

УДК 581.19

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕРИНОВОГО СТАТУСА ГЕНЕРАТИВНЫХ ОСОБЕЙ ПАЛЬЧАТОКОРЕННИКА ПЯТНИСТОГО (*DACTYLORHIZA MACULATA* (L.) SOÓ) (ORCHIDACEAE) МЕТОДОМ ГХ-МС

© Е.Н. Сечин¹, О.А. Маракаев^{1*}, Г.Б. Гаврилов²

¹ Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, ул. Советская, 14, Ярославль, 150003 (Россия), e-mail: marakaev@uniyar.ac.ru

² Ярославский государственный институт качества сырья и пищевых продуктов, Московский проспект, 76а, Ярославль, 150030 (Россия)

Методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором впервые выявлен фитостериновый статус подземных и надземных органов тубероидного вида орхидных, произрастающего в природных условиях Центрально-Европейской части России, – пальчатокоренника пятнистого *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae). Установлено наличие в растительном материале сквалена, циклоартенола, циклоэукаленола, кампестерина, брассикастерина, β-ситостерина, стигмастерина, а также эргостерина, обнаруженного в подземных органах и принадлежащего микосимбионту. Содержание эргостерина в придаточных корнях в пять раз выше по сравнению с окончаниями стеблекорневых тубероидов. Состав фитостеринов надземных органов *D. maculata* более разнообразен, чем подземных. Основным стеринем *D. maculata* является β-ситостерин (60%), который представлен во всех органах. Высоким содержанием отличается циклоартенол (21%), отсутствующий в стебле. Циклоэукаленол (8%) выявлен в соцветиях и листьях, кампестерин (1%) – в соцветиях, брассикастерин (2%) – в придаточных корнях, стигмастерин (8%) – в листьях. Различия в стериновом статусе органов могут быть объяснены биохимическими особенностями их тканей и неодинаковой функциональной значимостью выявленных соединений для роста и развития генеративных особей *D. maculata* в фазу бутонизации. Полученные результаты свидетельствуют о разнообразии фитостериновых соединений и их неодинаковом содержании в различных органах исследованного растительного объекта.

Ключевые слова: *Dactylorhiza maculata*, Orchidaceae, фитостерины, β-ситостерин, циклоартенол, эргостерин, ГХ-МС.

Введение

Фитостерины – класс биологически активных растительных веществ, относящихся к изопреноидным производным и насчитывающих более двухсот представителей [1, 2]. Свободные стерины, а также некоторые их гликозиды, являясь интегральными компонентами мембран, участвуют в регуляции ее проницаемости и обеспечивают внутриклеточный гомеостаз клетки [3, 4]. Они обладают рядом структурных особенностей (свободная 3β-гидроксильная группа, тетрациклический скелет, алифатическая боковая цепь с 8–10 атомами углерода и др.), обеспечивающих им возможность влиять на состояние мембран [4, 5]. Наибольшим содержанием стеринов характеризуется цитоплазматическая мембрана, меньшим – мембраны компартментов клетки [1].

Путь синтеза фитостеринов включает более тридцати ферментативных реакций, начальные из которых обеспечивают образование сквалена. Циклизация сквалена приводит к синтезу циклоартенола [6]. В результате реакций метилирования из циклоартенола образуется β-ситостерин. Посредником выступает 24-метилен лофенол, из которого синтезируется кампестерин, являющийся предшественником брассикастерина. Путем образования двойной связи при C22 β-ситостерин способен превращаться в стигмастерин [1, 3,

Сечин Евгений Николаевич – аспирант,
e-mail: unknowndifferance@gmail.com

Маракаев Олег Анатольевич – кандидат биологических наук, доцент, декан факультета биологии и экологии,
e-mail: marakaev@uniyar.ac.ru

Гаврилов Гавриил Борисович – доктор технических наук, директор, e-mail: milkar@mail.ru

5]. Отмечается, что равновесие между β-ситостерином и кампестерином, а также между β-ситостерином и стигмастеорином важно для функционирования растительных мембран [1]. Большинство ферментов, участвующих в синтезе фитостеринов,

* Автор, с которым следует вести переписку.

связано с мембранами эндоплазматического ретикула [1, 3, 5], часть – с цитоплазматической мембраной. Фитостерины – субстраты для синтеза широкого спектра вторичных метаболитов, таких как фитоалексины, гликоалкалоиды, карденолиды и сапонины. Стерины являются стабильными молекулами, о чем свидетельствует увеличение соотношения между ними и фосфолипидами в стареющих мембранах [5].

