

*На правах рукописи*



**Сидоров Роман Александрович**

**СОСТАВ ЖИРНЫХ МАСЕЛ ПЛОДОВ БЕРЕСКЛЕТОВ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории липидного обмена Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва.

Научный руководитель: кандидат биологических наук  
**Цыдендамбаев Владимир Дылыкович**

Официальные оппоненты: **Соловченко Алексей Евгеньевич**  
доктор биологических наук,  
кафедра биоинженерии биологического  
факультета МГУ им. М.В.Ломоносова, г. Москва,  
ведущий научный сотрудник

**Загоскина Наталья Викторовна**

доктор биологических наук,  
**ИФР РАН**, г. Москва,  
ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, г. Казань

Защита состоится 20 июня 2013 г. в 15.00 на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, д. 35. Факс: +7 (499) 977-80-18, e-mail: [m-azarkovich@ippras.ru](mailto:m-azarkovich@ippras.ru); [ifr@ippras.ru](mailto:ifr@ippras.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Автореферат разослан «19» мая 2013 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Род Бересклет (*Euonymus* L.) составляют кустарниковые или древесные растения, распространённые в основном в Северном полушарии, в том числе в нашей стране [Леонова, 1974]. Он включает 129 [Ma, 2001] или даже 220 видов [Zhu, 2012], которые, подразделяются на два подрода – *Euonymus* и *Kalonymus* [Blakelock, 1951; Ma, 2001], а также ряд секций [Леонова, 1974].

Фитохимические исследования растений рода *Euonymus* проводились до сих пор главным образом для обнаружения биологически активных веществ. Многие его виды используются в китайской народной медицине, поскольку они содержат вещества, обладающие противоопухолевой, противомикробной, антидиабетической и инсектицидной активностью [Zhu, 2012]. К настоящему времени из этих видов было выделено и идентифицировано свыше 200 различных соединений [Zhu, 2012].

Кроме того, в плодах отдельных видов этих растений уже давно было найдено жирное масло [Blakelock, 1951], которое накапливается не только в семенах, но и в ариллусах плодов [Corner, 1976; Меликян, Савинов, 2000]. Таким образом, можно заключить, что виды рода *Euonymus* принадлежат к группе растений с сочными маслянистыми плодами [Трусов, Созонова, 2012], накапливающих масло не только в высыхающих при созревании семенах, но и в водонасыщенных внесеменных частях плода (гипантиях, мезокарпах и др.). При этом масла, запасаемые в разных частях их плодов, резко различаются по ЖК-составу.

В семенах исследованных ранее видов бересклетов резервные нейтральные ацилглицерины (НАГ) масла на 80–98% состояли из *ac*ДАГ (*sn*-1,2-диацил-3-ацетилглицеринов – аналогов триацилглицеринов (ТАГ), у которых *sn*-3-положение этерифицировано остатком уксусной кислоты) и лишь на 2–15% – из ТАГ обычного состава. В то же время, в НАГ ариллусов *E. alatus* [Durrett et al., 2010] содержались преимущественно ТАГ, наряду с которыми в небольшом количестве присутствовали и *ac*ДАГ [Milcamps et al., 2005]. И ТАГ, и *sn*-1,2-положения *ac*ДАГ включали главным образом остатки высших C<sub>16</sub>–C<sub>18</sub>-насыщенных и -ненасыщенных ЖК [Kleiman et al., 1967; Milcamps et al., 2005], однако то, что остаток уксусной кислоты ацилирует именно *sn*-3-положение молекулы *ac*ДАГ, **достоверно доказано не было**. Кроме того, динамика накопления сухой массы, а также содержания и состава обоих классов НАГ в ходе развития плодов бересклетов также никем не изучались. Наконец, качественный и количественный состав резервных НАГ семян и ариллусов был до сих пор в той или иной степени изучен лишь у нескольких видов рода *Euonymus*, причём ни в одном случае не исследовались НАГ обеих частей одних и тех же плодов.

Учитывая это, а также то, что разные представители этого рода очень сильно отличаются друг от друга по морфологии и окраске плодов и семян, представляло интерес исследовать особенности состава и содержания НАГ в плодах ряда бересклетов, принадлежащих к различным систематическим подразделениям рода *Euonymus*.

**Цель и задачи исследования.** Цель настоящей работы — изучить особенности количественного и качественного состава НАГ ариллузов и семян зрелых плодов 14 видов бересклетов, относящихся к обоим под родам рода *Euonymus*.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- Изучить качественный и количественный состав НАГ в маслах ариллузов и семян зрелых плодов 14 видов бересклетов, а также ЖК-состав обоих классов НАГ;
- Доказать, что остаток уксусной кислоты в молекуле *ac*ДАГ этерифицирует исключительно *sn*-3-положение глицеринового остатка;
- Исследовать особенности формирования морфологической и анатомической структуры созревающих плодов трёх модельных видов бересклетов, относящихся к разным под родам и секциям рода *Euonymus*;
- Установить особенности накопления НАГ в ариллузах и семенах отдельных видов бересклетов в ходе созревания плодов, а также изменения их ЖК-состава.

**Научная новизна работы.** С помощью двумерной ЯМР-спектроскопии впервые было доказано, что остаток уксусной кислоты этерифицирует исключительно *sn*-3-положение в молекуле *ac*ДАГ, выделенных из семян бересклетовых растений. Тем самым получено первое строгое экспериментальное доказательство того, что в семенах бересклетов наряду с обычной диацилглицерин-3-ацилтрансферазой (ДАГАТ), специфичной к обычным ацил-КоА и катализирующей синтез ТАГ, содержится ДАГАТ, строго специфичная как к ацетил-КоА в качестве субстрата, так и к *sn*-3-положению глицеринового остатка, результатом действия которой является образование *ac*ДАГ. Установлено, что при ЯМР-спектроскопии остаток уксусной кислоты при *sn*-3-положении влияет на химические сдвиги протонов при *sn*-1- и *sn*-3-углеродных атомах глицеринового остатка *ac*ДАГ, что позволило исправить имевшееся ранее в литературе некорректное представление о соотношении сигналов от этих протонов с их положением в молекуле *ac*ДАГ.

Охарактеризован качественный и количественный состав НАГ ариллузов и семян как зрелых, так и созревающих плодов бересклетов, а также изучен их ЖК-состав; для 11 видов состав НАГ определён впервые. Кроме того, в ТАГ ариллузов некоторых видов бересклетов были обнаружены в значительных количествах (до 7.8%) необычные для выс-

ших растений  $\Delta 8$ -16:1 и  $\Delta 10$ -18:1 ЖК, структура которых была доказана с помощью масс-спектрометрии их ДМОХ-производных; эти жирные кислоты в растениях обнаружены впервые. Показано, что ЖК-состав ТАГ ариллузов является хемотаксономическим признаком, характеризующим тот или иной вид бересклета на уровне подрода. Установлено, что ариллузы по абсолютному и относительному содержанию НАГ превосходят семена.

Впервые в составе жирных масел ариллузов 12 видов и семян 4 видов бересклетов были обнаружены и детально изучены низшие алкиловые эфиры ЖК (НАЭЖК), состоящие из метиловых, этиловых, *изо*-пропиловых и *n*-бутиловых эфиров. Показано, что разные фракции НАЭЖК могли образовываться за счёт различных пулов ЖК.

**Практическая значимость.** Экспериментальные результаты и теоретические обобщения диссертационной работы могут быть использованы для разработки программ научных исследований по изучению диетической и энергетической ценности *ац*ДАГ природного происхождения, а также особенностей их метаболизма в организме животных; при планировании исследований, направленных на получение генетически модифицированных линий различных масличных культур, продуцирующих *ац*ДАГ, которые могут быть использованы для синтеза биодизеля или как пищевая добавка в диетическом питании. Совокупность экспериментальных данных может быть использована при чтении курсов лекций для студентов биологических специальностей вузов.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на VII съезде Общества физиологов растений России (Нижний Новгород, 2011); на конференциях (Москва, 2011 и 2012) и семинаре молодых учёных ИФР РАН (Москва, 2010); на IX Международном симпозиуме «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Пушино, 2011); на Международной научно-практической конференции «Клеточная биология и биотехнология растений» (Минск, 2013); на XIX и XX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2012 и 2013).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 9 печатных работ, из которых 2 являются статьями в рецензируемых изданиях.

**Структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 124 страницах машинописного текста, содержат 15 таблиц и 21 рисунок. Список литературы включает 330 источников, в том числе 315 на иностранном языке.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Растительный материал.** Зрелые плоды бересклетов (стадия III) собирали на стадии вскрывшейся коробочки в течение 2010 и 2011 годов в дендрарии Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН. Было исследовано 14 видов, относящихся к двум подродам и 4 секциям рода *Euonymus* L. Помимо зрелых плодов, также были выбраны три модельных вида, относящихся к секциям *Euonymus* (*E. europaeus*) и *Pseudovyenomus* (*E. verrucosus*) подрода *Euonymus*, и к одноимённой секции подрода *Kalonymus* (*E. maximoviczianus*). Их плоды собирали в процессе развития: на стадии глобулярного зародыша (стадия I), на стадии зрелого плода – раскрывшейся коробочки (стадия III) и между этими сроками, когда зародыш был вполне сформирован (стадия II).

**Экстракция липидов.** Семена в ариллусах фиксировали в течение 1 мин в кипящей воде, после чего разделяли на ариллусы и семена. Полученный материал гомогенизировали и липиды экстрагировали как описано ранее [Пчёлкин и др, 2006].

