

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОСТАВА СТЕРИНОВ ЭМБРИОГЕННЫХ И НЕЭМБРИОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ *LARIX SIBIRICA* LEDEB¹

© 2023 г. Н. В. Семёнова^a, *, В. Н. Шмаков^a, Ю. М. Константинов^a, Л. В. Дударева^a

^a Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

*e-mail: tashasemyonova@mail.ru

Поступила в редакцию 09.09.2022 г.

После доработки 09.09.2022 г.

Принята к публикации 09.09.2022 г.

С помощью метода газовой хромато-масс-спектрометрии проведен сравнительный анализ качественного и количественного составов стериновых компонентов в тканях клеточных линий лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) с разным эмбрионным потенциалом. Обнаружены существенные межлинейные различия в качественном и количественном содержании фракций свободных стеринов и эфиров стеринов. Наряду со стериновыми компонентами обнаружен сквален – тритерпен, являющийся промежуточным соединением в биосинтезе стеринов. Доминирующими свободными стеринами эмбрионных клеточных линий были β -ситостерин, кампестерин, изофукостерин и стигмастерин, а неэмбрионных линий – β -ситостерин, кампестерин и стигмастерин. При этом содержание кампестерина в эмбрионных линиях было в 1.3–1.9 раза выше, чем в неэмбрионных. Поскольку кампестерин является предшественником brassinosteroidов, логично предположить, что его высокое содержание обусловлено эмбрионным состоянием клеточных линий. Изофукостерин в заметных количествах найден только в эмбрионных линиях. Во фракции эфиров стеринов неэмбрионных линий обнаружено большее разнообразие компонентов по сравнению с эмбрионными линиями. Во всех клеточных линиях среди идентифицированных стериновых эфиров преобладали соединения без двойных связей, несущие в качестве структурного фрагмента стерановое ядро (кор) – циклопентанопергидрофенантрен: их содержание варьировало от 52 до 71% от суммы эфиров стеринов. Обнаруженные различия в составе стеринов и эфиров стеринов у клеточных линий *L. sibirica* с разным эмбрионным потенциалом свидетельствуют о значительных перестройках в метаболизме стеринов в ходе эмбриогенеза, которые, могут быть связаны с их участием в этом процессе на стадии формирования зародышей.

Ключевые слова: *Larix sibirica*, клеточные линии, соматический эмбриогенез, стерины, эфиры стеринов

DOI: 10.31857/S0015330322600516, **EDN:** GKWEZO

ВВЕДЕНИЕ

Соматический эмбриогенез является одним из перспективных направлений в биотехнологии микрорепродукции растений в культуре *in vitro*. При таком способе размножения становится возможным массовое воспроизводство растительного материала идентичного материнскому генотипу [1]. Из-за недостатка сведений о молекулярных механизмах индукции соматического эмбриогенеза, особенно для древесных видов, в частности, хвойных, получение и развитие соматических за-

родышей до настоящего времени остается трудноосуществимой задачей [2]. Изучение последовательности событий индукции соматического эмбриогенеза и этапов его последующего развития имеет достаточно длительную историю [3], однако роль липидных компонентов в этих процессах в культуре *in vitro* хвойных видов все еще остается малоизученной. На сегодняшний день этой проблеме посвящены единичные исследования [4–7]. Например, установлено, что качественный и количественный составы некоторых липидов у эмбрионных и неэмбрионных клеточных линий *Larix sibirica* существенно различаются. Так, для эмбрионных линий характерно повышенное содержание олеиновой кислоты [5], глицеридов [6], фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилинозитов [7], по сравнению с неэмбрионными. Однако полной

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330322600516 для авторизованных пользователей.

Сокращения: БС – brassinosteroidы; ГХ-МС – метод газовой хромато-масс-спектрометрии; ЭСМ – эмбрионально-сuspензорная масса.

ясности в вопросах липидного обмена в культуре растительных тканей *in vitro*, в том числе, сведений об участии в процессах эмбриогенеза отдельных групп липидов, в частности, эфиров стерина, а также свободных стерина пока нет.

В настоящее время известно более 200 видов растительных стерина [8]. В растениях они присутствуют как в свободном состоянии (свободные стерин), так и в виде производных, представляющих собой эфиры жирных кислот или гликозиды (стерилгликозиды и ацилстерилгликозиды) [8]. Стерин и их производные задействованы во многих клеточных процессах. Например, стерин играют важную роль в регуляции текучести мембраны и ее проницаемости [9]. Для плазматической мембраны характерны высокая вариабельность стеринового состава, а также различия в соотношении стерин/мембранные липиды, в зависимости от вида растения, стадии его развития, органа и ткани [10]. Функции отдельных стерина в составе мембран также различны. Известно, что β -ситостерин и кампестерин являются наиболее эффективными соединениями для ограничения подвижности фосфолипидных жирных ацильных цепей, по сравнению со стигмастерином. Кроме того, β -ситостерин и кампестерин, в отличие от стигмастерина, снижают проницаемость мембран [8, 11]. Стигмастерин, являющийся “стрессовым” стерин, как предполагается, влияет на распределение других мембранных липидов, метаболические процессы в мембранах, а также на сигнальные пути, изменяющие экспрессию “стрессовых” генов [12]. Поддержание определенного состава стерина в клеточных мембранах необходимо для оптимальной активности ферментов, транспорта ионов и метаболитов через каналы, белок-белковых и белок-липидных взаимодействий, а также трансдукции сигналов [8, 13]. Важно отметить, что стерин являются предшественниками брассиностероидов (БС) — гормонов, регулирующих рост и развитие растений [9, 14]. Известно, что БС принимают активное участие в элонгации клеток растений и морфогенезе органов, клеточном делении, модуляции гормональных ответов, а также в ответной реакции клеток на стрессовые воздействия [15, 16]. Кроме того, БС регулируют множество физиологических реакций, необходимых как для вегетативной, так и для репродуктивной стадий развития растений [15, 17, 18].

Растительные стерин играют важную роль в ходе эмбриональной и постэмбриональной стадий развития, а также во время цветения [19, 20]. Это касается как целых растений, так и культуры растительных тканей. В ряде работ были обнаружены изменения состава и содержания стерина в процессе соматического эмбриогенеза растений *in vitro*. Так, установлено, что содержание стерина в культуре льна посевного (*Linum usitatissimum* L.)

различалось в зависимости от степени дифференциации клеток [21]. Индукция соматического эмбриогенеза и органогенеза побегов льна была связана с увеличением общего количества стерина в компетентных к эмбриогенезу каллусах и повышенным соотношением стигмастерина к β -ситостерину в эмбрионах и побегах. Напротив, в неорганогенных каллусах величина соотношения стигмастерин/ β -ситостерин снижалась во время фазы экспоненциального роста из-за значительного увеличения содержания β -ситостерина. В работе [22] показано, что результатом дифференциации клеток *Brassica napus* L. в культуре *in vitro* было изменение состава свободных стерина в регенерирующих каллусах, при этом содержание стигмастерина увеличивалось, а кампестерина уменьшалось.