Все растения способны самостоятельно синтезировать стеринны. Они были выделены из различных органов – листьев, корней, стеблей, цветков, пыльцы, семян и плодов [5]. Отмечается, что качественный состав и количественное содержание стериннов в органах различаются [1, 3, 5]. Вероятно, их стеринновый статус обусловлен биохимическими особенностями тканей [5]. Стерины являются относительно неполярными молекулами, что определяет трудность их транспорта по растению. Межклеточный транспорт на короткие расстояния представляется возможным, а на дальние расстояния кажется маловероятным [4]. Транспорт фитостериннов в клетке осуществляется из эндоплазматического ретикула при участии комплекса Гольджи [5]. В настоящее время предполагается фундаментальная роль стериннов в регуляции роста и развития растений [7].

Растительные стеринны входят в состав многих лекарственных препаратов, нормализующих липидный обмен, оказывают гипохолестеринемическое действие, обусловленное возможностью конкуренции между фитостеринами и холестерином при одновременном приеме [2]. На сегодняшний день источником для промышленного получения фитостериннов наряду с отходами целлюлозно-бумажной промышленности является соя культурная (*Glycine max*), ее неполярный экстракт содержит более тринадцати различных стериннов [8].

Изучение содержания стериннов в различных органах растений является актуальной задачей в связи с недостаточностью и фрагментарностью имеющихся данных. Необходимо отметить, что исследования состава стериннов у представителей семейства Orchidaceae единичны, а имеющиеся в них сведения касаются отдельных органов и не позволяют сформировать представление о стеринновом статусе растительных особей.

В связи с этим цель работы – определение стериннового статуса генеративных особей пальчатокоренника пятнистого (*Dactylorhiza maculata* (L.) Soó) – представителя семейства Orchidaceae, произрастающего в естественных условиях Центрально-Европейской части России.

Экспериментальная часть

Объектом исследования являлись генеративные особи пальчатокоренника пятнистого *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae) – многолетнего растения с ежегодно замещающимся подземным запасующим органом стеблекорневого происхождения – тубероидом (клубнем). Исследуемые растения произрастали в природных условиях Центрально-Европейской части России (Ярославская область) в осоково-разнотравном фитоценозе на дерново-подзолистой почве. Морфометрические параметры исследуемых генеративных особей *D. maculata* представлены в таблице 1.

Растительный материал собирали в фазу бутонизации (июнь 2019 г.), высушивали при температуре 120 °С в течение 40 мин и при температуре 80 °С до постоянной массы, перемалывали в ступке до порошкообразного состояния.

Таблица 1. Морфометрические параметры исследованных генеративных особей *D. maculata*

| Показатель | Значение |
|---|----------|
| Высота стебля, см | 35.0±5.0 |
| Число листьев, шт. | 3.4±1.0 |
| Длина листа, см | 10.3±1.8 |
| Ширина листа, см | 2.4±1.0 |
| Число жилок, шт. | 13.7±1.8 |
| Длина стеблекорневого тубероида, см | 1.4±0.4 |
| Ширина стеблекорневого тубероида, см | 1.7±0.7 |
| Число лопастей стеблекорневого тубероида, шт. | 2.3±0.5 |
| Число придаточных корней, шт. | 6.3±2.7 |
| Длина придаточных корней, см | 5.1±2.9 |
| Длина старого тубероида, см | 1.4±0.4 |
| Ширина старого тубероида, см | 1.7±0.7 |
| Длина молодого тубероида, см | 0.6±0.3 |
| Ширина молодого тубероида, см | 0.7±0.3 |

В колбу помещали 0.5 г (точная навеска) подготовленного растительного материала, 0.3 г гидроксида натрия и 30 мл 96% этилового спирта. Кипятили на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч. К суспензии добавляли 30 мл дистиллированной воды и фильтровали через бумажный фильтр. Фильтрат помещали в делительную воронку и добавляли 15 мл гексана, перемешивали. Водно-спиртовой и гексановый слой разделяли. Экстракцию гексаном повторяли трижды. Гексановый раствор отмывали водой и фильтровали через бумажный фильтр, заполненный безводным сульфатом натрия. Фильтрат упаривали на ротационном испарителе. Сухой остаток перерастворяли в 1 мл гексана и использовали для анализа.

