

Метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии для таксономии мискантуса

Н.М. Слынько¹✉, Н.В. Бурмакина¹, О.М. Поцелуев¹, С.Ю. Капустянчик¹, Г.Ю. Галицын¹, Т.Н. Горячковская¹, Л.В. Куйбида², С.В. Шеховцов¹, С.Е. Пельтек¹, В.К. Шумный¹

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: nslynko@bionet.nsc.ru

Выделение новых видоопределяющих признаков актуально для систематики мискантуса и маркирования генотипов гибридов. Культивируемый в мире гибрид мискантуса *Miscanthus × giganteus* является аллополиплоидом, содержащим геномы *Miscanthus sacchariflorus* (в качестве материнского) и *M. sinensis*. В работе проведен хемотаксономический анализ образцов *M. sinensis* и *M. sacchariflorus*, собранных на Дальнем Востоке, и гибридных образцов как природного происхождения, так и полученных искусственно. В экстрактах 11 образцов мискантуса методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС) обнаружено 153 соединения, из которых 143 идентифицировано. Из этих соединений в соответствии с их химическим строением были выделены группы алканов (20 соединений), жирных кислот (34), фенолов (13), стеролов (18), токоферолов (8), нортерпеноидов (12) и фитолов (13) вместе с их производными. Основные компоненты экстрактов образцов мискантуса – жирные кислоты и их производные (общее содержание 19.94–41.02 %), с преобладанием пальмитиновой и линоленовых кислот, а также стеролы (особенно β-ситостерол, стигмастерол и α-амирин), на долю которых приходится 17.15–31.73 %. Значения «индекса нечетности» CPI для алкановых компонентов экстракционных смесей были в диапазоне 1.55–7.18, причем экстракты из листьев дальневосточных образцов характеризовались значениями нижней половины этого диапазона (1.55–2.74), тогда как экстракты из листьев гибридов – значениями верхней половины (5.78–7.18). Анализ экстракционных профилей методом главных компонент позволил выявить три отчетливо разделенных кластера, объединяющих образцы *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* и их гибридов, и уточнить таксономическое отнесение одного из гибридов. Хемотаксономическое отнесение в целом согласуется с результатами молекулярно-генетического анализа последовательности фрагмента пластидного генома мискантуса, который позволил также подтвердить видовую природу материнских растений, использованных для получения этих гибридов. Хемотаксономический анализ с использованием метода ГХ-МС может оказаться эффективным дополнительным инструментом в таксономическом отнесении различных морфологических форм мискантуса к *M. sinensis* или *M. sacchariflorus*, а также для хемотаксономической характеристики гибридов.

Ключевые слова: мискантус; листья; таксономия; ГХ-МС; метод главных компонент; пластидный геном.

Для цитирования: Слынько Н.М., Бурмакина Н.В., Поцелуев О.М., Капустянчик С.Ю., Галицын Г.Ю., Горячковская Т.Н., Куйбида Л.В., Шеховцов С.В., Пельтек С.Е., Шумный В.К. Метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии для таксономии мискантуса. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(8):1076-1081. DOI 10.18699/VJ19.583

Gas chromatography-mass spectrometry in the taxonomy of *Miscanthus*

N.M. Slynko¹✉, N.V. Burmakina¹, O.M. Potseluyev¹, S.Yu. Kapustyanchik¹, G.Yu. Galitsin¹, T.N. Goryachkovskaya¹, L.V. Kuybida², S.V. Shekhovtsov¹, S.E. Peltek¹, V.K. Shumny¹

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, SB RAS, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: nslynko@bionet.nsc.ru

Chemotaxonomy as a system approach deals with intra- and interspecific polymorphism of a group of taxa in order to clarify their taxonomic positions or to select material for selection or introduction. In this study we performed chemotaxonomic analysis of specimens of *Miscanthus sinensis* and *M. sacchariflorus* collected in the Russian Far East and of hybrid plants of both natural and artificial origin. We found 153 substances and identified 143 of them in extracts of eleven *Miscanthus* plants by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). These substances can be grouped into alkanes (20 compounds), fatty acids (34), phenols (13), sterols (18) tocopherols (8), norterpeneoids (12), and phytols (13), as well as their derivatives. The main components of the extracts of miscanthus samples are fatty acids and their derivatives (total content 19.94–41.02 %), dominated by palmitic and linolenic acids, and sterols (mainly β-sitosterol, stigmastanol, and α-amyirin), which constitute 17.15–31.73 %. The values of the CPI “oddness index” for the alkane components of the extracts were within 1.55–7.18, with extracts from leaves of the Far Eastern samples characterized by the lower half of this range (1.55–2.74), while extracts from leaves of hybrids fell to the upper half (5.78–7.18). Principal component analysis of extraction profiles allowed us to separate three distinct clusters: *M. sinensis*, *M. sacchariflorus*, and their