**Тонкослойная хроматография экстрактов.** Аналитическую ТСХ экстрактов ариллусов и семян проводили на пластинках Silufol (40×100 мм), используя смесь *n*-гексан : диэтиловый эфир : СН<sub>3</sub>СООН (70:30:1) в качестве подвижной фазы. Фракционирование экстрактов выполняли на пластинках Merck Kieselgel 60F (200×200 мм), предварительно промытых смесью ацетон : хлороформ (1:1), пропитанных 0.001%-ным раствором 2',7'-дихлорфлюоресцеина в метаноле.

**ЯМР-спектрокопия *α*ЦДАГ растительного происхождения.** Выделенные *α*ЦДАГ (~50 мг) растворяли в 500 мкл CDCl<sub>3</sub> и переносили в 5-мм ампулу для ЯМР спектрометра. Одномерные <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C, двумерные гомоядерные <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H спектры COSY, TOCSY, ROESY и двумерные гетероядерные <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C спектры HMBC, HSQC и HSQC-TOCSY регистрировали на приборе AV-600 Bruker по стандартным методикам. Химические сдвиги в <sup>13</sup>C спектрах (ppm) регистрировали относительно сигнала <sup>13</sup>C растворителя CDCl<sub>3</sub> (δ<sub>C</sub> 77.0 ppm) и остаточного сигнала <sup>1</sup>H CHCl<sub>3</sub> (δ<sub>H</sub> 7.27 ppm).

**ГЖХ-анализ ЖК-состава НАГ и идентификация необычных ЖК.** Метилловые эфиры ЖК (МЭЖК) *α*ЦДАГ или ТАГ получали прямой переэтерификацией в метаноле, содержащем 10% ацетилхлорида по методу [Zhukov, Vereshchagin, 1970]. Синтез ДМОХ-производных ЖК для установления точного положения двойной связи проводили по методу Куклева-Смита [Kuklev, Smith, 2003]. Состав МЭЖК и ДМОХ определяли с помощью ГЖХ-МС на приборе Agilent 7890А с капиллярной колонкой DB-23 (60 м × 0.25 мм × 0.25 мкм). Анализ и интерпретацию масс-спектров ДМОХ производных ЖК проводили на ос-

нове эмпирических правил и таблиц диагностических фрагментарных ионов [Zhang et al., 1998; Spitzer, 1997]. Количественное содержание ТАГ и *α*ЦДАГ определяли с помощью ГЖХ с внутренним стандартом (17:0) как описано ранее [Zhukov, Vereshchagin, 1970].

**Статистическая обработка экспериментальных данных.** Все вычисления производили в программе STATISTICA. Все данные были проверены на нормальность распределения с помощью теста Шапиро-Уилка ( $0.72 \leq W < 1.00$ ,  $0.31 \leq p < 0.84$ ) [Shapiro, Wilk, 1965]. Достоверность различий между анализируемыми выборками определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия Фишера. Степень возможного родства исследованных видов бересклетов, основанная на сходстве ЖК-состава запасных ТАГ ариллусов зрелых плодов, была изучена с помощью метода кластерного UPGMA-анализа (метод невзвешенного арифметического среднего) [Sneath, Sokal, 1973], а также с помощью кластеризации методом k-средних [MacQueen, 1967]. В таблицах представлены средние арифметические трёх аналитических определений трёх биологических повторностей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### ***Установление стереоспецифичности строения молекул $\alpha$ ЦДАГ растительного происхождения с помощью ЯМР-спектроскопии***

В настоящее время известно лишь три статьи, в которых *α*ЦДАГ растительного или животного происхождения были изучены с помощью ЯМР-спектроскопии, однако **достоверного доказательства** того, что остаток уксусной кислоты этерифицирует исключительно *sn*-3-положение авторам получить не удалось по причине недостаточного разрешения применяемых приборов [Kleiman et al, 1967], либо из-за ошибочного соотнесения сигналов от атомов [Limb et al, 1999], или по причине того, что исследователи не применяли методы 2D-ЯМР [Durrett et al, 2010].

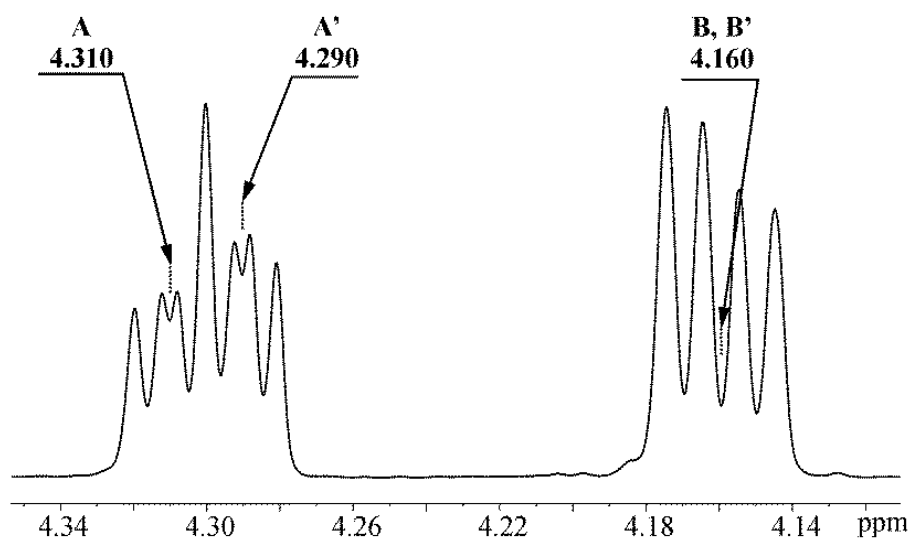
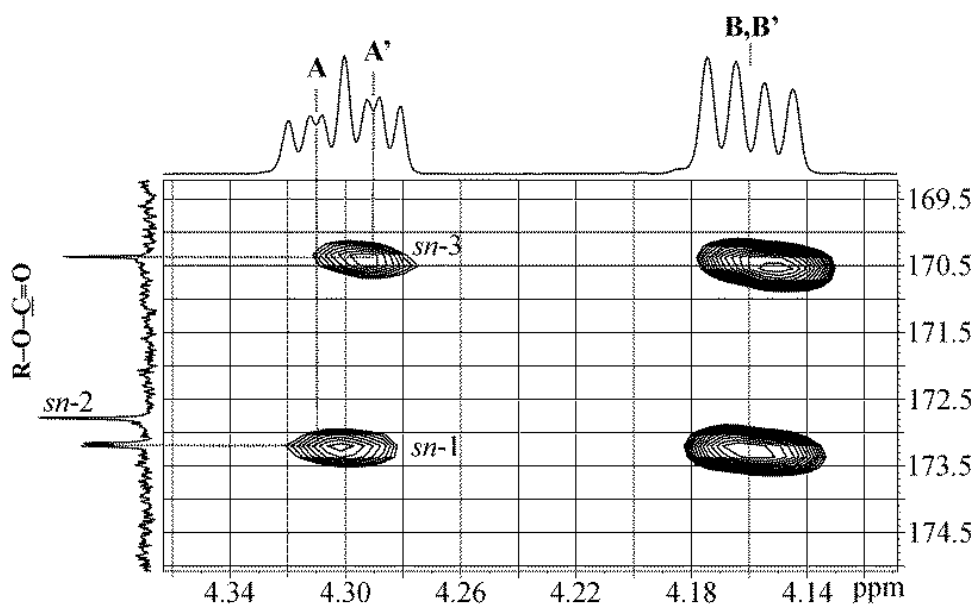


Рис. 1. Область 4.1-4.4 ppm <sup>1</sup>H-ЯМР спектра (600 МГц) *α*ЦДАГ из семян бересклета Максимовича

На рис. 1 приведена часть  $^1\text{H}$ -ЯМР спектра *ac*ДАГ из семян бересклета Максимовича. Можно видеть, что в области 4.3 ppm имеет место выраженная асимметричность двойного дублета. Опираясь на известные данные [Lie Ken Jie, Lam, 1995], мы предположили, что химические сдвиги протонов  $\text{H}_A$  и  $\text{H}_{A'}$ ,  $\delta_{\text{H}}$  4.31 и 4.29 соответственно, обусловлены влиянием ацильных остатков разной длины при *sn*-1- и *sn*-3-положениях глицеринового остатка. Для проверки этой гипотезы, мы записали спектры  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HMBC (рис. 2 и 3) и HSQC-TOCSY этих *ac*ДАГ.

На рис. 2 видно, что протон  $\text{H}_{A'}$  коррелирует с углеродным атомом глицеринового остатка ( $\delta_{\text{C}}$  170.37), в то время как протоны  $\text{H}_A$ ,  $\text{H}_B$  и  $\text{H}_{B'}$  – с углеродным атомом  $\delta_{\text{C}}$  173.20 и 173.16. Это расщепление сигнала от углеродного атома карбоксильной группы  $\text{R}-\text{O}-\underline{\text{C}}=\text{O}$  обусловлено различными остатками насыщенных и ненасыщенных ЖК при *sn*-1-положении глицеринового остатка. Также видно, что ни один из этих четырёх протонов не коррелирует с углеродным атомом ( $\delta_{\text{C}}$  172.78) при *sn*-2-положении.

Рис. 2. Фрагмент  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HMBC спектра *ac*ДАГ из семян *E. maximovizianus*



Также нами впервые было установлено, что синглет от протонов остатка уксусной кислоты ( $\delta_{\text{H}}$  2.07 ppm) даёт единственную корреляцию с углеродным атомом карбоксильной группы ( $\delta_{\text{C}}$  170.37 ppm). Два перекрывающихся триплета от протонов углеродного атома, связанного с углеродным атомом карбоксильной группы ( $\delta_{\text{H}}$  2.331 и 2.318 ppm), напротив, дают чёткие корреляции с углеродными атомами карбоксильных групп –  $\delta_{\text{C}}$  172.78 и 173.16 ppm соответственно (рис. 3).