Идентификацию соединений проводили на базе Ярославского государственного института качества сырья и пищевых продуктов с помощью газового хроматографа Agilent 7890A с масс-спектрометрическим детектором 5975C, работающем в режиме электронного удара (энергия ионизации 70 эВ). Использовали капиллярную колонку с неполярной подвижной фазой HP-5MS (30 м×0.25 мм×0.25 мкм). Условия хроматографирования: температура инжектора 300 °С, температура интерфейса 300 °С, начальная температура термостата колонки 60 °С, конечная 300 °С, скорость нагрева 100 °С/мин, время выдержки при конечной температуре 16 мин. В качестве газа-носителя использовали гелий, скорость потока которого составила 1 см³/мин. Регистрацию ионов проводили в режиме SCAN в диапазоне сканирования 40–500 а.е.м. Анализ спектров осуществляли с помощью программы MS Search с использованием библиотеки масс-спектров NIST 11. Количественное определение анализируемых фитостеринов проводили по отношению к стандартному образцу фирмы Larodan (Швеция) (25 мг/мл), содержащему смесь брассикастерина, кампестерина, β-ситостерина и стигмастерина в хлороформе. Брассикастерин (ergosta-5,22-dien-3-ol), β-ситостерин ((3β)-stigmast-5-en-3-ol), стигмастерин (stigmasta-5,22-dien-3-ol) и кампестерин (campest-5-en-3β-ol) сравнивали с соответствующими фитостеринами смеси, циклоартенол (9,19-cyclolanost-24-en-3-ol) и циклоэукаленол (9,19-cycloergost-24(28)-en-3-ol) – оценочно с β-ситостерином. Эргостерин (ergosta-5,7,22-trien-3β-ol) определяли по отношению к стандартному образцу холестерина фирмы Sigma-Aldrich (США). Сквален оценивали в относительных единицах как долю от суммарного содержания в растении. При расчете суммарного содержания исследуемых соединений на особь учитывали вклад массы отдельных органов в общую биомассу растения.

Обсуждение результатов

Исследование качественного и количественного содержания стеринов в различных органах генеративных особей *D. maculata* является важной задачей, выполнение которой позволяет определять характеристики их биохимического и физиологического статуса. Фитостерины выявляли методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Результаты исследования представлены в таблице 2.

В результате исследования в надземных и подземных органах генеративных особей *D. maculata* выявлено пять фитостеринов (циклоэукаленол, кампестерин, брассикастерин, β-ситостерин и стигмастерин), тритерпенол (циклоартенол), а также микостерин (эргостерин), обнаруженный в подземных органах растения и принадлежащий грибному симбионту (табл. 2). Кроме того, определено относительное содержание сквалена – непредельного ациклического углеводорода, предшественника стеринов [6, 9].

Циклоартенол (тритерпенол) обнаружен во всех органах *D. maculata* кроме стебля. Это соединение является важнейшим промежуточным метаболитом фитостеринового синтеза, а также представляет биохимическую значимость как субстрат для образования разнообразных вторичных соединений растений, например, стероидных алкалоидов [10, 11].

Циклоэукаленол, выявленный в соцветиях и листьях *D. maculata*, является посредником в синтезе 24-метилена лофенола из циклоартенола. Этап, связанный с метилированием циклоартенола в циклоэукаленол, является ключевым в скорости протекания фитостеринового синтеза, наряду с образованием сквалена [3].

Три фитостерина встречаются лишь однократно в исследованных органах *D. maculata*: кампестерин – в соцветиях, брассикастерин – в придаточных корнях, стигмастерин – в листьях (табл. 2). Кампестерин наряду с β-ситостерином играет важную роль в конфигурации мембранных структур и изменении активности белков, связанных с мембранами и выполняющих различные функции, в том числе сигнальные и транспортные [1, 3, 12]. Из кампестерина синтезируется брассикастерин, который, как известно, является предшественником брассиностероидов – гормонов растений, оказывающих влияние на процессы роста и развития, связанные с делением клеток и морфогенезом органов [1], а также способных повышать устойчивость к неблагоприятным факторам. В частности, отмечается, что брассиностероиды вызывают индукцию антиоксидантных белков (супероксиддисмутазы, каталазы и гваяколпероксидазы) [13]. Стигмастерин из-за наличия двойной

связи при С22 обладает меньшей способностью упорядочивать клеточную мембрану по сравнению с кампестерином и β -ситостерином. Высказываются предположения относительно его влияния на протонный насос плазматических мембран клеток, что доказывается усилением выделения протонов клетками интактных корней кукурузы при обработке их стигмастерином [14]. Функции стигмастераина связаны также с ответом на воздействие стрессовых факторов [12]. К существенному увеличению количества стигмастераина приводит стимуляция десатурации β -ситостерина в ответ на бактериальную атаку. Увеличение содержания стигмастераина отмечается также при раневом и температурном стрессах [1]. Известно, что изменение соотношения стерина во время стресса является приспособительной реакцией растения. Их разнообразие в растениях может быть основой для реализации дополнительных механизмов защиты от стресса.

β -ситостерин – единственный фитостерин, обнаруженный во всех исследованных органах *D. maculata* (табл. 2). Это соединение является наиболее эффективным стеринном для стабилизации мембран, что определяет его наибольшую распространенность и изученность [3, 5]. Он обладает высокой фармакологической и биологической активностями, может ингибировать пролиферацию опухолевых клеток различных линий (в частности, MCF-7, K-562, HT-29), являться акцептором активных форм кислорода [8]. β -ситостерин способен увеличивать пролиферативную активность Т- и НК-клеток иммунной системы человека в культуре *in vitro*, что может свидетельствовать о наличии у него иммуномодулирующей активности. Известна его антибактериальная активность по отношению к *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumonia*, сравнимая по эффективности с некоторыми антибиотиками [8].