Таким образом, анализ литературы свидетельствует о важной роли стерина в жизнедеятельности растений и их адаптации к условиям внешней среды. Стерин являются структурными компонентами клеточных мембран, принимают активное участие в регуляции процессов онтогенеза и стрессоустойчивости растений. Многообразие стеринового состава позволяет растениям на клеточном уровне адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Очевидно, что в значительной мере аналогичные клеточные механизмы реализуются и в случае адаптации растительных клеток *in vitro*. При этом необходимо принимать во внимание, что стресс может быть одним из индукторов процесса эмбриогенеза. Следовательно, наряду с фитогормонами, фенольными и другими соединениями, стерин играют важную роль в процессах роста и развития растительных клеток как *in vivo*, так и *in vitro*. Поэтому изучение особенностей состава стерина и их эфиров, как возможных маркеров процесса развития в клеточных линиях с разным эмбриогенным потенциалом *in vitro*, позволит прояснить роль этих соединений в процессе эмбриогенеза, что важно как для фундаментальных, так и для прикладных исследований.

Цель работы — провести сравнительный анализ качественного и количественного составов свободных стерина и их эфиров в эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линиях листовницы сибирской на ранней стадии развития.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В качестве растительного материала использовали эмбриогенные и неэмбриогенные клеточные линии листовницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), полученные И.Н. Третьяковой с соавт. [1, 2] в Институте леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (г. Красноярск). Клеточные линии *L. sibirica* поддерживали в течение 6 лет на агаризованной питательной среде АИ, разработанной И.Н. Третьяковой [2]. В качестве

регуляторов роста использовали 2,4-Д (2 мг/л) и БАП (0.5 мг/л). Для анализа качественного и количественного составов стеринов каллусов лиственницы сибирской использовали эмбриогенные долгоживущие клеточные линии Кл2, Кл4, Кл6, Кл10 на стадии пролиферации эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) и неэмбриогенные клеточные линии Кл23 и Кл31. Клеточные линии имели видимые внешние различия: эмбриогенные — кремового цвета, рыхлые, со сформированными незрелыми соматическими зародышами; неэмбриогенные — кремового цвета, плотные, глобулярные, без зародышей. Каждая эмбриогенная клеточная линия представляла собой ЭСМ, состоящую из глобулярных зародышей (эмбрионов) и суспензоров. В ЭСМ образуются полиэмбриональные комплексы, состоящие из нескольких эмбрионов, других клеток в ней не наблюдается [2]. Для эмбриогенных клеточных линий число зародышей составляло от 2 (Кл2, Кл6) до 11 (Кл10) тыс. шт./г сырой массы ЭСМ [1, 2]. Эмбриогенные клеточные линии *L. sibirica* со сформированными незрелыми соматическими зародышами в дальнейшем могут формировать растения-регенеранты, при этом линия Кл4 была наиболее перспективной в этом отношении, в то время как неэмбриогенные клеточные линии не формируют соматические зародыши и, соответственно, не обладают способностью к регенерации [1, 2].

Оводненность тканей клеточных линий составляла 95–97%. Пересадку на свежую питательную среду проводили каждые 28 дней. Материал для исследования во всех случаях брали на 28 сутки выращивания каллусных культур (фаза роста — стадии замедления роста).

Выделение липидной фракции. Для выделения липидной фракции навеску растительного материала (0.5 г) фиксировали в жидком азоте и растирали в ступке до получения гомогенной массы. Затем добавляли 10 мл смеси хлороформ : метанол (2 : 1 v/v), используя хлороформ, стабилизированный 0.005% массовой долей амилена, а также ионол в качестве антиоксиданта (из расчета 1.25 мг на 100 мл указанной смеси растворителей). Полученную суспензию тщательно перемешивали и оставляли на 30 мин для извлечения липидов растворителем. Полученный раствор отделяли от осадка фильтрованием. Ступку и фильтр с остатками растительного материала трижды промывали используемой смесью растворителей и объединяли с основным объемом раствора. В делительную воронку с объединенным раствором добавляли воду и оставляли до расслаивания водной и органической фаз. После органическую (нижнюю, хлороформную) фазу, содержащую сумму липидных компонентов, отделяли от водной фазы. Хлороформ из полученного липидного экстракта удаляли при пониженном давлении с помощью ротационного испарителя RVO-64 (Микротехна, Чехия).

Выделение стериновых компонентов. Обнаружение и выделение стериновых компонентов (свободных стеринов и стериновых эфиров) осуществляли с помощью метода ТСХ. Для этого полученную фракцию, содержащую сумму липидов, повторно растворяли в 200 мкл хлороформа и наносили тонкой полосой на высокоэффективную пластинку Sorbfil ПТСХ-АФ-В (Россия) (сорбент силикагель СТХ-1ВЭ, зернение 8–12 мкм, толщина слоя 80–100 мкм). Операцию нанесения пробы повторяли дважды. Пластину помещали в хроматографическую камеру и осуществляли хроматографирование элюентом следующего состава: гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота (80 : 20 : 1 v/v/v). По окончании хроматографирования (когда элюент доходил до края пластины), пластину вынимали из камеры и высушивали. Для обнаружения стериновых компонентов край пластины (0.5 см) обрабатывали 10% раствором серной кислоты в этаноле, а затем нагревали на электроплитке до 110°C. Зоны обнаружения стериновых компонентов проявлялись на пластинке розово-голубыми пятнами. Рассчитанные значения R_f для свободных стеринов ($R_f = 0.19$) и стериновых эфиров ($R_f = 0.87–0.92$) совпадали со значениями R_f для стандартных образцов (холестерин, стигмастерин, кампестерин (Sigma, США)), β -ситостерин (European pharmacopoeia reference standard, Франция) и табличными значениями. После хроматографирования с высушенной необработанной пластины шпателем удаляли сорбент в зонах обнаружения стериновых компонентов. Сорбент с хроматографической пластины количественно переносили в центрифужные пробирки (10 мл) и добавляли в них по 1.5 мл хлороформа. Извлечение стериновых компонентов с адсорбента в среду хлороформа осуществляли с помощью облучения ультразвуком (частота 35 кГц, мощность 80 Вт, продолжительность 15 мин), используя ультразвуковую ванну (Bandelin Sonorex, Германия). Суспензию адсорбента в хлороформе центрифугировали (5 мин) при 3000 об/мин. После центрифугирования надосадочный раствор переносили в стеклянные флаконы (2 мл). Из полученных растворов упаривали (досуша) хлороформ в инертной атмосфере (в токе азота) во избежание окисления выделяемых субстанций. Для полноты выделения стериновых компонентов к сорбенту, оставшемуся в пробирке, добавляли 1.5 мл этилацетата и повторяли экстракцию с использованием ультразвукового воздействия дважды. К полученным свободным стеринам и их эфирам в качестве внутреннего стандарта добавляли эргостерин (20 мкг) (Sigma, США) — компонент, не встречающийся в объектах исследования. Для получения необходимых для анализа методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) летучих производных свободные стерины и эфиры стеринов подвергали модификации — силилированию путем обработки N,O-бис-(триметилси-

лил)трифторацетамидом с триметилхлорсиланом (200 мкл) (Fluka, США). Силилирование проводили в сушильном шкафу (Binder, Германия) в течение 30 мин при 70°C. Полученные триметилсил-производные анализировали с помощью метода ГХ-МС.