hybrids, as well as to verify the origin of one of the natural hybrids. The results of chemotaxonomic analysis mostly matched those of DNA sequencing of a fragment of the plastid genome, which, moreover, allowed us to identify the species nature of the maternal plants used to obtain these hybrids. Chemotaxonomic analysis using GC-MS was found to be an efficient additional technique to delimit various morphological forms of *M. sinensis*, *M. sacchariflorus*, and their hybrids.

Key words: *Miscanthus*; leaves; taxonomy; GC-MS; PCA; plastid genome.

For citation: Slynko N.M., Burmakina N.V., Potseluyev O.M., Kapustyanchik S.Yu., Galitsin G.Yu., Goryachkovskaya T.N., Kuybida L.V., Shekhovtsov S.V., Peltek S.E., Shumny V.K. Gas chromatography-mass spectrometry in the taxonomy of *Miscanthus*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(8): 1076-1081. DOI 10.18699/VJ19.583 (in Russian)

Введение

В хемотаксономии основной критерий разделения организмов – биохимическая характеристика вторичных метаболитов, пути синтеза которых складываются в ходе эволюционного развития. В качестве маркеров используют такие соединения, как сесквитерпеноиды (для тысячелистника) (Покровская и др., 2009), фитостероиды (для сем. гвоздичные (Caryophyllaceae Juss.)), (Дармограй и др., 2016), летучие терпеновые соединения при анализе подвидов облепихи *Hippophae rhamnoides* (Socaci et al., 2013), алкалоиды (для сем. Annonaceae) (Silva et al., 2016). Хемотаксономические маркеры представляют интерес для систематики близкородственных видов. Например, сесквитерпеновые соединения из эфирных масел оказались дополнительными хемотаксономическими критериями установления видового статуса различных полыней (Namzalov et al., 2019). Выделение новых видоопределяющих признаков актуально для родов и семейств растений, объединяющих большое количество видов.

Одним из таких растений является мискантус (веерник), широко используемый в ландшафтном дизайне. Все виды мискантуса – многолетние корневищные злаки. Высота стебля у некоторых видов достигает 7 м (Chen, Renvoize, 2006). В настоящее время в мире происходит увеличение площадей культивирования мискантуса и разрабатываются новые технологии на основе его биомассы. Промышленное значение имеют три таксона мискантуса: *Miscanthus sacchariflorus*, *M. sinensis* и *M. × giganteus*. *M. × giganteus* представляет собой стерильный гибрид *M. sinensis* × *M. sacchariflorus* (Hodkinson, Renvoize, 2001). На территории России в дикой природе распространены мискантус сахароцветный (*M. sacchariflorus*) и мискантус китайский (*M. sinensis*).

Культивируемый в Европе и Новой Зеландии гибрид *M. × giganteus* является триплоидным (Linde-Laursen, 1993) и морфологически по соцветию более похож на *M. sacchariflorus*, а по структуре ризом и корневища – на *M. sinensis*. У мискантуса сахароцветного нижняя цветковая чешуя с короткой прямой остью, волоски хохолка белые, иногда красноватые, корневища тонкие, ползучие. Мискантус китайский имеет укороченные толстые корневища. Колосковые чешуи несут длинные волоски. Волоски хохолка негустые, сильно оттопыренные, грязно-белые, но нередко бывают красноватые (Hodkinson et al., 2016).

В настоящей работе проведен хемотаксономический анализ образцов *M. sinensis* и *M. sacchariflorus*, собранных на Дальнем Востоке, и гибридных образцов как природного происхождения, так и полученных искусственно.

Материалы и методы

Образцы растений. Из коллекции, собранной во время экспедиции в Приморском крае, взяты образцы мискантуса *M. sinensis* и *M. sacchariflorus* и, предположительно, дикие гибриды (Hodkinson et al., 2016). Коллективом, реализующим проект GrassMargins, на основе *M. sinensis* и *M. sacchariflorus* получен межвидовой гибрид *M. × giganteus*.

Корни образцов, выкопанные во время экспедиционной поездки в Приморский край в сентябре 2014 г., в октябре того же года были высажены в гидропонную теплицу Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук. Листья мискантуса были срезаны 9 сентября 2018 г. и высушены на воздухе в течение трех дней до постоянного веса.