Эргостерин, обнаруженный в придаточных корнях и окончаниях стеблекорневых тубероидов *D. maculata* (табл. 2), содержится в микоризообразующих грибах, вступающих с растением в симбиотические отношения [14]. У большинства грибов эргостерин является основным стеринном, содержание которого превышает более 50% от суммы всех стерина [15, 16]. Рост и развитие *D. maculata* с момента прорастания семени связаны с формированием эумицетной толипофаговой эндомикоризы. Ее развитие происходит в придаточных корнях и окончаниях стеблекорневых тубероидов и максимально проявляется в период активного роста подземных органов (июнь–июль) [17]. Содержание эргостерина в придаточных корнях в пять раз выше по сравнению с окончаниями стеблекорневых тубероидов (табл. 2). Это совпадает с данными о микотрофности *D. maculata*, свидетельствующими о более интенсивном развитии микосимбионта в придаточных корнях [17]. Отмечается, что эргостерин может выступать биохимическим маркером (наряду со специфическими пигментами и хитином) для количественной оценки микосимбионта в органах растения [15, 16]. При проникновении микосимбионта в клетки растения меняется соотношение стерина с сохранением соотношения жирных кислот [15]. Это рассматривается как защитная функция, связанная с увеличением стабильности мембран растительных клеток. Одновременно имеются сведения об изменении стеринового состава мембран микосимбионтов, что объясняется антагонистическими взаимодействиями двух организмов на начальных этапах [15, 16].

Сквален найден в соцветиях, листьях, придаточных корнях и стеблекорневых тубероидах *D. maculata*. Он образуется из мевалоната, предшественником которого является ацетат. Из сквалена в результате циклизации образуется циклоартенол [1, 3, 6]. Отмечается, что стерины появились в процессе биологической эволюции только с накоплением кислорода в атмосфере, так как циклизация молекулы сквалена могла произойти лишь в его присутствии [9]. Сквален является предшественником многих растительных метаболитов [9], таких как α - и β -амирины, имеющих значение как предшественники олеаноловой и урсоловой кислот.

Таблица 2. Содержание циклоартенола и стерина в генеративных особях *D. maculata* с учетом распределения их по органам (мкг/г сухой массы)*

| Органы (их части) | Циклоартенол | Циклоэукаленол | Кампестерин | Брассикастерин | β -ситостерин | Стигмастерин | Эргостерин | Суммарное содержание в органе (его части) |
|--|--------------|----------------|-------------|----------------|---------------------|--------------|------------|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| Соцветия | 27.8 | 245.8 | 85.5 | – | 876.2 | – | – | 1235.3 |
| Стебли | – | – | – | – | 102.6 | – | – | 102.6 |
| Листья | 427.4 | 171.0 | – | – | 961.7 | 291.7 | – | 1851.8 |
| Придаточные корни | 341.9 | – | – | 259.8 | 790.7 | – | 82.1 | 1474.5 |
| Стеблекорневые тубероиды | 128.2 | – | – | – | 341.9 | – | – | 470.1 |
| | | | | | | | | |
| Окончания стеблекорневых тубероидов (старые) | 106.9 | – | – | – | 153.9 | – | – | 260.8 |
| Окончания стеблекорневых тубероидов (старые) | 85.5 | – | – | – | 213.7 | – | 17.1 | 316.3 |

* Примечание: знак «–» означает отсутствие пика соединения на хроматограмме.

Ранее в псевдобульбах представителя рода *Cymbidium* (орхидеи субтропических и тропических широт) были обнаружены три фитостерина – β-ситостерин, стигмастерин и кампестерин [18]. В тубероидах наземной орхидеи *Ophrys lutea*, распространенной преимущественно на территории Южной Европы, Северной Африки и Ближнего Востока, были обнаружены эргостерин, кампестерин, 24-этил-холест-7,22-диен-3-β-ол, ситостерин и циклоартенол [19], в цветках гетеротрофного вида, встречающегося в условиях умеренного климата Северного полушария, *Epipogium aphyllum* – стигмастерин и β-ситостерин [20].

Общее содержание циклоартенола и фитостеринов в генеративных растениях *D. maculata* составляет 847.8 мкг/особь, уровень отдельных соединений различается (рис. 1). Максимальное содержание отмечено для β-ситостерина – 504.4 мкг/особь (60%). Содержание остальных соединений существенно ниже. По уменьшению уровня они располагаются в следующем порядке: циклоартенол – 175.6 мкг/особь (21%), циклоэукаленол – 67.0 мкг/особь (8%), стигмастерин – 63.3 мкг/особь (8%), брассикастерин – 20.0 мкг/особь (2%), кампестерин – 10.4 мкг/особь (1%). При исследовании представителя рода *Cymbidium* было выявлено, что соотношение содержания β-ситостерина, стигмастерина и кампестерина составляет 70 : 25 : 5 [18]. Это, в целом, согласуется с данными нашей работы.