ГХ-МС анализ. Анализ проводили с помощью хромато-масс-спектрометра Agilent G7000B Triple Quad (Agilent Technologies Inc., США), состоящего из газового хроматографа 7890A (колонка HP-5MS, 30 м × 250 мкм × 0.25 мкм со стационарной фазой метилполисилаксан) и масс-селективного детектора Agilent 7000 (QQQ) с трехквadrupольным масс-анализатором (в режиме квадруполь). Температурная программа хроматографирования: при 70°C (1 мин), изотерма; далее программируемый нагрев до 280°C со скоростью 5°C/мин; при 280°C (5 мин), изотерма; далее программируемый нагрев до 300°C со скоростью 20°C/мин; при 300°C (3 мин), изотерма. Инжектор с делением потока 5 : 1. Температура инжектора 250°C, температура детектора 150°C, температура интерфейса 280°C. Газ-носитель — гелий, скорость потока 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 1 мкл. Хроматограмма образцов — по полному ионному току (SCAN). Условия масс-спектрометрического детектирования: энергия ионизирующих электронов 70 эВ; регистрация масс-спектров положительных ионов в диапазоне (m/z) от 50 до 600 а.е.м. со скоростью 1.9 скан/сек. Программное обеспечение — MassHunter GC/MS Acquisition B.05.00.412 и Mass Hunter Workstation Software Qualitative Analysis Version B.03.01 Build 3.1.346.14 Service Pack 3 (Agilent Technologies Inc., США).

Детектирование и количественный анализ. Идентификация компонентного состава (качественный анализ) проведена в соответствии с базой данных полных масс-спектров (NIST-08 и Wiley-7), с учетом фрагментных диагностических пиков, присутствующих в масс-спектрах и характеризующих структурные особенности исследуемых соединений, а также в соответствии со значениями хроматографического времени удерживания (Retention Time, RT) стандартных образцов. В качестве стандартных образцов использовали холестерин, стигмастерин, кампестерин (Sigma, США) и β-ситостерин (European pharmacopoeia reference standard, Франция). Относительное содержание (%) компонентов смеси (количественный анализ) вычислено из соотношения площадей хроматографических пиков (методом простого нормирования). Количественный анализ исследуемых компонентов проводили методом внешней калибровки с учетом отклика внутреннего стандарта по формуле:

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

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

Статистическая обработка. В таблицах представлены средние данные из четырех-шести биологических повторностей и их стандартные отклонения. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием пакета статистического анализа в среде Microsoft Office Excel 2010. Нормальность распределения полученных значений определяли по критерию Шапиро-Уилка. Статистическую значимость различий сравниваемых средних значений оценивали с помощью t -критерия ($P < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты ГХ-МС анализа компонентного состава свободных стерина в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской приведены в табл. 1 и 2, а эфиров стерина — в табл. 3, 4 и 5. Подробный компонентный состав фракций стерина и их эфиров представлен в табл. 1 и 2 (Дополнительные материалы). Следует отметить, что свободные стерина клеточных линий отличались большим разнообразием компонентов и насчитывали от 11 (Кл2) до 21 (Кл4, Кл10) различных соединений, по сравнению с эфирами стерина, которых было обнаружено 10 соединений у эмбрионных клеточных линий и 16 — у неэмбрионных.

Как известно, свободные стерина по химической структуре относятся к изопреноидам с циклопентанопергидрофенантеном в качестве остова [8]. Методом ГХ-МС в клеточных линиях *L. sibirica* среди свободных стерина были обнаружены соединения как без двойных связей в структуре циклопентанопергидрофенантена, в их числе циклоартенол, так и с двойными связями: в положении Δ8, Δ4, Δ12 и две большие группы свободных стерина с двойными связями в положении Δ7 и Δ5 (табл. 1). Среди Δ7-стерина обнаружен холестер-7-ан-3β-ол, являющийся предшественником холестерина и авенастерина — предшественник 24-этилстерина. Основной вклад в общее количество свободных стерина внесли Δ5-стерина (холест-5-ен-3-он, холестер-5-ен-24-он, прегн-5-ен-20-он, γ-ситостерин, изофукостерин, холестерин, кампестерин, стигмастерин, β-ситостерин), их относительное содержание варьировало от 90.7% (Кл31) до 98.6% (Кл6) от суммы свободных стерина (табл. 1; Дополнительные материалы, табл. 1). Хроматографическое время удерживания (RT) и характеристические ионы (m/z), наблюдаемые в масс-спектрах идентифицированных стерина компонентов, представлены в табл. 6.

Таблица 1. Содержание компонентов фракции свободных стерин в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской (% по весу)

Соединения	Кл2 (э)	Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)
Стерины						
Без двойной связи	1.9 ± 0.1	2.8 ± 0.2	0.3 ± 0.0	6.0 ± 0.5	3.3 ± 0.3	6.0 ± 0.5
С разными двойными связями	1.8 ± 0.2	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.03 ± 0.00	1.2 ± 0.1
ΣΔ7-стеринов	3.1 ± 0.4	1.6 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.1	2.3 ± 0.3	2.1 ± 0.1
ΣΔ5-стеринов	93.2 ± 1.0	95.3 ± 1.0	98.6 ± 1.1	92.5 ± 0.4	94.4 ± 0.9	90.7 ± 1.1
Δ5-стерины						
Изофукостерин	12.9 ± 1.2	15.3 ± 0.1	18.0 ± 1.3	17.7 ± 0.3	—	2.6 ± 0.1
Холестерин	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.8 ± 0.2	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Кампестерин	9.2 ± 0.9	15.5 ± 0.7	19.8 ± 0.6	12.5 ± 0.3	10.2 ± 1.2	4.6 ± 0.6
Стигмастерин	1.0 ± 0.1	6.3 ± 0.3	4.1 ± 0.2	23.2 ± 1.4	3.9 ± 0.4	2.9 ± 0.2
β-ситостерин	65.6 ± 4.9	54.3 ± 0.9	54.2 ± 2.0	38.4 ± 1.1	75.9 ± 1.2	75.6 ± 2.0

Примечание. (э) — эмбрионные клеточные линии; (нэ) — неэмбрионные клеточные линии. В таблице приведены средние значения из 4–5 биологических повторностей и их стандартные отклонения, различия значимы при $P < 0.05$.