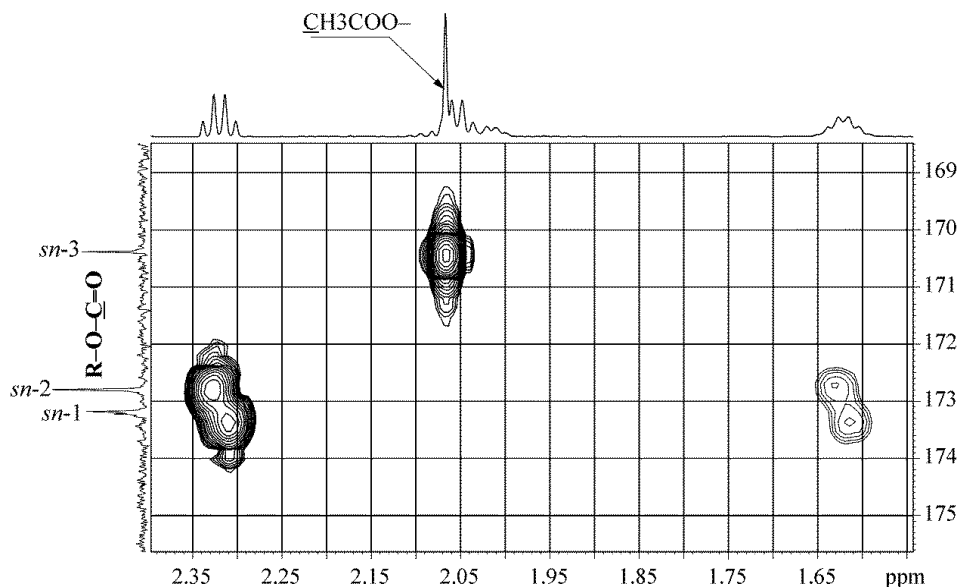


Рис. 3. Фрагмент  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  НМВС спектра *acyl*ДАГ из семян *E. maximoviczianus*

Таким образом, было показано, что протон  $\text{H}_A$  ( $\delta_{\text{H}}$  4.29) при углеродном атоме  $\delta_{\text{C}}$  62.32 остатка глицерина коррелирует с углеродным атомом  $\delta_{\text{C}}$  170.37 карбоксильной группы, которая также коррелирует с протонами ацетатного остатка ( $\delta_{\text{H}}$  2.07). Это означает, что остаток уксусной кислоты связан с углеродным атомом  $\delta_{\text{C}}$  62.32, который, согласно данным Дарретта с соавт. [Durrett et al, 2010], представляет собой углеродный атом в *sn*-3-положении глицеринового остатка молекулы *acyl*ДАГ. То есть, нами получено строгое инструментальное подтверждение стереоспецифичности строения *acyl*ДАГ, а значит, и присутствия в семенах бересклетов наряду с обычной диацилглицерин-3-ацилтрансферазой (ДАГАТ), специфичной к обычным ацил-КоА и катализирующей синтез ТАГ, другой ДАГАТ, строго специфичной как к ацетил-КоА в качестве субстрата, так и к *sn*-3-положению глицеринового остатка.

### **Содержание сухого вещества и НАГ в зрелых плодах бересклетов**

В ходе проведённых исследований было установлено, что семена достоверно превосходили ариллусы по абсолютному и относительному (рис. 4 А) содержанию сухой массы в среднем в 2.6 и 1.6 раза, соответственно.

У всех изученных видов ТАГ в том или ином количестве присутствовали в обеих частях плода. В то же время, *acyl*ДАГ всегда обнаруживались только в семенах, а в ариллусах четырёх видов они содержались лишь в следовых количествах. Абсолютное содержание НАГ в ариллусах в мг/г сухой массы было в среднем вдвое выше, чем в семенах (23.6 и 11.3 %) (рис. 4 Б); в расчёте на сухую массу 1 органа, ариллусы также обнаруживают повышенную маслячность (рис. 4 В). Доля ТАГ в семенах изученных нами бересклетов составляла 4–5%, а в ариллусах – ~98% от суммы НАГ, что было несколько выше, чем обна-

руженное ранее в семенах (3.3 и 91.7% от суммы липидов) и ариллузах (91.2 и 0.5%, соответственно) *E. alatus* [Durrett et al, 2009].

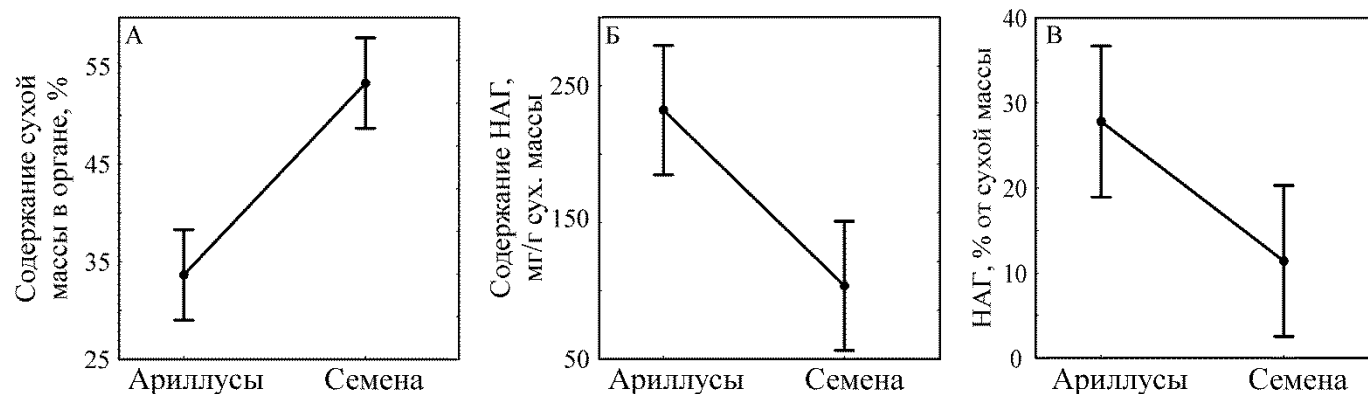


Рис. 4. Дисперсионный анализ достоверности различий некоторых признаков в наблюдаемых выборках (N=14)

А:  $F_{df=1}=38.2, p=0.001\%$ ; Б:  $F_{df=1}=15.8, p=0.006\%$ ; В:  $F_{df=1}=7.2, p=1.3\%$

Таким образом, у бересклетов, как и у других растений с сочными маслянистыми плодами, разные части плода резко различались по составу резервных НАГ – в ариллузах, обладающих только материнским генотипом, содержались преимущественно ТАГ, а в семенах, обладающих генами обоих родителей, присутствовали почти исключительно *α*ЦДАГ. Ранее было показано, что семена и гипантии плода облепихи, НАГ которых состояли только из ТАГ, также резко различались между собой по составу ЖК. Так, в гипантиях содержалось высоконасыщенное масло с преобладанием  $C_{16}$ -ЖК – 16:0 и  $\Delta 9$ -16:1 и/или октадеценовых кислот, в то время как в семенах тех же плодов накапливаются ТАГ, богатые  $C_{18}$ -полиненасыщенными ЖК. [Пчёлкин и др., 2006].

### ЖК-состав НАГ из плодов бересклетов

В НАГ плодов было обнаружено (наряду с минорными ЖК) 14 видов ЖК, среди которых всегда преобладали пальмитиновая, олеиновая, линолевая и  $\alpha$ -линоленовая кислоты (табл. 1 и 2). В более или менее заметных количествах (3–12%) могли содержаться 12:0, 14:0, 18:0, 9-16:1, 9,12-16:2 и 11-18:1, а также необычные  $\Delta 8$ -16:1- и  $\Delta 10$ -18:1-ЖК, структура которых была установлена нами с помощью масс-спектрометрии их DMOX-производных (рис. 5, Табл. 3).  $\Delta 8$ -16:1- и  $\Delta 10$ -18:1-ЖК в липидах растений обнаружены впервые.

Таблица 1. Жирнокислотный состав ТАГ и ацДАГ из ариллусов зрелых плодов 14 видов бересклетов