Содержание фитостеринов в органах *D. maculata* различается в широких пределах: от 102.6 мкг/г сухой массы (стебли) до 1851.8 мкг/г сухой массы (листья) (табл. 2). Относительно высокое суммарное содержание фитостеринов выявлено в листьях (32%), придаточных корнях (26%) и соцветиях (22%) (рис. 2). Пониженный уровень отмечен в стеблекорневых тубероидах и их окончаниях (5–8%). Минимальным содержанием фитостеринов отличается стебель (2%). В работе P. Paul et al. (2007) показано, что в проростках *Dendrobium fimbriatum*, полученных в результате микроклонального размножения, количество β-ситостерина было выше в листьях (5890 мкг/г сухой массы) по сравнению со стеблями (4960 мкг/г сухой массы) и корнями (4460 мкг/г сухой массы) [21].

Наряду с фитостеринами установлено относительное распределение в органах *D. maculata* сквалена – соединения, лежащего в основе стеринового синтеза. По уменьшению его содержания органы *D. maculata* располагаются в следующем порядке: листья (50%) – молодые тубероиды (23%) – придаточные корни (11%) – соцветия (9%) – старые тубероиды (7%).

β-ситостерин присутствует во всех органах *D. maculata*, циклоартенол отсутствует в стеблях. Содержание β-ситостерина выше, чем циклоартенола, в каждом органе (рис. 3). Наибольшие различия по относительному содержанию этих двух стеринов характерны для стеблей и соцветий, наименьшие – для молодых стеблекорневых тубероидов (рис. 3). Различное относительное содержание циклоартенола (предшественника β-ситостерина) и β-ситостерина (одного из основных конечных соединений фитостеринового ряда), вероятно, связано с отсутствием необходимых соединений для синтеза того или иного фитостерина, отсутствием или недостаточной активностью ферментов. Отсутствие в стеблях и низкое содержание в соцветиях циклоартенола, возможно, связано с его эффективным использованием для синтеза β-ситостерина и других соединений фитостеринового ряда. В молодых стеблекорневых тубероидах может происходить активный синтез β-ситостерина, поэтому разница его содержания по сравнению с циклоартенолом в этих органах оказывается минимальной.

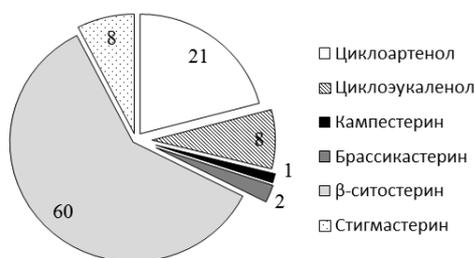


Рис. 1. Соотношение содержания циклоартенола и фитостеринов (%) в генеративных особях *D. maculata* с учетом вклада органов в общую биомассу растения



Рис. 2. Соотношение содержания циклоартенола и фитостеринов между органами (их частями) (%) генеративных особей *D. maculata*

Распределение циклоартенола по органам с учетом их вклада в общую биомассу генеративных особей *D. maculata* отличается от такого для β -ситостерина (рис. 4). Различия содержания циклоартенола и β -ситостерина минимальны для старых стеблекорневых тубероидов и отсутствуют для их окончаний, максимальное различие характерно для стеблей, где циклоартенол отсутствует, и соцветий, в которых содержание циклоартенола ниже в 11 раз. Эта картина, по-видимому, определяется биохимическими особенностями клеток подземных и надземных органов генеративных особей *D. maculata* в фазу бутонизации.

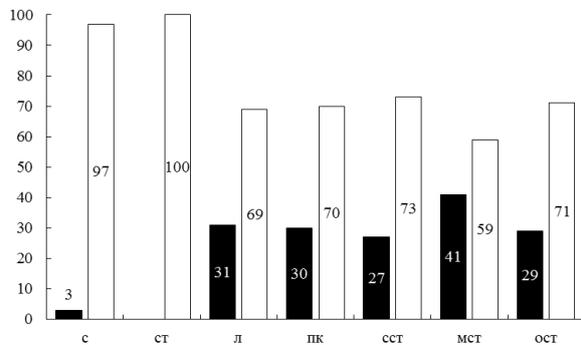


Рис. 3. Соотношение циклоартенола (■) и β -ситостерина (□) в органах (их частях) генеративных особей *D. maculata* (% от суммарного содержания двух соединений в органе): с – соцветия, ст – стебли, л – листья, пк – придаточные корни, сст – старые стеблекорневые тубероиды, мст – молодые стеблекорневые тубероиды, ост – окончания стеблекорневых тубероидов