Данные по происхождению образцов мискантуса сведены в табл. 1. Образцы 07–11 получены в проекте European Framework Programme 7, grant number 289461 (GrassMargins). Природные образцы 01–06 были классифицированы по морфологическим признакам (см. табл. 1) (Hodkinson, et al., 2016).

Методы анализа. Определение экстрактивных веществ: 5.00 г воздушно-сухого материала экстрагировали 100 мл смеси этилацетат + хлороформ в объемном соотношении 1:2 в аппарате Сокслета, экстракт фильтровали через плотный стеклянный фильтр, промывали фильтр этилацетатом до общего объема 50 мл, добавляли 0.25 мл раствора стандартного вещества (5,6,7,8-тетрафторбензобаррелена) в этилацетате (1.00 мг/мл), отбирали 1 мл, отгоняли основную часть растворителя, остаток наносили на окись алюминия III ст. акт., смоченную этилацетатом, и элюировали этилацетатом до объема 5.0 мл. Элюент анализировали методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС).

Условия проведения анализа: хроматограф Agilent Technologies 6890 с масс-спектрофотометрическим детектором 5973; хроматографическая колонка – капиллярная DB-1 J&W с внутренним диаметром 0.25 мм и длиной 30 м; скорость газа-носителя (гелий) – 1.0 мл/мин; температура нагревателя ввода пробы 250 °С; температура термостата программировалась от 50 до 250 °С со скоростью 25 °С/мин; скорость ввода пробы 1.0 мл/мин. Ввод пробы (1 мкл) в хроматографическую колонку осуществляли без деления потока. Специфичность (селективность) определяли путем введения растворителя с целью подтвердить, что не было ложных пиков в течение целевого времени удерживания.

Хроматографический масс-спектрометрический анализ образцов для измерения полного ионного тока выпол-

Table 1. Specimens examined

Specimen	Species*	Sampling site	Parents
01	<i>Miscanthus sinensis</i>	N42.702491, E130.814686 Khasan raion, eastern outskirts of Kraskino Village, 50 m north of highway 189	
02	Natural hybrid	N42.612412, E130.722623 Khasan raion, south of Mayachnoye Village, 250 m east of highway 189	
03	<i>M. sacchariflorus</i>	N43.761063, E131.454047 Ussuri city district, 2.0 km north of Monakino Village	
04	<i>M. sacchariflorus</i>	N44.473862, E135.950393 Dalnegorskiy city district, west of the Ze Langou camping site, 100 m north of highway 181	
05	<i>M. sacchariflorus</i>	N44.401283, E131.774052 Pogranichnyy raion, south of Nesterovka Village, 300 m east of highway 183	
06	<i>M. sacchariflorus</i>	N44.669587, E131.667229 Khasan raion, north of Mayachnoye Village, 250 m east of highway 183	
07	<i>M. sinensis</i> × <i>M. sacchariflorus</i>		Ru-Msi (<i>M. sacchariflorus</i>) × D-M7GoFal (<i>M. sinensis</i>) ♀
08	<i>M. sinensis</i> × <i>M. sacchariflorus</i>		(<i>M. sacchariflorus</i>) × Ru-Msi 18 (<i>M. sinensis</i>) ♀
09	<i>M. sinensis</i> × <i>M. sacchariflorus</i>		Ru-Msi (<i>M. sacchariflorus</i>) ♀ × 18 (<i>M. sinensis</i>)
10	<i>M. sinensis</i> × <i>M. sacchariflorus</i>		Ru-Msi (<i>M. sacchariflorus</i>) × D-82 (<i>M. sinensis</i>) ♀
11	<i>M. sinensis</i> × <i>M. sacchariflorus</i>		Ru-Msi (<i>M. sacchariflorus</i>) ♀ × D-82 (<i>M. sinensis</i>)

Note. Specimens 01–06 were identified using morphological characters as described in (Hodkinson et al., 2016).

няли как в режиме сканирования в диапазоне масс 10–800 а. е. м., так и в режиме селективного сканирования ионов. Индексы удерживания RI определяли с использованием данных хроматографического анализа смеси гомологичных линейных алканов (C₈–C₃₂) и рассчитывали из времен выхода пиков по (Dool, Kratz, 1963). Площади пиков всех компонентов рассчитывали с помощью программы Xcalibur 2.0. Идентификацию компонентов проводили с использованием встроенной базы масс-спектров The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 2.0a, а также сравнением полученных значений RI со значениями из расширенного варианта той же базы (<https://webbook.nist.gov/chemistry/gc-ri/>).