Вид	НАГ	Жирные кислоты, мас. %								ИН
		16:0	9-16:1	18:0	9-18:1	11-18:1	9,12-18:2	9,12,15-18:3	Прочие <sup>1</sup>	
<i>E. bungeanus</i>	ТАГ <sup>2</sup>	29.3	3.9	1.4	11.2	3.0	39.7	1.2	10.3	1.109
	ацДАГ	20.5	1.5	1.5	10.9	2.2	53.6	2.7	7.1	1.351
<i>E. europaeus</i>	ТАГ	23.0	3.8	1.7	17.8	4.6	41.4	2.3	5.4	1.147
	ацДАГ	21.3	2.6	1.6	10.0	4.0	52.7	2.7	5.1	1.340
<i>E. hamiltonianus</i>	ТАГ	30.8	1.8	2.2	15.3	1.7	45.0	1.6	1.6	1.142
	ацДАГ	19.9	0.7	1.8	7.4	1.5	64.9	2.4	1.4	1.468
<i>E. phellomanus</i>	ТАГ	32.9	1.2	4.7	16.6	1.0	39.5	1.7	2.4	1.037
<i>E. semiexsertus</i>	ТАГ	29.4	3.8	1.4	11.4	4.0	46.5	1.1	2.4	1.179
	ацДАГ	20.7	1.3	1.6	5.7	3.5	63.2	1.8	2.2	1.451
<i>E. sieboldianus</i>	ТАГ <sup>3</sup>	21.7	12.6	1.7	13.2	10.7	34.5	1.0	4.6	1.137
	ацДАГ	15.9	7.1	1.2	4.5	8.8	53.5	2.3	6.7	1.425
<i>E. alatus</i>	ТАГ	26.3	0.4	1.8	21.4	1.5	45.2	2.7	0.7	1.219
	ацДАГ	23.0	0.3	2.4	19.8	1.6	47.0	3.3	2.6	1.261
<i>E. sacrosanctus</i>	ТАГ	23.5	0.9	1.8	25.3	2.1	43.1	2.8	0.5	1.231
	ацДАГ	17.6	0.6	2.3	15.2	1.7	43.8	14.3	4.5	1.495
<i>E. pauciflorus</i>	ТАГ	27.9	0.9	4.9	36.8	1.4	25.6	1.0	1.5	0.933
	ацДАГ	18.4	0.4	3.4	30.4	0.9	40.0	2.5	4.0	1.202
<i>E. verrucosus</i>	ТАГ <sup>4</sup>	11.0	2.6	2.6	38.5	3.5	26.0	3.8	12.0	1.095
<i>E. latifolius</i>	ТАГ	21.6	1.4	1.9	52.3	1.0	18.1	2.7	1.0	0.994
	ацДАГ	17.2	0.7	2.9	42.2	0.9	25.6	8.0	2.5	1.197
<i>E. macropterus</i>	ТАГ	41.8	0.4	2.8	18.9	1.7	31.1	2.7	0.6	0.915
	ацДАГ	22.5	0.7	3.1	19.2	1.4	32.3	17.3	3.5	1.384
<i>E. maximoviczianus</i>	ТАГ	39.0	0.8	3.2	27.5	0.7	26.9	1.0	0.9	0.862
<i>E. sachalinensis</i>	ТАГ	35.6	0.4	5.5	44.5	1.5	11.4	0.7	0.4	0.713

<sup>1</sup> сумма остальных ЖК, каждой из которых содержалось менее 1.0% (10:0, 12:0, 14:0, 15:0, 7-16:1, 11-16:1, 7,10-16:2, 9,12-16:2, 17:0, 20:0, 11-20:1, 22:0, 24:0); <sup>2</sup> содержали также 8-16:1 (6.7%) и 10-18:1 (2.2%) ЖК; <sup>3</sup> содержали 2,3% 8-16:1 ЖК; <sup>4</sup> содержали 12:0 (4.8%), 14:0 (3.1%) ЖК.

Таблица 2. Жирнокислотный состав ТАГ и ацДАГ из семян зрелых плодов 14 видов бересклетов

Вид бересклета	НАГ	Жирные кислоты, мас. %							Прочие <sup>1</sup>	ИН
		16:0	9-16:1	18:0	9-18:1	11-18:1	9,12-18:2	9,12,15-18:3		
<i>E. bungeanus</i>	ТАГ	23.0	1.4	4.1	31.5	1.4	32.6	2.8	3.2	1.097
	ацДАГ	15.6	0.2	1.8	38.4	1.2	34.6	7.6	0.6	1.320
<i>E. europaeus</i>	ТАГ	22.4	2.3	4.0	31.9	2.8	25.9	4.4	6.3	0.912
	ацДАГ	18.1	0.2	2.0	43.8	1.1	24.6	9.3	0.9	0.951
<i>E. hamiltonianus</i>	ТАГ	22.5	0.7	3.2	33.0	1.1	33.4	4.3	1.8	1.153
	ацДАГ	16.3	0.1	2.7	52.5	1.1	19.6	7.0	0.7	1.141
<i>E. phellomanus</i>	ТАГ	23.6	0.4	4.9	31.9	0.9	32.0	4.9	1.4	1.121
	ацДАГ	19.1	0.1	2.3	47.4	1.2	21.2	8.1	0.6	1.154
<i>E. semiexsertus</i>	ТАГ	22.4	1.5	2.8	29.9	1.9	34.9	4.6	2.0	1.181
	ацДАГ	16.4	0.1	2.2	50.6	1.0	20.5	8.7	0.5	1.189
<i>E. sieboldianus</i>	ТАГ	20.8	8.0	2.4	23.7	7.2	32.3	2.4	3.2	1.135
	ацДАГ	15.4	0.1	2.0	54.8	1.2	19.2	6.8	0.5	1.152
<i>E. alatus</i>	ТАГ	24.8	0.2	6.3	31.0	1.0	32.9	1.8	2.0	1.035
	ацДАГ	20.2	0.1	2.9	25.7	0.9	47.9	1.7	0.6	1.279
<i>E. sacrosanctus</i>	ТАГ	18.6	0.3	4.9	36.8	1.1	35.5	1.8	1.0	1.147
	ацДАГ	18.7	0.2	2.3	27.0	1.0	48.8	1.7	0.3	1.309
<i>E. pauciflorus</i>	ТАГ	15.6	0.3	5.3	36.5	0.8	36.9	2.3	2.3	1.186
	ацДАГ	15.5	0.1	3.5	29.4	0.7	48.7	1.4	0.7	1.320
<i>E. verrucosus</i>	ТАГ	16.7	0.2	4.8	48.6	0.8	25.1	1.8	2.0	1.057
	ацДАГ	17.3	0.1	3.6	44.0	0.7	31.0	2.0	1.3	1.133
<i>E. latifolius</i>	ТАГ	16.6	0.2	5.8	52.0	1.1	16.3	6.0	2.0	1.044
	ацДАГ	17.7	0.1	2.6	46.1	1.2	25.4	6.0	0.9	1.167
<i>E. macropterus</i>	ТАГ	22.2	0.5	3.9	42.2	1.4	25.3	2.9	1.6	1.039
	ацДАГ	18.6	0.2	2.5	43.8	1.1	26.1	7.2	0.6	1.191
<i>E. maximoviczianus</i>	ТАГ	21.9	0.3	5.3	43.9	1.2	22.9	3.1	1.4	1.008
	ацДАГ	19.4	0.2	4.3	36.8	1.0	31.2	6.9	0.2	1.199
<i>E. sachalinensis</i>	ТАГ	28.0	0.3	4.4	44.1	1.1	14.8	5.3	2.0	0.917
	ацДАГ	20.9	0.0	3.2	54.1	1.1	14.1	6.0	0.5	1.014

<sup>1</sup> Сумма ЖК, каждой из которых содержалось < 1.0% (10:0, 12:0, 14:0, 15:0, 7-16:1, 11-16:1, 7,10- и 9,12-16:2, 17:0, 20:0, 11-20:1, 22:0).

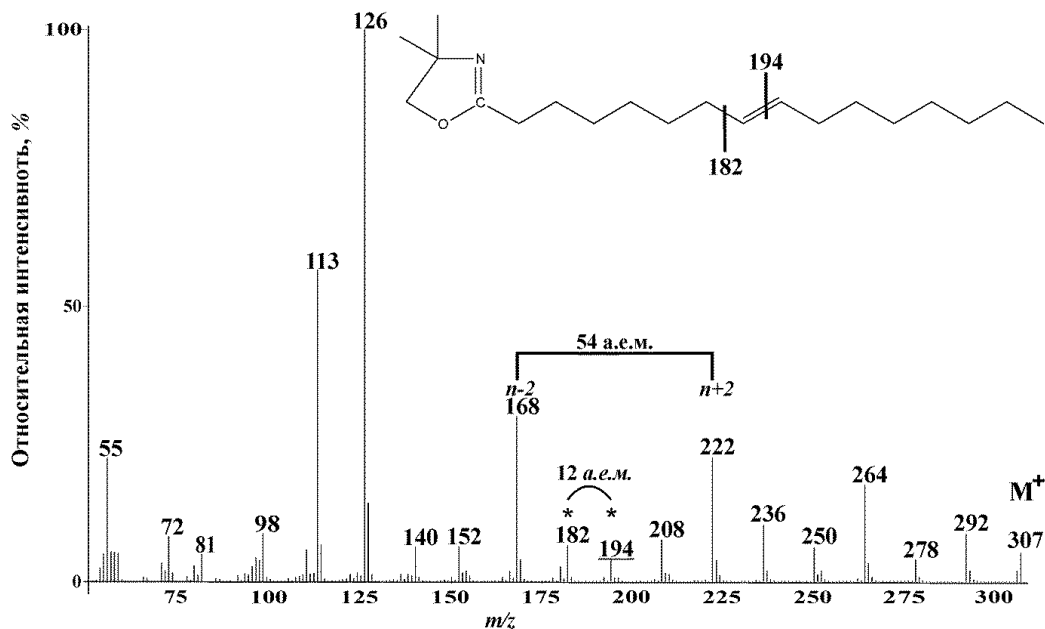


Рис. 5. Масс-спектр DMOX-производного необычной  $\Delta 8$ -гексадеценовой кислоты из ТАГ зрелых ариллусов *E. sieboldianus*

Таблица 3. Массовые числа молекулярных и диагностических фрагментарных ионов необычных ЖК

ЖК	Отношение массы к заряду, а.е.м			
	Ионы с $\Delta=54$ а.е.м	Ионы с $\Delta=12$ а.е.м	Молекулярный ион	Положение двойной связи
X-16:1	168/222	182/194	307	$\Delta 8$
9-16:1	182/236	196/208	307	$\Delta 9$
9-18:1	182/236	196/208	335	$\Delta 9$
X <sub>2</sub> -18:1	196/250	210/222	335	$\Delta 10$
11-18:1	210/264	224/236	335	$\Delta 11$

По-видимому,  $\Delta 10$ -18:1 ЖК образуется посредством  $C_2$ -удлинения её предшественника –  $\Delta 8$ -16:1, за синтез которой может отвечать специфическая десатураза, как это было показано ранее для растений, способных накапливать ЖК с необычным положением двойной связи [Suh, Schiltz, Ohlrogge, 1999]. Эти две кислоты обнаруживались только в ТАГ ариллусов бересклетов, относящихся к подроду *Euonymus* (см. ниже). Каких-либо упоминаний в литературе об этих необычных ЖК в составе липидов растений и животных нам обнаружить не удалось.