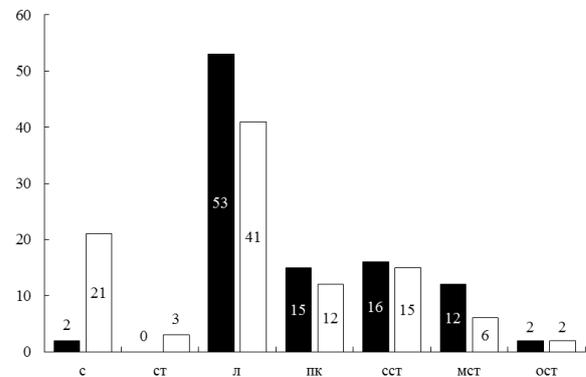


Рис. 4. Распределение циклоартенола (■) и β -ситостерина (□) в генеративных особях *D. maculata* (% от суммарного содержания фитостерина в растении с учетом вклада органов в общую биомассу): с – соцветия, ст – стебли, л – листья, пк – придаточные корни, сст – старые стеблекорневые тубероиды, мст – молодые стеблекорневые тубероиды, ост – окончания стеблекорневых тубероидов

Выводы

В результате исследования фитостеринового статуса генеративных особей *D. maculata* методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в растительном материале выявлено присутствие сквалена, циклоартенола, циклоэукаленола, кампестерина, брассикастерина, β -ситостерина, стигмастерина, а также эргостерина, обнаруженного в подземных органах и принадлежащего микосимбионту. Состав фитостеринов надземных органов *D. maculata* более разнообразен, чем подземных. В соцветиях присутствуют циклоартенол, циклоэукаленол, кампестерин и β -ситостерин, в листьях – циклоартенол, циклоэукаленол, β -ситостерин и стигмастерин, в стеблях – β -ситостерин, в придаточных корнях – циклоартенол, брассикастерин и β -ситостерин, в стеблекорневых тубероидах (и их окончаниях) – циклоартенол и β -ситостерин. Различия в стеринном статусе органов могут быть объяснены неодинаковой функциональной значимостью выявленных соединений для роста и развития растения.

Основным стеринном *D. maculata* является β -ситостерин (60% от суммы всех стеринов), который представлен во всех органах. Высоким содержанием отличается циклоартенол (21% от суммы всех соединений стеринового ряда), отсутствующий в стеблях. Наибольшее относительное различие по содержанию этих двух стеринов характерно для соцветий и стеблей, наименьшее – для молодых стеблекорневых тубероидов. При этом почти четверть от общего содержания β -ситостерина в растении отмечена в соцветиях, где уровень циклоартенола минимален. Наибольшее суммарное количество стеринов содержится в листьях, придаточных корнях и соцветиях (80%).

Таким образом, в работе впервые для генеративных особей *D. maculata* – представителя семейства Orchidaceae, произрастающего в естественных условиях Центрально-Европейской части России, – определены состав и содержание стеринов в различных органах. Выявленная картина демонстрирует стеринный статус *D. maculata* и свидетельствует о разнообразии соединений стеринового ряда, их неодинаковом содержании и соотношении в подземных и надземных органах исследованного растительного объекта.