Массовую долю определяемого компонента смеси (мкг/г экстракта) находили через соотношение площадей пиков стандартного и определяемого веществ. Принималось, что фактор отклика для каждого отдельного соединения одинаков для всех расчетов.

В сводке данных не учитывали хроматографические пики, принадлежащие веществам с очевидным антропогенным происхождением: 2,5-ди-трет-бутил-р-бензохинон (время удерживания RT 9.398 мин); 3-трет-бутил-4-гидроксианизол (RT 9.765 мин), н-додецилакрилат (RT = 10.396 мин), дибутилфталат (RT 11.517 мин), бис(2-этилгексил)фумарат (RT 13.044 мин), ди-(2-этилгексил)фталат (15.972 мин).

Многофакторный анализ был выполнен в программе Past 3, версия 3.25 (Hammer et al., 2001). ДНК мискантуса была экстрагирована из свежих либо сухих листьев мискантуса в соответствии с методикой, описанной в

статье (Shekhovtsov et al., 2012). Для амплификации пластидного гена tRNA-Leu(UAA) и фланкирующих последовательностей использовали праймеры Misc-Leu-Fw (5'-TGGAA-GCTGT-TCTAA-CGAAT-C-3') и Misc-Leu-Rv (5'-AATGG-GACTC-TCTCT-TTATC-CTC-3'). В состав реакции входили: 60 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1.5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0.1 % Тритон X-100, 0.7 mM праймеров, 1 ед. полимеразы TaqSE («СибЭнзим», Новосибирск). Реакцию ПЦР проводили со следующим профилем реакции: 3 мин при 94 °C; 35 циклов, включающих 15 с при 94 °C, 15 с при 54 °C и 25 с при 72 °C; финальный цикл синтеза – 5 мин при 72 °C. Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском центре секвенирования СО РАН.

Результаты

Согласно анализу ГХ-МС (рис. 1), в экстрактах 11 образцов мискантуса было обнаружено 152 соединения, из которых идентифицировано 143, представленных в Приложении¹. Из этих соединений в соответствии с их химическим строением были выделены группы алканов (20 соединений), жирных кислот (34), фенолов (13), стеролов (18), токоферолов (8), нортерпеноидов (12) и фитолов (13) вместе с их производными.

Содержание алканов в экстрактах из образцов листьев мискантуса было в диапазоне 2.40–18.55 %, причем максимальные значения были характерны для гибридов мискантуса. Среди алканов в экстрактах из листьев дальневосточных образцов наибольшее содержание наблюда-

¹ Приложение см. по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2019-23/appx24.pdf>