Таблица 2. Абсолютное содержание наиболее распространенных Δ5-стеринов в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской во фракции свободных стерин

Стерины, мкг/г сухого веса	Кл2 (э)	Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)
Холестерин	4.2 ± 0.3	6.7 ± 2.8	17.6 ± 1.5	4.4 ± 1.5	4.4 ± 0.7	4.2 ± 0.1
Кампестерин	191.8 ± 8.1	166.2 ± 7.7	199.2 ± 12.0	133.8 ± 1.3	104.3 ± 2.9	102.4 ± 0.9
Стигмастерин	21.8 ± 1.3	67.2 ± 8.0	41.7 ± 4.9	248.2 ± 3.8	40.0 ± 0.1	63.9 ± 1.3
β-ситостерин	1370.1 ± 49.3	582.5 ± 53.5	544.7 ± 32.3	410.0 ± 7.1	776.5 ± 96.5	1684.8 ± 23.7
Стигмастерин/Ситостерин	0.02 ± 0.00	0.12 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.61 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00
Ситостерин/Кампестерин	7.14 ± 0.05	3.50 ± 0.17	2.73 ± 0.10	3.06 ± 0.08	7.44 ± 1.17	16.45 ± 0.19

Примечание. (э) — эмбрионные клеточные линии; (нэ) — неэмбрионные клеточные линии. В таблице приведены средние значения из 4–5 биологических повторностей и их стандартные отклонения, различия значимы при $P < 0.05$.

Таблица 3. Содержание различных компонентов во фракции эфиров стерин в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской (% по весу)

Соединения	Кл2 (э)	Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)
Эфиры стерин						
Без двойной связи	54.4 ± 0.6	61.0 ± 3.9	52.8 ± 3.1	71.1 ± 3.3	61.9 ± 2.3	55.7 ± 0.1
С разными двойными связями	15.5 ± 0.1	4.6 ± 0.5	2.6 ± 0.3	3.1 ± 0.3	4.0 ± 0.3	4.0 ± 0.0
Δ5-стерины	17.6 ± 0.4	8.6 ± 0.6	10.4 ± 0.9	10.7 ± 1.0	15.6 ± 1.8	7.8 ± 0.2
Δ5-стерины						
Холестерин	3.1 ± 0.2	2.2 ± 0.3	3.6 ± 0.4	3.1 ± 0.4	1.9 ± 0.2	1.4 ± 0.1
Кампестерин	1.6 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.3	3.1 ± 0.4	1.4 ± 0.1	0.5 ± 0.0
Стигмастерин	4.7 ± 0.5	2.4 ± 0.3	1.8 ± 0.2	2.2 ± 0.3	1.0 ± 0.1	1.5 ± 0.1
β-ситостерин	8.3 ± 0.2	1.9 ± 0.2	2.8 ± 0.3	2.4 ± 0.2	2.1 ± 0.3	1.7 ± 0.2

Примечание. (э) — эмбрионные клеточные линии; (нэ) — неэмбрионные клеточные линии. В таблице приведены средние значения из 4–5 биологических повторностей и их стандартные отклонения, различия значимы при $P < 0.05$.

Таблица 4. Абсолютное содержание наиболее распространенных эфиров Δ^5 -стеринов в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях ливенницы сибирской, во фракции свободных стероидов

Эфиры стероидов, мкг/г сухого веса	Кл2 (э)	Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)
Холестерин	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	2.8 ± 0.1	1.4 ± 0.3	5.8 ± 0.0	3.2 ± 0.4
Кампестерин	0.6 ± 0.0	1.2 ± 0.2	1.8 ± 0.4	1.4 ± 0.4	4.3 ± 0.7	1.1 ± 0.1
Стигмастерин	1.8 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.0 ± 0.1	3.1 ± 0.8	3.3 ± 0.1
β -ситостерин	3.2 ± 0.1	1.1 ± 0.4	2.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1	6.5 ± 0.5	3.8 ± 0.4

Примечание. (э) — эмбрионные клеточные линии; (нэ) — неэмбрионные клеточные линии. В таблице приведены средние значения из 4–5 биологических повторностей и их стандартные отклонения, различия значимы при $P < 0.05$.

Таблица 5. Содержание соединений не циклической природы во фракции эфиров стероидов в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях ливенницы сибирской (% по весу)

Соединения	Кл2 (э)	Кл4 (э)	Кл6 (э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)	Кл31 (нэ)
Сквален	12.5 ± 0.1	25.8 ± 2.8	34.2 ± 3.3	15.1 ± 1.6	2.3 ± 0.3	2.9 ± 0.0
9,10-секохолеста-5,7,10(19)-триен-1,3,25-триол	—	—	—	—	16.2 ± 2.3	29.6 ± 0.1

Примечание. (э) — эмбрионные клеточные линии; (нэ) — неэмбрионные клеточные линии. В таблице приведены средние значения из 4–5 биологических повторностей и их стандартные отклонения, различия значимы при $P < 0.05$.

Таблица 6. Хроматографическое время удерживания (RT, мин) и характеристические ионы (m/z), наблюдаемые в масс-спектрах идентифицированных стероидных компонентов

Соединения	RT, мин	m/z
Циклоартенол	22.757	458, 75, 255, 458
Авенастерин	22.914	484, 343, 386, 344
Изофукостерин	22.103	484, 386, 296, 257
Холестерин	19.514	458, 329, 129, 368
Кампестерин	20.734	472, 129, 343, 382
Стигмастерин	21.057	484, 83, 55, 129
β -ситостерин	21.938	486, 129, 357, 396
Этилизо-аллохолат	10.549	436, 55, 57, 81
7,8-эпоксиланостан-11-ол, 3-ацетокси	18.755	502, 57, 69, 95
Сквален	16.688	410, 69, 81, 95
9,10-секохолеста-5,7,10(19)-триен-1,3,25-триол	7.278	502, 55, 57, 71

Наибольший вклад в суммарное содержание свободных стероидов эмбрионных клеточных линий *L. sibirica* внесли (% от суммы свободных стероидов): β -ситостерин (38.4–65.6), кампестерин (9.2–19.8), изофукостерин (12.9–18.0) и стигмастерин (1.0–23.2) (табл. 2). Наибольший вклад в суммарное содержание свободных стероидов (% от суммы свободных стероидов) неэмбрионных линий внесли β -ситостерин (75.6–75.9), кампестерин (4.6–10.2) и стигмастерин (2.9–3.9). Изофукостерин в неэмбрионных линиях, в отличие от эмбрионных, либо не был обнаружен (Кл23), либо обнаружен в незначительных количествах (2.6% от суммы свободных стероидов для Кл31).