Список литературы

1. Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А.Г., Минибаева Ф.В. Растительные стерины: многообразие, биосинтез, физиологические функции // Биохимия. 2016. Т. 81. №8. С. 1050–1068.
2. Дадали В.А., Тутельян В.А. Фитостерины – биологическая активность и перспективы практического применения // Успехи современной биологии. 2007. Т. 127. №5. С. 458–470.
3. Piironen V., Lindsay D.G., Miettinen T.A., Toivo J., Lampi A.-M. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000. Vol. 80. Pp. 939–966.
4. Bloch K.E. Sterol structure and membrane function // CRC critical reviews in biochemistry. 1983. Vol. 14. N1. Pp. 47–82. DOI: 10.1016/b978-0-12-152818-8.50022-0.
5. Hartmann M.A., Benveniste P. Plant membrane sterols: isolation, identification and biosynthesis // Methods in Enzymology. 1987. Vol. 148. Pp. 632–650.
6. Племенков В.В. Химия изопреноидов. Глава 3. Биосинтез изопреноидов // Химия растительного сырья. 2005. №3. С. 91–108.
7. Lindsey K., Pullen M.L., Topping J.F. Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signaling // Trends in Plant Science. 2003. Vol. 8. N11. Pp. 521–525. DOI: 10.1016/j.tplants.2003.09.012.
8. Saeidnia S., Manayi A., Gohari A.R., Abdollahi M. The story of beta-sitosterol – a review // European Journal of Medicinal Plants. 2014. Vol. 4. N5. Pp. 590–609. DOI: 10.9734/EJMP/2014/7764.
9. Summons R.E., Bradley A.S., Jahnke L.L. Steroids, triterpenoids and molecular oxygen // Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences. 2006. Vol. 361. Pp. 951–968. DOI: 10.1098/rstb.2006.1837.
10. Ohyama K., Suzuki M., Kikuchi J., Saito K., Muranaka T. Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis* // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009. Vol. 106. Pp. 725–730. DOI: 10.1073/pnas.0807675106.
11. Dev S. Cycloartenol to *Buxus* alkaloids // Proceedings of the Indian Academy of Sciences. 1984. Vol. 93. N6. Pp. 1015–1030.
12. Hartmann M.-A. 5 Sterol metabolism and functions in higher plants // Topics in Current Genetics. 2004. Vol. 6. Pp. 183–211.
13. Вайнер А.А., Колупаев Ю.Е., Швиденко Н.В., Хрипач В.А. Протекторное действие брассиностероидов на растения проса при абиотических стрессах // Biotechnologia Acta. 2014. Vol. 7. N5. Pp. 77–84.
14. Grandmougin-Ferjani A., Schuler-Muller I., Hartmann M.A. Sterol modulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids // Plant Physiology. 1997. Vol. 113. Pp. 163–174.
15. Frey B., Buser H.-R., Schiiepp H. Identification of ergosterol in vesicular-arbuscular mycorrhizae // Biology and Fertility of Soils. 1992. Vol. 13. Pp. 229–234. DOI: 10.1007/BF00340581.
16. Schmitz O., Danneberg G., Hundeshagen B., Kungner A., Bothe H. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhiza by biochemical parameters // Journal of Plant Physiology. 1991. Vol. 139. Pp. 106–114.
17. Маракаев О.А., Холмогоров С.В. Динамика развития микосимбионта в подземных органах *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae, Monocotyledoneae) в течение периодов вегетации и покоя // Поволжский экологический журнал. 2015. №2. С. 193–203.
18. Arditti J., Flick B.H., Ehmann A., Fisch M.H. Orchid phytoalexins. II. Isolation and characterization of possible sterol companions // American Journal of Botany. 1975. Vol. 62. N7. Pp. 738–742.
19. Barroso J., Neves H.C., Pais M.S.S. Production of free sterols by infected tubers of *Ophrys lutea* Cav.: identification by gas chromatography-mass spectrometry // New Phytologist. 1987. Vol. 106. Pp. 147–152.
20. Jakubska-Busse A., Jasicka-Misiak I., Poliwoda A., Świączkowski E., Kafarski P. The chemical composition of the floral extract of *Epipogium aphyllum* Sw. (Orchidaceae): a clue for their pollination biology // Archives of biological sciences. 2014. Vol. 66. N3. Pp. 989–998. DOI: 10.2298/ABS1403989B.
21. Paul P., Joshi M., Gurjar D., Shailajan S., Kumaria S. *In vitro* organogenesis and estimation of β-sitosterol in *Dendrobium fimbriatum* Hook.: an orchid of biopharmaceutical importance // South African Journal of Botany. 2007. Vol. 113. Pp. 248–252. DOI: 10.1016/j.sajb.2017.08.019.

Поступила в редакцию 22 января 2020 г.

После переработки 10 марта 2020 г.

Принята к публикации 14 мая 2020 г.

Для цитирования: Сечин Е.Н., Маракаев О.А., Гаврилов Г.Б. Определение стеринового статуса генеративных особей пальчатокоренника пятнистого (*Dactylorhiza maculata* (L.) Soó) (Orchidaceae) методом ГХ-МС // Химия растительного сырья. 2020. №4. С. 171–178. DOI: 10.14258/jcprm.2020047320.

Sechin E.N.¹, Marakaev O.A.^{1*}, Gavrilov G.B.² DETERMINATION OF THE STEROL STATE OF GENERATIVE PLANTS OF HEATH SPOTTED-ORCHID (*DACTYLORHIZA MACULATA* (L.) SOÓ) (ORCHIDACEAE) BY GC-MS

¹ P.G. Demidov Yaroslavl State University, ul. Sovetskaya, 14, Yaroslavl, 150003 (Russia),

e-mail: marakaev@uniyar.ac.ru

² Yaroslavl State Institute of Raw Materials and Food Quality, Yaroslavl, Moskovsky pr., 76a, 150030 (Russia)