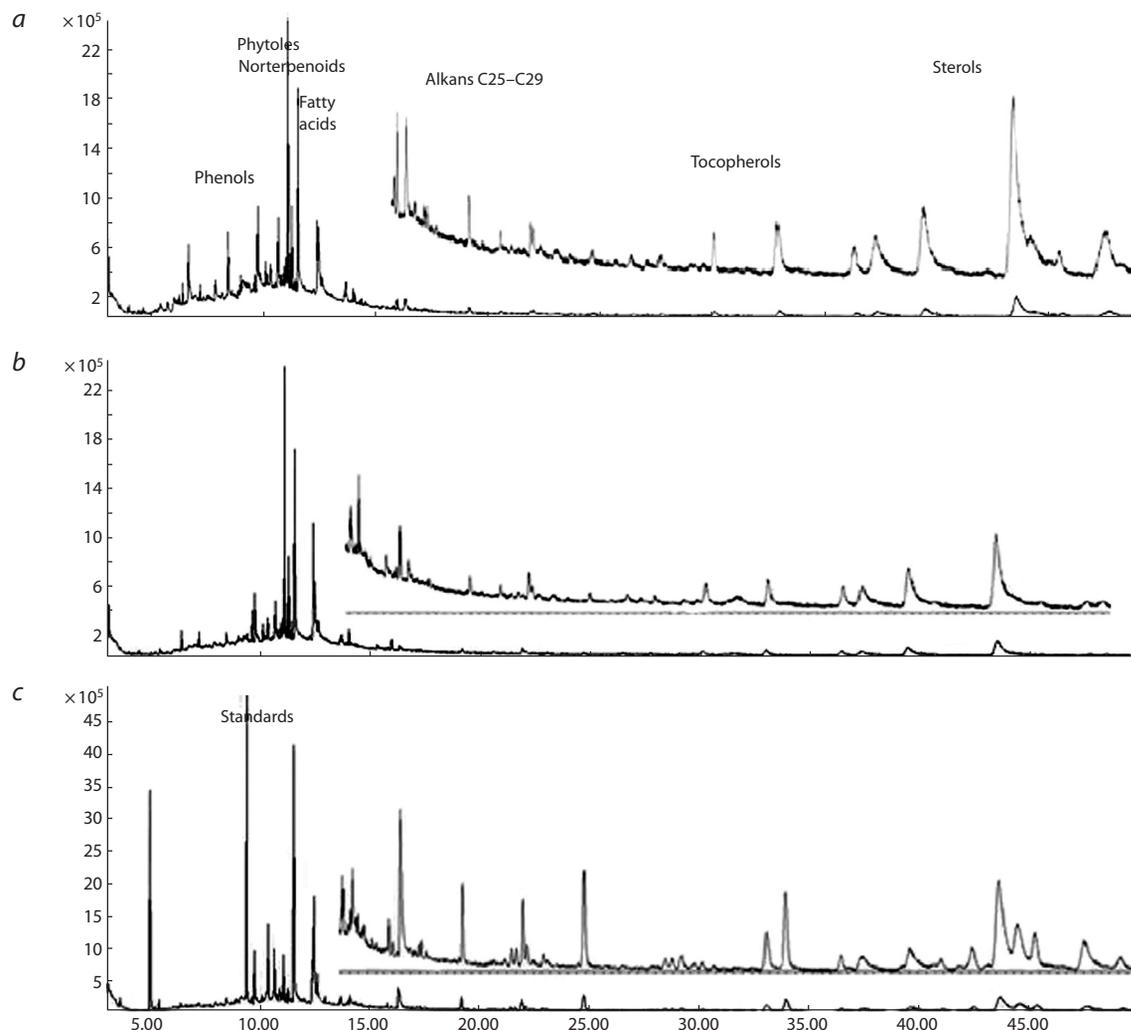


Fig. 1. Chromatograms of *Miscanthus* extracts: a – specimen 01, *M. sinensis*; b – specimen 04, *M. sacchariflorus*; c – specimen 09, *M. sinensis* × *M. sacchariflorus*.

лось у гептакозана (кроме образца 01), в то время как у гибридов лидером был нонакозан.

В группе жирных кислот и их производных ожидаемо доминировали кислоты с четным количеством атомов углерода и их эфиры. Пальмитиновая (C16:0) и линолевая (C16:2 ω 9,12) кислоты обладали наибольшим содержанием среди кислот, однако экстракты из листьев *M. sinensis* (образцы 01 и 02) содержали их в количестве 7.74–9.95 и 5.13–5.96 % соответственно, тогда как содержание этих кислот в остальных образцах было существенно выше: 11.20–15.49 %.

Фенолы же, напротив, имели максимальное содержание в образцах 01 и 02 – 11.78 и 16.20 % соответственно, тогда как их суммарное содержание в прочих образцах не превышало 7.54 %, а наименьшими концентрациями характеризовались гибриды (не более 4.19 %). Из фенолов наибольшие концентрации были зарегистрированы у 2-гидрокси-5-метилацетофенона, ранее обнаруженном только в табаке и кофе (Buckingham, 1996).

Сходное, но более сглаженное распределение характерно для фитостерольной фракции, в которой вполне ожидаемо преобладали β -ситостерол, стигмастерол и кампестерол (Winkler-Moser, 2012). Поверхностный ана-

лиз не выявляет каких-либо закономерностей в распределении этих соединений.

Представители группы нортерпеноидов, часто определяющих аромат растений, открыты в экстрактах из листьев мискантуса в относительно небольшом количестве, причем наибольшим содержанием отмечены образцы экстрактов из *M. sinensis* (3.54–5.54 %), а наименьшим – экстракты из листьев гибридов (0.75–1.24 %). Отнесение пиков изомеров мегастигматриен-3-она выполнено в соответствии с данными работы (Osorio et al., 2003).