Доминирующим стероидом во всех клеточных линиях *L. sibirica* был β -ситостерин — его содержание варьировало от 410.0 (Кл10) до 1684.8 (Кл31) мкг/г сухого веса образца (табл. 2). Содержание β -ситостерина было достоверно выше в неэмбрионных клеточных линиях, по сравнению с эмбрионными. Абсолютное содержание кампестерина было достоверно более высоким в эмбрионных клеточных линиях — от 133.8 (Кл10) до 199.2 (Кл6) мкг/г сухого веса, чем в неэмбрионных, где этот показатель составлял 102.4 (Кл31) — 104.3 (Кл23) мкг/г сухого веса (табл. 2). Значимых отличий в распределении стигмастерина и холестерина между эмбрионными и неэмбрио-

генными клеточными линиями выявлено не было (табл. 2). Абсолютное содержание стигмастерина варьировало в пределах от 21.8 (Кл2) до 248.2 (Кл10) мкг/г сухого веса. Абсолютное содержание холестерина у всех линий было значительно ниже, чем стигмастерина и составляло от 4.2 (Кл31) до 17.6 (Кл6) мкг/г сухого веса. Следует отметить, что в эмбрионных клеточных линиях листовницы сибирской обнаружено довольно высокое относительное содержание изофукостерина (12.9% (Кл2) и 18.0% (Кл6) от суммы свободных стеринов), в то время как в неэмбрионных клеточных линиях этот стерин был обнаружен только в линии Кл31 в минорном количестве.

Во всех клеточных линиях *L. sibirica* во фракции эфиров стеринов в небольшом количестве были обнаружены эфиры холестерина, кампестерина, стигмастерина, β -ситостерина (табл. 3, 4). Наибольший вклад в суммарное содержание эфиров стеринов во всех клеточных линиях вносили соединения без двойной связи в структуре циклопентанопергидрофенантрена: от 52.8% (Кл6) до 71.1% (Кл10) от суммы эфиров стеринов (табл. 3). Кроме того, этот тип соединений включал в себя наибольшее разнообразие эфиров — 7 соединений (Дополнительные материалы, табл. 2). Среди эфиров стеринов всех клеточных линий, в отличие от свободных стеринов, не были обнаружены Δ^7 -стерины. Во фракции, содержащей эфиры стеринов, был идентифицирован сквален — углеводород тритерпенового ряда (табл. 5). Относительное содержание этого компонента (% от суммы эфиров стеринов) в эмбрионных линиях было значительно выше (12.5 (Кл2) — 34.2 (Кл6)), чем в неэмбрионных (2.3% (Кл23) — 2.9% (Кл31)).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что холестерин оказывает значительное влияние на мембранную проницаемость, в меньшей степени такое влияние оказывают кампестерин, β -ситостерин и стигмастерин [8]. У растений содержание холестерина, как правило, достаточно низкое. Так, у арабидопсиса содержание холестерина составляло 3.8% от суммы свободных стеринов [23], а в надземных частях хвоща пестрого (*Equisetum variegatum* Shleich. ex Web.) содержание холестерина снижалось к осенней вегетации с 1.2 до 0.6% от суммы свободных стеринов (с 4.9 до 2.7 мкг/г сухого веса) по сравнению с летней [24]. В растительных тканях *in vitro* холестерин может отсутствовать. Например, холестерин не был обнаружен в каллусных культурах *Euphorbia tirucalli* L. [25] и *Linum usitatissimum* L. [21], но содержался в малых количествах (1.2%) в суспензионной культуре *Nicotiana tabacum* L. [26]. В наших экспериментах абсолютное содержание холестерина во всех клеточных линиях *L. sibirica* было значительно ниже, чем стигмастерина и ва-

рьировало от 4.2 (Кл31) до 17.6 (Кл6) мкг/г сухого веса или от 0.2% (Кл2, Кл31) до 1.8% (Кл6) от суммы свободных стеринов. При этом анализ полученных результатов не выявил различий в содержании холестерина между эмбрионными и неэмбрионными линиями.

Как уже говорилось выше, доминирующим стеринном во всех клеточных линиях *L. sibirica* был β -ситостерин — его содержание варьировало от 410.0 (Кл10) до 1684.8 (Кл31) мкг/г сухого веса (табл. 2). Следует отметить, что содержание этого стерина было достоверно выше в неэмбрионных клеточных линиях, по сравнению с эмбрионными (табл. 2). Однако было и исключение: в эмбрионной линии Кл2 содержание β -ситостерина было более высоким (1370.1 мкг/г сухого веса), чем в других эмбрионных линиях и, таким образом, сравнимо с таковым у неэмбрионных линий. Известно, что β -ситостерин является важным участником процесса элонгации клеток [27], а также участвует в процессах их пролиферации [28] и дифференциации [29]. В растениях *in vivo* β -ситостерин также обычно является преобладающим стеринном, однако, его содержание может отличаться в тканях отдельных органов. Например, в цветках и плодах *Olea europaea* L. cv. Píscual, содержание этого стерина составляло 97 и 92% от суммы свободных стеринов, соответственно [30]. У *N. tabacum* L. var. Xanthi содержание β -ситостерина в корнях составляло 31%, а в листьях 18% от суммы свободных стеринов [31]. Для *Triticum aestivum* L. (сорт Казанская Юбилейная), также отмечено более высокое содержание этого стерина в корнях, чем в листьях — 60.5 и 55.6% от суммы свободных стеринов, соответственно [32]. Что касается растений *in vitro*, то β -ситостерин не всегда является преобладающим. Например, в суспензионной культуре сельдерея (*Apium graveolens* L.) отмечено более низкое относительное содержание этого стерина — 28.3% от суммы свободных стеринов, тогда как доминирующим стеринном был стигмастерин (44.2% от суммы свободных стеринов) [33]. Известно, что содержание стериннов в каллусной культуре растений зависит от исходного материала (типа экспланта) [34]. Например, в каллусах *Crataeva tapia* L., полученных из листьев, содержание β -ситостерина варьировало от 360 до 1230 мкг/г сухого веса, тогда как в каллусах, полученных из тканей стебля, оно было более высоким и составляло 420–3410 мкг/г сухого веса [34]. Показано также, что в эмбрионных и неэмбрионных каллусах льна (*L. usitatissimum* L.) абсолютное содержание β -ситостерина было около 800 и 700 мкг/г сухого веса (53.3 и 50.0% от суммы свободных стеринов), соответственно [21]. Этими же авторами установлена связь между накоплением β -ситостерина и ростом биомассы неэмбрионных каллусов. По-видимому, уровень β -ситостерина, необходимый для нормального

развития растения *in vivo* и *in vitro* является видоспецифическим признаком. При этом, как известно, важное физиологическое значение имеет баланс содержаний стигмастерина и β -ситостерина [8].

