. A., Dudareva L. V., Konstantinov Yu. M. 2014. Fatty acids composition of lipids in the calluses of two *Larix* species (*Larix gmelinii* and *Larix sibirica*). Chemistry of Plant Raw Material. (Himija rastitel'nogo syr'ja). 2 : 121—127.)
- Парамонова Н. В., Красавина М. С., Соколова С. В. 2002. Ультраструктура хлоропластов клеток-спутников и мезофилла в связи с аттрагирующим действием цитокининов. Физиол. раст. 49 (2) : 212—220. (Paramonova N. V., Krasavina M. S., Sokolova S. V. 2002. The ultrastructure of companion cell and mesophyll chloroplasts as related to attraction by cytokinins. Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastanii). 49 (2) : 212—220.)
- Романов Г. А. 2009. Как цитокинины действуют на клетку. Физиол. раст. 56 (2) : 295—319. (Romanov G. A. 2009. How do cytokinins affect the cell? Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastanii). 56 (2) : 268—290.)
- Романов Г. А. 2011. Открытие рецепторов и биосинтеза цитокининов: как это было. Физиол. раст. 58 (4) : 631—635. (Romanov G. S. 2011. The discovery of cytokinin receptors and biosynthesis of cytokinins: a true story. Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastanii). 58 (4) : 743—747.)
- Романова И. М., Живет'ев М. А., Дударева Л. В., Граскова И. А. 2016. Динамика жирнокислотного состава и активности ацил-липидных десатураз в хвое *Pinus sylvestris* L., произрастающей в Иркутской области. Химия растительного сырья. 2 : 61—66. (Romanova I. M., Zhivet'ev M. A., Dudareva L. V., Graskova I. A. 2016. Variation of fatty acid composition and activity of acyl-lipid desaturases of *Pinus sylvestris* L. needles, growing in the Irkutsk region. Chemistry of Plant Raw Material. (Himija rastitel'nogo syr'ja). 2 : 61—66.)
- Роньжина Е. С., Гамалей Ю. В., Воронин П. Ю., Киселева И. С., Чиков В. И., Гончарова Э. А., Мухин В. А., Борзенкова Р. А., Некрасова Г. Ф., Иванова Л. А. 2009. Фотосинтез: физиология, онтогенез, экология. Калининград: Изд-во ФГОУ ВПО «КГТУ». 372 с. (Ron'zhina E. S., Gamalei Yu. V., Voronin P. Yu., Kiseleva I. S., Chikov V. I., Goncharova E. A., Mukhin V. A., Borzenkova R. A., Nekrasova G. F., Ivanova L. A. 2009. Photosynthesis: physiology, ontogeny, ecology. Kaliningrad: Kaliningrad State Technical Univ. Publ. 372 p.)
- Сиймер Э. Х., Таутс О. В., Мейстер Л. Э. 1971. Рассчитанные значения ЭДЦ cis-полиеновых метилен-разделенных жирных кислот. В кн.: Труды Таллин. политех. ин-та. А (300) : 73—78. (Seimer E. Kh., Tauts O. V., Meister K. E. 1971. Calculated EDC values of cis-polyene methylene-separated fatty acids. In: Trudi Tallinn Polytechnic. Inst. A (300) : 73—78.)
- Тихонов А. Н. 1999. Защитные механизмы фотосинтеза. Сорос. образоват. журн. 11 : 16—21. (Tikhonov A. N. 1999. Protective mechanism of photosynthetic apparatus. Soros Educat. J. 11 : 16—21.)
- Choi J., Hwang I. 2007. Cytokinin: perception, signal transduction, and role in plant growth and development. J. Plant Biol. 50 : 98—108.
- Carimi F., Zottini M., Formentin E., Terzi M., Lo Schiavo F. 2003. Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. Planta. 216 : 413—421.
- Dobryzn A., Ntambi J. M. 2005. The role of stearoyl-CoA desaturase in the control of metabolism. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 73 : 35—41.
- Eldoma A. M. A., Muniandi S. K., Shukor N. A. Ab. 2015. Stimulation of multiple leader formation in some genotypes of *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* with 6-benzylaminopurine (BAP). Open J. Forestry. 5 : 637—650.
- Folch J., Lees M., Stanley G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226 : 497—509.
- Haberer G., Kieber J. 2002. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. Plant Physiol. 128 : 354—362.
- Hendrickson L., Vlčková A., Selstam E., Huner N., Öquist G., Hurry V. 2006. Cold acclimation of the Arabidopsis *dgdl* mutant results in recovery from photosystem I-limited photosynthesis. FEBS Lett. 580 : 4959—4968.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyoizuka J. 2007. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. Nature. 445 : 652—655.
- Lyons J. M., Wheaton T. A., Pratt H. K. 1964. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants. Plant Physiol. 39 : 262—268.
- Marsh J. B., Weinstein D. B. 1966. Simple charring method for determination of lipids. J. Lipid Res. 7 : 574—579.
- Mlejnek P. I., Procházková S. 2002. Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. Planta. 215 : 158—166.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant. 15 : 437—497.
- Nakamura Yu., Shimizu K., Ando Ya. 2014. Gas chromatographic equivalent chain length (ECL) values of fatty acid methyl esters on a highly polar ionic liquid column, SLB-IL111. Bull. Fish Sci. Hokkaido Univ. 64 : 9—16.
- O'Brien J. A., Benkova E. 2013. Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. Frontiers Plant Sci. 4 : 1—11.
- Piispanen R., Saranpää P. 2002. Neutral lipids and phospholipids in Scots pine (*Pinus sylvestris*) sapwood and heartwood. Tree Physiol. 22 : 661—666.
- Rathwell R., Shukla M. R., Jones A. M. P., Saxena P. K. 2016. In vitro propagation of cherry birch (*Betula lenta* L.). Can. J. Plant Sci. 96 : 571—578.
- Ryynänen L., Ryynänen M. 1986. Propagation of adult curly birch succeeds with tissue culture. Silva Fenn. 20 : 139—147.
- Staden J., Zazimalova E., George E. F. 2008. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonist. In: Plant Propagation by Tissue Culture. The Background. Netherlands: Springer. 1 : 205—226.
- Vlčková A., Špundová M., Kotabová E., Novotný R., Doležal K., Nauš J. 2006. Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. Physiol. Plantarum. 126 : 257—267.
- Werner T., Schmülling T. 2009. Cytokinin action in plant development. Curr. Opin. Plant Biol. 12 : 527—538.