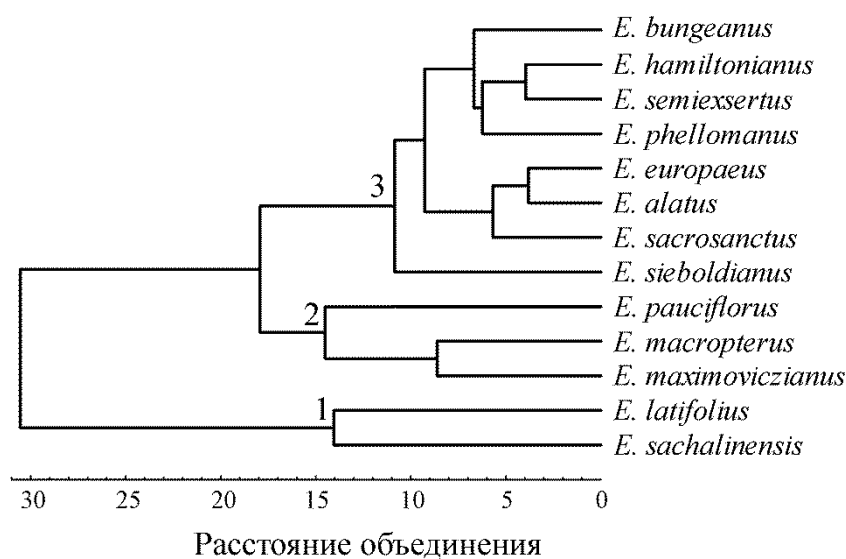
Ранее было показано, что в *sn*-1,2-положениях *acy*ДАГ семян *E. verrucosus* содержание 16:0, 18:0, 9-18:1, 9,12-18:2 и 9,12,15-18:3 составляло 14, 4, 40, 40 и 2% [Kleiman et al, 1967], а для трёх видов растений *Maytenus* sp., также принадлежащих к сем. Celastraceae, соответствующие величины составляли 13.0–15.2, 3.0–6.0, 36.8–58.7, 21.0–44.5 и 0.2–0.6% [Spitzer, Aichholz, 1996]. Приведённые данные указывают на определённое сходство между отдельными видами бересклетовых растений по составу главных ЖК в НАГ плодов.

Во всех пробах НАГ (табл. 1 и 2), за исключением НАГ семян *E. hamiltonianus*, по величине ИН ТАГ в той или иной степени уступали *ацДАГ* (табл. 2). По-видимому, это различие вызывалось, прежде всего, тем, что молекула ТАГ содержит два положения остатка глицерина (*sn-1* и *sn-3*), включающие преимущественно более насыщенные высшие ЖК [Пчёлкин и др., 2006], тогда как в *ацДАГ* имеется только одно такое положение – *sn-1* (см. выше). Обнаруженное различие было гораздо сильнее выражено в ариллусах, где средние величины ИН в ТАГ и *ацДАГ* составляли 1.051 и 1.357, чем в семенах (1.074 и 1.180, соотв.), что связано с намного более высоким уровнем линолеата в *ацДАГ* ариллусов, чем в *ацДАГ* семян.

### Хемотаксономический анализ возможного родства изученных видов бересклетов

Чтобы проверить наше предположение о связи ЖК-состава НАГ зрелых плодов 13 различных видов бересклетов с их систематическим положением внутри рода, мы применили иерархический кластерный анализ. *E. verrucosus* был исключён из анализа, как вид, практически не накапливающий жирное масло в ариллусах (0.02-0.1% от сухой массы).

Рис. 6. Дендрограмма объединения видов бересклетов в кластеры по сходству ЖК-составов запасных ТАГ ариллусов зрелых плодов (невзвешенное арифметическое среднее, метрика Чебышева)



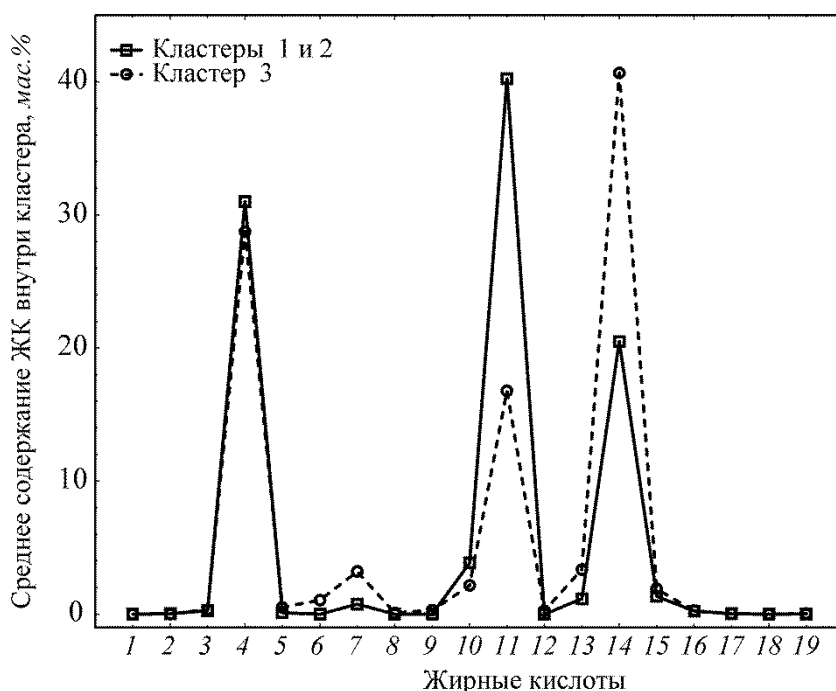
На рис. 6 представлен результат иерархической кластеризации изученных видов рода *Euonymus* на основе данных ЖК-состава ТАГ ариллусов их плодов (см. табл. 1). Можно видеть, что изученные виды группируются в три кластера: кластеры 1 и 2 включают в себя виды, относящиеся, за исключением *E. pauciflorus*, к секции *Kalonymus* одноимённого подрода, а кластер 3 объединил виды, принадлежащие к подроду *Euonymus*, который в этом исследовании был представлен тремя секциями: *Euonymus*, *Melanocarya* и *Pseudoeuonymus* [Леонова, 1974]. Группировка отдельных видов в менее крупные кластеры внутри кластера 3 не отражает их принадлежности к различным секциям подрода *Euonymus*.

Таким образом, ЖК-состав ТАГ ариллусов исследованных видов бересклетов достоверно характеризует только относительно крупные таксономические единицы – подроды.

В то же время сама по себе иерархическая кластеризация не позволяет определить факторы, которые оказывают влияние на формирование того или иного кластера. Поэтому для того чтобы определить, какими различиями в ЖК-составе ТАГ характеризуются подроды *Euonymus* и *Kalonymus*, которые обуславливают состав кластеров, был применён дополнительный анализ ЖК-состава ТАГ ариллусов изученных видов бересклетов с помощью метода k-средних.

Рис. 7. Величины k-средних значений содержания *i*-тых ЖК для двух кластеров

1-19 – обозначения ЖК: 1 – 10:0, 2 – 12:0, 3 – 14:0, 4 – 16:0, 5 – 7-16:1, 6 – 8-16:1, 7 – 9-16:1, 8 – 7,10-16:2, 9 – 9,12-16:2, 10 – 18:0, 11 – 9-18:1, 12 – 10-18:1, 13 – 11-18:1, 14 – 9,12-18:2, 15 – 9,12,15-18:3, 16 – 20:0, 17 – 11-20:1, 18 – 11,14-20:2, 19 – 22:0)



При кластеризации методом k-средних и количестве кластеров  $k=2$  (по числу подродов) исследуемые виды группируются практически в полном соответствии с их систематическим положением внутри рода. Из данных, представленных на рис. 7, видно, что значимыми факторами при формировании кластеров являются средние концентрации олеиновой ( $p=0.01\%$ ,  $F=32.9$ ) и линолевой кислот ( $p=0.01\%$ ,  $F=33.8$ ) в ТАГ ариллусов. Виды из подрода *Euonymus*, формирующие кластер 3 (рис. 6), достоверно отличаются более высоким содержанием линолевой кислоты по сравнению с олеиновой, а для видов из кластеров 1 и 2, к которым относятся представители подрода *Kalonymus*, наблюдается обратное соотношение между концентрациями этих ЖК в ТАГ.

Виды, относящиеся к кластеру 3, также отличаются несколько повышенным содержанием 9-16:1- и 11-18:1-ЖК, хотя это различие статистически недостоверно; также в них

присутствуют необычные 8-16:1 и 10-18:1 ЖК. Что же касается насыщенных кислот, 16:0 и 18:0, то значимые различия между видами из разных подродов отсутствуют.

Вместе с тем, на рис. 6 можно видеть, что *E. pauciflorus*, по классификации [Леонова, 1974] относящийся к секции *Pseudovuenomus* подрода *Euonymus*, по ЖК-составу запасных ТАГ ариллусов оказывается в одном кластере с представителями подрода *Kalonymus*, что возможно свидетельствует в пользу необходимости уточнения его систематической принадлежности. К тому же недавно было показано, что анатомическое строение ариллусов *E. pauciflorus* сходно с таковым у представителей подрода *Kalonymus* и отличается от других представителей подрода *Euonymus* наличием у зрелых ариллусов между эпидермами нескольких слоёв паренхимных клеток, которые не разрушаются в процессе развития плода [Трусов, 2010].