Стигмастерин считается “стрессовым” стеринном, поскольку его содержание в тканях возрастает при реакции растений на стрессирующие воздействия различной природы [8]. У высших растений содержание стигмастерина обычно ниже, чем β -ситостерина. Например, у арабидопсиса содержание стигмастерина составляло всего 4.2% от суммы свободных стериннов [23]. В работе [24] авторами показано, что в надземных частях хвоща пестрого стигмастерин обнаружен только в образцах осенней вегетации (4.3 мкг/г сухого веса) при относительно низкой температуре. Имеющиеся в литературе данные показывают, что для каллусов, полученных от разных видов растений, содержание этого стерина может существенно различаться. Например, в суспензионной культуре табака (*N. tabacum* L.) содержание стигмастерина составляло 7.1% [26], а в каллусах молочая (*E. tirucalli* L.) — от 5.9 до 34.3% от суммы свободных стериннов [25]. В нашем исследовании не было выявлено значимых отличий в распределении стигмастерина (и холестерина) между эмбрионными и неэмбрионными клеточными линиями лиственницы сибирской (табл. 2). Относительное и абсолютное содержание стигмастерина варьировало в пределах от 21.8 (Кл2) до 248.2 (Кл10) мкг/г сухого веса или от 1.0% (Кл2) до 23.2% (Кл10) от суммы свободных стериннов, за одним исключением. Среди эмбрионных линий, Кл10 отличалась значительно более высоким абсолютным и относительным содержанием этого стерина (248.2 мкг/г сухого веса и 23.2% соответственно), чем все остальные линии. Следует отметить, что на ранней стадии культивирования (1 год) Кл10 формировала самое высокое число зародышей, однако при более длительном культивировании эта линия характеризовалась низким относительным количеством нормальных соматических зародышей и более низким процентом их прорастания относительно других эмбрионных линий [35]. Учитывая, что низкое соотношение стигмастерин/ β -ситостерин характерно для линий с более высоким потенциалом выхода нормальных соматических зародышей и процентом их прорастания, можно предположить, что соотношение этих двух стериннов важно для регуляции нормального развития эмбрионных тканей в культуре лиственницы сибирской. Известно, что высокие значения соотношения стигмастерин/ β -ситостерин характерны для стрессового состояния растений [8]. Можно предположить, что увеличение на порядок этого параметра для Кл10, относительно других эмбрионных клеточных линий, связано со стрессовым состоянием тканей

этой линии, обусловленным особенностями ее развития.

В растениях предшественником β -ситостерина в биосинтезе стериннов является изофукостерин [13, 36]. Его содержание может быть достаточно высоким, наряду с другими распространенными стеринами, такими как β -ситостерин, кампестерин и стигмастерин [8]. Например, в каллусах *E. tirucalli* содержание изофукостерина составляло от 20.7 до 90.3% от суммы свободных стериннов [25]. В наших экспериментах относительное содержание изофукостерина в эмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской варьировало от 12.9% (Кл2) до 18.0% (Кл6) от суммы свободных стериннов. В неэмбрионных клеточных линиях изофукостерин был обнаружен только в линии Кл31, где его содержание было в 5–7 раз ниже, чем в эмбрионных линиях. Можно предположить, что в эмбрионных клеточных линиях конвертация изофукостерина в β -ситостерин (посредством работы SSR1 — Sterol Side-chain Reductase — редуктазы боковой цепи) менее интенсивна, чем у неэмбрионных. В биосинтезе стериннов SSR1 участвует не только в образовании β -ситостерина из изофукостерина, но также в образовании кампестерина из 24-метилхлестерина [14, 36]. Особенности работы этого фермента в эмбрионных и неэмбрионных линиях лиственницы сибирской могло бы объясняться не только более высоким содержанием β -ситостерина в неэмбрионных каллусах, но и более высоким содержанием кампестерина в эмбрионных линиях. В наших экспериментах относительное содержание кампестерина составляло около 19% от суммы свободных стериннов в эмбрионных линиях и 4.6% (Кл31) и 10.2% (Кл23) от суммы свободных стериннов в неэмбрионных (табл. 2). Что касается абсолютного содержания кампестерина, то в эмбрионных линиях оно было значительно (в линии Кл6 в два раза) выше (от 133.8 (Кл10) до 199.2 (Кл6) мкг/г сухого веса), чем в неэмбрионных, где этот показатель составлял 102.4 (Кл31) — 104.3 (Кл23) мкг/г сухого веса (табл. 2). Следует отметить, что линия Кл10, имеющая низкий выход нормальных зародышей, имела наиболее низкое содержание кампестерина среди эмбрионных линий.

Известно, что кампестерин является основным предшественником БС, которые у многих растений играют важную роль в их росте и развитии. БС вызывают широкий спектр морфологических и физиологических реакций и влияют на устойчивость растений к абиотическим и биотическим стрессовым факторам. Предполагается, что дефекты роста тканей могут быть связаны с отсутствием достаточного количества кампестерина в качестве предшественника БС [13]. Кампестерин стимулирует рост и развитие растительных тканей в условиях *in vivo* и в культуре *in vitro* и

участвует в регуляции морфогенетических процессов [9, 14]. Поэтому можно предположить, что установленное в наших экспериментах высокое абсолютное содержание кампестерина в эмбрионных линиях листовницы сибирской, значительно превышающее таковое у неэмбрионных линий, может свидетельствовать о важной роли этого стерина в процессах эмбриогенеза.

Полученные нами данные показывают, что биосинтез стеринов у эмбрионных и неэмбрионных линий листовницы сибирской имеет отличительные особенности в отношении баланса 24-этилстеринов (β -ситостерин) и 24-метилстерин (кампестерин).

Как уже говорилось выше, эфиры стерин неэмбрионных клеточных линий, в отличие от эмбрионных, характеризуются большим разнообразием. Во фракции эфиров стеринов всех клеточных линий листовницы сибирской были обнаружены эфиры холестерина, кампестерина, стигмастерина, β -ситостерина в сравнительно небольшом количестве (табл. 3). Абсолютное их содержание представлено в табл. 4. Помимо стерин и их эфиров в процессе анализа был идентифицирован сквален — углеводород тритерпенового ряда (табл. 5). Содержание этого компонента в эмбрионных линиях листовницы сибирской было значительно, в 4 и более раз выше, чем в неэмбрионных. Сквален является важным предшественником в процессе биосинтеза стеринов [8, 14]. Кроме того, благодаря неполярной природе и расположению в гидрофобном центре липидного бислоя, сквален увеличивает жесткость и размер клеточной мембраны, ее полярность и гидрофобные свойства, способствует восстановлению мембран, функциональной регуляции мембранных белков, транспорту ионов, обладая при этом антиоксидантными свойствами [37]. Можно предположить, что высокое содержание сквалена в эмбрионных клеточных линиях, обусловленное, вероятно, особенностями биосинтеза стеринов в тканях каллусов с разной эмбрионностью, способно положительно влиять на мембранную структуру клеток, защищая их от окисления и способствуя тем самым нормальному прохождению процесса эмбриогенеза.