Примерно одинаковым содержанием в экстрактах характеризуются пики токоферолов. Максимальная концентрация у витамина E: 1.99–2.59 %. Подобная картина у производных фитола, причем самые характеристические соединения в данной группе – это сам фитол (1.58–4.45 %) и продукт его дегидратации неофитатиен. Последний имеет выраженную область низких (1.09–2.30 % для экстрактов из листьев гибридов) и высоких (4.72–6.62 % для экстрактов из листьев *M. sacchariflorus*) значений. Из неклассифицированных соединений (см. Приложение, «Прочие») обращает на себя внимание наличие в экстрактах листьев дальневосточных видов мискантуса азотсодержащих продуктов взаимодействия алифатических

альдегидов C3 и C4 с алифатическими аминами. Подобные соединения в экстрактах из листьев гибридов не зарегистрированы.

Обсуждение

При изучении объектов растительного мира как в живой природе, так и в палеонтологических отложениях профиль содержания алкановых соединений может снабдить исследователя важной информацией. n-Алканы способствуют гидрофобным свойствам листового воска и служат частью первого барьера защиты растения от внешней среды, спасая листья от потери воды в результате испарения (Jetter et al., 2006). Растения производят ряд n-алканов обычно с сильным превалированием нечетного числа атомов углерода над четным и одной или двумя доминирующими длинами цепей (Eglinton, Hamilton, 1967). Так, постулировано, что преобладание в смеси алканов гентриаконтана C31 является характеристичным для трав, в то время как максимумы для C27 и C29 более свойственны деревьям и кустарникам (Yi Duan, Jinxian He, 2011). Применительно к нашему исследованию это положение выполняется для гибридных образцов мискантуса 07–11, в то время как в хроматограммах экстрактов из образцов *M. sacharoflorus* 04–06 превалирует нонакозан C29, а в образцах 01 и 02 поиски гентриаконтана не увенчались успехом.

Еще один характеристичный таксономический параметр – так называемый индекс нечетности (carbon preference index, CPI), представляющий собой отношение содержания нечетных гомологов n-алканов к четным. Как правило, в растениях содержание нечетных алканов, образующихся главным образом при метаболическом декарбоксилировании более распространенных жирных кислот с четным числом атомов углерода, естественным образом должно превалировать над содержанием алканов с четным числом атомов. Действительно, рассчитанные значения CPI для алкановых компонентов экстракционных смесей лежали в диапазоне 1.55–7.18, причем экстракты из листьев дальневосточных образцов характеризовались значениями нижней половины этого диапазона (1.55–2.74), тогда как экстракты из листьев гибридов – значениями верхней половины (5.78–7.18).

Было полезным сравнить наши результаты с данными, полученными в сходных исследованиях. Газ-хроматографический анализ экстрактов листьев *M. sinensis* впервые был выполнен G.V. Weißmann и W. Lange (1991). Хотя авторы не привели численных значений содержания алканов, они отметили, что в экстрактах превалировали пентакозан, гептакозан и наноккозан. В работе (Villaverde et al., 2009) при описании состава экстрактов из стеблей и влагалищных листьев *M. × giganteus* среди 63 идентифицированных соединений алканы не упоминаются вовсе.

Анализ методом главных компонент (PCA) был рассчитан путем нормализации 142 переменных на основе 142 идентифицированных веществ по евклидовым расстояниям и средней связи основных компонентов первого дерева (рис. 2). Совокупная дисперсия первых двух компонентов составляет 75.77 %. Этот анализ позволяет выявить три отчетливо разделенных кластера, объединяющих образцы *M. sinensis*, *M. sachariflorus* и их гибридов,

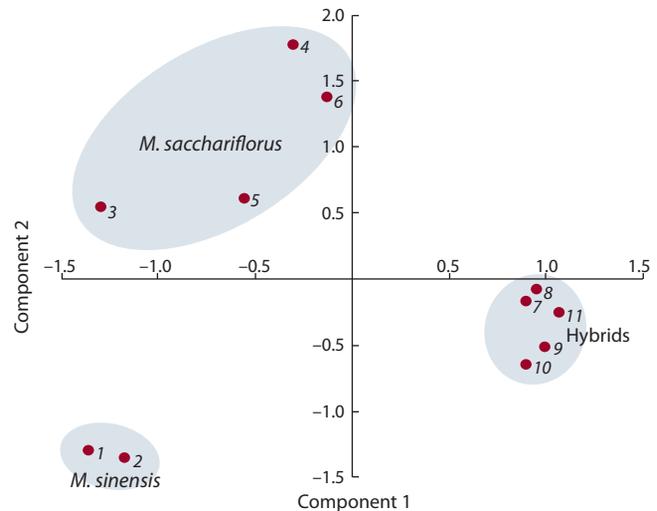


Fig. 2. Principal component analysis of extracts from 11 miscanthus specimens, based on PC1 and PC2 scores.