For the first time, the phytosterol state of the underground and aboveground organs of the tuberoid species of the orchid *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae), which grows in the natural conditions of the Central European part of Russia, was studied using gas chromatography with a mass spectrometric detector. The plant material contains cycloartenol, cycloeukenol, campesterol, brassicasterin, β -sitosterol, stigmaterol and ergosterol, which was found in underground organs and belong to mycosymbiont. The ergosterol content in the adventitious roots is five times higher compared to the endings of stem root tuberoids. The phytosterols content of the aboveground organs of *D. maculata* is more diverse than that of the underground organs. The basic sterol of *D. maculata* is β -sitosterol (60%), which is present in all organs. Also a high amount was noted for cycloartenol (20%), which is absent in the stem. Cycloeukenol (7%) was found in inflorescences and leaves, campesterol (2%) in inflorescences, brassicasterin (5%) in the adventitious roots, stigmaterol (5%) in the leaves. Differences in the sterol statuses of organs can be explained by the biochemical characteristics of their tissues and the uneven functional significance of the identified compounds for the growth and development of generative individuals of *D. maculata* in the budding phase. The results obtained indicate the diversity of phytosterol compounds and their uneven content in various organs of the studied plant object.

Keywords: *Dactylorhiza maculata*, Orchidaceae, phytosterols, β -sitosterol, cycloartenol, ergosterol, GC-MS.

References

1. Valitova Yu.N., Sulkarnayeva A.G., Minibayeva F.V. *Biokhimiya*, 2016, vol. 81, no. 8, pp. 1050–1068. (in Russ.).
2. Dadali V.A., Tutel'yan V.A. *Uspekhi sovremennoy biologii*, 2007, vol. 127, no. 5, pp. 458–470. (in Russ.).
3. Piironen V., Lindsay D.G., Miettinen T.A., Toivo J., Lampi A.-M. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, vol. 80, pp. 939–966.
4. Bloch K.E. *CRC critical reviews in biochemistry*, 1983, vol. 14, no. 1, pp. 47–82. DOI: 10.1016/b978-0-12-152818-8.50022-0.
5. Hartmann M.A., Benveniste P. *Methods in Enzymology*, 1987, vol. 148, pp. 632–650.
6. Plemenkov V.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2005, no. 3, pp. 91–108. (in Russ.).
7. Lindsey K., Pullen M.L., Topping J.F. *Trends in Plant Science*, 2003, vol. 8, no. 11, pp. 521–525. DOI: 10.1016/j.tplants.2003.09.012.
8. Saeidnia S., Manayi A., Gohari A.R., Abdollahi M. *European Journal of Medicinal Plants*, 2014, vol. 4, no. 5, pp. 590–609. DOI: 10.9734/EJMP/2014/7764.
9. Summons R.E., Bradley A.S., Jahnke L.L. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, 2006, vol. 361, pp. 951–968. DOI: 10.1098/rstb.2006.1837.
10. Ohyama K., Suzuki M., Kikuchi J., Saito K., Muranaka T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, vol. 106, pp. 725–730. DOI: 10.1073/pnas.0807675106.
11. Dev S. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, 1984, vol. 93, no. 6, pp. 1015–1030.
12. Hartmann M.-A. *Topics in Current Genetics*, 2004, vol. 6, pp. 183–211.
13. Vayner A.A., Kolupaev Yu.E., Shvydenko N.V., Khrpach V.A. *Biotechnologia Acta*, 2014, vol. 7, no. 5, pp. 77–84. (in Russ.).
14. Grandmougin-Ferjani A., Schuler-Muller I., Hartmann M.A. *Plant Physiology*, 1997, vol. 113, pp. 163–174.
15. Frey B., Buser H.-R., Schiepp H. *Biology and Fertility of Soils*, 1992, vol. 13, pp. 229–234. DOI: 10.1007/BF00340581.
16. Schmitz O., Danneberg G., Hundeshagen B., Kungner A., Bothe H. *Journal of Plant Physiology*, 1991, vol. 139, pp. 106–114.
17. Marakayev O.A., Kholmogorov S.V. *Povolzhskiy ekologicheskiy zhurnal*, 2015, no. 2, pp. 193–203. (in Russ.).
18. Arditti J., Flick B.H., Ehmann A., Fisch M.H. *American Journal of Botany*, 1975, vol. 62, no. 7, pp. 738–742.
19. Barroso J., Neves H.C., Pais M.S.S. *New Phytologist*, 1987, vol. 106, pp. 147–152.
20. Jakubska-Busse A., Jasicka-Misiak I., Poliwoda A., Święczkowski E., Kafarski P. *Archives of biological sciences*, 2014, vol. 66, no. 3, pp. 989–998. DOI: 10.2298/ABS1403989B.
21. Paul P., Joshi M., Gurjar D., Shailajan S., Kumaria S. *South African Journal of Botany*, 2007, vol. 113, pp. 248–252. DOI: 10.1016/j.sajb.2017.08.019.

Received January 22, 2020

Revised March 10, 2020

Accepted May 14, 2020

For citing: Sechin E.N., Marakaev O.A., Gavrilov G.B. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 4, pp. 171–178. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020047320.

* Corresponding author.