В неэмбрионных линиях листовницы сибирской во фракции эфиров стеринов обнаружено соединение 9,10-секохолеста-5,7,10(19)-триен-1,3,25-триол (табл. 5), которое в своей структуре содержит только два циклогексановых кольца вместо четырех, характерных для стерин, и относится к классу терпеноидов [38]. Содержание этого соединения достаточно высокое — 16.2% (Кл23) и 29.6% (Кл31) от общего количества эфиров стерин. Исходя из структуры 9,10-секохолеста-5,7,10(19)-триен-1,3,25-триола, можно предположить, что это соединение является предшествен-

ником или побочным продуктом при биосинтезе стерин. В литературе имеются сведения об обнаружении этого соединения в семенах *Wrightia arborea* [39], экстрактах листьев *Terminalia catappa* [38] и др.

Анализ полученных результатов показывает, что содержание и качественный состав свободных стерин и их эфиров в культуре *in vitro* листовницы сибирской существенно различаются в клеточных линиях с разным эмбрионным потенциалом. Эмбрионные линии содержали значительно больше кампестерина — предшественника БС, для которого показана важная роль в морфогенезе [14], а неэмбрионные линии — β -ситостерина, высокое содержание которого многие авторы связывают с накоплением биомассы [21], но не с эмбриогенезом. Установлено, что клеточные линии листовницы сибирской, контрастные по способности к соматическому эмбриогенезу, демонстрировали значительные различия в соотношении двух основных растительных стерин — β -ситостерин/кампестерин. Известно, что это соотношение критически важно для функционального состояния клеточной мембраны, в том числе для упорядочивания жирнокислотных цепей в составе мембран, увеличения мембранной проницаемости для воды и ионов, а также для активности мембранно-связанных белков [8, 22]. Мы предполагаем, что установленные в экспериментах различия в соотношении β -ситостерин/кампестерин могут указывать на такие изменения мембранных свойств, которые играют важную роль в процессах дифференциации клеток при эмбриогенезе. В отношении “стрессового” стигмастерина, большое количество которого обнаружено у линии Кл10, имеющей нарушения в развитии зародышей, логично предположить, что его высокое содержание сопровождает и/или вызывает нарушение нормального развития эмбрионных структур листовницы сибирской. Высокое содержание в тканях эмбрионных линий сквалена, являющегося субстратом для биосинтеза стерин, может быть связано как с различиями в активности синтетических процессов в клеточных линиях *L. sibirica* с разной эмбрионностью, так и со структурными и антиоксидантными функциями этого соединения, которые могут способствовать эмбриогенезу.

Высокое содержание кампестерина в эмбрионных тканях клеточных линий *L. sibirica*, наряду с ранее установленным нами высоким содержанием в них моноеновых ЖК (в первую очередь, олеиновой) [5], вероятно, могут служить маркером эмбрионного потенциала этих линий для отбора перспективных для клонального размножения каллусов.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Био-

аналитика” СИФИБР СО РАН. Авторы выражают благодарность д.б.н., проф. И.Н. Третьяковой (Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, г. Красноярск) за предоставление исходного растительного материала лиственницы сибирской.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Шуваев Д.Н., Пак М.Э. Перспективы микроклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез // Хвойные бореальной зоны. 2012. Т. 30. С. 180.
2. Tretiakova I.N. Embryogenic cell lines and somatic embryogenesis in an vitro culture of Siberian larch // Dokl. Biol. Sci. 2013. V. 450. № 1. P. 139. <https://doi.org/10.1134/S0012496613030034>
3. Joy R.W., Yeung E.C., Kong L., Thorpe T. Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 1991. V. 27. P. 32.
4. Tranvan H.O.A., Troton D., Calvayrac R. Morphological, histological and lipid changes during adventitious budding in *Pinus pinaster* cultured cotyledons // J. Exp. Bot. 1988. V. 39. № 7. P. 907. <https://doi.org/10.1093/jxb/39.7.907>
5. Makarenko S.P., Shmakov V.N., Dudareva L.V., Stolbikova A.V., Semenova N.V., Tret'yakova I.N., Konstantinov Yu.M. Fatty acid composition of total lipids in embryogenic and nonembryogenic callus lines of larch // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. №. 2. P. 252. <https://doi.org/10.1134/S1021443716020102>
6. Семёнова Н.В., Шмаков В.Н., Пак М.Э., Третьякова И.Н., Константинов Ю.М., Дударева Л.В. Особенности состава нейтральных липидов эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий *Larix sibirica* Ledeb. // Биологические мембраны. 2020. Т. 37. С. 215. <https://doi.org/10.31857/S0233475520020127>
7. Semenova N.V., Shmakov V.N., Konstantinov Yu.M., Dudareva L.V. Phospholipids of embryogenic and non-embryogenic cell lines of *Larix sibirica* Ledeb. // Russ. J. Plant Physiol. 2020. V. 67. P. 1076. <https://doi.org/10.1134/S1021443720060151>
8. Valitova J.N., Sulkarnayeva A.G., Minibayeva F.V. Plant sterols: Diversity, biosynthesis, and physiological functions // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. P. 819. <https://doi.org/10.1134/S0006297916080046>
9. Kreis W., Muller-Uri F. Biochemistry of sterols, cardiac glycosides, brassinosteroids, phytoecdysteroids and steroid saponins // Ann. Plant Rev. 2010. V. 40. P. 304. <https://doi.org/10.1002/9781444320503.ch6>
10. Willmann M.R. Sterols as regulators of plant embryogenesis // Trends Plant Sci. 2000. V. 5. № 10. P. 416. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)91717-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)91717-5)
11. Hartmann M.A. Plant sterols and the membrane environment // Trends Plant Sci. 1998. V. 3. № 5. P. 170. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01233-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01233-3)
12. Senthil-Kumar M., Wang K., Mysore K.S. *AtCYP710A1* gene mediated stigmastanol production plays a role in imparting temperature stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* // Plant Signal. Behav. 2013. V. 8. № 2. P. e23142-1. <https://doi.org/10.4161/psb.23142>
13. Schaller H. The role of sterols in plant growth and development // Prog. Lipid Res. 2003. V. 42. № 3. P. 163. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00047-4](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00047-4)
14. Bajguz A., Chmur M., Gruszka D. Comprehensive overview of the Brassinosteroid biosynthesis pathways: substrates, products, inhibitors, and connections // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 1034. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01034>
15. Clouse S.D. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development // Plant Cell. 2011. V. 23. № 4. P. 1219. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084475>
16. Tian X., Xuan L., Liu B., Hu T., Wang C., Wang X. Effects of heterologous expression of *Populus euphratica* brassinosteroids biosynthetic enzyme genes *CPD* (*PeCPD*) and *DWF4* (*PeDWF4*) on tissue dedifferentiation and growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2018. V. 132. № 1. P. 111. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1316-2>
17. Nolan T., Chen J., Yin Y. Cross-talk of Brassinosteroid signaling in controlling growth and stress responses // Biochem. J. 2017. V. 474. № 16. P. 2641. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160633>
18. Zu S.H., Jiang Y.T., Hu L.Q., Zhang Y.J., Chang J.H., Xue H.W., Lin W.H. Effective modulating Brassinosteroids signal to study their specific regulation of reproductive development and enhance yield // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00980>
19. Schrick K., Mayer U., Martin G., Bellini C., Kuhnt C., Schmidt J., Jurgens G. Interactions between sterol biosynthesis genes in embryonic development of *Arabidopsis* // Plant J. 2002. V. 31. № 1. P. 61. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01333.x>
20. Schrick K., Cordova C., Li G., Murray L., Fujioka S. A dynamic role for sterols in embryogenesis of *Pisum sativum* // Phytochem. 2011. V. 72. № 6. P. 465. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.009>
21. Cunha A., Ferreira M.F. Differences in free sterols content and composition associated with somatic embryogenesis, shoot organogenesis and calli growth of flax // Plant Sci. 1997. V. 124. P. 97. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)04587-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)04587-1)
22. Zur I., Skoczowski A., Niemczyk E., Dubert F. Changes in the composition of fatty acids and sterols of membrane lipids during induction and differentiation of *Brassica napus* (var. *oleifera* L.) callus // Acta Physiol. Plant. 2002. V. 24. № 1. P. 3. <https://doi.org/10.1007/s11738-002-0015-7>
23. Silvestro D., Andersen T.G., Schaller H., Jensen P.E. Plant sterol metabolism. Δ^7 -Sterol-C5-desaturase (STE1/DWARF7), $\Delta^5,7$ -sterol- Δ^7 -reductase (DWARF5) and Δ^{24} -sterol- Δ^{24} -reductase (DIMINUTO/DWARF1) show multiple subcellular localizations in *Arabidopsis thaliana* (Heynh) L. // PLOS One. 2013. V. 8. P. 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056429>
24. Дударева Л.В., Семенова Н.В., Нохсоров В.В., Рудикова Е.Г., Петров К.А. Компонентный состав фитостероидов надземной части хвоща пестрого