Table 2. Variable positions in the alignment of *Miscanthus* plastid sequences

Specimen	Position			Species
	109	227	232	
01	G	A	T	<i>M. sachariflorus</i>
03	G	A	T	»
04	G	A	T	»
05	G	A	T	»
06	G	A	T	»
07	T	A	A	<i>M. sinensis</i>
08	T	A	A	»
09	G	A	T	<i>M. sachariflorus</i>
10	T	C	A	Intermediate

причем бо́льшая площадь кластера, принадлежащего *M. sachariflorus*, объясняется большим расстоянием между точками сбора образцов и, соответственно, принадлежностью к разным популяциям и различными условиями их произрастания. Следует отметить, что ареалы распространения *M. sinensis* и *M. sachariflorus* пересекаются и, вполне естественно, может произойти межвидовая гибридизация. Однако образец 01, отнесенный по морфологическим признакам к гибриднему, по хемотаксономическим параметрам тесно кластеризуется вместе с *M. sinensis*, что дает основания предполагать их общую природу.

Представляло интерес сравнить результаты, полученные при использовании различных методов видоопределения. Молекулярно-генетические подходы считаются одними из наиболее надежных и достоверных. Мы получили последовательности фрагмента пластидного генома для девяти из одиннадцати исследованных образцов. Из табл. 2 следует, что два образца имеют гаплотип, типичный для *M. sinensis*, шесть – типичный для *M. sachariflorus* и один – редкий гаплотип, встречающийся у единичных образцов *M. sinensis*, а также *M. capensis*. При интерпретации результатов необходимо помнить, что ха-

рактар пластидных последовательностей гибридов указывает на видовую принадлежность материнского растения.

Интерпретация совокупности результатов не дает завершенной картины. Описанное в работе (Hodkinson et al., 2016) отнесение образцов 03–06 к *M. sacchariflorus* по морфологическим признакам, подтвержденное хемотаксономическим анализом; об этом же свидетельствуют результаты, полученные молекулярно-генетическим методом. Аналогично последним методом подтверждена видовая природа материнских растений, использованных для синтеза гибридов 07–09. В образце 10 видовое отнесение материнского растения к *M. sinensis* не выглядит однозначным. Отнесение образца 01 к *M. sinensis*, выполненное по хемотаксономическим признакам, результатами, полученными молекулярно-генетическим методом, не подтверждается. Для объяснения всех имеющихся противоречий, связанных с установлением видовой природы образца 01, можно предположить, что это растение является природным гибридом различных видов мискантуса, обладающим хемотаксономическим профилем, отличным от таковых у искусственных гибридов.

Заключение

Хемотаксономический анализ с использованием метода ГХ-МС в совокупности с данными, полученными другими методами, может оказаться эффективным дополнительным инструментом в таксономическом отнесении различных морфологических форм мискантуса к виду *M. sinensis* или *M. sacchariflorus*. Эти данные имеют также прикладное значение, поскольку виды *M. sacchariflorus* и *M. sinensis* используются для создания промышленных гибридов *Miscanthus* × *giganteus*. Изучение хемотаксономических характеристик гибридов позволит разработать «химические паспорта» технологически перспективных сортов мискантуса.

Список литературы / References

Дармограй С.В., Ерофеева Н.С., Филиппова А.С., Дармограй В.Н. Хемотаксономическое изучение некоторых видов рода ясколки (*Cerastium* L.) семейства гвоздичные (Caryophyllaceae Juss.). Усп. соврем. естествознания. 2016;7:32-36.
[Darmogray S.V., Erofeeva N.S., Filippova A.S., Darmogray V.N. Chemotaxonomical study of the *Cerastium* genus some plants of the Caryophyllaceae family. Uspekhi Sovremennogo Yestestvoznaniya = Advances in Current Natural Sciences. 2016;7:32-36. (in Russian)]

Покровская И.С., Мазова О.В., Апыхтин Н.Н., Племенков В.В. Хемотаксономия тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.). Химия раст. сырья. 2009;3:85-89.
[Pokrovskaya I.S., Mazova O.V., Apykhtin N.N., Plemenkov V.V. Chemotaxonomy yarrow (*Achillea millefolium* L.). Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya = Chemistry of Plant Raw Materials. 2009;3:85-89. (in Russian)]

Buckingham J. Dictionary of Organic Compounds. CRC Press, 1996; 8:3681.