Что же касается *ац*ДАГ семян зрелых плодов бересклетов, то кластерный анализ их ЖК-состава не выявил никакой связи с их систематическим положением не только на уровне секции, но и подрода.

#### **Накопление сухой массы и НАГ в развивающихся плодах бересклетов**

После изучения особенностей качественного и количественного состава НАГ ариллусов и семян зрелых плодов бересклетов, было выбрано три модельных вида, относящихся к разным подкладам и секциям рода *Euonymus* L. – *E. europaeus*, *E. verrucosus* и *E. maximowiczianus*.

У изученных видов на всех стадиях созревания семени по сухой массе органа в несколько раз превосходили ариллусы, и лишь у *E. europaeus* на стадии I наблюдалась обратная картина. У *E. maximowiczianus* и *E. verrucosus* накопление сухой массы семян и особенно ариллусов происходило значительно медленнее, чем у *E. europaeus*. Если у первых двух видов на стадии I (глобулярного зародыша) сухая масса семени составляла лишь 5.5 и 9% массы зрелого семени и 13 и 7.7% массы зрелого ариллуса, соответственно, а на стадии II (зрелого зародыша) накапливалось только 23 и 31.6% массы зрелого семени и 32.7 и 20.5% конечной сухой массы зрелого ариллуса, то у *E. europaeus* эта доля, составлявшая 4.2 и 57.3% на стадии I, на стадии II достигала уже 47.6 и 66% сухой массы соответствующей части плода, соотв. В ходе созревания от стадии I до стадии III сухая масса одного семени у *E. maximowiczianus* и *E. verrucosus* возрастала в 18 и 11 раз, а у *E. europaeus* – в 23.6 раза. Между тем, для ариллусов прирост сухой массы у этих видов не был столь значительным. Относительный уровень массы ариллусов в ходе роста изменялся мало, а у *E. verrucosus* он был намного ниже, чем у двух других видов.



Также нами было исследовано накопление НАГ в ходе созревания плодов, которое у бересклетов ранее не изучалось. В семенах всех изученных видов главным классом НАГ на каждой стадии созревания были *ацДАГ* (92–100% от суммы НАГ), которые по абсолютному содержанию на полтора порядка величин превышали ТАГ. На стадии I в семенах обнаруживалось лишь малое количество НАГ (не более 100–200 мкг/плод), которое на дальнейших стадиях созревания непрерывно возрастало. В ходе этого процесса *E. verrucosus* всегда значительно превосходил *E. europaeus* и *E. maximowiczianus* по интенсивности образования каждого из классов НАГ. На стадии III (полной зрелости) эти два вида обычно также были ближе друг к другу по абсолютному содержанию НАГ и заметно уступали *E. verrucosus* по величине данного параметра. Так, в зрелых семенах *E. europaeus* и *E. maximowiczianus* абсолютное содержание НАГ в расчёте на одно семя было лишь в 5.8 и 6.8 раза выше, чем на стадии I, тогда как у *E. verrucosus* уровень НАГ к концу созревания возрастал, главным образом за счёт *ацДАГ*, почти в 42 раза. Наблюдавшееся накопление НАГ в ходе созревания плодов обуславливало рост числа олеосом в клетках семян и ариллугов.

В созревающих и зрелых ариллугах *E. verrucosus* НАГ – как ТАГ, так и *ацДАГ* – практически полностью отсутствовали, а динамика накопления ТАГ у двух других видов была сходна с наблюдавшейся в семенах. По содержанию ТАГ в зрелых ариллугах *E. maximowiczianus* в 1.6 раза превосходил другой вид – *E. europaeus*. В последнем случае оно было во много раз выше, чем содержание *ацДАГ*. Наконец, совершенно необычной была динамика абсолютного содержания *ацДАГ* в созревающих ариллугах *E. maximowiczianus*: эта величина была максимальной на стадии I, затем резко снижалась, а при наступлении полной зрелости плода и вовсе падала до нуля.

Таким образом, обмен веществ в плодах бересклетов при созревании характеризовался более интенсивным накоплением сухой массы у семян, чем у ариллугов. У семян *E. europaeus* он был более интенсивным, чем у семян *E. maximowiczianus* и *E. verrucosus*; напротив, по скорости образования сухого вещества в ариллугах *E. europaeus* значительно уступал двум другим исследованным видам.

В семенах *ацДАГ* синтезировались во много раз активнее, чем ТАГ, а *E. europaeus* и *E. maximowiczianus* по интенсивности биосинтеза каждого из классов НАГ заметно уступали *E. verrucosus*. В ариллугах, в отличие от семян, образовывались преимущественно ТАГ, а по характеру обмена НАГ в ариллугах имели место резкие межвидовые различия. Так, в ариллугах *E. verrucosus* НАГ практически не обнаруживались, а в ариллугах плодов

*E. taximowiczianus* уровень *α*ЦДАГ достигал максимума в начале созревания, а в зрелом плоде снижался до нуля.

### **Динамика ЖК-состава НАГ созревающих плодов бересклетов**

В составе НАГ созревающих плодов бересклетов было обнаружено 29 индивидуальных ЖК, главными из которых (до 29–51% от суммы ЖК) были пальмитиновая, олеиновая, линолевая и  $\alpha$ -линоленовая кислоты. В значительно меньших количествах содержались 12:0 (до 4.8%), 14:0 (до 1.1–3.1%), 7-16:1 (до 1.0–3.9%), 8-16:1 (до 1.3–7.6%), 9-16:1 (до 1.2–3.7%), 17:0 (до 1.6–2.1%), 18:0 (до 1.0–5.3%), 10-18:1 (2.8–3.2%), 11-18:1 (до 1.0–4.6%), 20:0 (до 1.8%) и 22:0 (до 1.4%) ЖК. Качественный состав главных ЖК НАГ в ходе созревания плодов почти не изменялся. Динамика их количественного содержания в ТАГ и *α*ЦДАГ семян и ариллугов приведена в таблицах 4 и 5.

Можно видеть, что в этих классах НАГ на разных стадиях созревания плода доминировали 9,12-18:2 и 9-18:1 ЖК — на долю каждой из них могло приходиться до половины от суммы ЖК, и их содержание отличалось наибольшей изменчивостью в зависимости от вида растения, части плода, стадии созревания и класса НАГ. Так, в семенах в ходе созревания плодов доля 9-18:1 как в ТАГ, так и в *α*ЦДАГ, возрастала в 1.5–2.5 раза, а в ариллугах *E. europaeus* и *E. verrucosus* – в 2.5 и 4 раза, соответственно, в то время как в ТАГ *E. taximowiczianus* и *α*ЦДАГ *E. europaeus* она снижалась в >1.3 раза. Эти изменения концентрации олеата в НАГ сопровождалось соответствующим ростом или снижением относительного содержания линолеата.

Пальмитиновая кислота в наиболее высокой концентрации (40–47% от суммы ЖК) содержалась в ТАГ ариллугов *E. taximowiczianus*, а в остальных пробах её уровень обычно не превышал 15–25% и относительно мало возрастал в ходе созревания. Наконец,  $\alpha$ -линоленовая кислота была главной ЖК только в *α*ЦДАГ наименее зрелых семян *E. europaeus*. Её концентрация в НАГ по мере их накопления в плоде обычно падала. Наиболее резкое снижение (с 26–28 до 3–8%) наблюдалось в отдельных пробах ТАГ и *α*ЦДАГ из семян и ариллугов *E. europaeus* и *E. taximowiczianus* (с 20 до 4–7%). В других пробах НАГ из ариллугов этих видов, а также из семян и ариллугов *E. verrucosus* это снижение было менее значительным (с 3–10 до 2–4%).

Таблица 4. ЖК-состав ТАГ и ацДАГ ариллусов созревающих плодов трёх видов бересклетов

		АРИЛУСЫ											
Вид	Стадия	НАГ	Жирные кислоты, мас.%										ИН
			16:0	7-16:1	8-16:1	9-16:1	18:0	9-18:1	10-18:1	11-18:1	9,12-18:2	9,12,15-18:3	
<i>E. europaeus</i>	I	ТАГ	23.9		7.6	2.4	2.3	7.2	3.2	3.2	42.0	4.7	1.226
		ацДАГ	20.5	1.3		1.1	2.1	13.4		1.8	30.2	28.3	1.629
	II	ТАГ	23.3		6.9	2.7	2.1	8.1	2.8	3.7	43.7	4.1	1.248
		ацДАГ	26.7	3.2		1.4	2.7	12.6		2.6	39.6	7.5	1.214
	III	ТАГ	23.0	3.9	Следы	3.8	1.7	17.8	Следы	4.6	41.4	2.3	1.147
		ацДАГ	21.3	2.9		2.6	1.6	10.0		4.0	52.7	2.7	1.340
<i>E. maximoviczianus</i>	I	ТАГ	На данной стадии отсутствуют										
		ацДАГ	29.2	0.2		0.6	1.0	36.70		1.3	25.8	3.1	1.007
	II	ТАГ	47.1	0.6		0.7	1.2	35.6		1.1	13.2	Следы	0.643
		ацДАГ	23.3	0.8		1.2	1.2	41.6		1.8	27.2	2.2	1.063
	III	ТАГ	39.0	0.3		0.8	3.2	27.5		0.7	26.9	1.0	0.862
		ацДАГ	На данной стадии отсутствуют										
<i>E. verrucosus</i>	I	ТАГ	18.8	0.6		1.1	1.1	9.9		3.3	50.6	10.4	1.473
		ацДАГ	Отсутствуют у этого вида										
	II	ТАГ	21.0	1.0		0.3	3.4	24.0		4.1	29.6	7.2	1.125
		ацДАГ	Отсутствуют у этого вида										
	III	ТАГ	11.0	1.4		2.6	2.6	38.5		3.5	26.0	3.8	1.095
		ацДАГ	Отсутствуют у этого вида										