- Equisetum variegatum* Schleich. ex. Web., произрастающего в северо-восточной Якутии // Химия растительного сырья. 2020. № 2. С. 133.
<https://doi.org/10.14258/jcprm.2020025555>
25. Uchida H., Ohyama K., Suzuki M., Yamashita H., Muranaka T., Ohyama K. Triterpenoid levels are reduced during *Euphorbia tirucalli* L. callus formation // Plant Biotechnol. 2010. V. 27. № 1. P. 105.
<https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.27.105>
 26. Chiu P.L., Bottino P.J., Patterson G.W. Sterol composition of nystatin and amphotericin B resistant tobacco calluses // Lipids. 1980. V. 15. № 1. P. 50.
<https://doi.org/10.1007/BF02534118>
 27. Deng S., Wei T., Tan K., Hu M., Li F., Zhai Y., Ye Sh., Xiao Y., Hou L., Luo M. Phytosterol content and the campesterol: sitosterol ratio influence cotton fiber development: role of phytosterols in cell elongation // Sci. China Life Sci. 2016. V. 59. № 2. P. 183.
<https://doi.org/10.1007/s11427-015-4992-3>
 28. Qian P., Han B., Forestier E., Hu Z., Gao N., Lu W., Shaller H., Li J., Hou S. Sterols are required for cell fate commitment and maintenance of the stomatal lineage in *Arabidopsis* // Plant J. 2013. V. 74. № 6. P. 1029.
<https://doi.org/10.1111/tjp.12190>
 29. Carland F.M., Fujioka Sh., Takatsuto S., Yoshida Sh., Nelson T. The identification of *CVPI* reveals a role for sterols in vascular patterning // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 2045.
<https://doi.org/10.1105/tpc.003939>
 30. Ines C., Corbacho J., Paredes M.A., Labrador J., Cord-eiro A.M., Gomez Jimenez M.C. Regulation of sterol content and biosynthetic gene expression during flower opening and early fruit development in olive // Physiol. Plant. 2019. V. 167. № 4. P. 526.
<https://doi.org/10.1111/pp.12969>
 31. Schaeffer A., Bouvier-Nave P., Benveniste P., Schaller H. Plant sterol-C24-methyl transferases: different profiles of tobacco transformed with SMT1 or SMT2 // Lipids. 2000. V. 35. № 3. P. 263.
<https://doi.org/10.1007/s11745-000-0522-1>
 32. Valitova J., Renkova A., Mukhitova F., Dmitrieva S., Beckett R.P., Minibayeva F.V. Membrane sterols and genes of sterol biosynthesis are involved in the response of *Triticum aestivum* seedlings to cold stress // Plant Physiol. Biochem. 2019. V. 142. P. 452.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.07.026>
 33. Dias L., Prescott M.C., Evershed R.P., Goad L.J. Steryl esters in a cell suspension culture of celery (*Apium graveolens*) // Lipids. 1991. V. 26. № 7. P. 536.
<https://doi.org/10.1007/BF02536600>
 34. Sharma P., Patil A., Patil D. Quantification of β -sitosterol from field grown plants and callus of *Crataeva tapia* L. // Int. J. Pharm. Sci. 2016. V. 7. № 4. P. 1556.
[https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7\(4\).1556-63](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(4).1556-63)
 35. Третьякова И.Н., Иваницкая А.С., Пак М.Э. Продуктивность эмбриогенных клеточных линий и их соматическая изменчивость у листовницы сибирской *in vitro* // Лесоведение. 2015. № 1. С. 27.
 36. Sonawane P.D., Pollier J., Panda S., Szymanski J., Mas-salha H., Yona M., Unger T., Malitsky S., Arendt Ph., Pauwels L., Almekias-Siegl E., Rogachev I., Meir S., Cardenas P.D., Athar M. et al. Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism // Nat. Plants. 2016. V. 3. № 1. P. 1.
<https://doi.org/10.1038/nplants.2016.205>
 37. Lozano-Grande M.A., Gorinstein S., Espitia-Rangel E., Dávila-Ortiz G., Martínez-Ayala A.L. Plant sources, extraction methods, and uses of squalene // Int. J. Agron. 2018. V. 2018. P. 1.
<https://doi.org/10.1155/2018/1829160>
 38. Iheagwam F.N., Israel E.N., Kayode K.O., De Campos O.C., Ogunlana O.O., Chinedu S.N. GC-MS analysis and inhibitory evaluation of *Terminalia catappa* leaf extracts on major enzymes linked to diabetes // Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2019. V. 2019. P. 1.
<https://doi.org/10.1155/2019/6316231>
 39. Nagalakshmi M.A.H., Murthy K.S.R. Phytochemical profile of crude seed oil of *Wrightia tinctoria* R. BR. and *Wrightia arborea* (DENNST.) MABB. by GC-MS // Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2015. V. 31. P. 46.