THE EFFECT OF BENZYLAMINOPURINE ON THE FATTY ACID COMPOSITION
OF MEMBRANE LIPIDS IN CURLY BIRCH SHOOTS *IN VITRO*L. V. Vetchinnikova,^{1,*} A. F. Titov,² T. Yu. Kuznetsova¹

¹ Forest Research Institute, Karelian Research Centre RAS, Petrozavodsk, 185910,
and ² Institute of Biology, Karelian Research Centre RAS, Petrozavodsk, 185910;
* e-mail: vetchin@krc.karelia.ru

The effect of cytokinin (synthetic 6-benzylaminopurine or BAP) on the fatty acid composition of membrane lipids was studied in curly (Karelian) birch *Betula pendular* var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti shoots *in vitro*. The addition of BAP (0.25, 0.5, 1.0, or 2 mg/l concentrations) to the culture medium was found to increase the amount of saturated fatty acids in phospholipids whereas unsaturated fatty acids prevailed in the control. In glycolipids, on the contrary, BAP intensified the synthesis of unsaturated fatty acids (mainly, linolenic acid), but the degree of this effect depended on the concentration of the hormone. In the variant with the highest concentration of BAP (2.0 mg/l), for instance, the proportion of linolenic acid decreased. It was hypothesized that the observed modifications in the glycolipid composition are one of the indices of the stimulating effect of cytokinin (up to a certain concentration threshold) on the structure and function of chloroplasts which, due to the photoheterotrophy of shoots culture, is an important factor that determines not only their photosynthetic activity but also cell proliferation and direction of *in vitro* organogenesis.

Key words: *Betula pendular* var. *carelica*, 6-benzylaminopurine, glycolipids, phospholipids, fatty acids.