Chen S.L., Renvoize S.A. *Miscanthus*. In: Wu Z.Y., Raven P.H., Hong D.Y. (Ed.). Flora of China. Beijing/St. Louis: Science Press/Missouri Botanical Garden Press, 2006;22:581-583.

Dool H.V.D., Kratz P.D., A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J. Chromatogr. A. 1963;11:463-471. DOI 10.1016/S0021-9673(01)80947-X.

Eglinton G., Hamilton R.J. Leaf epicuticular waxes. Science. 1967; 156:1322-1335.

Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica. 2001;4(1):1-9. 178kb. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.

Hodkinson T.R., Petrunenko E., Klaas M., Münnich C., Barth S., Shekhovtsov S.V., Peltek S.E. New breeding collections of *Miscanthus sinensis*, *M. sacchariflorus* and hybrids from Primorsky Krai, Far Eastern Russia. In: Perennial Biomass Crops for a Resource-Constrained World. Springer, 2016;105-118.

Hodkinson T.R., Renvoize S.A. Nomenclature of *Miscanthus* × *giganteus* (Poaceae). Kew Bull. 2001;56:759-760. DOI 10.2307/4117709.

Jetter R., Kunst L., Samuels A.L. Composition of plant cuticular waxes. In: Riederer M., Muller C. (Ed). Biology of the Plant Cuticle. Oxford: Blackwell Publ., 2006.

Linde-Laursen I.B. Cytogenetic analysis of *Miscanthus* 'Giganteus', an interspecific hybrid. Hereditas. 1993;119:297-300. DOI 10.1111/j.1601-5223.1993.00297.x.

Namzalov B.B., Zhigzhitzhapova S.V., Dubrovsky N.G., Sakhyeva A.B., Radnaeva L.D. Wormwoods of Buryatia: diversity analysis, ecological-geographical features, and chemotaxonomy of section Abrotanum. Acta Biologica Sibirica. 2019;5(3):178-187. DOI 10.14258/abs.v5.i3.6589.

Osorio C., Duque C., Batista-Viera F. Studies on aroma generation in lulo (*Solanum quitoense*): enzymatic hydrolysis of glycosides from leaves. Food Chem. 2003;81(3):333-340. DOI 10.1016/S0308-8146(02)00427-2.

Shekhovtsov S.V., Shekhovtsova I.N., Peltek S.E.. Phylogeny of Siberian species of *Carex* sect. *Vesicariae* based on nuclear and plastid markers. Nord. J. Bot. 2012;30(3):343-351. DOI 10.1111/j.1756-1051.2011.01405.x.

Silva F.M.A., Silva F.F.A., Lima B.R., Almeida R.A., Soares E.R., Koolen H.H.F., Souza A.D.L., Pinheiro M.L.B. Chemotaxonomy of the Amazonian *Unonopsis* species based on leaf alkaloid fingerprint direct infusion ESI-MS and chemometric analysis. J. Braz. Chem. Soc. 2016;27:599-604. DOI 10.5935/0103-5053.20150296.

Socaci S.A., Socaciu C., Tofană M., Rați I., Pinteaa A. In-tube extraction and GC-MS analysis of volatile components from wild and cultivated sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *Carpatica*) berry varieties and juice. Phytochem. Anal. 2013;24:319-328. DOI 10.1002/pca.2413. Epub 2013 Jan 15.

Villaverde J.J., Domingues R.M.A., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Pascoal Neto C., Ligerio P., Vega A. *Miscanthus* × *giganteus* extracts: a source of valuable phenolic compounds and sterols. J. Agric. Food Chem. 2009;57:3626-3631. DOI 10.1021/jf900071t.

Weißmann G.V., Lange W. Untersuchung der Extraktstoffe von *Miscanthus sinensis* Anderss. Holzforschung. 1991;45(4):285-289.

Winkler-Moser J. Gas Chromatographic Analysis of Plant Sterols. USDA, ARS, NCAUR, Functional Foods Research Unit, 2012. DOI 10.21748/lipidlibrary.40384.

Yi Duan, Jinxian He. Distribution and isotopic composition of n-alkanes from grass, reed and tree leaves along a latitudinal gradient in China. Geochem. J. 2011;45:199-207. DOI 10.2343/geochemj.1.0115.

ORCID ID

S.V. Shekhovtsov orcid.org/0000-0001-5604-5601
S.E. Peltek orcid.org/0000-0002-3524-0456

Acknowledgements. This work was supported by State Budgeted Project AAAA-A17-117092070032-4.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received November 15, 2019. Revised December 13, 2019. Accepted December 13, 2019.