Таблица 5. ЖК-состав ТАГ и ацДАГ созревающих семян трёх видов бересклетов

		СЕМЕНА											
Вид	Стадия	НАГ	Жирные кислоты, мас. %										ИН
			16:0	7-16:1	8-16:1	9-16:1	18:0	9-18:1	10-18:1	11-18:1	9,12-18:2	9,12,15-18:3	
<i>E. europaeus</i>	I	ТАГ	18.9	0.2	1.5	2.2	1.9	13.1		2.5	30.8	26.5	1.610
		ацДАГ	22.6	0.1		0.2	2.9	23.7		1.3	22.4	25.5	1.471
	II	ТАГ	19.9	0.1	1.7	1.4	2.2	23.3		2.1	32.3	15.4	1.393
		ацДАГ	19.9	0.1		0.2	2.8	33.4		1.2	23.5	17.6	1.347
	III	ТАГ	22.4	0.3	0.7	2.3	4.0	31.9		2.8	25.9	4.4	0.912
		ацДАГ	18.1	0.1		0.2	2.0	43.8		1.1	24.6	9.3	0.951
<i>E. maximoviczianus</i>	I	ТАГ	19.6	0.2		0.3	3.3	19.3		Следы	35.2	19.9	1.497
		ацДАГ	14.4	0.1		0.2	2.9	16.0		Следы	45.2	20.7	1.690
	II	ТАГ	14.6	0.3		0.2	3.1	40.6		1.1	29.9	9.3	1.299
		ацДАГ	14.6	0.1		0.1	2.6	25.5		0.1	40.1	16.4	1.555
	III	ТАГ	21.9	0.2		0.3	5.3	43.9		1.2	22.9	3.1	1.008
		ацДАГ	19.4	0.1		0.2	4.3	36.8		1.0	30.5	6.9	1.199
<i>E. verrucosus</i>	I	ТАГ	На данной стадии отсутствуют										
		ацДАГ	17.0	0.1		0.3	2.3	28.8		Следы	43.9	6.8	1.369
	II	ТАГ	18.1			0.7	2.8	32.1		2.6	38.2	3.3	1.219
		ацДАГ	18.6				2.8	36.7		1.0	36.8	3.1	1.208
	III	ТАГ	16.7	0.1		0.2	4.8	48.5		0.8	25.1	1.8	1.054
		ацДАГ	17.3	0.1		0.1	3.6	44.0		0.7	31.0	2.0	1.133

### *Присутствие низших алкиловых эфиров ЖК в плодах растений рода Euphytius*

Исследуя состав нейтральных липидов в зрелых масличных плодах бересклетов, мы нашли в них неидентифицированный компонент (“компонент X”). В условиях ТСХ на силикагеле в системе *n*-гексан : диэтиловый эфир зона этого компонента совпадала по величине подвижности с зоной стандартных метиловых эфиров ЖК (МЭЖК). Методом капиллярной ГЖХ-МС мы установили, что эта фракция наряду с МЭЖК содержала также эфиры этилового и других низших спиртов и, следовательно, компонент X представлял собой смесь низших алкиловых эфиров ЖК (НАЭЖК). Из 14 исследованных нами видов бересклетов НАЭЖК в плодах содержали только 10 видов, причём у 4 видов бересклетов, входящих в секции *Euphytius* и *Melanocarya* подрода *Euphytius*, НАЭЖК присутствовали не только в ариллусах, но и в семенах.

В плодах изученных бересклетов были идентифицированы 32 индивидуальных вида НАЭЖК: 16 видов МЭЖК, девять видов этиловых (ЭЭЖК), пять видов *изо*-пропиловых (ИПЭЖК), а также два вида *n*-бутиловых эфиров ЖК. В ЖК-составе НАЭЖК нашли (с учетом минорных ЖК) 16 индивидуальных видов C<sub>14</sub>–C<sub>24</sub>-ЖК, включавших насыщенные (8 видов), -моно- (6 видов), -ди- (1 вид) и -триненасыщенные ЖК (1 вид). В НАЭЖК ариллусов всегда присутствовали МЭЖК, которые обычно превосходили по концентрации другие фракции. У *E. maximowiczianus* и у *E. latifolius* этиловые эфиры ЖК (ЭЭЖК) были в значительной степени сходны с МЭЖК по ЖК-составу. Существование такого сходства позволяет предположить, что в ариллусах этих видов биосинтез МЭЖК и ЭЭЖК осуществлялся за счёт одного и того же, свойственного данному виду растений, пула ЖК.

ИПЭЖК содержались в ариллусах девяти видов бересклетов и обычно несколько уступали МЭЖК по концентрации в сумме НАЭЖК. Исключением здесь был только вид *E. alatus*, в НАЭЖК которого ИПЭЖК составляли 86.4% и состояли почти полностью из *изо*-пропилмирилата. Очень близкая по составу смесь ИПЭЖК присутствовала и в семенах этого вида, где соответствующая величина достигала 94.6%. В ИПЭЖК ариллусов у всех видов, кроме *E. maximowiczianus* и *E. europaeus*, содержалась только 14:0 ЖК, которая, в свою очередь, почти никогда не обнаруживалась в других фракциях НАЭЖК. Наконец, ИПЭЖК семян *E. phellomanus* и *E. alatus* представляли собой чистый *изо*пропилмирилат. Весьма ограниченным набором ЖК отличались также *n*-бутиловые эфиры, содержавшие или только линолевою кислоту (в семенах *E. sacrosanctus*) или её смесь (7:3) с олеиновой (в ариллусах *E. europaeus*).

Найденные особенности ЖК-состава ИПЭЖК и *n*-бутиловых эфиров ЖК позволяют предположить, что эти эфиры по механизму биосинтеза значительно отличаются от МЭЖК и ЭЭЖК. Действительно, у МЭЖК и ЭЭЖК набор ЖК был много шире, а жёсткая избирательность по отношению к тому или иному виду низшего спирта или виду ЖК при этерификации отмечалась лишь у *E. bungeanus*.

Результаты настоящей работы показывают, что у растений рода *Euonymus* НАЭЖК образовывались преимущественно в ариллусах, которые к тому же значительно превосходили семена по числу видов ЖК в НАЭЖК. Следовательно, ариллусы намного более активны в биосинтезе НАЭЖК, чем семена.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами установлено, что изученные представители рода *Euonymus* (за исключением *E. verruscus*), как и другие растения с сочными маслянистыми плодами, накапливают жирные масла, как в семенах, так и во внесеменной части плода – ариллусах. Запасаемые в семенах и ариллусах масла, состоят из нейтральных ацилглицеринов – ТАГ и *α*ЦДАГ, однако у разных видов бересклетов эти масла различаются не только ЖК-составом, но и соотношением между классами составляющих их запасных НАГ. В ариллусах всегда доминируют ТАГ, а в семенах – *α*ЦДАГ, причём несмотря на пониженное по сравнению с семенами содержание сухой массы, ариллусы характеризовались большей, чем семена маслянистостью как в абсолютном (мг/г сухой массы), так и в относительном выражении (% от сухой массы). Доля ТАГ в семенах составила 4–5%, а в ариллусах – ~98% от суммы НАГ.

Поскольку до начала нашей работы было известно, что остаток ацетата в *α*ЦДАГ может быть связан с углеродным атомом либо в *sn*-1-, либо в *sn*-3-положении глицеринового остатка [Durrett et al, 2010], было необходимо выяснить какие из этих положений он может ацилировать. Методом двумерной ЯМР-спектроскопии нами впервые было доказано, что в семенах бересклетов остаток уксусной кислоты в молекуле *α*ЦДАГ этерифицирует исключительно *sn*-3-положение. Отсюда следует, что в семенах бересклетов **наряду** с обычной ДАГАТ, катализирующей синтез ТАГ из обычных ацил-КоА, содержится и ДАГАТ, **строго специфичная** как к ацетил-КоА в качестве субстрата, так и к *sn*-3-положению глицеринового остатка, **результатом действия** которой и является образование *α*ЦДАГ. В ходе нашего исследования было также показано, что при ЯМР-спектроскопии остаток уксусной кислоты при *sn*-3-положении влияет на химические сдвиги протонов при *sn*-1- и *sn*-3-углеродных атомах глицеринового остатка *α*ЦДАГ, что позволило исправить имевшееся

ранее в литературе некорректное представление о соотношении сигналов от этих протонов с их положением в молекуле *α*-ДАГ.

У 14 видов, относящихся к двум под родам и четырём секциям рода *Euonymus*, был охарактеризован качественный и количественный состав НАГ ариллугов и семян как зрелых, так и созревающих плодов бересклетов, а также изучен их ЖК-состав; для 11 видов состав НАГ определён впервые. В НАГ плодов было обнаружено (наряду с минорными ЖК) 14 видов ЖК, главными из которых всегда были линолевая, олеиновая и пальмитиновая кислоты. У всех изученных видов бересклетов ТАГ ариллугов, по сравнению с *α*-ДАГ семян, всегда отличались бóльшим разнообразием состава ЖК. Для ТАГ и *α*-ДАГ ариллугов была характерна достоверно более высокая концентрация пальмитиновой и олеиновой кислот, в то время как в ЖК-составе НАГ семян преобладала линолевая кислота. Помимо обычных ЖК в ТАГ ариллугов некоторых видов бересклетов были обнаружены в значительных количествах (до 7.8%) необычные ЖК, идентифицированные как  $\Delta$ 8-гексадеценовая и  $\Delta$ 10-октадеценовая кислоты; эти ЖК в растениях обнаружены впервые. Кроме того, с помощью метода кластерного UPGMA-анализа, а также с помощью кластеризации методом k-средних нами было показано, что ЖК-состав ТАГ ариллугов является хемотаксономическим признаком, характеризующим тот или вид бересклета на уровне подрода.

У трёх модельных видов, относящихся к секциям *Euonymus* (*E. europaeus*) и *Pseudoyuonymus* (*E. verrucosus*) подрода *Euonymus*, и к одноимённой секции подрода *Kalonymus* (*E. maximowiczianus*) было изучено формирование морфолого-анатомической структуры семян и ариллугов плода в ходе созревания. Изученные виды бересклетов значительно различаются по характеру роста и накопления НАГ в семенах и ариллугах. В ходе созревания плодов как в клетках эндосперма и семядолей, так и в клетках ариллугов у всех изученных бересклетов формируются мелкие олеосомы одинакового размера, а у *E. europaeus* и *E. maximowiczianus*, наряду с ними – также крупные олеосомы разной величины. Количество жировых включений в клетках ариллугов у всех изученных видов в ходе созревания увеличивается. В ходе созревания в семенах *α*-ДАГ синтезируются во много раз активнее, чем ТАГ, а в ариллугах, наоборот, образуются преимущественно ТАГ. При этом если при созревании плодов качественный состав главных ЖК в обоих классах НАГ почти не изменялся, то значения индекса ненасыщенности ЖК и в ТАГ, и в *α*-ДАГ, всегда снижались вследствие резкого падения уровня  $\alpha$ -линолената, уменьшения концентрации линолеата и соответствующего роста содержания олеата.

Помимо НАГ, в составе жирных масел ариллузов большинства исследованных бересклетов в небольшом количестве (0.03-0.05% от сырой массы) содержатся необычные компоненты – низшие алкиловые эфиры ЖК, представляющие собой смеси метиловых, этиловых, *изо*-пропиловых и *n*-бутиловых эфиров C<sub>14</sub>-C<sub>24</sub>-ЖК. Семена некоторых видов бересклетов также содержат НАЭЖК. Как и в ТАГ, в МЭЖК и ЭЭЖК обеих частей плода преобладают линолевая, олеиновая и пальмитиновая кислоты. Метиловые и этиловые эфиры ЖК могут образовываться за счёт того же пула ЖК, что и НАГ, в то время как *изо*-пропиловые и *n*-бутиловые эфиры ЖК по-видимому синтезируются за счёт иного, чем НАГ пула ЖК.

### ВЫВОДЫ

1. Исследованные представители рода *Euonymus* (за исключением *E. verrucosus*) накапливают жирные масла, как в семенах, так и во внесеменной части плода – ариллузах. Запасаемые в семенах и ариллузах масла, различаются не только ЖК-составом, но и соотношением между классами запасных НАГ: ТАГ и *ац*ДАГ. В ариллузах всегда доминируют ТАГ, а в семенах – *ац*ДАГ, причём ариллузы по абсолютному и относительному содержанию НАГ превосходят семена.
2. Методом двумерной ЯМР-спектроскопии высокого разрешения впервые достоверно установлено, что в *ац*ДАГ остаток уксусной кислоты ацилирует только *sn*-3-положение остатка глицерина. Это указывает на присутствие в семенах бересклетов наряду с обычной диацилглицерин-3-ацилтрансферазой (ДАГАТ), специфичной к обычным ацил-КоА и катализирующей синтез ТАГ, другой ДАГАТ, строго специфичной как к ацетил-КоА в качестве субстрата, так и к *sn*-3-положению глицеринового остатка.
3. Изученные виды бересклетов значительно различаются по характеру роста и накопления НАГ в семенах и ариллузах. В ходе созревания плодов как в клетках эндосперма и семядолей, так и в клетках ариллузов формируются мелкие олеосомы одинакового размера, а у *E. europaeus* и *E. taximowiczianus*, наряду с ними – также крупные олеосомы разной величины; в процессе созревания их количество в клетках возрастает.
4. В ходе созревания в семенах *ац*ДАГ синтезируются во много раз активнее, чем ТАГ, а в ариллузах, наоборот, образуются преимущественно ТАГ. При этом если при созревании плодов качественный состав главных ЖК в обоих классах НАГ почти не изменялся, то значения индекса ненасыщенности ЖК и в ТАГ, и в *ац*ДАГ, всегда снижались вследствие резкого падения уровня  $\alpha$ -линолената, уменьшения концентрации линолеата и соответствующего роста содержания олеата.



5. У всех изученных видов бересклетов ТАГ ариллусов, по сравнению с *ацДАГ* семян, всегда отличались большим разнообразием состава ЖК. Для ТАГ, и *ацДАГ* ариллусов было характерно достоверно более высокое относительное содержание пальмитиновой и олеиновой кислот, в то время как в ЖК-составе НАГ семян преобладала линолевая кислота. Помимо обычных ЖК в ТАГ ариллусов некоторых видов бересклетов были обнаружены необычные ЖК, идентифицированные как  $\Delta 8$ -гексадеценовая и  $\Delta 10$ -октадеценовая кислоты; эти ЖК в растениях обнаружены впервые.
6. Установлено, что особенности ЖК-состава ТАГ ариллусов являются хемотаксономическим признаком, характеризующим тот или иной вид бересклетов на уровне подрода. В частности, для видов, относящихся к подроду *Euonymus*, в ТАГ ариллусов характерен более высокий уровень линолевой кислоты по сравнению с олеиновой; для видов из подрода *Kalonymus* в ТАГ наблюдается обратное соотношение между этими ЖК. Обнаруженная особенность ЖК-состава ТАГ ариллусов видов, относящихся к разным подродам, наблюдается даже на самых ранних этапах развития плодов.
7. Помимо НАГ, в составе жирных масел ариллусов большинства исследованных бересклетов в небольшом количестве (0.03-0.05% от сырой массы) содержатся необычные компоненты – низшие алкиловые эфиры ЖК, представляющие собой смеси метиловых, этиловых, *изо*-пропиловых и *n*-бутиловых эфиров  $C_{14}$ - $C_{24}$ -ЖК. Семена некоторых видов бересклетов также содержат НАЭЖК. Как и в ТАГ, в МЭЖК и ЭЭЖК обеих частей плода преобладают линолевая, олеиновая и пальмитиновая кислоты. Метиловые и этиловые эфиры ЖК могут образовываться за счёт того же пула ЖК, что и НАГ, в то время как *изо*-пропиловые и *n*-бутиловые эфиры ЖК по-видимому синтезируются за счёт иного, чем НАГ пула ЖК.

### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Сидоров Р.А., Трусов Н.А., Цыдендамбаев В.Д (2011). Анатомическое строение семян и присемянников бересклета Максимовича (*Euonymus maximowiczianus*) и состав их жирных масел // В сб. Древесные растения: фундаментальные и прикладные исследования, М.: ООО «Астра-Полиграфия», 2011, Вып. 1, с. 108–114.
2. Сидоров Р.А., Трусов Н.А., Цыдендамбаев В.Д (2011). Бересклеты как перспективный источник сырья для биодизеля. // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их

- использования: Материалы IX международного симпозиума. Т. III. – М.: РУДН, с. 206–209.
3. Сидоров Р.А., Жуков А.В., Пчёлкин В.П., Цыдендамбаев В.Д., Верещагин А.Г. (2011) Позиционный состав триацилглицеринов из масла присемянников плодов двух видов бересклетов. // Тез. докладов VII съезда Общества физиологов растений России. Нижний Новгород, ч.2, с. 634.
  4. Сидоров Р.А., Трусов Н.А., Цыдендамбаев В.Д. (2011) Липидный состав масел присемянников и семян бересклета Максимовича (*Euonymus maximowiczianus*) // Тез. докладов VII съезда Общества физиологов растений России. Нижний Новгород, ч.2, с. 635.
  5. Сидоров Р.А., Жуков А.В., Верещагин А.Г., Цыдендамбаев В.Д. (2012). Низшие алкиловые эфиры жирных кислот из плодов бересклетов. *Физиология растений*, **59**: 362–368.
  6. Сидоров Р.А., Трусов Н.А. (2012). Строение присемянников и семян *Euonymus europaeus* L. (Celastraceae) и состав их жирных масел в ходе созревания плодов. XIX международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов — 2012», тезисы докладов. М: МАКС-пресс, с. 239–240.
  7. Sidorov R.A., Zhukov A.V., Pchelkin V.P., Vereshchagin A.G., Tsydendambaev V.D. (2013). Occurrence of fatty acid short-chain-alkyl esters in fruits of Celastraceae plants. *Chemistry and Biodiversity*, doi: 10.1002/cbdv.201200329
  8. Сидоров Р.А., Фоменков А.А. (2013). Особенности биосинтеза запасных триацилглицеринов и низших алкиловых эфиров жирных кислот клетками суспензионной культуры бересклета Максимовича. XX международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов — 2013», тезисы докладов. М: МАКС-пресс, с. 308–309.
  9. Фоменков А.А., Сидоров Р.А., Носов А.В. (2013) Суспензионная культура клеток *E. maximowiczianus* — новый объект в исследованиях биосинтеза низших алкиловых эфиров жирных кислот. Международная научно-практическая конференция «Клеточная биология и биотехнология растений», тезисы докладов. Минск: Издательский центр БГУ, с. 61.